

حسگر پلاسمونیک برای شناسایی و تعیین غلظت باکتری بیماری‌زای اشریشیا کلی

خلاصه

مقدمه: روش طیف‌سنجی رامان بهبود 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 بر روی نانوساختارهای فلزی، به علت برهم‌کنش گونه‌ها و پلاسمون‌های سطحی نقره، شدت سیگنال رامان افزایش می‌یابد. باکتری اشریشیا کلی، در بسیاری از مواد غذایی یافت می‌شود و به راحتی می‌تواند رشد کند. بنابراین، کنترل باکتری اشریشیا کلی در صنایع غذایی و کشاورزی مورد توجه است که برای شناسایی این باکتری می‌توان استفاده از تکنیک SERS را که نسبت به سایر تکنیک‌هایی به کار گرفته می‌شوند؛ ساده و ارزان است؛ پیشنهاد کرد. از آنجایی که نانوساختارهای نقره به دلیل تشدید پلاسمون‌های سطحی و پراکندگی نور، سیگنال رامان حاصل از مولکول‌های مختلف را بهبود می‌دهد؛ در این تحقیق، بسترهای نقره‌اندود به هدف ساخت حسگر پلاسمونیک برای آشکارسازی غلظت‌های مختلف باکتری اشریشیا کلی ساخته و مطالعه شده است.

روش بررسی: در این مطالعه تجربی، به هدف ساخت حسگر پلاسمونیک، بسترهای نقره‌اندود به روش ساده شیمیایی ساخته شدند و با استفاده از بسترهای نقره‌اندود و طیف‌سنجی رامان که تکنیکی غیرمخرب است، آشکارسازی باکتری اشریشیا کلی انجام شد.

یافته‌ها: قله پلاسمونی حدود ۴۱۰ نانومتر تشکیل نانوذرات نقره را تایید کرد. براساس تصویر میکروسکوپ الکترونی گسیل میدانی (FESEM)، تعداد زیادی از ذرات بسترهای نقره‌اندود، اندازه بین ۱۴۰۰ تا ۱۵۰۰ نانومتر دارند. هرچند ذرات کوچکتر تا اندازه حدود ۱۰۰ نانومتر و ذرات بزرگتر تا اندازه حدود ۱۷۰۰ نیز در تصویر FESEM مشاهده می‌شود. زبری بسترهای نقره‌اندود که حاصل از یکنواخت نبودن پوشش نقره است منجر به پراکندگی نور از بستر نقره‌اندود می‌شود. تشدید پلاسمون‌های سطحی نانوذرات نقره و پراکندگی نور از ذرات نقره کلوخه شده بزرگتر، ارتعاش‌های مولکولی باکتری اشریشیا کلی را تقویت می‌کنند. با کالیبراسیون شدت ارتعاش‌های مولکولی برحسب غلظت باکتری، رابطه خطی به دست آمد که از روی آن می‌توان با اندازه‌گیری طیف SERS باکتری به غلظت آن پی برد.

نتیجه‌گیری: در طیف‌سنجی رامان به دلیل تشدید پلاسمون‌های سطحی نانوذرات نقره و پراکندگی نور از ذرات نقره بزرگتر سیگنال رامان حاصل از باکتری اشریشیا کلی بهبود می‌یابد. با کاهش غلظت باکتری، به دلیل کاهش تعداد ارتعاش‌های مولکولی سیگنال‌های SERS نیز تضعیف می‌شود که با استفاده از این بسترهای نقره‌اندود، شناسایی، آشکارسازی سریع و راحت باکتری اشریشیا کلی تا غلظت 10^2 cfu mL⁻¹ قابل انجام است. درضمن، با کالیبراسیون، استفاده از بسترهای نقره‌اندود و طیف‌سنجی رامان، می‌توان غلظت باکتری اشریشیا کلی را به دست آورد.

واژه‌های کلیدی: باکتری اشریشیا کلی، نانوذرات نقره، بسترهای نقره‌اندود، حسگر پلاسمونیک، طیف‌سنجی رامان.

وحید اسکندری^۱
نفیسه شریفی^{۲*}

۱. کارشناس ارشد، پژوهشکده علوم و فناوری نانو، دانشگاه کاشان ۸۷۳۱۷۵۳۱۵۳ کاشان، ایران
۲- استادیار، گروه فوتونیک و پلاسما، دانشکده فیزیک و پژوهشکده علوم و فناوری نانو، دانشگاه کاشان ۸۷۳۱۷۵۳۱۵۳ کاشان، ایران

نویسنده مسئول: نفیسه شریفی
پست الکترونیکی:

sharifi@kashanu.ac.ir

۰۳۱۵۵۹۱۳۲۲۰

شماره تماس:

مقدمه

باکتری اشریشیا کلی (*Escherichia coli*) در بسیاری از مواد غذایی یافت می‌شود و در شرایط محیطی نامناسب نیز نه تنها می‌تواند زنده بماند که به راحتی می‌تواند رشد کند. بنابراین کنترل باکتری اشریشیا کلی در صنعت کشاورزی، غذا و صنایع فرآوری همواره مسئله‌ساز است و شناسایی و تشخیص مقادیر بسیار اندک آن مورد توجه قرار دارد [۱، ۲]. در حال حاضر، برای تعیین مقدار باکتری اشریشیا کلی روش‌های متعددی مانند PCR [1]، ELISA [1]، کروماتوگرافی گازی^۳ و اسپکترومتری جرم^۴ [۳-۴]، کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا [HPLC (۵°)] و طیف‌سنجی تبدیل فوریه رامان (FT-Raman^۵) [۶، ۷، ۸] به کار برده می‌شود. این روش‌ها، روش‌هایی مخرب، دشوار، آلاینده، درون آزمایشگاهی، و نیازمند آماده‌سازی نمونه، نیروی متخصص آموزش دیده، آزمایشگاه‌های مجهز و صرف وقت و هزینه بسیار هستند. از این رو، توسعه یک روش غیرمخرب، با کاربری ساده، سریع، کم‌هزینه، ناآلاینده، با قابلیت حمل و کاربرد خارج از محیط آزمایشگاه و آماده‌سازی سریع‌تر نمونه بسیار ضروری است. از طرفی شناسایی و تشخیص مقادیر بسیار اندک از باکتری اشریشیا کلی نیز مورد توجه است. با استفاده از طیف‌سنجی زیرقرمز و طیف‌سنجی رامان که هر دو طیف‌سنجی اثر انگشتی محسوب می‌شوند و ارتعاش‌های مولکولی ماده را بررسی می‌کنند؛ می‌توان مواد و آنالیت‌های بیولوژیکی را شناسایی کرد [۹، ۱۰]. در طیف‌سنجی زیرقرمز به دلیل فعال بودن ارتعاش‌های مولکولی آب، شناسایی باکتری اشریشیا کلی دشوار است و حساسیت آشکارسازهای آن نیز پایین است. در طیف‌سنجی رامان نیز به دلیل ضعیف بودن ذاتی سیگنال حاصل از پراکندگی رامان، مطالعه مولکول‌ها با غلظت‌های اندک، عملاً امکان‌پذیر نیست [۱۱]. یکی از روش‌هایی

که می‌توان سیگنال رامان را بهبود داد استفاده از نانوساختارهای فلزی است که به دلیل تشدید پلاسمون‌های سطحی می‌توانند میدان الکتریکی قوی را در نزدیک نانوساختارها ایجاد کنند یا با افزایش میزان پراکندگی نور از این نانوساختارها، سیگنال پراکندگی را به طور موثر بهبود می‌دهند که به دنبال آن ارتعاش‌های مولکولی با سیگنال بهتر و بیشتری مشاهده خواهند شد. این روش طیف‌سنجی رامان بهبود یافته سطحی (SERS^۷) نام دارد که یک روش حساس و انتخابی است که نتیجه آن بهبود پراکندگی رامان مولکول‌هایی است که بر روی ساختارهای فلزی جذب سطحی شده‌اند [۱۲]. در واقع با تابش نور (لیزر) به سطح ناصاف فلزی، در اثر تشدید پلاسمون‌های سطحی نانوساختارهای فلزی به وسیله میدان الکترومغناطیسی لیزر، میدان‌های الکتریکی بهبودیافته در اطراف فلز ایجاد می‌شود [۱۳، ۱۴]، گویی میدان الکتریکی حاصل از تابش نور لیزر تقویت شده است. بنابراین، مولکولی که در این میدان الکتریکی بهبودیافته قرار می‌گیرد؛ بیشتر قطبیده می‌شود و در نتیجه سیگنال رامان آن بهبود می‌یابد [۱۵]. در این روش، هنگامی که آنالیت‌های بیولوژیکی مورد مطالعه در نزدیک سطح فلز قرار می‌گیرند یا به طور فیزیکی جذب نانوذرات فلزی می‌شوند، به علت برهم‌کنش آنالیت‌های بیولوژیکی و پلاسمون‌های سطحی فلز، شدت سیگنال رامان افزایش می‌یابد و بدین ترتیب SERS می‌تواند برای تشخیص سریع و دقیق آنالیت‌های بیولوژیکی استفاده شود. در این مطالعه به هدف طراحی و ساخت حسگر ساده با سرعت تشخیص بالا، حساسیت، گزینش‌پذیری، تکرارپذیری و عدم نیاز به تجهیزات پیچیده، ابتدا نانوذرات نقره با عامل کاهنده ساکاروز، با استفاده از روش ساده شیمیایی، بر روی زیرلایه‌های شیشه‌ای پوشش داده شدند تا بسترهای نقره‌اندود برای تشخیص و تعیین غیرمخرب باکتری اشریشیا کلی در غلظت‌های مختلف استفاده شود.

¹ Polymerase Chain Reaction

² Enzyme Linked Immunosorbent Assay

³ Gas Chromatography

⁴ Mass Spectroscopy

⁵ High-performance Liquid Chromatography

⁶ Fourier Transform Raman Methods (FT-Raman)

⁷ Surface-Enhanced Raman Spectroscopy

روش بررسی

مواد و روش‌ها

۱- روش‌های ساخت و شناسایی

۱-۱- روش ساخت بسترهای نقره‌اندود

ابتدا قطعات شیشه‌ای با ابعاد $1\text{cm} \times 2/5\text{cm}$ پس از شستشو با شوینده و آب، با استون شستشو داده شدند که همزمان از امواج فراصوت نیز برای تمیز کردن آنها استفاده شد. پس از خشک شدن این قطعات شیشه‌ای، در دمای 400°C به مدت ۳۰ دقیقه در کوره حرارت دهی داده شدند تا آلودگی‌های آلی نیز از سطح شیشه حذف شوند و سطح آنها آب‌دوست شوند. در ادامه به منظور ساخت نانوذرات نقره، از روش شیمیایی تولنز استفاده شد که در روش تولنز از سه محلول آبی شامل (۱) ۱۲ میلی‌لیتر محلول نقره نیترات ۰/۱ مولار، (۲) ۲۰ میلی‌لیتر محلول پتاس ۰/۰۵ مولار و (۳) ۱۰ میلی‌لیتر محلول ساکاروز ۰/۰۷ مولار استفاده می‌شود [۱۶]، با افزودن محلول ساکاروز بر روی محلول آمونیاکی نقره نیترات و پتاس با دمای 50°C درجه سانتی‌گراد حاوی زیرلایه‌های شیشه‌ای در داخل ظرف حاوی محلول نانوذرات نقره، پس از گذشت حدود ۴ دقیقه، شیشه‌های نقره اندود شده داریم که در دمای آزمایشگاه خشک شدند و به‌عنوان بسترهای نقره‌اندود برای تشخیص و تعیین غلظت باکتری اشیریشیاکلی استفاده شدند.

۱-۲- کشت و قرار دادن باکتری اشیریشیاکلی روی زیرلایه

شیشه‌ای و بستر نقره‌اندود

بعد از کشت باکتری اشیریشیا، جهت فعال‌سازی باکتری اشیریشیا کلی ابتدا پودر نوترینت آگار (شرکت مرک آلمان) با آب بدون یون (DI) مخلوط شده و در دمای 120°C به مدت ۲۰ دقیقه در اتوکلاو (شرکت ریخان طب مدل RT-۲) قرار داده شد تا باکتری‌ها فعال شوند. در ادامه مقداری کلنی باکتری در محیط کشت لیوفیلیزه در محیط TSB در دمای 37°C به مدت ۲۴ ساعت در اتوکلاو (شرکت ریخان طب مدل RT-۲) قرار داده شد تا باکتری‌ها رشد کنند. سپس با گلیسرین استریل مخلوط و در لوله‌های اپندرف استریل در در

دمای 20°C نگهداری شدند. از کشت مادر، کشت ذخیره تهیه شده و در مراحل بعدی از کشت ذخیره باکتری اشیریشیا کلی در غلظت‌های 10^2 ، 10^3 ، 10^4 ، 10^5 و 10^6 cfu mL⁻¹ (colony-forming unit mL⁻¹) روی زیرلایه‌های شیشه‌ای و بسترهای نقره‌اندود لایه‌نشانی شد و در دمای آزمایشگاه خشک شدند و در ادامه طیف رامان باکتری اشیریشیا کلی، لایه‌نشانی شده روی زیرلایه‌های شیشه‌ای و طیف SERS باکتری اشیریشیا کلی، لایه‌نشانی شده روی بسترهای نقره‌اندود اندازه‌گیری شدند.

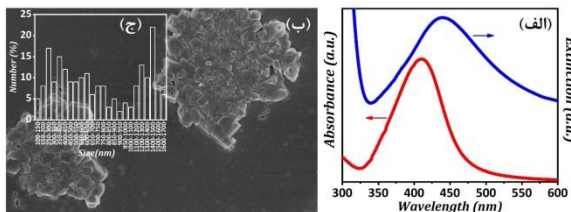
۱-۳- مشخصه‌یابی

طیف‌سنجی UV-Vis محلول کلونیدی نقره و بستر نقره‌اندود به‌وسیله دستگاه Perkin-Elmer مدل Lambda25 در دمای اتاق انجام شد. تصاویر میکروسکوپ الکترونی گسیل میدانی (FESEM) به‌وسیله دستگاه Hitachi مدل S4160 و تصویر میکروسکوپ نیروی اتمی (AFM) نمونه‌ها نیز با استفاده از دستگاه شرکت نانو سیستم پارس ساخت ایران بررسی شد. دستگاه طیف‌سنجی رامان دستگاه رامان Metrohm Raman مدل MIRA ساخت شرکت متروم با تابش نور لیزر Nd:YAG، با طول موج ۷۸۵ نانومتر و توان خروجی قابل تنظیم ۷۵ میلی‌وات برای اندازه‌گیری طیف رامان و طیف SERS نمونه‌ها استفاده شد.

نتایج و بحث

۱- طیف جذب محلول کلونیدی نقره؛ طیف خاموشی و تصویر SEM بسترهای نقره‌اندود

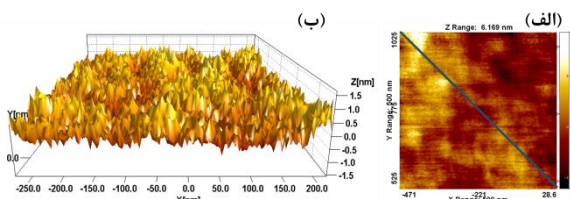
شکل ۱-الف (منحنی قرمز)، طیف جذب نانوذرات نقره ساخته شده به روش شیمیایی تولنز با عامل کاهنده ساکاروز را نشان می‌دهد. ظاهر شدن قله تشدید پلاسمونی در 410 نانومتر تشکیل نانوذرات نقره را تایید می‌کند [۱۷]، مشاهده یک قله جذبی در طیف‌های جذبی نانوذراتی مانند نقره بیانگر شکل کروی یا شبه‌کروی نانوذرات است [۱۸]. شکل ۱-الف (منحنی آبی) طیف خاموشی بستر نقره‌اندود را نشان می‌دهد. همان‌طور که مشاهده می‌شود با نشانیدن نانوذرات نقره بر روی زیرلایه شیشه‌ای، قله تشدید پلاسمونی در 439 نانومتر ظاهر می‌شود



شکل ۱: (الف)، (منحنی قرمز) طیف جذب کلئید حاوی نانوذرات نقره که به روش شیمیایی تولنز ساخته شده است و با بیشینه جذب در طول موج ۴۱۰ نانومتر؛ (منحنی آبی) طیف خاموشی بستر نقره‌اندود با بیشینه خاموشی در طول موج ۴۳۹ نانومتر و (ب) تصویر FE-SEM بستر نقره‌اندود که (ج) توزیع اندازه ساختارهای نقره روی این بستر را نشان می‌دهد که اندازه‌های بین ۱۰۰ تا ۱۷۰۰ نانومتر دارند.

۲- تصاویر AFM بسترهای نقره‌اندود

شکل ۲- تصاویر AFM (الف) دو بعدی و (ب) سه بعدی بسترهای نقره‌اندود را نشان می‌دهد. با استفاده از نرم‌افزار Image Plus (نسخه ۲/۹) میانگین زبری ۵۸/۶ نانومتر، میانگین مرتفع‌ترین زبری ۲۵۷/۵ نانومتر و میانگین عمیق‌ترین زبری ۱۴۷/۳ به دست آمد. زبری سطحی بسترهای نقره‌اندود می‌تواند مراکز برای پراکندگی نور باشند و باعث تقویت سیگنال رامان شوند [۲۲].



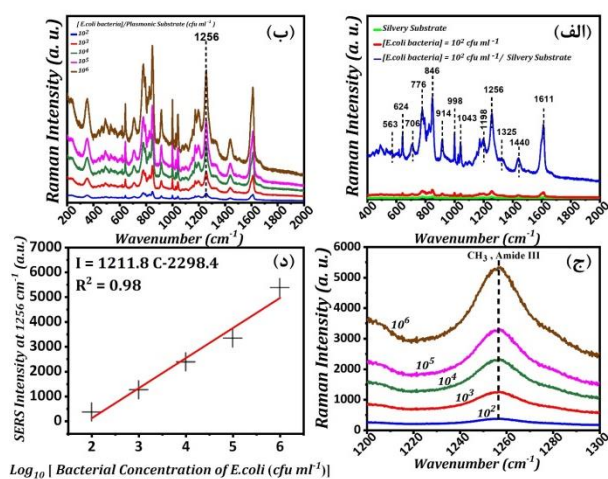
شکل ۲: تصاویر AFM، تصویر (الف) دو بعدی و (ب) سه بعدی بسترهای نقره‌اندود.

۳- طیف رامان و آشکارسازی باکتری اشریشیا کلی

در شکل ۳، منحنی سبز، طیف رامان بستر نقره‌اندود، منحنی قرمز، طیف رامان باکتری با غلظت 1 cfu ml^{-1} قرار داده شده بر روی زیرلایه شیشه‌ای و منحنی آبی، طیف SERS مربوط به غلظت 1 cfu ml^{-1} باکتری اشریشیا کلی قرار داده شده بر روی بستر نقره‌اندود را نشان می‌دهد. همان‌طور که مشاهده می‌شود چنانچه باکتری اشریشیا کلی بر روی زیرلایه شیشه‌ای قرار داده شود، ارتعاشات مولکولی باکتری اشریشیا کلی با شدت ضعیفی مشاهده می‌شود. بنابراین عملاً شناسایی این‌گونه حتی با غلظت 1 cfu ml^{-1} و با استفاده از

که نشان کلوخه‌شدن ذرات روی زیرلایه شیشه‌ای و تشکیل ذرات بزرگتر است. قله پلاسمونی به ضریب شکست محیط دربردارنده آنها وابسته است [۱۹]؛ پس با تغییر محیط در بردارنده نانوذرات نقره از آب به روی شیشه و داخل هوا؛ جابه‌جایی در طول موج قله پلاسمونی رخ می‌دهد و ارتفاع آن کاهش و پهنای قله نیز افزایش می‌یابد که به معنای افزایش توزیع اندازه ذرات است. برخلاف محلول کلئیدی پایدار که نانوذرات در داخل محلول آبی پراکنده هستند و به فاصله‌های مشخصی از یکدیگر قرار دارند؛ با قرار گرفتن نانوذرات نقره روی زیرلایه‌های شیشه‌ای، حین خشک‌شدن، ذرات در مجاورت یکدیگر قرار می‌گیرند و کلوخه‌هایی متشکل از چندین نانوذره روی زیرلایه‌ها شکل می‌گیرد به‌گونه‌ای که می‌توان این کلوخه‌ها را ذرات بزرگتری در نظر گرفت که منجر به افزایش پهنای طیف می‌شود [۱۹]، کاهش شدت قله نیز ناشی از پراکندگی نور از ذرات کلوخه شده است [۱۹]. زمینه طیف خاموشی (طیف جذب + طیف پراکندگی) بسترهای نقره‌اندود، در مقایسه با طیف جذب محلول کلئیدی در مقادیر بالاتری رخ داده است که ناشی از بازتاب و پراکندگی نور از سطح شیشه است. در شکل ۱- ب، تصویر FE-SEM بستر نقره‌اندود و شکل ۱- ج توزیع اندازه ساختارهای نقره مشاهده می‌شود. پوشش نقره ایجاد شده بر روی زیرلایه‌های شیشه‌ای به صورت یکپارچه و یکنواخت نیست و مجموعه‌ای از ذرات کروی یا شبه‌کروی در بخش‌های مختلف مشاهده می‌شود. ذرات نقره مشاهده شده در شکل ۱- ب، اندازه‌های بین ۱۰۰ تا ۱۷۰۰ نانومتر دارند و تعداد زیادی از ذرات با اندازه ۱۴۰۰ تا ۱۵۰۰ نانومتر مشاهده می‌شود. نانوذرات کوچکتر، میدان‌های الکتریکی نزدیک قابل توجهی در اطراف خود ایجاد می‌کنند که حاصل تشدید پلاسمون‌های سطحی نقره است و چنانچه گونه‌های زیستی در میدان‌های الکتریکی قوی قرار بگیرند؛ قطبیده‌تر می‌شوند و اثر پراکندگی رامان آنها بهبود می‌یابد. ذرات بزرگتر، میدان‌های الکتریکی نزدیک ناچیزی دارند و نور تابیده شده به آنها، از سطح آنها پراکنده می‌شود یا میدان الکتریکی دور را تقویت می‌کنند [۲۱-۲۰].

نشان داده شده است که با برازش انجام شده از رابطه $I = 1211.8 C$ (R2=0.98) 2298.4 پیروی می کند. رابطه به دست آمده خطی است و ضریب رگرسیون (R2) آن برابر با ۰/۹۸ است. از آنجاکه هدف از ساخت حسگر پلاسمونیک، آشکارسازی غلظت های بسیار پایین از نمونه های بیولوژیکی و محیطی است، خطی بودن منحنی کالیبراسیون غلظت های پایین از اهمیت بیشتری برخوردار است که در این مطالعه، چنین رابطه خطی به دست آمد و می توان با استفاده از این نمودار با مشاهده شدت قله ارتعاش های مولکولی کششی H-C-H و Amide III در عدد موج 1256 cm^{-1} در طیف رامان، غلظت باکتری اشریشیا کلی را به دست آورد.



شکل ۳: (الف) طیف رامان بستر نقره اندود (منحنی سبز)، طیف رامان باکتری اشریشیا کلی با غلظت 10^2 cfu ml^{-1} قرار داده شده بر روی زیرلایه شیشه ای (منحنی قرمز) و طیف SERS باکتری اشریشیا کلی با غلظت 10^2 cfu ml^{-1} قرار داده شده بر روی بستر نقره اندود (منحنی آبی). (ب) طیف SERS باکتری اشریشیا کلی با غلظت های 10^2 cfu ml^{-1} (منحنی صورتی)، 10^3 ، 10^4 ، 10^5 و 10^6 cfu ml^{-1} (منحنی سبز) قرار داده شده بر روی بستر نقره اندود. (ج) غلظت های ارتعاش های مولکولی کششی H-C-H و Amide III در عدد موج 1256 cm^{-1} برای غلظت های (منحنی آبی) 10^2 cfu ml^{-1} ، (منحنی قرمز) 10^3 ، (منحنی سبز) 10^4 ، (منحنی صورتی) 10^5 و (منحنی قهوه ای) 10^6 از باکتری اشریشیا کلی قرار داده شده بر روی بستر نقره اندود است که فقط در بازه $1300\text{--}1200\text{ cm}^{-1}$ نمایش داده شده است. (د) تغییرات شدت I، برای قوی ترین سیگنال SERS مربوط به ارتعاش های مولکولی کششی H-C-H و Amide III در عدد موج 1256 cm^{-1} بر حسب تغییرات لگاریتمی غلظت باکتری اشریشیا کلی، C که برگرفته از شکل (ج) است.

طیف سنجی رامان امکان پذیر نیست. با قرار دادن باکتری اشریشیا کلی با غلظت 10^2 cfu ml^{-1} بر روی بسترهای نقره اندود، ارتعاشات مولکولی باکتری اشریشیا کلی (شکل ۳-الف) ظاهر می شوند. ارتعاشات مولکولی باکتری اشریشیا کلی به صورت خط چین هایی بر روی طیف های مولکولی باکتری اشریشیا کلی در شکل ۳-الف نمایش داده شده است. ارتعاشات کربوهیدرات ها، ارتعاشات کششی COO-، پروتئین، تیروزین، کششی C-N، کششی C-N، کششی Amide III، کششی C-N، کششی H-C-H و Amide III، کششی H-N-H، خمشی H-C-H و لیپیدها، کششی C-N و Amide II و کششی N-H به ترتیب در 1611 ، 1440 ، 1325 ، 1256 ، 1043 ، 998 ، 914 ، 846 ، 776 ، 624 ، 563 و 1704 cm^{-1} ظاهر می شوند [۲۳].

بنابراین، استفاده از نانوذرات نقره در ساخت بستر نقره اندود منجر به بهبود ارتعاشات مولکولی باکتری اشریشیا کلی در حسگر پلاسمونیک معرفی شده می شود. شکل ۳-ب، طیف های SERS باکتری اشریشیا کلی با غلظت های 10^2 ، 10^3 ، 10^4 ، 10^5 و 10^6 cfu ml^{-1} قرار داده شده بر روی بستر نقره اندود را نشان می دهد. با کاهش غلظت باکتری اشریشیا کلی، شدت قله های ارتعاش های مولکولی آن کاهش می یابد که به دلیل کاهش تعداد باکتری اشریشیا کلی و در نتیجه کاهش تعداد ارتعاش های مولکولی آن است به گونه ای که در غلظت های کمتر از 10^2 cfu ml^{-1} ، ارتعاش های کششی H-C-H و Amide III، به راحتی قابل مشاهده نیستند. بنابراین بستر نقره اندود معرفی شده می تواند تا غلظت 10^2 cfu ml^{-1} از باکتری اشریشیا کلی را شناسایی کند.

ارتعاش های مولکولی کششی H-C-H و Amide III در عدد موج 1256 cm^{-1} برای غلظت های مختلف در محدوده $10^2\text{--}10^6\text{ cfu ml}^{-1}$ در شکل ۳-ج نمایش داده شده است. منحنی کالیبراسیون که منحنی تغییرات شدت سیگنال SERS مربوط به ارتعاش های مولکولی کششی H-C-H و Amide III بر حسب تغییرات لگاریتمی غلظت باکتری اشریشیا کلی، C، است در شکل ۳-د

نتیجه‌گیری

به‌منظور شناسایی و کنترل بیماری‌های متعدد ناشی از باکتری اشیریشیا کلی، تشخیص این باکتری دارای اهمیت است. روش طیف‌سنجی رامان روشی غیرمخرب برای شناسایی مولکول‌ها است اما به دلیل ضعیف‌بودن سیگنال رامان، عملاً شناسایی غلظت‌های اندک از مولکول‌ها امکان‌پذیر نیست. با قرار دادن باکتری اشیریشیا کلی، در معرض تشدید پلاسمون‌های سطحی نانوذرات فلزی مانند نقره و همچنین نور پراکنده‌شده از ذرات بزرگ فلزی، می‌توان سیگنال رامان را بهبود داد. بنابراین، ابتدا نانوذرات نقره با استفاده از روش شیمیایی که روشی ساده، سریع و ارزان است از کاهش شیمیایی نمک نقره ساخته شدند و در ادامه نانوذرات نقره بر روی زیرلایه‌های شیشه‌ای لایه‌نشانی شدند و بسترهای نقره‌اندود جهت آشکارسازی باکتری اشیریشیا کلی استفاده شدند. با کاهش غلظت باکتری اشیریشیا کلی، سیگنال رامان آن نیز کاهش می‌یابد که بسترهای نقره‌اندود معرفی‌شده قادر به شناسایی باکتری اشیریشیا کلی،

تا غلظت 1-10² cfu ml هستند. بهبود سیگنال رامان باکتری اشیریشیا کلی، ناشی از تشدید پلاسمون‌های سطحی نانوذرات نقره است که با دریافت نور لیزر فرودی، نور را در منطقه کوچکی در اطراف خود متمرکز می‌کنند و با قرارگیری باکتری اشیریشیا کلی، در این مناطق و در نتیجه به دلیل دریافت میدان الکتریکی قوی‌تر، و یا رسیدن نور حاصل از پراکندگی از نقاط زبر بستر نقره‌اندود، مولکول‌های سازنده باکتری اشیریشیا کلی، قطبیده‌تر می‌شوند و در نتیجه ارتعاش‌های مولکولی با شدت قوی‌تری ظاهر می‌شوند. در صورت ظاهر شدن ارتعاش‌های مولکولی کششی H-C-H و Amide III، با استفاده از رابطه خطی که از کالیبراسیون غلظت باکتری اشیریشیا کلی باشد این ارتعاش مولکولی به‌دست آمده است؛ می‌توان غلظت باکتری اشیریشیا کلی را تعیین کرد. از مزایای بستر نقره‌اندود معرفی‌شده، استفاده آسان و توانایی تشخیص سریع غلظت‌های اندک است که برای ساخت آن نیز هزینه‌چندانی صرف نمی‌شود.

References:

- 1- Pamela A, Mosier B. Review on SERS of Bacteria. *Biosensors*. 2017; 7(4): 51-77.
- 2- Cowcher DP, XU Y, Goodacre R. Portable, Quantitative Detection of Bacillus Bacterial Spores Using Surface-Enhanced Raman Scattering. *American Chemical Society (ACS)*. 2013; 85(6): 3297-3302.
3. Patsias J, Papadopoulou-Mourkidou EJ. Rapid method for the analysis of a variety of chemical classes of pesticides in surface and ground waters by off-line solid-phase extraction and gas chromatography-ion trap mass spectrometry. *Journal of Chromatography*. 1998; 740: 83-98.
4. Goncalves C, Alpendurada MF. Solid-phase micro-extraction-gas chromatography-(tandem) mass spectrometry as a tool for pesticide residue analysis in water samples at high sensitivity and selectivity with confirmation capabilities. *Journal of Chromatography*. 2004; 1020: 239-50.
5. Papadopoulou-Mourkidou E, Patsias JJ. Development of asemi-automated high-performance liquid chromatographic-diode array detection system for screening pesticides at trace levels in aquatic systems of the Axios River basin. *Journal of Chromatography*. 1996; 726: 99-113.
6. Skoulika SG, Georgiou CA .Univariate and Multivariate Calibration for the Quantitative Determination of Methyl-parathion in Pesticide Formulations by FT-Raman Spectroscopy. *Applied Spectroscopy*. 2000; 54: 747-52.
7. Sato-Berru RY, Medina-Valtierra J, Medina Gutierrez C, Frausto-Reyes C. Quantitative NIR-Raman analysis of methyl-parathion pesticide microdroplets on aluminum substrates. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*. 2004; 60: 2231-4.
8. Alak-Ala M, Vo-Dinh T. Surface-enhanced Raman spectrometry of organo phosphorus chemical agents. *ACS Publication Analytical Chemistry*. 1987; 59: 2149-53.
9. Ivanov AN, Evtuygin GA, Brainina KZ, Budnikov GK, Stenina LE. Cholinesterase Sensors Based on Thick-Film Graphite Electrodes for the Flow-Injection Determination of Organophosphorus Pesticides. *Journal of Analytical Chemistry*. 2002; 57: 1042-8.
10. Alizadeh T. High Selective Parathion Voltammetric Sensor Development by Using an Acrylic Based Molecularly Imprinted Polymer-Carbon Paste Electrode. *Electroanalysis*. 2009; 21: 1490-8.
11. Duan N, Chang B, Zhang H, Wang Z, Wu S. Salmonella typhimurium detection using a surface-enhanced Raman scattering-based aptasensor. *International Journal Food Microbiology*. 2016; 218: 38-43.
12. Wang LR, 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.
13. Ren B, Liu GK, Lian XB, Yang ZL, Tian ZQ. Raman spectroscopy on transition metals. *Analytical and bioanalytical chemistry*. 2007; 388: 29-45.
14. Matricardi C, Hanske C, Garcia-Pomar JL, Langer J, Mihi A, Liz-Marzan LM. Gold Nanoparticle Plasmonic Superlattices as Surface-Enhanced Raman Spectroscopy Substrates. *ACS Nano*. 2018; vol. 12: 8531-9.
15. Lin KQ, Yi J, Hu S, Liu BJ, Liu JY, Wang X, Ren B. Size effect on SERS of gold nanorods demonstrated via single nanoparticle spectroscopy. *The Journal of Physical Chemistry C*. 2016; 120: 20806-3.

16. Sharifi N, Taghavinia N. Silver nano-islands on glass fibers using heat segregation method. *Materials.Chemistry.and.Physics*.2009;113:63-6.
17. Ngumbi PK, Mugo SW, Ngaruiya JM. Determination of Gold Nanoparticles Sizes via Surface Plasmon Resonance. *IOSR Journal of Applied Chemistry (IOSR-JAC)*. 2018; 11: 25-9.
18. Tarik Baytekin H , Baytekin B, Huda S, Yavuz Z, Grzybowski BA. Mechanochemical Activation and Patterning of an Adhesive Surface toward Nanoparticle Deposition. *Journal of the American Chemical Society*. 2015; 137: 1726-9.
19. Bohren CF, Huffman DR. Absorption and Scattering of Light by Small Particles. Wiley. New York. 1983; 306: 625.
20. Wang LR, 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.
21. Canameres MV, Garcia-Ramos JV, Sanchez-Cortes S, Castillejo M, 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.
22. Tarik Baytekin H, Baytekin B, Huda S, Yavuz Z, Grzybowski BA. Mechanochemical Activation and Patterning of an Adhesive Surface toward Nanoparticle Deposition. *Journal of the American Chemical Society*. 2015; 137: 1726-9.
23. Zhou H, Yang D, Lvleva N, Mircescu N, Niessner R, Haisch Ch. SERS Detection of Bacteria in Water by in Situ Coating with Ag Nanoparticles. *American Chemical Society Analytical Chemistry*. 2014; 86 (3): 1525-33.