

杨泽帆, 陈颖欣, 黄晓桐, 袁勇, 周丽华. 表面增强拉曼散射光谱新型基底及其在环境微生物分析中的应用研究进展[J]. 应用与环境生物学报, 2022, 28 (3): 796-804

Yang ZF, Chen YX, Huang XT, Yuan Y, Zhou LH. Progress of new substrates of surface-enhanced Raman scattering spectroscopy and its application in the analysis of environmental microorganisms [J]. *Chin J Appl Environ Biol*, 2022, 28 (3): 796-804

表面增强拉曼散射光谱新型基底及其在环境微生物分析中的应用研究进展

杨泽帆¹ 陈颖欣¹ 黄晓桐¹ 袁勇² 周丽华¹✉

¹广东工业大学生物医药学院 广州 510006

²广东工业大学环境科学与工程学院 广州 510006

摘要 表面增强拉曼散射 (Surface Enhanced Raman Scattering, SERS) 光谱作为一种新型的快速分析技术, 在灵敏度、分辨率、重现性等方面的进一步提高及应用领域的不断扩大, 主要取决于该技术的核心组成部分基底的发展, 新型基底研究一直是该技术领域的热点之一。从基底组成类型出发, 围绕SERS增强机理 (电磁增强与化学增强), 综述近几年零维 (0D) 纳米胶体与颗粒、一维 (1D) 纳米棒、二维 (2D) 平面载体与三维 (3D) 立体载体作为新型基底材料的研究进展, 对典型材料的结构特性、拉曼增强机理、优缺点、性能优化方法及应用等进行分析和对比; 介绍SERS及相关联用技术在环境微生物分析中的应用进展。SERS通过材料维度的增加及形状的改变而增加基底的稳定性, 改善其检测“热点”的均匀度, 提高获得的谱图重现性; SERS通过基底材料的功能化修饰进一步提高其检测的特异性; SERS通过与微流控、稳定同位素标记、机器学习等联用提高其对复杂样品的检测能力, 从而使其在环境微生物的鉴别、分类、监测等方面发挥着不可替代的作用。由于环境微生物种类繁多, 个体组成与取样环境复杂, 非目标物质干扰较多, 环境微生物SERS谱图目前仍在一定程度上存在重现性差、分辨率低等问题, SERS对微生物的定性准确度有待提高, 定量分析有待突破。另外, SERS在环境微生物群感效应研究及微生物膜动态分析应用相对较少。构建具有高特异性识别能力和高密度“热点”的新型基底, 并联用高效分离纯化技术、原位杂交技术、化学计量学及人工智能等技术, 将进一步激发SERS在环境微生物分析中的应用潜力。 (图2 表1 参80)

关键词 表面增强拉曼散射; 新型基底; 电磁增强; 化学增强; 环境微生物

Progress of new substrates of surface-enhanced Raman scattering spectroscopy and its application in the analysis of environmental microorganisms

YANG Zefan¹, CHEN Yingxin¹, HUANG Xiaotong¹, YUAN Yong² & ZHOU Lihua¹✉

¹ School of Biomedical and Pharmaceutical Sciences, Guangdong University of Technology, Guangzhou 510006, China

² School of Environmental Science and Engineering, Guangdong University of Technology, Guangzhou 510006, China

Abstract Surface-enhanced Raman scattering (SERS) is a new rapid analysis technique. The improvement in sensitivity, resolution, and reproducibility, and the expanding application fields of SERS spectroscopy mainly depend on the development of the substrates, which are a key part of the technique. Research on novel SERS substrates is a popular topic. Considering the types of substrate compositions, and a focus on the SERS enhancement mechanisms (electromagnetic enhancement and chemical enhancement), we reviewed the research progress in recent years of zero-dimensional (0D) nanocolloids and particles, one-dimensional (1D) nanorods, two-dimensional (2D) planar carriers, and three-dimensional (3D) carriers as new SERS substrates. The structural characteristics, Raman enhancement mechanism, advantages and disadvantages, performance optimization method, and applications of typical SERS substrates were analyzed and compared, and the application progress of SERS in the analysis of environmental microorganisms was summarized. The stability of the SERS substrates, the “hot spots” uniformity of SERS detection, and the reproducibility of spectra could be increased by a change in the dimension and shape of the substrate material. The specificity of SERS detection could be further improved with the functional modification of the substrate material. Combining SERS with microfluidic control, stable isotope labeling, and machine learning could improve its detection ability for complex samples. Therefore, SERS plays an irreplaceable role in the identification, classification, and monitoring of environmental microbes. Owing to the great variety in environmental microorganisms, the complexity of microorganism individual composition and sampling environment, and the interference of non-target substances,

收稿日期 Received: 2021-01-07 接受日期 Accepted: 2021-08-17

国家自然科学基金项目 (21876032) 资助 Supported by the National Natural Science Foundation of China (21876032)

✉通信作者 Corresponding author (E-mail: qhzhoulh@gdut.edu.cn)

the SERS spectra of environmental microorganisms still have poor reproducibility and low resolution to some extent. The accuracy of SERS qualitative analysis of microorganisms should be further improved. Therefore, a quantitative analysis of microorganisms should be performed. In addition, the application of SERS in research on quorum sensing and dynamic analysis of biofilms is less well established. The construction of a new SERS substrate with specific recognition ability and high-density "hot spots" and the combination of SERS technology with other efficient separation and purification methods, *in situ* hybridization, stoichiometry, and artificial intelligence could further promote the application of SERS in environmental microbial analysis.

Keywords surface enhanced Raman scattering; new substrate; electromagnetic enhancement; chemical enhancement; environmental microorganism

拉曼光谱是一种快速、无损的分析技术,其峰形窄、分辨率高、水影响小等优点便于更好地研究分子振动及结构组成;但其信号强度及分析灵敏度过低,大大限制了该法的广泛应用^[1]。而当分析物分子被吸附到某些粗糙的金属表面上时,其拉曼散射强度会增加 10^4 ~ 10^6 倍的现象的产生,也就是被称之为表面增强拉曼散射(surface enhanced Raman scattering, SERS)效应^[2-3]的发现,极大地推动了拉曼光谱的发展。其中具有粗糙表面的金属材料则成为该技术的核心部分基底。寻求能更有效代替粗糙表面的金属基底新材料的研究始终伴随着SERS技术发展。近年来,尽管SERS技术目前已取得了显著的进展,但通常其信号的增强能力源于基底纳米结构上的独特的光学性质表面等离子体共振(local surface plasmon resonance, LSPR)效应,其通过增强分析物环境中的电磁场达到提高其拉曼信号强度的效果。但是,基底纳米结构分布的不均匀性会导致不同结构的区域产生的电磁场增强效应差异显著,即存在的采集“热点”不均匀性等问题,使SERS的整体灵敏度和检测重现性受到一定限制。SERS技术要成为一种实用的生物分析方法,仍需开发新型SERS基底,使基底不仅能达到增强目标物信号,克服“热点”不均问题,还能起到富集、专一识别等作用,从而提高SERS对目标物的定性定量能力,同时具备低成本,易制备等优点。早期的SERS充当活性基底的材料主要是目前仍常用的具有粗糙表面的金属如金(Au)、银(Ag)、铜(Cu)、钯(Pd)等。随着SERS应用领域的扩大、分析对象复杂性的提高、材料科学的迅速发展及SERS机理的深入探讨,SERS基底可设计成不同形状和尺寸、可加入不同涂层等而达到分析目的,从而不同类型的新型基底逐渐被开发和报道。

基于具有粗糙表面金属的引入而产生的SERS光谱技术不仅具有拉曼光谱的优点,并具有其独特的优势,在化学、生物、医学、药学、材料、农业、工业、国防等各个领域得到广泛应用。SERS能为分析物提供化学特异性分子指纹^[4],超高的灵敏度可实现对单分子的检测,其产生的信号的增强效应可促进其对生物样品的检测和鉴定^[5],其中SERS在环境微生物分析中的应用广受关注。环境微生物在海洋、水生和陆地环境中的元素循环和生态系统功能中的核心作用早已确立^[6],同时环境中也存在许多对人类、动植物有害的病原体微生物。因此,对环境微生物和与其相关的生物分子进行检测分析,对生态系统的正常运行和环境安全健康具有重要的意义。目前,用于环境微生物分析的方法除了SERS外,还有酶联免疫吸附法(ELISA)、聚合酶链反应(PCR)、色谱-质谱等^[7-8],但上述方法与SERS相比,通常耗时、成本高且需烦琐的样品预处理,难以实现现场快速检测和大规模样品筛选。因此,分析快速、成本低且高灵敏度的SERS技术表现出极大的优势。

本文从基底组成类型与材料维度出发,综述近几年零维(0D)纳米胶体及颗粒、一维(1D)纳米棒、二维(2D)平面载体与三维(3D)立体载体等材料作为SERS新型基底的研究进展,对典型材料的结构特性、拉曼增强机理、优缺点、性能优化方法及应用等进行分析讨论和对比,为SERS基底相关研究提供较为系统的参考;进一步介绍SERS在环境微生物鉴别、分类、监测等方面的应用进展,为食品安全、生物医学、矿产资源开发等领域中的微生物研究提供技术和信息参考。此外,简述SERS与微流控、稳定同位素标记、机器学习等其他技术的联用,进一步凸显SERS在环境微生物分析中发挥着不可替代的作用。最后基于作者所在课题组开展的相关研究,分析SERS在实际应用中遇到的挑战并展望SERS技术的进一步发展。

1 SERS新型基底

新型高效的基底的产生,一是为了更深入探讨SERS机理,扩大SERS的应用范围;二是为了进一步提高SERS响应,克服其存在的检测弱点,达到理论和应用有机结合的目的。目前SERS增强机理主要是电磁增强(electromagnetic enhancement, EM)和化学增强(chemical enhancement, CM)。EM由金属纳米粒子结构表面产生的自由电子与入射光耦合时发生表面等离子体共振LSPR效应导致;CM则基于底物和分析物之间的电荷转移,使其分子极化率增加,从而导致拉曼信号增加^[9]。在以上增强效应中,由于LSPR的产生依赖于纳米颗粒形态,且由其产生的采集信号的“热点”对分析物整体信号的强度大约有70%的贡献。因此,提高“热点”区域在基底材料的占比是关键。而通过控制基底材料的尺寸、形状和组成等因素,则是有效的途径。

1.1 零维(0D)纳米胶体与颗粒

向金属盐溶液中加入化学还原剂制成的金属胶体,已经成为SERS最常用的纳米结构^[12]。银和金胶体作为最常用的两种0D SERS纳米胶体,只需将制备好的贵金属纳米胶体与目标物混合,便可显著增强分析物拉曼信号。此类基底制备和使用简便,但与目标物混合的不均匀性和金属纳米胶体对目标物的低效附着一般会使SERS光谱重现性差。为实现纳米胶体与分析物更紧密的接触及特异性识别,可采用以下方式进行性能优化:(1)采用原位合成或原位作用提高SERS对分析物的信号识别。如图1A所示,2017年,Alula等利用银离子与细菌存在静电相互作用的特性,将银离子吸附到细菌细胞壁上,在细胞壁上原位合成银纳米颗粒(AgNPs),产生了对于增强SERS至关重要的“热点”,为检测和鉴别多种不同的细

菌提供了至关重要的物质基础^[13]。我们课题组则合成了两种金属纳米颗粒(AgNPs和NiNPs)作为SERS的底物,以电活性细菌的胞外聚合物(EPS)为对象,利用SERS对EPS在细胞外电子转移(EET)过程中的氧化还原性能进行了评价,这两种基底在增强EPS中生物分子的拉曼信号的同时,又可作为氧化剂/还原剂作用于氧化/还原EPS中的还原/氧化组分^[14]。该研究为探讨EPS中氧化还原物质的EET性能提供了强有力的工具,也为微生物代谢物的生物分子研究开辟了新的思路。

(2)与银基底相比,金虽然在可见区的增强因子较小,但其易制备成单分散的各种尺寸的溶胶,并具有更高的化学稳定性和更强的生物相容性。可通过对金基底进行不同分子如特定蛋白、抗体或适配体等的修饰实现SERS靶向测定目标物。Cao等2020年开发出半胱氨酸修饰的金纳米颗粒(AuNPs)新型基底,对海洋神经毒素STX进行快速灵敏地检测^[15]。STX分子对金或银胶体的亲和力较弱,因此难以通过SERS实现对STX的直接检测。而半胱氨酸含—NH₂、—SH和—COOH基团,既可通过Au-S共价键与AuNPs结合,又可通过静电及氢键作用捕获STX分子。与单纯的AuNPs基底相比,该半胱氨酸修饰AuNPs的新型基底为STX的拉曼信号提供了至少一个数量级的显著增强。如图1B所示,Franco等则将P9b噬菌体与金胶体通过静电和范德华力作用组装形成SERS基底,该组装新基底可特异性识别铜绿假单胞菌肽段,极大地增强了铜绿假单胞菌的拉曼信号强度,且通过在750、1 580和1 655 cm⁻¹处获得归属于DNA碱基和酰胺I的拉伸模式的拉曼新信号峰,增强对铜绿假单胞菌外膜部分的识别,进一步提高对该菌的特异性鉴别^[16]。Guo等则使用对pH敏感响应的4-巯基苯甲酸(4-MBA)修饰AuNPs,以此制成的活性基底涂覆于纳米移液器的外表面,将pH敏感的纳米移液器吸头插入细胞中心,进行SERS测量,成功实现了单细胞内的pH传感,并通过改变细胞外pH,了解到相比于正常细胞,癌细胞能有效调节细胞内的pH和更好地适应弱酸性的细胞外环境^[17]。

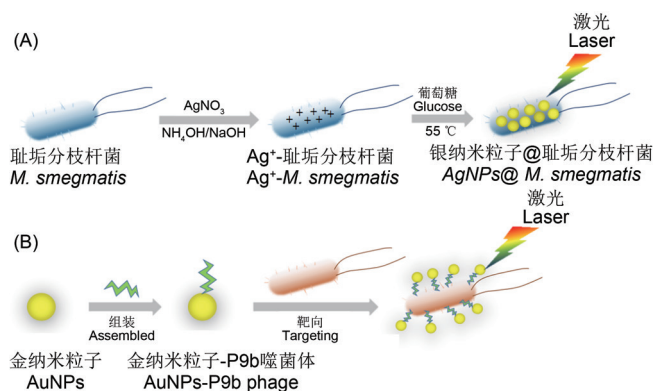


图1 AgNPs@*Mycobacterium smegmatis*的原位合成(A)和AgNPs-P9b phage特异性识别铜绿假单胞菌(B)(根据文献^[13]和^[16]总结绘制)。Fig. 1 The *in situ* synthesis of AgNPs@*Mycobacterium smegmatis* (A) and the specific recognition of *Pseudomonas aeruginosa* by AgNPs-P9b phage (B) ^[13, 16].

1.2 一维(1D)纳米棒

为解决0D SERS底物信号稳定性和重复性差的问题,研究人员以可控的分布方式将金属纳米粒子装载到线或棒上合成1D SERS基底。此类基底具有更大的局部电磁场增强能力,能使分析物的分子拉曼信号极大增强。Waiwijit等使用共溅射和倾斜角沉积技术合成了Au-Ag纳米棒,并进一步通过化学蚀

刻对其进行脱合金处理,在纳米棒上引入更多的金原子且使表面粗糙度增加,有利于对目标物的吸附和获得丰富的“热点”,从而达到同时增强SERS的EM和CM效应。采用Au-Ag脱合金纳米棒可获得对4-MBA信号 1.5×10^6 的增强因子,其强度比Au-Ag合金底物高一个数量级。与Au-Ag合金和Ag纳米棒基底相比,其稳定性也得到了极大改善^[18]。Chou等则将半导体的CM作用和贵金属的EM作用有机地结合起来,使用修饰有AuNPs的氧化锌纳米棒(ZnO NRs)作为SERS基底,均匀分散的AuNPs为增强拉曼信号提供了“热点”,而ZnO纳米结构与分析物之间存在电荷转移,基于EM和CM的协同增强作用,金纳米粒子和氧化锌纳米结构的组合能极大增强目标物的拉曼信号,该新型基底可实现浓度低至 10^{-9} M的罗丹明6G(R6G)的灵敏检测^[19]。

1.3 二维(2D)平面载体

将金属纳米粒子有效修饰到平面支撑物上可制备2D SERS基底。2D基底因其具有比一般0D和1D的基底更大比表面积而更有利于形成更多均匀且稳定的“热点”,是克服传统金属SERS基底的缺点的理想材料之一^[20-21]。自从石墨烯增强拉曼散射发现^[22]以来,一批创新的2D纳米材料,从各向同性的六方氮化硼^[23]、二硫化钼^[24]到各向异性的正交黑磷^[25]、金纳米三角形^[26]等,为SERS的机理研究和实际应用提供了新的可能性^[27]。与大多数等离子体SERS基底的EM增强不同,基于2D材料的基底通常归因于CM增强,CM增强是一种短程效应,主要取决于分子在2D材料表面化学吸附时拉曼极化张量的放大。对于分子-2D材料系统,CM增强主要来自电荷转移和激子共振^[28]。Liu等将AuNPs修饰到黑磷(BP)纳米片上,由于BP片状纳米物和目标分析物之间存在电荷转移,因此将AuNPs的EM作用和BP纳米片的CM作用进行整合,形成的BP-AuNPs展现了出色的SERS活性和分子检测优异的可重现性,可用于多种类型的肿瘤细胞的生物成分鉴定和无标记活细胞生物成像^[29]。除了将贵金属纳米材料修饰到二维材料上,制备双金属体系的2D材料也是提高贵金属纳米结构稳定性的一种可能策略,通过将不相容金属与不同功能性质相结合,双金属体系表现出比单一元素体系更优越的性能^[30-31]。Chen等通过磁控溅射技术和气相沉积技术制备了Ta和Ag的双金属膜(Ta@Ag),Ta掺杂既可改善Ag的生物相容性,降低Ag的杀菌活性,又可提高金属膜的化学稳定性。以掺杂8.8%Ta的Ta@Ag双金属膜作为SERS基底,在保持菌活性的同时可有效地区分大肠杆菌和金黄色葡萄球菌,鉴别能力优于纯Ag薄膜^[32]。Duan等则将AuNPs涂覆到改性的聚二甲基硅氧烷(PDMS)膜状载体上充当活性底物,该成膜的活性基底解决了胶体溶液团簇的尺寸和形状不稳定导致的重现性问题。与零维胶体基底功能化策略相同,该课题组采用特定的病原体适体(Apt)对成膜基底进一步功能化,特异性地捕获靶标,成功实现了副溶血弧菌和鼠伤寒沙门氏菌的同时检测并定量,LOD值分别为18 CFU/mL和27 CFU/mL,显示具有较高的检测灵敏度。该活性基底体系也可适用于检测真实海鲜样品中的食源性致病细菌^[33]。基于2D平面载体的SERS可以实现生物指标的灵敏检测。如Zhang等将细胞色素C(Cyt C)的适配体修饰到金纳米三角形(AuNTs)上,通过杂交作用把修饰有Cy5的互补链与Cyt C适配体互补配对,当细胞处于正常状态时,AuNTs充当拉曼增强的底物,增强Cy5的拉曼信号并淬灭其荧光;当细胞凋亡时,会诱导线粒体上的Cyt C释放到细胞质中,Cyt C就会特异性结合其适体,Cy5修饰的互补链

将分离, 导致其SERS信号减弱和荧光信号恢复. 通过拉曼信号和荧光信号可直接观察凋亡细胞中Cyt C的转运过程, 且可同时定量检测凋亡细胞中释放的Cyt C, 为SERS在细胞内Cyt C的定量分析提供了新思路^[26].

1.4 三维 (3D) 立体载体

3D SERS立体载体的有效体积通过增加平均场增强, 最大限度地生成和采集SERS信号, 创造出比低维基底更强的SERS响应. 另外, 对于3D SERS立体载体, 入射激光不需要精确聚焦在共焦平面上. 3D基底的这些显著优势推动了研究人员为实际应用创造新的基底^[34]. 2017年, Li等以抗坏血酸(AA)作为还原剂, 在石墨烯(rGO)板上合成了分散良好的AgNPs, 利用rGO和目标物之间存在电荷转移而产生CM效应, 该Ag NPs/rGO复合材料在检测大肠杆菌和金黄色葡萄球菌中表现出良好的SERS活性, 对大肠杆菌的检出限已降至 1×10^5 CFU/cm³, 且引入rGO作为SERS底物时, 还可以抑制共振拉曼光谱中的荧光干扰^[35]. Yang等则利用半导体ZnO的CM作用与Ag的EM作用, 设计了一种新型的3D多孔ZnO/Ag SERS复合底物, 对R6G的检测限低至 10^{-11} M^[36]. Yang等同样利用半导体材料TiO₂, 通过静电纺丝和原位沉积技术在TiO₂纳米纤维上均匀装载了AgNPs, 纳米纤维因其高孔隙率和大表面积等优异性能, 使分布在其表面的AgNPs出现了更多的“热点”, 同时激发的电子可以从AgNPs转移到TiO₂上, 电荷转移的诱导使该Ag@TiO₂复合材料具有更强的拉曼增强作用, 对4-MBA和4-巯基苯酚(4-MPh)的检测限低至 10^{-9} mol/L^[37]. Ag@TiO₂纳米纤维除了作为直接检测细菌的SERS底物之外, 还对大肠杆菌和金黄色葡萄球菌显示出优异的抗菌活性, 银纳米颗粒的接触作用、Ag⁺的释放和活性氧的富集是可能的抗菌机制, 高效的抑菌率使其在微生物传感、杀菌净水等实际应用中具有广阔的前景. Jabbar等通过简单的浸入式电镀工艺, 控制浸入时间, 在梯度多孔硅(GPSi)中生成了银和钯双金属合金纳米粒子(Ag@Pd NPs). 基于银和钯之间的相互作用和更好的构型可调性, 且GPSi具有高比表面积的优势, 成功实现大肠杆菌的超灵敏检测, 检测限甚至低至1 CFU/mL, 表现出比单金属纳米粒子更强的SERS活性^[38].

除了利用具有CM效果的石墨板及半导体作为3D材料外, 天然绿色的3D材料的利用以进一步优化基底性能也深受研究者的青睐. 在2019年, Huang等将之前合成的2D BP-AuNPs底物吸附到天然滤纸上制得BP-Au滤纸3D SERS基底, 与2D底物相比, 3D底物能够更有效增强目标分子的拉曼信号, 提供了更大的表面积, 从而利于吸附更多的目标分析物(图2). 该课题组利用BP-Au滤纸3D基底快速对3种常见食源性细菌(大肠杆菌、单增李斯特菌和金黄色葡萄球菌)进行了鉴定和分类, 证明了该3D基底在细菌检测方面的实用性^[39]. 除了物理吸附沉积外, 还可以通过原位还原来制备3D SERS基底. 基于米糠中存在的各种酚酸可将Au³⁺还原为Au⁰, Philip等通过使用大米中的酚酸还原HAuCl₄以及在米粒表面上原位吸附还原的AuNPs, 将装饰有AuNPs的米粒用作SERS底物, 对于4-氨基硫酚(4-ATP)的最低检测浓度为 10^{-6} M. 该基底制备方法中, 米粒既用作还原剂, 又作为制备金纳米颗粒的载体, 便宜绿色的合成过程既不需要使用额外的有毒试剂, 又降低了成本^[40].

纳米团簇、纳米星和纳米花等3D基底, 因能产生更大的比表面积, 有利于形成高密度的“热点”, 已成为产生SERS的优异形态. Li等合成了具有分支和核-壳结构双重特征的

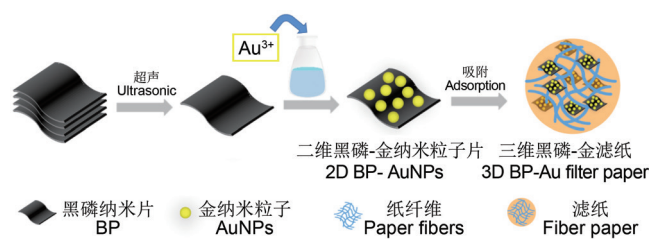


图2 基于BP-AuNPs和BP-Au滤纸的SERS基底制备示意图(根据文献[29]和[39]总结绘制).

Fig. 2 Schematic illustration of the SERS substrate fabrication of BP-AuNPs and BP-Au filter paper^[29, 39].

AuAg@AuAg卵黄壳纳米星, 由于形成金银合金的壳, 使得金和银耦合产生的电磁增强作用远大于AuAg@Ag纳米星, 同时外壳的阻碍避免了颗粒聚集造成的影响; 更多的Ag可以沉积在具有大量“热点”的分支中, 且改善了卵黄与壳之间的耦合, 更大的比表面积可以吸收更多的信号分子, 使对R6G的SERS增强因子增大为 1.223×10^6 ^[41]. Li等通过水热法在硅纳米棒(SiNRs)上生长氧化锌纳米线(ZnONWs), 再用AgNPs进行修饰制造出3D纳米花SERS底物, 对R6 G的检出限低至1 pM, 且可以用于检测淀粉样蛋白结构^[42].

表1列出了部分典型新型SERS基底及其特点. 可知, 相比于传统0D基底, 新型0D SERS基底主要采用原位合成或对基底进行特异性分子的修饰, 提高检测的特异性和灵敏性. 而将金属纳米粒子修饰到纳米棒上、平面支撑物上或立体载体上, 较大的比表面积则有利于形成更多均匀且稳定的“热点”, 增强分析物的拉曼信号, 提高信号的稳定性和重复性. 将黑磷、石墨烯、半导体等材料的CM作用和金属的EM作用有机地结合起来, EM和CM的协同增强作用有助于对目标物进行灵敏地检测, 优异的生物相容性也有利于对环境微生物的分析研究.

2 SERS在环境微生物分析中的应用

环境微生物存在于生物圈的每个部分(河流、森林、山脉、农田等), 绝大多数环境微生物参与了无数的自然生物过程, 在地球的生物地球化学循环中起着至关重要的作用, 可用于生活、农业和工业中的废物^[43]以及土壤^[44]甚至海洋环境中的污染物的原位分解修复^[45], 部分微生物则会引发各种传染病^[46-47]. SERS由于具有灵敏度、选择性和与其他技术的兼容性, 可实现对微生物从分子水平到细胞水平上的检测. 本文主要介绍近几年SERS在环境微生物鉴别、分类和监测中的应用.

2.1 环境微生物的鉴别与分类

基于环境微生物巨大的生物多样性, 不同种属的微生物之间存在一定的化学差异. 对于环境微生物的鉴别与分类, 可从微生物具有代表性、特异性的生物分子入手, 如DNA、特征蛋白、代谢物等^[48]. 如游华建等对不同的SERS光谱中腺嘌呤、酪氨酸和鸟嘌呤等重要分析信息处理后, 实现了对两种大肠埃希菌JM109、DH5α和两种金黄色葡萄球菌ATCC 25923、MRSA的鉴别^[49]. 尽管SERS在生物分析中具有超高灵敏度, 不同微生物的光谱图谱在相对峰强度或不同标准偏差方面仍可能显示出很小的差异, 难以直观区分不同的细菌^[50]. 因此, SERS与多元统计分析相结合用以在种水平上进一步提升其鉴别能力. 如Breuch等使用覆盖有AuNPs的纸基SERS基底, 对所获的数据再进行了由主成分分析(PCA)和

表1 典型新型SERS基底及其特点

Table 1 Typical new substrates of SERS and their characteristics

类型 Type	新型基底 New substrate	研究对象 Subject	检测限 Detection limit	参考文献 Reference
0D	AgNPs (<i>in-situ</i>)	<i>Mycobacterium smegmatis</i>	100 bacilli per laser spot area	[13]
	AuNPs-Cys	Marine toxin STX	10^{-7} M	[15]
1D	Au-Ag dealloyed nanorod	4-MBA	10^{-9} M	[18]
	AuNPs-ZnONRs	R6G	10^{-9} M	[19]
2D	Aptamer-AuNTs	Cyt c	2×10^{-8} M	[26]
	Apt-Au-PDMS film	<i>Vibrio parahaemolyticus</i> and <i>Salmonella typhimurium</i>	18 and 27 CFU/mL	[33]
	Ta@Ag film	<i>Escherichia coli</i>	100 CFU/mL	[32]
	ZnO-Ag	R6G	10^{-11} M	[36]
3D	Ag@TiO ₂	4-MBA	10^{-9} M	[37]
	(Ag@Pd)NPs/GPSi	<i>E. coli</i>	1 CFU/mL	[38]
	Au-rice	4-ATP	10^{-6} M	[40]
	Ag/ZnO/Si nanoflower	R6G	10^{-12} M	[42]

判别分析(CDA)组成的化学计量学评估,通过对数据集进行数据约简,降低维数,实现了在属水平上准确分辨出7种与肉类腐败相关的细菌,分别是嗜热芽孢杆菌、大肠杆菌、藤黄微球菌、荧光假单胞菌、肠炎沙门氏菌、单增李斯特菌和苏云金芽孢杆菌^[51]。Akanny等则开发了一种球形金纳米粒子作为SERS底物,在鉴定革兰氏阳性枯草芽孢杆菌、鼠李糖乳杆菌和革兰氏阴性大肠杆菌过程中,对所得的3种相似的拉曼信号进行主成分分析(PCA)和偏最小二乘-判别分析(PLS-DA)后发现,这3种菌株之间最具差异的拉曼光谱来源于细胞壁肽聚糖、腺嘌呤化合物或嘌呤小分子,从而实现三者的区分^[52]。常用的AgNPs基底在获得可达到有效鉴别微生物的拉曼信号的能力有限,Korkmaz等则利用硅藻在AgNPs的基础实现拉曼信号增强,达到从蛋白分子水平上的细菌鉴定^[53]。该课题组将AgNO₃溶液与多孔硅藻一起孵育,并通过抗坏血酸的还原获得了附着在硅藻上的AgNPs,最后把原位生成的多孔硅藻-AgNPs复合材料黏附于常规的胶带上制得稳定且价廉的SERS底物。硅藻作为天然的光子晶体具有导模共振(GMR)的特性,其GMR与金属胶体的LSPR的光耦合可以大大增强复合结构的局部电场,且硅藻多孔的结构为分析物提供了更大的附着面积。使用该新型底物即可获得高质量的环境细菌蛋白SERS光谱图,区别细胞色素C和溶菌酶等细菌相关蛋白,通过进一步与PCA分析结果结合,还可有效区别出两种不同菌株的金黄色葡萄球菌(ATCC6538和ATCC29213),从而证明该复合基底材料可使SERS进行无标记的细菌鉴定。Berg等利用过氧化物酶(HRP)将Ag⁺在其HRP共轭寡核苷酸探针标记的位点处沉积,沉积的银纳米颗粒(Silver-DISH)可作为靶向的细菌细胞内的SERS底物,设法在细菌细胞内形成SERS活性底物,促使金属和细菌成分之间更紧密地接触,从而成功实现了对大肠杆菌纯培养物和湖中环境微生物的SERS检测鉴定^[54]。Silver-DISH能够从细胞内的生物分子中有针对性地增强拉曼光谱,为环境中未培养微生物的单细胞特异性鉴定开辟了新的可能性。

真菌霉菌也属于环境微生物一类,某些真菌霉菌本身或代谢产物会对公众健康会带来巨大影响,如镰刀菌真菌产生的次生代谢产物伏马菌素会对谷物饲料等农产品造成严重污染,食用受污染的农产品对人和动物都会带来极大的危害。为了筛选被伏马菌素污染的玉米样品, Lee等合成Ag树枝状晶体作为基底,在450-804和1 100-1 352 cm⁻¹的光谱区域中,伏马菌素特征峰的拉曼强度与伏马菌素的浓度成正比,通过SERS快速对伏马菌素进行定性和定量分析,体现其在控制伏

马毒素风险,保证玉米等农产品安全方面起到的重要作用^[55]。丝状真菌在生物地球循环中也起着重要的作用,同时也作为生物降解的媒介。对于丝状真菌的检测分类,大多数基于表观形态学研究、DNA碱基测序或质谱技术,Fazio等则是将SERS用于丝状真菌鉴别分类的研究:即将各真菌代谢物的萃取物施加到干燥的AuNPs上,溶剂挥发后获得了信噪比良好的SERS光谱。对600-1 800 cm⁻¹区域的拉曼光谱进行PCA分析,实现了木霉菌、镰刀菌、神经孢菌、枝孢菌和曲霉菌5个不同属真菌的分类鉴定,为文化遗址的保护研究提供了很大帮助^[56]。

2.2 环境微生物的利用与监测

上述提及的相关SERS检测应用主要针对作为病原体或污染物的细菌、真菌。实际上,SERS技术用于监测某些环境微生物,亦可为矿产开发、资源回收及自然资源的有效利用带来极大的帮助。蜡状芽孢杆菌作为一种土壤细菌,其含量与富金土壤有选择性地相关,Chen等利用葡萄糖还原[Ag(NH₃)₂]⁺复合物合成AgNPs,与细菌混合,直接测量获得SERS光谱,对蜡状芽孢杆菌的检测限低至10⁴ CFU/mL^[57]。通过对不同浓度金属离子存在下蜡状芽孢杆菌的拉曼散射和SERS谱图分析,发现SERS信号更有利于区分细菌对Au³⁺的响应,具体表现为:(1) 654 cm⁻¹处鸟苷的谱带信号强度随Au³⁺的浓度从0.01到10.0 μg/mL的升高而降低,724 cm⁻¹处次黄嘌呤的谱带强度则随浓度升高而升高;(2) 当不同的金属离子(Au³⁺, Ag⁺, Cu²⁺和Zn²⁺)存在时,蜡状芽孢杆菌对Au³⁺具有最强的抗性,从而表明蜡状芽孢杆菌可作为金矿的指示菌,SERS对其监测有助于金矿的野外勘探。随着对黄金需求的增加,且为了治理金水离子排入环境存在生物富集问题,利用环境微生物回收黄金已经引起了很多关注。受表面活性剂可控制微生物表面金属纳米颗粒的尺寸和形状启发,Huang等基于微生物介导的表面活性剂定向方法,在乳酸杆菌中添加了HAuCl₄、抗坏血酸(AA)和不同的表面活性剂,轻松制备可作为SERS活性基底的功能性生物AuNWs复合材料,对罗丹明6G和4-巯基苯甲酸的检测限分别降至10⁻⁹和10⁻⁶ M,且从HAuCl₄水溶液中回收了Au^[58]。该研究不仅从水体中回收了金离子,并且细胞与AuNWs整合形成功能纳米复合材料,而无需将AuNWs从细胞中分离出来,生物AuNWs的SERS强力增强也有助于生物分子的单分子检测或痕量检测,成功实现了金的回收与功能性金纳米材料的制造相结合。甲烷氧化细菌(MOB)是利用甲烷作为能量来源的细菌,已被证明是天然气勘探的生物学指标,Liang等通过将合成的AgNPs吸附到

细菌表面, 获得增强的拉曼信号, 与PCA分析的结合成功将MOB与其他密切相关的共存菌区分开^[59]。因此, SERS分析也可以用作有选择地鉴别与气体相关的细菌的有效工具, 并将为气体勘探提供新的途径。

3 SERS相关联用技术在环境微生物分析中的应用

尽管SERS在环境微生物分析方面具有巨大的潜力, 但缺乏富集、捕获等特性使其在实际现场分析中的应用面临很大的挑战。越来越多的研究者致力于SERS与其他设备与技术的结合应用, 为微生物鉴别与分析提供更全面的保障。目前, SERS联用手段聚焦于提高系统对所监测微生物的捕获和信号放大。如Krafft等将纳孔膜的三维微流控装置与SERS检测结合在一起, 利用微流控设备浓缩饮用水中的低浓度细菌, 通过纳米多孔膜对细菌以及AgNPs簇的捕获, 大大提高SERS感测水样中的细菌的能力, 即时检测饮用水中对人体有害的病原微生物^[60]。Barzan等则提出了拉曼光谱和介电泳相结合的方法, 通过介电泳聚集细菌而增加细菌的局部密度, 目标菌的拉曼信噪比达到优化, 从而实现大肠杆菌、金黄色葡萄球菌和铜绿假单胞菌对抗生素的敏感性研究^[61]。再如Potluri等开发了一种结合SERS和聚合酶链反应(PCR)的快速耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(MRSA)检测的高特异性方法: PCR扩增得到了MRSA的两个特异性基因(mecA和femA)的引物, 并合成了具有AuNPs、拉曼标记分子和捕获探针的SERS基底。基于引物和捕获探针的杂交, 以及磁珠和PCR扩增子的反应, 形成了AuNPs-PCR-磁珠的“三明治复合物”, 在临床样品中实现了MRSA的直接检测^[62]。然而, 环境中获取的微生物多源自复杂的样品体系, 因此不可避免地将SERS与样品与处理步骤相结合, 以保证复杂样品基质中的微生物及其代谢产物的高效监测。如Morelli等先后使用液液萃取(LLE)分离发酵后大肠杆菌的次级代谢物对香豆酸, 在以AuNPs为高度均匀的SERS基底上进行定量, 其检测结果与HPLC分析显示出良好的相关性^[63-64]。支持液膜(supported liquid membrane, SLM)提取是一种强大且通用的技术, 它以两相之间的浓度差及pH差等为驱动力, 能够实现高选择性和目标化合物的富集^[65]。Rostami等首次通过高通量的SLM与多孔SERS检测单元结合, 对赭曲霉毒素A(OTA)进行了无标记检测^[66]。

轻原子可被较重的原子稳定取代, 从而产生了特征性的拉曼位移。据此, 稳定同位素标记也被用于与SERS结合, 这类拉曼位移可作为目标细菌的生物标记, 可实现对微生物的有效区分并探究相关的生命活动过程。Cui等在培养细菌群落中用“较重”的¹⁵N稳定同位素取代“轻”氮, 利用AgNPs和AuNPs作为SERS基底进行检测, 发现在653、730、957 cm⁻¹处的N含量相关SERS谱带呈现可分辨的位移, 该表面增强拉曼光谱结合¹⁵N稳定同位素探针(SERS-¹⁵N SIP)对细菌进行非破坏性分析, 不仅可用于监测活性氮同化细胞, 研究氮循环中高度多样的环境微生物活性, 而且还可进行拉曼活化细胞分选和下游基因组分析, 从而能够更深入地了解环境微生物的氮代谢^[67]。Li等通过D₂O同位素标记成功探测了土壤中的磷酸盐增溶细菌(PSB), PSB释放固定的磷(P)会表现出高代谢活性, 可吸收重水中的D用于自身合成利用, 因此显示出很强的C-D谱带。将C-D谱带作为特征标记, 拉曼成像可以在

混合细菌培养甚至复杂土壤微生物群落中鉴别PSB^[68]。类似地, Olaniyi等也将拉曼光谱与重水结合, 用于检测降解纤维素的细菌, 比较了单细胞水平上7个细菌菌株的纤维素降解活性^[69]。Chisanga等将¹²C/¹³C葡萄糖和¹⁴N/¹⁵N氯化铵分别作为唯一碳源和氮源, 稳定同位素标记了大肠杆菌细胞, 通过原位合成的银纳米颗粒作为SERS的基底, SERS谱带显示出清晰的红移, 对标记的细菌进行了定量区分^[70]。

SERS与其他光谱设备的联用亦能进一步补充微生物的光学信息。红外吸收和拉曼散射可提供互补的振动光谱信息, 但由于两者模态之间的空间分辨率不匹配, 信号的共取向困难等原因, 之前的研究都是在单独的两个仪器上进行, 而Xu等将拉曼光谱技术集成到中红外光热显微镜技术中, 该系统能够对抗生素影响下的细菌进行光谱分型, 在单细胞分辨率下检测到细菌对红霉素的作用机理具有特异性的生化变化, 两种技术结合的优势使其能在很短时间内获取光热红外和拉曼综合指纹图谱, 为细菌的分析检测提供了及时、广泛的振动光谱信息^[71]。此外, 基于仪器结构和光学设计的相似性, 激光诱导击穿光谱(LIBS)成为与拉曼相结合的有力竞争者^[72]。作为一种实时元素分析技术, LIBS可以实现对细菌细胞膜和细胞质中的矿物质阳离子(如K⁺、Na⁺、Ca⁺和Mg²⁺)以及细菌的定量分析^[73]。Liao等考虑到SERS的定量不足, 构建了基于SERS和LIBS组合的简单、快速和准确的细菌检测平台。平台通过在疏水硅晶片上蒸发原位合成样品液滴, 在3D空间中制造热点, 然后在平台上依次进行3D SERS和LIBS测量, 对4种不同类型的细菌进行了定性和定量分析^[74]。

随着人工智能对科研实验的渗入, 机器学习方法已在拉曼分析中得到应用。Yu等通过结合拉曼光谱和生成对抗网络(GAN), 成功实现对3种海洋菌株(葡萄球菌、溶藻弧菌和地衣芽孢杆菌)的准确识别分类。经过30 000次的训练迭代后, 生成的光谱与真实光谱十分相似, 便可利用该GAN算法模型对菌株进行准确分类, 避免了因细菌光谱的高度相似性导致难以直观分辨目标菌株^[75]。与传统的化学计量学相比, 卷积神经网络(CNN)和完全连接的人工神经网络(ANN)的应用提高了使用拉曼光谱进行细菌鉴别的准确性, 该新方法可在培养后1 h内快速鉴定和鉴定芽孢杆菌^[76]。拉曼光谱技术与机器学习相结合, 能快速、可靠地在物种水平上准确鉴定出芽孢杆菌, 为在农业食品链中对该微生物进行流行病学监测提供了有希望的工具。拉曼光谱和GAN等深度学习方法的结合, 减少了人力的投入, 提高了工作效率, 在人工智能的带动下, 病原体的鉴别提高到了一个更快更准的水平。

4 总结与展望

SERS技术的完善与发展, 始终贯穿着对新基底的研究。从本文综述的零维(0D)纳米胶体和颗粒、一维(1D)纳米棒、二维(2D)平面载体与三维(3D)立体载体等新型基底的研究进展来看, 基底组成及维度的变化可进一步提高SERS分析的灵敏度、分辨率、重现性及特异性, 使其测定对象呈现多样性和复杂性; 基底组成无论从维度的纵向或横向的变化, 大多数仍以SERS传统基底金属Au或Ag材料为基础; 为了维持零维纳米颗粒基底的稳定性防止其聚集, 可借助特殊的纳米材料作固体担体从一维到二维再到三维进行变化, 从而提高测定谱图的重现性; 呈三维空间分布的纳米粒子与二维的片状相比, 比表面积的增大使其内部存在更多的粒间空隙, 使“热点”分布更均匀, 能产生更强的SERS信号; 柔性材料如

滤纸等的使用,不但可增加基底材料的维度,更能增加待测物与基底接触程度,获得更多谱图信息^[39, 77]。随着对SERS机理研究的深入及纳米技术、材料科学等的发展,具更高特异性识别能力、更高密度“热点”同时兼具价廉、易合成且环境友好特点的新型基底将不断被开发。

SERS技术在环境微生物鉴别、分类、监测等方面虽取得了一定的进展。但环境微生物个体组成与取样环境的复杂性使其存在大量非目标物质的干扰,SERS获取的环境微生物指纹谱图或特征生物分子光谱信息仍存在重现性差、分辨率低

等问题。SERS对环境微生物分析目前主要针对浮游微生物开展,虽已有SERS技术对生物膜原位分析的报道^[78-80],但大多数仅是分析其静态信息,仍较少涉及对生物膜动态变化如胁迫环境下生物膜结构演化过程中相关生物分子变化信息的监测。此外,SERS技术在环境微生物群感效应的相关研究中也相对应用较少。而SERS技术与其他技术的联用如高效分离或富集技术、原位杂交技术、化学计量学及人工智能等技术,可大大减少由于环境微生物样本的复杂性带来的检测问题,同时促进SERS技术的应用扩展。

参考文献 [References]

- 1 杨尹,梁伟伟,王小华,沈爱国,胡继明. 无标记和标记表面增强拉曼光谱技术用于细菌的检测[J]. 分析科学学报, 2019, **35** (5): 650-656 [Yang Y, Liang WW, Wang XH, Shen AG. Label-free and label based surface-enhanced Raman spectroscopy for bacteria detection [J]. *J Anal Sci*, 2019, **35** (5): 650-656]
- 2 Fleischmann MP, Hendra PJ, Mcquillan AJ. Raman spectra of pyridine adsorbed at a silver electrode [J]. *Chem Phys Lett*, 1974, **26** (2): 163-166
- 3 Albrecht MG, Creighton JA. Anomalous intense Raman spectra of pyridine at a silver electrode [J]. *J Am Chem Soc*, 1977, **99** (15): 5215-5217
- 4 Emory SR. Probing single molecules and single nanoparticles by surface-enhanced Raman scattering [J]. *Science*, 1997, **275** (5303): 156
- 5 Kneipp K, Kneipp H, Kartha VB, Manoharan R, Deinum G, Itzkan I, Dasari RR, Feld MS. Detection and identification of a single DNA base molecule using surface-enhanced Raman scattering (SERS) [J]. *Phys Rev*, 1998, **57** (6): R6281-R6284
- 6 Conrad R. Soil microorganisms as controllers of atmospheric trace gases (H₂, CO, CH₄, OCS, N₂O, and NO) [J]. *Microbiol Rev*, 1996, **60** (4): 609-640
- 7 Gasanov U, Hughes D, Hansbro PM. Methods for the isolation and identification of listeria spp. and listeria monocytogenes: a review [J]. *FEMS Microbiol Rev*, 2005, **29** (5): 851-875
- 8 Behrens S, Kappler A, Obst M. Linking environmental processes to the *in situ* functioning of microorganisms by high-resolution secondary ion mass spectrometry (NanoSIMS) and scanning transmission X-ray microscopy (STXM) [J]. *Environ Microbiol*, 2012, **14** (11): 2851-2869
- 9 刘小红,姜珊,常林,张炜. 非贵金属表面增强拉曼散射基底的研究进展[J]. 物理学报, 2020, **69** (19): 190701 [Liu XH, Jiang S, Chang L, Zhang W. Recent research progress of non-noble metal based surface enhanced Raman scattering substrates [J]. *Acta Phys Sin*, 2020, **69** (19): 190701]
- 10 Tian ZQ, Ren B, Wu DY. Surface-enhanced Raman scattering: from noble to transition metals and from rough surfaces to ordered nanostructures [J]. *J Phys Chem B*, 2002, **106** (37): 9463-9483
- 11 Banholzer MJ, Millstone JE, Qin L, Mirkin CA. Rationally designed nanostructures for surface-enhanced Raman spectroscopy [J]. *Chem Sci Rev*, 2008, **37** (5): 885-897
- 12 Aroca RF, Alvarez-Puebla RA, Pieczonka N, Sanchez-Cortez S, Garcia-Ramos JV. Surface-enhanced Raman scattering on colloidal nanostructures [J]. *Adv Colloid Interfac*, 2005, **116** (1-3): 45-61
- 13 Alula M T, Krishnan S, Hendricks N R, Karamchand L, Blackburn JM. Identification and quantitation of pathogenic bacteria via *in-situ* formation of silver nanoparticles on cell walls, and their detection via SERS [J]. *Microchem Acta*, 2017, **184** (1): 219-227
- 14 Tan B, Zhou SF, Wang Y, Zhang BP, Yuan Y. Molecular insight into electron transfer properties of extracellular polymeric substances of electroactive bacteria by surface-enhanced Raman spectroscopy [J]. *Sci China Technol Sci*, 2019, **62** (10): 1679-1687
- 15 Cao C, Li P, Liao H, Wang J, Yang L. Cys-functionalized AuNP substrates for improved sensing of the marine toxin STX by dynamic surface-enhanced Raman spectroscopy [J]. *Anal Bioanal Chem*, 2020, **412** (19SI): 4609-4617
- 16 Franco D, De Plano LM, Rizzo MG, Scibilia S, Lentini G, Fazio E, Neria F, Guglielmino SPP, Mezzasalma AM. Bio-hybrid gold nanoparticles as SERS probe for rapid bacteria cell identification [J]. *Spectrochim Acta A*, 2020, **224**: 117394
- 17 Guo J, Rubfiaro AS, Lai Y, Moscoso J, Chen F, Liu Y, Wang X, He J. Dynamic single-cell intracellular pH sensing using a SERS-active nanopipette [J]. *Analyst*, 2020, **145** (14): 4852-4859
- 18 Waiwijit U, Chananonwathorn C, Eimchai P, Bora T, Hornyak GL, Nuntawong N. Fabrication of Au-Ag nanorod SERS substrates by co-sputtering technique and dealloying with selective chemical etching [J]. *Appl Surf Sci*, 2020, **530**: 147171
- 19 Chou C, Le Tran TT, Nguyen TQN, Liao SY, Hsiao VKS. Zinc oxide nanorod surface-enhanced Raman scattering substrates without and with gold nanoparticles fabricated through pulsed-laser-induced photolysis [J]. *Appl Sci-Basel*, 2020, **10**: 501514
- 20 Hu Z, Liu ZB, Tian JG. Stacking of exfoliated two-dimensional materials: a review [J]. *Chin J Chem*, 2020, **38** (9): 15
- 21 Jin LZ, Wang SS, Xie LH, Huang W. An overview of molecular packing mode in two-dimensional organic nanomaterials via supramolecular assembly [J]. *Chin J Chem*, 2019, (4): 405-416
- 22 Zong C, Xu MX, Xu LJ, Wei T, Ma X, Zheng XS, Hu R, Ren B. Surface-enhanced Raman spectroscopy for bioanalysis: reliability and challenges [J]. *Chem Rev*, 2018, **118** (10): 4946-4980
- 23 Cai QR, Mateti S, Yang WR, Jones R, Watanabe K, Taniguchi T, Huang SM, Chen Y, Li LH. Boron nitride nanosheets improve sensitivity and reusability of surface enhanced raman spectroscopy [J]. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2016, **55** (29): 8457-8457
- 24 Muehlethale rC, Considine CR, Menon V, Lin WC, Lee YH, Lombardi JR. Ultra-high raman enhancement on monolayer MoS₂ [J]. *ACS Photonics*, 2016, **3** (7): 1164-1169

- 25 Lin JJ, Liang LB, Ling X, Zhang SQ, Mao NN, Zhang N, Sumpter BG, Meunier V, Tong LM, Zhang J. Enhanced Raman scattering on in-plane anisotropic layered materials [J]. *J Am Chem Soc*, 2015, **137** (49): 15511-15517
- 26 Zhang J, Ma X, Wang Z. Surface-enhanced Raman scattering-fluorescence dual-mode nanosensors for quantitative detection of cytochrome c in living cells [J]. *Anal Chem*, 2019, **91** (10): 6600-6607
- 27 Kannan PK, Shankar P, Blackman C, Chung CH. Recent advances in 2D inorganic nanomaterials for sensing [J]. *Adv Mater*, 2019, **31** (34): 1803432
- 28 Yin Z, Xu KC, Jiang SZ, Luo D, Chen R, Xu CX, Shum P, Liu JY. Recent progress on two-dimensional layered materials for surface enhanced Raman spectroscopy and their applications [J]. *Mater Today Phys*, 2021, **18** (1): 100378
- 29 Liu Z, Chen H, Jia Y, Zhang W, Zhao HN, Fan WD, Zhang WL, Zhong HQ, Ni YR, Guo ZY. A two-dimensional fingerprint nanoprobe based on black phosphorus for bio-SERS analysis and chemo-photothermal therapy [J]. *Nanoscale*, 2018, **10** (39): 18795-18804
- 30 Sachan R, Yadavali S, Shirato N, Krishna H, Ramos V, Duscher G, Pennycook SJ, Gangopadhyay AK, Garcia H, Kalyanaraman R. Self-organized bimetallic Ag-Co nanoparticles with tunable localized surface plasmons showing high environmental stability and sensitivity [J]. *Nanotechnology*, 2012, **23** (27): 275604
- 31 Yang Y, Liu J, Fu ZW, Qin D. Galvanic replacement-free deposition of Au on Ag for core-shell nanocubes with enhanced chemical stability and SERS activity [J]. *J Am Chem Soc*, 2014, **136** (23): 8153-8156
- 32 Chen D, Ning P, Zhang Y, Jing J, Zhu X. Ta@Ag porous array with high stability and biocompatibility for SERS sensing of bacteria [J]. *ACS Appl Mater Inter*, 2020, **12** (17): 20138-20144
- 33 Duan N, Shen M, Qi S, Wang W, Wang Z. A SERS aptasensor for simultaneous multiple pathogens detection using gold decorated PDMS substrate [J]. *Spectrochim Acta A*, 2020, **230**: 118103
- 34 Liu H, Yang L, Liu J. Three-dimensional SERS hot spots for chemical sensing: Towards developing a practical analyzer [J]. *Trac-Trend Anal Chem*, 2016, **80**: 364-372
- 35 Li Y, Yang J, Zhong T, Zhao N, Liu QQ, Shi HF, Xu HM. Fast and green synthesis of silver nanoparticles/reduced graphene oxide composite as efficient surface-enhanced Raman scattering substrate for bacteria detection [J]. *Monatsh Chem*, 2017, **148** (7): 1155-1163
- 36 Yang M, Yu J, Lei F, Yuan X, Yu J, Ren J, Wei Y, Li C, Lei F, Man B. Synthesis of low-cost 3D-porous ZnO/Ag SERS-active substrate with ultrasensitive and repeatable detectability [J]. *Sensor Actuat B-Chem*, 2018, **256**: 268-275
- 37 Yang Y, Zhang Z, He Y, Wang ZH, Zhao YB, Sun L. Fabrication of Ag@TiO₂ electrospinning nanofibrous felts as SERS substrate for direct and sensitive bacterial detection [J]. *Sensor Actuat B-Chem*, 2018, **273**: 600-609
- 38 Jabbar AA, Alwan AM, Zayer MQ, Bohana AJ. Efficient single cell monitoring of pathogenic bacteria using bimetallic nanostructures embedded in gradient porous silicon [J]. *Mater Chem Phys*, 2020, **241**: 122359
- 39 Huang D, Zhuang Z, Wang Z, Li S, Zhong H, Liu Z, Guo Z, Zhang W. Black phosphorus-Au filter paper-based three-dimensional SERS substrate for rapid detection of foodborne bacteria [J]. *Appl Sur Sci*, 2019, **497**: 143825
- 40 Philip A, Ankudze B, Pakkanen TT. A simple one-step fabrication of gold nanoparticles-based surface-enhanced Raman scattering substrates using rice grains [J]. *Appl Sur Sci*, 2019, **480**: 229-234
- 41 Li Y, Zhu J, Weng G, Li JJ, Zhao JW. "Magic mitt": morphologically controllable AuAg@AuAg yolk-shell nanostars with better plasmonic optical properties [J]. *J Alloy Compd*, 2020, **844**: 156134
- 42 Li SJ, Zhang NN, Zhang N, Lin DD, Hu XF, Yang XJ. Three-dimensional ordered Ag/ZnO/Si hierarchical nanoflower arrays for spatially uniform and ultrasensitive SERS detection [J]. *Sensor Actuat B-Chem*, 2020, **321**: 128519
- 43 宗雪莹, 刘胜南, 王嘉诚, 蒋丽娟, 刘舒蕾, 肖琳. 大肠杆菌在微塑料上定殖自主实验[J]. *实验室科学*, 2021, **24** (2): 30-33 [Zong XY, Liu SN, Wang JC, Jiang LJ, Liu SL, Xiao L. Independent experiments of the colonization of *E. coli* on microplastics [J]. *Laborat Sci*, 2021, **24** (2): 30-33]
- 44 Shi MZ, Zhao XY, Zhu LJ, Wu JQ, Mohamed TA, Zhang X, Chen XM, Zhao Y, Wei ZM. Elucidating the negative effect of denitrification on aromatic humic substance formation during sludge aerobic fermentation [J]. *J Hazard Mater*, 2020, **388**: 122086
- 45 孟瑶, 付玉彬, 梁生康, 陈伟, 柳昭慧. 石油污染物对海底微生物燃料电池性能的影响及加速降解效应[J]. *环境科学*, 2015, **36** (8): 3080-3085 [Meng Y, Fu YB, Liang SK, Chen W, Liu ZH. Effects of oil pollutants on the performance of marine benthonic microbial fuel cells and its acceleration of degradation [J]. *Environ Sci*, 2015, **36** (8): 3080-3085]
- 46 黄亮. 病原微生物对人类的威胁[J]. *生物化工*, 2019, **5** (4): 135-140 [Huang L. The threat of pathogenic microorganisms to humans [J]. *Biol Chem Eng*, 2019, **5** (4): 135-140]
- 47 Huang SW, Tai CH, Fonville JM, Lin CH, Wang SM, Liu CC, Su IJ, Smith DJ, Wang JR [J]. Mapping enterovirus A71 antigenic determinants from viral evolution [J]. *J Virol*, 2015, **89** (22): 11500-11506
- 48 姬洪飞, 王颖. 分子生物学方法在环境微生物生态学中的应用研究进展[J]. *生态学报*, 2016, **36** (24): 8234-8243 [Ji HF, Wang Y. Advances in molecular approach applications in microbial ecology studies [J]. *Acta Ecol Sin*, 2016, **36** (24): 8234-8243]
- 49 Li CN, Qin YN, Li D, Zhang C, Liang AH, Wen GQ, Lu ZJ, Jiang ZL. A highly sensitive enzyme catalytic SERS quantitative analysis method for ethanol with Victoria blue B molecular probe in the stable nanosilver sol substrate [J]. *Sensor Actuat B-Chem*, 2018, **255**: 3464-3471
- 50 Li LH, Liao ML, Chen YF, Shan BB, Li M. Surface-enhanced Raman spectroscopy (SERS) nanoprobe for ratiometric detection of cancer cells [J]. *J Mater Chem B*, 2019, **7**: 815-822
- 51 Breuch R, Klein D, Siefke E, Hebel M, Herbert U, Wickleder C, Kaul P. Differentiation of meat-related microorganisms using paper-based surface-enhanced Raman spectroscopy combined with multivariate statistical analysis [J]. *Talanta*, 2020, **219**: 121315
- 52 Akanny E, Bonhomme A, Commun C, Doleans - Jordheim A, Farre C, Bessueille F, Bourgeois S, Bordes C. Surface-enhanced Raman spectroscopy using uncoated gold nanoparticles for bacteria discrimination [J]. *J Raman Spectrosc*, 2020, **51** (4): 619-629
- 53 Korkmaz A, Kenton M, Aksin G, Mehmet K, Sebastian WH. Inexpensive and flexible SERS substrates on adhesive tape based on biosilica plasmonic nanocomposites [J]. *ACS Appl Nano Mater*, 2018, **1** (9): 5316-5326

- 54 Berg JS, Khachikyan A, Tienken D, Littmann S, Kuypers MMM, Milucka J. An intracellular silver deposition method for targeted detection and chemical analysis of uncultured microorganisms [J]. *Syst Appl Microbiol*, 2020, **43**: 1260863
- 55 Lee K, Herrman TJ. Determination and prediction of fumonisin contamination in maize by surface-enhanced Raman spectroscopy (SERS) [J]. *Food Biopro Technol*, 2016, **9** (4): 588-603
- 56 Fazio AT, Lopez MM, Temperini MLA, De FDLA. Surface enhanced Raman spectroscopy and cultural heritage biodeterioration: fungi identification in earthen architecture from Paraíba Valley (Sao Paulo, Brazil) [J]. *Vib Spectrosc*, 2018, **97**: 129-134
- 57 Chen Q, Yang Y, Ilmur M, Liang WW, Shen AG, Hu JM. 'Mixing-and-measuring' surface-enhanced Raman scattering (SERS) detection of *Bacillus cereus* for potentially aiding gold mine field exploration [J]. *Talanta*, 2019, **204**: 44-49
- 58 Huang J, Huang D, Liu Y, Chen H, Jing X, Sun D, Li D. Rapid Au recovery from aqueous solution by a microorganism-mediated, surfactant-directed approach: effect of surfactants and SERS of bio-Au [J]. *Chem Eng J*, 2015, **267**: 43-50
- 59 Liang W, Chen Q, Peng F, Shen AG, Hu JM. A novel surface-enhanced Raman scattering (SERS) detection for natural gas exploration using methane-oxidizing bacteria [J]. *Talanta*, 2018, **184**: 156-161
- 60 Krafft B, Tycova A, Urban R D, Dusny C, Belder D. Microfluidic device for concentration and SERS-based detection of bacteria in drinking water [J]. *Electrophoresis*, 2021, **42**: 86-94
- 61 Barzan G, Sacco A, Mandrile L, Giovannozzi AM, Brown J, Portesi C, Alexander MR, Williams P, Hardie KR, Rossi AM.. New frontiers against antibiotic resistance: a Raman-based approach for rapid detection of bacterial susceptibility and biocide-induced antibiotic cross-tolerance [J]. *Sensor Actuat B-Chem*, 2020, **309**: 127774
- 62 Potluri P R, Rajendran V K, Sunna A, Wang Y. Rapid and specific duplex detection of methicillin-resistant staphylococcus aureus genes by surface-enhanced Raman spectroscopy [J]. *Analyst*, 2020, **145** (7): 2789-2794
- 63 Morelli L, Zór K, Jendresen CB, Rindzevicius T, Schmidt MS, Nielsen AT, Boisen A. Surface enhanced raman scattering for quantification of p-coumaric acid produced by *Escherichia coli* [J]. *Anal Chem*, 2017, **89** (7): 3981-3987
- 64 Morelli L, Seriola L, Centorbi FA, Jendresen CB, Matteucci M, Ilchenko O, Demarchi D, Nielsen AT, Zór K, Boisen A. Injection molded lab-on-a-disc platform for screening of genetically modified *E. coli* using liquid-liquid extraction and surface enhanced Raman scattering [J]. *Lab Chip*, 2018, **18** (6): 869-877
- 65 Morelli L, Andreasen SZ, Jendresen CB, Nielsen AT, Emnéus J, Zór K, Boisen A. Quantification of a bacterial secondary metabolite by SERS combined with SLM extraction for bioprocess monitoring [J]. *Analyst*, 2017, **142** (23): 4553-4559
- 66 Rostami S, Zór K, Zhai DS, Viehriig M, Boisen A. High-throughput label-free detection of ochratoxin a in wine using supported liquid membrane extraction and ag-capped silicon nanopillar sers substrates [J]. *Food Control*, 2020, **113**: 107183
- 67 Cui L, Yang K, Zhou G, Huang WE, Zhu YG. Surface-enhanced Raman spectroscopy combined with stable isotope probing to monitor nitrogen assimilation at both bulk and single-cell level [J]. *Anal Chem*, 2017, **89** (11): 5794-5801
- 68 Li H, Bi Q, Yang K, Zheng BX, Pu Q, Cui L. D₂O-isotope-labeling approach to probing phosphate-solubilizing bacteria in complex soil communities by single-cell Raman spectroscopy [J]. *Anal Chem*, 2019, **91** (3): 2239-2246
- 69 Olaniyi OO, Yang K, Zhu Y, Cui L. Heavy water-labeled Raman spectroscopy reveals carboxymethylcellulose-degrading bacteria and degradation activity at the single-cell level [J]. *Appl Microbiol Biot*, 2019, **103** (3): 1455-1464
- 70 Chisanga M, Muhamadali H, Kimber R, Goodacre R. Quantitative detection of isotopically enriched *E. coli* cells by SERS [J]. *Farday Discuss*, 2017, **205**: 331-343
- 71 Xu J, Li X, Guo Z, Huang WE, Cheng JX. Fingerprinting bacterial metabolic response to erythromycin by Raman-integrated mid-infrared photothermal microscopy [J]. *Anal Chem*, 2020, **92** (21): 14459-14465
- 72 Cahoon EM, Almirall JR. Quantitative analysis of liquids from aerosols and microdrops using laser induced breakdown spectroscopy [J]. *Anal Chem*, 2012, **84** (5): 2239-44
- 73 Manzoor S, Moncayo S, Navarro-Villoslada F, Ayala JA, Izquierdo-Hornillos R, de Villena FJ, Caceres JO. Rapid identification and discrimination of bacterial strains by laser induced breakdown spectroscopy and neural networks [J]. *Talanta*, 2014, **121**: 65-70
- 74 Liao W, Lin Q, Xie S, He Y, Tian Y, Duan Y. A novel strategy for rapid detection of bacteria in water by the combination of three-dimensional surface-enhanced Raman scattering (3D SERS) and laser induced breakdown spectroscopy (LIBS) [J]. *Anal Chim Acta*, 2018, **1043**: 64-71
- 75 Yu S, Li H, Li X, Fu YV, Liu FH. Classification of pathogens by Raman spectroscopy combined with generative adversarial networks [J]. *Sci Total Environ*, 2020, **726**: 138477
- 76 Wang KD, Chen L, Ma XY, Ma LN, Chou KC, Cao YK, Khan IUH, Gözl G, Lu XH. Arcobacter identification and species determination using Raman spectroscopy combined with neural networks [J]. *Appl Environ Microb*, 2020, **86**: e00924-2020
- 77 刘思佳, 喻倩, 王锐, 康蕾, 孔宪明. 柔性复合材料在表面增强拉曼散射光谱中的研究进展. 分析试验室, 2021, **40** (11): 1351-1357 [Liu SJ, Yu Q, Wang R, Kang L, Kong XM. Advance in flexible composite applied in surface enhanced Raman scattering spectroscopy [J]. *Anal Lab*, 2021, **40** (11): 1351-1357]
- 78 Ivleva NP, Wagner M, Horn H, Niessner R, Haisch C. Raman microscopy and surface-enhanced Raman scattering (SERS) for in situ analysis of biofilms [J]. *J Biophoton*, 2010, **3** (8-9): 548-556
- 79 Ravindranath SP, Kadam US, Thompson DK, Thompson DK, Irudayaraj J. Intracellularly grown gold nanoislands as SERS substrates for monitoring chromate, sulfate and nitrate localization sites in remediating bacteria biofilms by Raman chemical imaging [J]. *Anal Chim Acta*, 2012, **745**: 1-9
- 80 Chao YQ, Zhang T. Surface-enhanced Raman scattering (SERS) revealing chemical variation during biofilm formation: from initial attachment to mature biofilm [J]. *Anal Bioanal Chem*, 2012, **404** (5): 1465-1475