

ساخت بسترهای پلاسمونیک به روش آسان چرخشی و به هدف آشکارسازی باکتری سالمونلا

خلاصه

وحید اسکندری^۱
نفیسه شریفی^۲

مقدمه: روش پراکندگی رامان ارتقاء یافته سطحی (SERS) یکی از روش‌های کارآمد برای شناسایی مقادیر اندک و حتی شناسایی تک مولکول است. با قرار گرفتن گونه‌های مختلف در نزدیکی سطح فلز و یا جذب فیزیکی گونه‌ها به نانوساختارهای فلزی، به علت برهم‌کنش گونه‌ها و پلاسمون‌های سطحی فلز، شدت سیگنال رامان افزایش می‌یابد. از طرفی باکتری سالمونلا در بسیاری از مواد غذایی یافت می‌شود و به راحتی می‌تواند رشد کند که شناسایی این باکتری در صنایع غذایی و کشاورزی مورد توجه است که برای شناسایی این باکتری می‌توان استفاده از تکنیک SERS را پیشنهاد کرد.

روش بررسی: در این پژوهش، نانوذرات نقره به روش شیمیایی و با استفاده از عامل کاهنده ساکاروز ساخته شدند، سپس با به کارگیری روش چرخشی و نشست نانوذرات نقره روی بسترهای شیشه‌ای، بسترهای پلاسمونیک ساخته شدند. با استفاده از بسترهای پلاسمونیک و طیف‌سنجی رامان که تکنیکی غیرمخرب است، آشکارسازی باکتری سالمونلا انجام شد.

یافته‌ها: با استفاده از آنالیزهای طیف‌سنجی فرابنفش-مرئی (UV-Vis)، میکروسکوپ الکترونی روبشی گسیل میدانی (FESEM) و میکروسکوپ نیروی اتمی (AFM)، مشخصه‌های بسترهای پلاسمونیک بررسی شدند و به عنوان حسگر زیستی پراکندگی رامان ارتقاء یافته سطحی (SERS) مورد استفاده قرار گرفتند. استفاده از بستر پلاسمونیک سبب می‌شود که به دلیل تشدید پلاسمون-های سطحی نانوذرات نقره و پراکندگی نور از جزایر نقره میکرومتری، ارتعاش‌های مولکولی باکتری سالمونلا تقویت شوند بنابراین شدت قله‌های ارتعاش‌های مولکولی طیف SERS باکتری سالمونلا نسبت به طیف رامان آن که از حاکایی باکتری روی بستر شیشه‌ای به دست می‌آید، قوی‌تر است. بسترهای پلاسمونیک معرفی شده می‌تواند به تشخیص کم‌هزینه و زود هنگام بیماری‌های ناشی از باکتری سالمونلا و پاتوژن‌های موجود در مواد غذایی کمک کند.

نتیجه‌گیری: از آنجایی که نقره به دلیل تشدید پلاسمون‌های سطحی و پراکندگی نور، سیگنال رامان حاصل از مولکول‌های مختلف را بهبود می‌دهد، بسترهای پلاسمونیک

۱. کارشناسی ارشد، پژوهشکده علوم و فناوری نانو، دانشگاه کاشان، کاشان، ایران
۲. استادیار، گروه لیزر و فوتونیک، دانشکده فیزیک، دانشگاه کاشان، کاشان، ایران

به‌عنوان بستر فعال در طیف‌سنجی ارتقاء‌یافته سطحی (SERS) برای آشکارسازی غلظت‌های مختلف باکتری سالمونلا به‌کار گرفته شدند. با استفاده از بسترهای پلاسمونیک که متشکل از نانوجزایر و جزایر میکرومتری نقره هستند می‌توان از اثر تشدید پلاسمون‌های سطحی و اثر پراکندگی نور به‌طور هم‌زمان استفاده کرد و سیگنال رامان باکتری سالمونلا را افزایش داد. با کاهش غلظت باکتری، سیگنال‌های SERS نیز کاهش می‌یابند. برخلاف رامان باکتری‌هایی که روی بستر غیرپلاسمونیک شیشه قرار دارند در بسترهای پلاسمونیک، با کاهش غلظت باکتری، شدت قله‌های ارتعاش‌های مولکولی سالمونلا هنوز هم از شدت قابل ملاحظه‌ای برخوردار است که نتیجهٔ تحریک ارتعاش‌های مولکولی به‌وسیلهٔ پلاسمون‌های سطحی و پراکندگی نور از بستر پلاسمونیک است و می‌توان باکتری سالمونلا تا غلظت 10^2 cfu mL^{-1} را شناسایی کرد هرچند این بسترهای پلاسمونیک توانایی شناسایی تک مولکول را ندارد که برای انجام این کار باید از سوزن میکروسکوپ نیروی اتمی استفاده کرد که هزینه‌ها را افزایش می‌دهد.

واژه‌های کلیدی: بسترهای پلاسمونیک، نانوذرات نقره، پراکندگی رامان ارتقاء‌یافته سطحی (SERS)، باکتری سالمونلا، ارتعاش‌های مولکولی

نویسنده‌مسئول: نفیسه شریفی تلفن: ۰۳۱۵۵۹۱۳۰۹۱
پست الکترونیک: sharifi@kashanu.ac.ir

مقدمه

سطحی نقره، شدت سیگنال رامان افزایش می‌یابد و بدین ترتیب SERS می‌تواند برای تشخیص سریع و دقیق گونه‌های میکروبیولوژیکی استفاده شود [۵ و ۶]. در این پژوهش، نانوذرات نقره با استفاده از روش سادهٔ چرخشی، بر روی بسترهای شیشه‌ای قرار گرفتند تا به‌عنوان بسترهای فعال در SERS برای تشخیص غلظت‌های مختلفی از باکتری سالمونلا به‌کار گرفته شوند. بدین ترتیب می‌توان با صرف هزینه‌های کمتر به تشخیص زودهنگام بیماری‌های ناشی از باکتری سالمونلا و پاتوژن‌های موجود در مواد غذایی دست بیابیم.

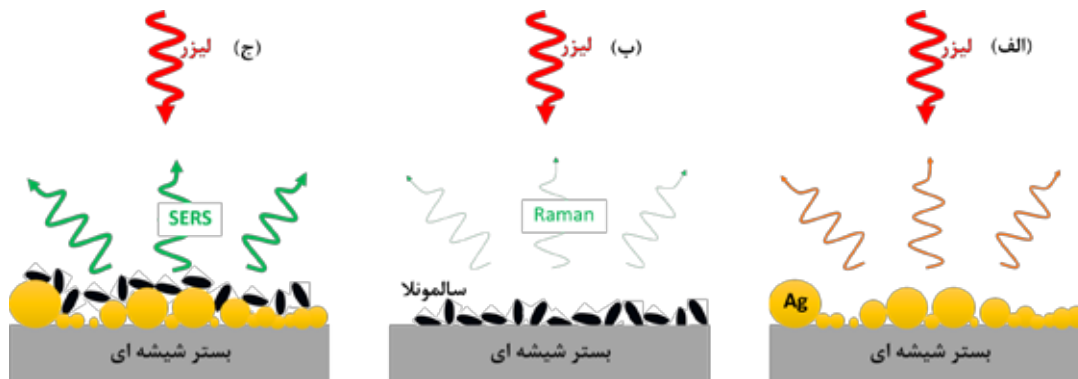
شکل ۱ طرح‌وارهٔ آشکارسازی باکتری سالمونلا را نشان می‌دهد که الف: بستر پلاسمونیک، ب: بستر شیشه‌ای حکاکی‌شده با باکتری سالمونلا و ج: بستر پلاسمونیک حکاکی‌شده با باکتری سالمونلا است که با تابش نور لیزر با طول موج ۷۸۵ نانومتر سیگنال نور رامان پراکنده‌شده اندازه‌گیری می‌شود.

روش‌های ساخت و شناسایی

روش ساخت بسترهای پلاسمونیک

لام‌های شیشه‌ای با ابعاد $2 \text{ cm} \times 2 \text{ cm}$ به‌عنوان بستر برش داده شدند و ابتدا با شوینده‌های آنیونی و آب و سپس با استون شستشو داده شدند و حین شستشو از امواج فراصوت نیز استفاده شد. سپس بسترها خشک و در نهایت در دمای 400°C به مدت ۳۰ دقیقه در کوره حرارت‌دهی شدند تا آلودگی‌های آلی نیز از سطح شیشه حذف شوند و سطح بسترها

باکتری سالمونلا در بسیاری از مواد غذایی یافت می‌شود و در شرایط محیطی نامناسب نیز نه‌تنها می‌تواند زنده بماند که به‌راحتی می‌تواند رشد کند. بنابراین کنترل باکتری سالمونلا در صنعت کشاورزی، غذا و صنایع فرآوری همواره مسئله‌ساز است و شناسایی و تشخیص مقادیر بسیار اندک آن مورد توجه قرار دارد. از طرفی شناسایی و تشخیص مواد میکروبیولوژیکی زمان‌بر و نیازمند هزینه‌های گزاف است و تشخیص سریع باکتری‌ها در مواد غذایی از اهداف حوزه‌های مرتبط با آن است که دستگاه‌های مختلفی از جمله طیف‌سنجی زیرقرمز و طیف‌سنجی رامان که هر دو طیف‌سنجی اثر انگشتی محسوب می‌شوند و با استفاده از ارتعاش‌های مولکولی ماده را بررسی می‌کنند برای تشخیص باکتری‌ها به‌کار گرفته می‌شوند. اما، از آنجایی که گونه‌های میکروبیولوژیکی مانند باکتری‌ها در محیط‌های آبی قرار دارند و به‌دلیل فعال بودن ارتعاش‌های مولکولی آب، اندازه‌گیری با طیف‌سنجی زیرقرمز مناسب گونه‌های موجود در محیط آبی نیست، طیف‌سنجی رامان گزینهٔ مناسبی برای تشخیص گونه‌های میکروبیولوژیکی است [۱] اما به‌دلیل ضعیف بودن ذاتی سیگنال حاصل از پراکندگی رامان، مطالعهٔ مولکول‌ها با غلظت‌های اندک عملاً امکان‌پذیر نیست [۲]. یکی از روش‌های کارآمد برای تشخیص و شناسایی مقادیر اندک و حتی شناسایی تک‌مولکول، روش پراکندگی رامان ارتقاء‌یافتهٔ سطحی (SERS) است [۳ و ۴]. در این روش هنگامی که گونه‌های مختلف مورد مطالعه در نزدیک سطح فلز قرار می‌گیرند یا به‌طور فیزیکی جذب نانوذرات فلزی می‌شوند، به‌علت برهم‌کنش گونه‌ها و پلاسمون‌های



شکل ۱: طرحواره آشکارسازی الف) سیگنال رامان بستر پلاسمونیک، ب) سیگنال رامان بستر شیشه‌ای حکاکی شده با باکتری سالمونلا و ج) سیگنال SERS بستر پلاسمونیک حکاکی شده با باکتری سالمونلا که بهبود سیگنال رامان باکتری سالمونلای حکاکی شده روی بستر پلاسمونیک را نسبت به حالتی که باکتری سالمونلا در معرض نور پراکنده شده از نانوذرات نقره قرار نگرفته است، نمایش می‌دهد.

آب‌دوست شوند. به‌منظور ساخت نانوذرات نقره با استفاده از هم‌زن مغناطیسی و با افزودن آمونیا به ۲۱ mL محلول ۰/۱ مولار نقره نیترات، کمپلکس آمونیاکی نقره ساخته شد. سپس با اضافه کردن ۲۰ mL محلول پتاس ۰/۰۵ مولار به‌صورت قطره قطره، رسوب نقره اکسید که به‌رنگ تیره است، تشکیل می‌شود. اضافه کردن آمونیا به‌صورت قطره قطره باعث حل شدن رسوب حاصل و شفاف شدن محلول می‌شود. بعد از اضافه کردن ۰/۱ mL محلول ساکاروز ۰/۰۷ مولار و استفاده از حمام گرمایی با دمای ۵۰°C به مدت ۴ دقیقه، کمپلکس نقره کاهیده می‌شود و نقره در داخل محلول تشکیل می‌شود [۷]. سپس برای پوشش‌دهی نقره روی لام‌های شیشه‌ای و ساخت بسترهای پلاسمونیک، ۱۰۰ mL محلول کلونیدی نقره روی لام‌های شیشه‌ای قرار داده شد و با استفاده از دستگاه چرخشی به مدت ۶۰ ثانیه با سرعت ۳۶۰۰ دور بر دقیقه لایه‌نشانی انجام شد که مدت‌زمان شتاب‌گیری ۱۲ ثانیه تنظیم شد.

ساخت بسترهای پلاسمونیک حکاکی شده با باکتری سالمونلا و ج) سیگنال SERS بستر شیشه‌ای

یافته‌ها و بحث

طیف جذب و تصویر FE-SEM بستر پلاسمونیک

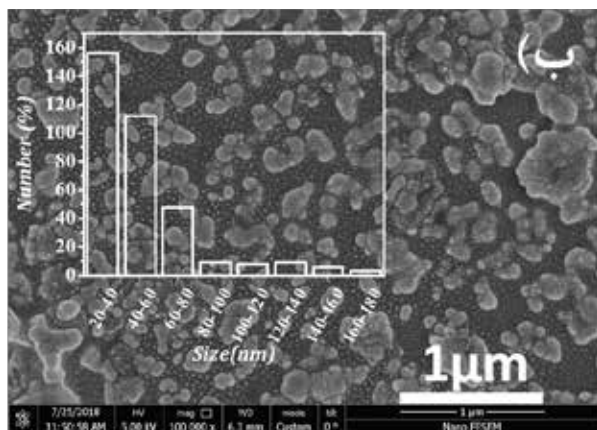
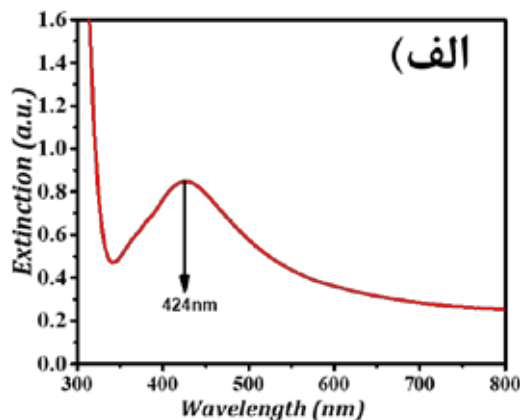
شکل ۲-الف طیف جذب بستر پلاسمونیک را نشان می‌دهد که مشاهده بیشینه جذب در طول موج ۴۲۴ نانومتر که قله پلاسمونی نقره است، تشکیل نانوذرات نقره را تأیید می‌کند. وجود تنها یک قله جذبی در طیف جذب نقره نیز نشان می‌دهد که نانوذرات کروی یا شبه کروی هستند. در شکل ۲-ب تصویر FE-SEM بستر پلاسمونیک مشاهده می‌شود که نقره به‌صورت جزایری روی سطح بستر شیشه قرار گرفته‌اند. اندازه جزایر کوچک‌تر که به‌صورت نقاطی روشن چه بر روی سطح تیره شیشه و چه بر روی ذرات بزرگ‌تر و کلوخه‌ای در تصویر دیده می‌شود، حدود ۱۰ نانومتر است. توزیع اندازه جزایر بزرگ‌تر در منحنی که بر روی تصویر قرار داده شده مشاهده می‌شود که اندازه بین ۲۰ تا ۱۸۰ دارند. در واقع، با کاهش کمپلکس نقره و تشکیل نانوذرات نقره، ذرات کروی یا شبه‌کروی ساخته می‌شوند که در مورد بسیاری از آن‌ها پدیده کلوخه شدن اتفاق افتاده است که به‌صورت جزایری بی‌شکل دیده می‌شوند. بنابراین با روش ساخت به‌کارگرفته‌شده، بستر پلاسمونیک هم شامل ذرات میکرونی و هم شامل نانوذرات است که ذرات بزرگ‌تر نقره منجر به پراکندگی نور (تقویت میدان الکتریکی دور) می‌شوند و ذرات کوچک‌تر، میدان‌های الکتریکی نزدیک قابل توجهی ایجاد می‌کنند که حاصل تشدید پلاسمون‌های سطحی است [۹ و ۸].

کشت و حکاکی باکتری سالمونلا روی بستر شیشه‌ای و بستر پلاسمونیک

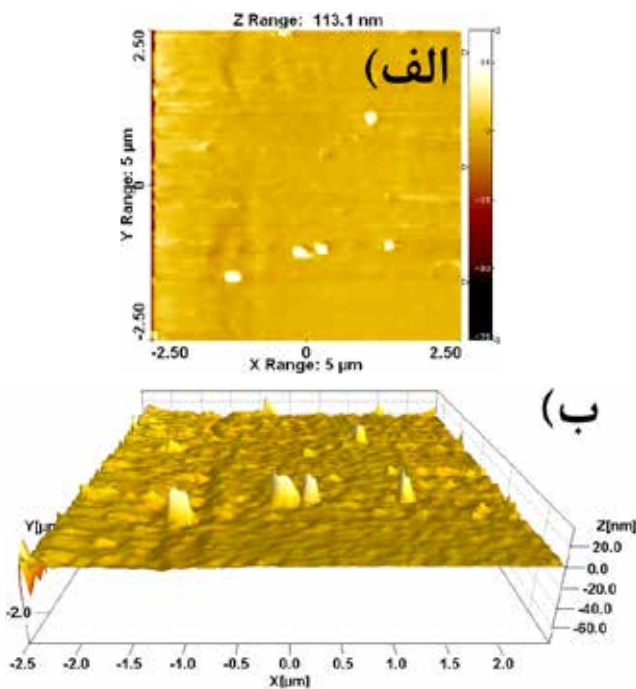
مقداری کلنی باکتری در محیط کشت سوی براث (SOY-BROTH) در دمای ۳۷°C به مدت ۱۸ ساعت در اتوکلاو (شرکت ریجان طب مدل RT-۲، ایران) قرار داده شد تا باکتری‌ها فعال شوند. پس از سانتریفیوژ به مدت ۱۰ دقیقه با سرعت ۱۵۰۰۰ دور بر دقیقه، مایع زردرنگ جدا شد که از لوله‌های سانتریفیوژ خارج شد و ۳ بار، هر بار با ۱۰ mL آب بدون یون این عمل تکرار شد و باکتری سالمونلا در غلظت‌های ۱۰^۳، ۱۰^۴، ۱۰^۵ و ۱۰^۶ cfu mL⁻¹ (colony-forming unit mL⁻¹) تهیه شد و از هر کدام ۱۰ mL روی بسترهای شیشه‌ای و بسترهای پلاسمونیک حکاکی شد و در دمای آزمایشگاه خشک شدند.

مشخصه‌یابی

طیف‌سنجی UV-Vis و تصویر میکروسکوپ الکترونی گسیل میدانی (FE-SEM) بستر پلاسمونیک به ترتیب به‌وسیله دستگاه



شکل ۲: الف) طیف جذب بستر پلاسمونیک با بیشینه جذب در طول موج ۴۲۴ نانومتر و ب) تصویر FE-SEM بستر پلاسمونیک و (داخل شکل) توزیع اندازه جزایر نقره روی بستر پلاسمونیک



شکل ۳: تصویر AFM الف) دوبعدی و ب) سه بعدی بستر پلاسمونیک

درواقع، با تابش نور (لیزر) به سطح ناصاف فلز، در اثر تشدید پلاسمون‌های سطحی نانو ساختارهای فلزی به وسیله میدان الکترومغناطیسی لیزر، میدان‌های الکتریکی ارتقاء یافته در اطراف فلز ایجاد می‌شود [۱۰ و ۱۱]. گویی میدان الکتریکی حاصل از تابش نور لیزر تقویت شده است. بنابراین مولکولی که در این میدان الکتریکی ارتقاء یافته قرار می‌گیرد، بیش‌تر قطبیده می‌شود و در نتیجه سیگنال رامان بهبود می‌یابد [۱۲].

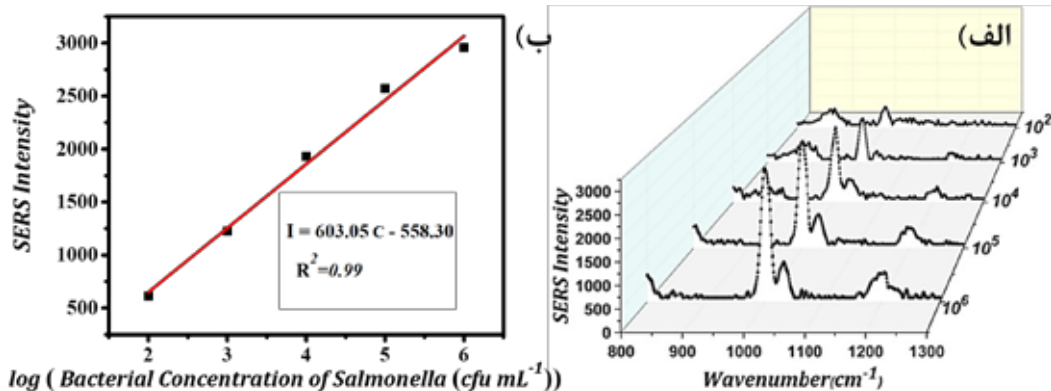
تصویر AFM بستر پلاسمونیک

شکل ۳ تصویر AFM الف: دوبعدی و ب: سه بعدی بستر پلاسمونیک را نشان می‌دهد. با استفاده از نرم‌افزار Image Plus میانگین زبری ۱۶/۹ نانومتر، میانگین مرتفع‌ترین زبری ۱۳۷/۸ نانومتر و میانگین عمیق‌ترین زبری ۲۴/۳ نانومتر برای بستر پلاسمونیک به دست آمد. همان‌طور که در تصویر FESEM شکل ۲-ب مشاهده می‌شود ساختارهای نقره در تمام سطح شیشه به‌طور کامل به یکدیگر متصل نشده‌اند و ساختار جزیره‌ای دارند. از طرفی اندازه ذرات یکسان نیست و توزیعی برای اندازه ذرات مشاهده می‌شود که این غیریکنواختی اندازه در ارتفاع نیز وجود دارد و در تصاویر AFM نیز مشاهده می‌شود. همان‌طور که گفته شد، این زبری و ناصافی نقره می‌تواند باعث تقویت سیگنال رامان شود.

طیف رامان و SERS و آشکارسازی باکتری سالمونلا

شکل ۴-الف طیف SERS باکتری سالمونلا با غلظت‌های ۱۰^۰، ۱۰^۱، ۱۰^۲، ۱۰^۳ و ۱۰^۴ cfu mL⁻¹ که روی بسترهای پلاسمونیک حکاکی شده‌اند را نشان می‌دهد. قله‌هایی که مشاهده می‌شود مربوط به ارتعاش‌های مولکولی باکتری سالمونلا است که در جدول ۱ مولکول‌های سازنده باکتری سالمونلا و ارتعاش‌های مولکولی و موقعیت آن‌ها مشاهده می‌شود. با کاهش غلظت باکتری، شدت قله‌های ارتعاش‌های مولکولی آن کاهش می‌یابد چون تعداد باکتری‌ها و در نتیجه تعداد سیگنال‌های ارتعاشی آن‌ها کاهش یافته است [۱ و ۲]. شکل ۴-ب تغییرات شدت قوی‌ترین سیگنال SERS مشاهده شده، I، که مربوط به فسفولپیدها در عدد موج ۹۹۸ cm⁻¹ است را بر حسب تغییرات لگاریتمی غلظت باکتری سالمونلا، C، نشان می‌دهد که با برازش انجام شده از رابطه (۱) پیروی می‌کند.

همان‌طور که در شکل ۴-الف مشاهده شد با کاهش غلظت باکتری تا غلظت ۱۰^۲ cfu mL⁻¹ حتی شدت قوی‌ترین قله SERS نیز کاهش می‌یابد. در شکل ۵ طیف رامان بستر پلاسمونیک طیف رامان بستر شیشه‌ای (غیر پلاسمونیک) حکاکی شده با باکتری و طیف SERS بستر پلاسمونیک حکاکی شده با سالمونلا مشاهده می‌شود. با تابش نور لیزر با طول موج ۷۸۵ نانومتر ارتعاش‌های مولکولی باکتری سالمونلا تحریک می‌شوند. همان‌طور که دیده می‌شود سیگنال SERS باکتری سالمونلا حکاکی شده روی بستر پلاسمونیک در مقایسه با سیگنال رامان باکتری حکاکی شده روی بستر شیشه‌ای بهبود یافته است که همان‌طور که در شکل



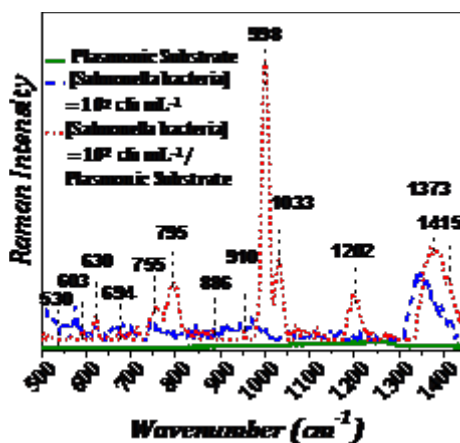
شکل ۴-الف) طیف SERS باکتری سالمونلا با غلظت‌های 10^2 ، 10^3 ، 10^4 ، 10^5 ، 10^6 cfu mL^{-1} که روی بستر پلاسمونیک حکاکی شده‌اند و ب) منحنی تغییرات شدت قوی‌ترین سیگنال SERS مربوط به فسفولیپیدها در عدد موج 998 cm^{-1} بر حسب تغییرات لگاریتمی غلظت باکتری سالمونلا، C

مختلف 10^2 ، 10^3 ، 10^4 ، 10^5 ، 10^6 cfu mL^{-1} از باکتری سالمونلا روی بستر پلاسمونیک حکاکی شد. استفاده از بستر پلاسمونیک سبب می‌شود که به دلیل تشدید پلاسمون‌های سطحی نانوجزایر نقره و پراکندگی بالای نور از جزایر نقره میکرومتری است [۱۶ و ۱۷]. که با تابش نور (لیزر) به سطح ناصاف فلز و تقویت میدان‌های الکتریکی دور و نزدیک سطح ناصاف، مولکول‌های سازنده باکتری سالمونلا که در این میدان الکتریکی ارتقاء یافته قرار گرفته‌اند، قطبیده‌تر می‌شوند و در نتیجه سیگنال رامان ارتعاش‌های آن‌ها تقویت می‌شود.

نتیجه‌گیری

در این پژوهش، آشکارسازی باکتری سالمونلا با استفاده از بسترهای پلاسمونیک که به روش ساده چرخشی ساخته شدند، با استفاده از طیف سنسجی رامان که تکنیکی غیرمخرب است بررسی شد. ابتدا، بسترهای پلاسمونیک فعال در SERS به روش شیمیایی ساخته شدند. غلظت‌های

جدول ۱: ارتعاش‌های مولکولی و موقعیت آن‌ها برای باکتری سالمونلا (۱۵-۱۳)



شکل ۵: طیف رامان بستر پلاسمونیک (منحنی ممتد سبز)، طیف رامان باکتری سالمونلا با غلظت 10^2 cfu mL^{-1} حکاکی شده روی بستر شیشه‌ای (منحنی خط چین آبی) و طیف SERS باکتری سالمونلا با غلظت 10^2 cfu mL^{-1} حکاکی شده روی بستر پلاسمونیک (منحنی نقطه چین قرمز)

موقعیت ارتعاش‌های مولکولی باکتری سالمونلا (cm^{-1})	ارتعاش‌های مولکولی باکتری سالمونلا
۵۳۰	کربوهیدرات‌ها (کششی)
۶۰۳	COO- (کششی)
۶۳۰-۶۹۴	COO- (خمشی)
۷۵۵-۷۹۵	C-N (کششی)
۸۸۶	تیروزین، C-N (کششی)
۹۱۰	فسفولیپیدها
۹۹۸	فسفولیپیدها
۱۰۳۳	CH ₂ OH و C-O (کششی)
۱۲۰۲	CH (لیپید) و آمید I، II (پروتئین)
۱۳۷۳	C-H (خمشی-پروتئین)
۱۴۱۵	کربوکسیلیک‌اسید (کششی) N-H CH ₂ (خمشی)

References:

1. Novais Â, Freitas AR, Rodrigues C, and Peixe L. Fourier transform infrared spectroscopy : unlocking fundamentals and prospects for bacterial strain typing. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*. 2018; 38: 427–48.
2. Duan N, Chang B, Zhang H, Wang Z and Wu S. Salmonella typhimurium detection using a surface-enhanced Raman scattering-based aptasensor. *Int. J. Food Microbiology*. 2016; 218: 38–43.
3. Wang C, Meloni MM, Wu X, Zhuo M, He T, Wang J and Dong P. Magnetic plasmonic particles for SERS-based bacteria sensing: A review. *AIP Advances*. 2019; 9: 010701.
4. Su SR, Chen YY, Li KY, Fang YC, Wang CH, Yang CY, Chau LK and Wang SC. Electrohydrodynamically enhanced drying droplets for concentration of Salmonella bacteria prior to their detections using antibody-functionalized SERS-reporter submicron beads. *Sensors and Actuators B: Chemical*. 2019; 283: 384–9.
5. Zhou H, Yang D, Ivleva NP, Mircescu NE, Niessner R, and Haisch C. SERS detection of bacteria in water by in situ coating with Ag nanoparticles. *Analytical Chemistry*. 2014; 86(3): 1525–33.
6. Mosier-Boss P. Review on SERS of bacteria. *Biosensors*. 2017; 7(4): 51.
7. Sharifi N and Taghavinia N. Silver nano-islands on glass fibers using heat segregation method. *Materials Chemistry and Physics*. 2009; 113: 63–6.
8. Wang LR and Fang Y. IR-SERS study and theoretical analogue on the adsorption behavior of pyridine carboxylic acid on silver nanoparticles. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*. 2006; 63: 614–8.
9. Canamares MV, Garcia-Ramos JV, Sanchez-Cortes S, Castillejo M and Oujja M. Comparative SERS effectiveness of silver nanoparticles prepared by different methods: A study of the enhancement factor and the interfacial properties. *Journal of Colloid and Interface Science*. 2008; 326: 103–9.
10. Ren B, Liu GK, Lian XB, Yang ZL and Tian ZQ. Raman spectroscopy on transition metals. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 2007; 388: 29–45.
11. Matricardi C, Hanske C, Garcia-Pomar JL, Langer J, Mihi A and Liz-Marzan LM. Gold nanoparticle plasmonic superlattices as surface-enhanced Raman spectroscopy substrates. *ACS Nano*. 2018; 12(8): 8531–9.
12. Lin KQ, Yi J, Hu S, Liu BJ, Liu JY, Wang X and Ren B. Size effect on SERS of gold nanorods demonstrated via single nanoparticle spectroscopy. *The Journal of Physical Chemistry C*. 2016; 120 (37): 20806–13.
13. Zeiri L and Efrima S. Surface-enhanced Raman spectroscopy of bacteria: the effect of excitation wavelength and chemical modification of the colloidal milieu. *Journal of Raman Spectroscopy*. 2005; 36: 667–75.
14. Sengupta A, Laucks ML and Davis EJ. Surface-enhanced Raman spectroscopy of bacteria and pollen. *Applied Spectroscopy*. 2005; 59:1016–23.
15. Zeiri L, Bronk BV, Shabtai Y, Eichler J and Efrima S. Surface-enhanced Raman spectroscopy as a tool for probing specific biochemical components in bacteria. *Applied Spectroscopy*. 2004; 58(1): 33–40.
16. Chen HY, Lin MH, Wang CY, Chang YM and Gwo S. Large-scale hot spot engineering for quantitative SERS at the single-molecule scale. *Journal of the American Chemical Society*. 2015; 137(42): 13698–705.
17. Granger JH, Schlotter NE, Crawford AC and Porter MD. Prospects for point-of-care pathogen diagnostics using surface-enhanced Raman scattering (SERS). *Chemical Society Reviews*. 2016; 45: 3865–82.