

Design and Fabrication of Porous Silicon-Gelatin Hybrid to Detect Bacterial Growth by Reflectometric Interference Fourier Transform Spectrometry

Available in: <http://jips.ippi.ac.ir>Iran. J. Polym. Sci. Technol.
(Persian),

Vol. 37, No. 4, 321-330

October-November 2024

ISSN: 1016-3255

Online ISSN: 2008-0883

DOI: 10.22063/JIPST.2025.35553.2346

Shima Abarghoe¹, Fereshteh Rahimi^{1,2*}, Nizami Duran³, Ali Abouie Mehrizi⁴, Mahsa Sedighi⁵

1. Department of Nanobiotechnology and Biomimetics, School of Life Science Engineering, College of Interdisciplinary Science and Technology, University of Tehran, Postal Code: 14399-57131, Tehran, Iran
2. Center for International Scientific Studies and Cooperation, Postal Code: 13149-83655, Tehran, Iran
3. Department of Microbiology, Faculty of Medicine, Mustafa Kemal Hatay University, Postal Code: 31060, Antakya-Hatay, Turkey
4. Department of Medical Technology and Tissue Engineering, School of Life Science Engineering, College of Interdisciplinary Science and Technology, University of Tehran, Postal Code: 14399-57131, Tehran, Iran
5. Department of Pharmaceutics and Nanotechnology, Faculty of Pharmacy, Birjand University of Medical Sciences, Postal Code 97178-53076, Birjand, Iran

Received: 23 September 2024, accepted: 15 March 2025

ABSTRACT

Hypothesis: The detection of pathogenic bacteria in food and clinical samples is valuable, and diagnosing them in a short period of time remains a challenge. In this research, an optical nanosensor based on Fourier transform spectroscopy from a porous silicon integrated with gelatin hydrogel was used to detect bacterial growth. Gelatin is a pH-sensitive hydrogel that swells quickly with the growth of bacteria and changes in the pH of the environment. The hybrid of this hydrogel with porous silicon nanostructure creates a pH-sensitive structure whose refractive index changes with bacterial growth and pH changes. This change causes a variation in the effective optical thickness of the hybrid nanostructure, which can be investigated using Fourier transform spectrometry.

Methods: First, electrochemical etching was used to fabricate porous silicon. In the next step, the oxidized porous silicon surface was functionalized with APTES, which leaves amine groups on the surface for conjugation with gelatin. Finally, the swelling behavior of hydrogel in hybrid was investigated in response to environmental pH changes and then in the presence of different concentrations of bacteria.

Findings: By X-ray energy dispersive spectroscopy in mapping mode and checking the distribution of elements, the penetration of the gel into the pores of porous silicon was observed. By analyzing the Fourier transform spectroscopy of the porous silicone-gelatin hybrid in the presence of buffers with different pH levels, it was determined that due to the swelling of the gel layer and the refractive index of this layer approaching the refractive index of the surrounding environment, the location of the first peak used as the fluid peak can be considered as a diagnostic point. The results showed that this structure has the ability to detect changes in environmental pH as well as bacterial growth in the concentration range of 10^2 to 10^5 cfu/mL.

Keywords:

nanosensor,
pH sensitive,
gelatin,
porous silicon,
reflectometric interference
Fourier transform spectrometry

(*)To whom correspondence should be addressed.

E-mail: rahimi.f@gmail.com

Please cite this article using:

Abarghoe S., Rahimi F., Duran N., Abouie Mehrizi A., Sedighi M., Design and Fabrication of Porous Silicon-Gelatin Hybrid to Detect Bacterial Growth by Reflectometric Interference Fourier Transform spectrometry, *Iran. J. Polym. Sci. Technol. (Persian)*, **37**, 321-330, 2024.

طراحی و ساخت هیبرید سیلیکون متخلخل-ژلاتین برای تشخیص مقدار رشد باکتری با طیف سنجی تبدیل فوریه تداخل بازتابی

شیمای ابرقویی^۱، فرشته رحیمی^{۲*}، نظامی دوران^۳، علی ابویی مهریزی^۴، مهسا صدیقی^۵

دسترسی پذیر در نشانی: <http://jips.ippi.ac.ir>

مجله علوم و تکنولوژی پلیمر،

سال سی و هفتم، شماره ۴،

صفحه ۳۳۰-۳۲۱، ۱۴۰۳

ISSN: 1016-3255

Online ISSN: 2008-0883

DOI: 10.22063/JIPST.2025.35553.2346

۱- تهران، دانشگاه تهران، دانشکده‌های علوم و فناوری‌های میان‌رشته‌ای، دانشکده مهندسی علوم زیستی،

گروه نانوبیوتکنولوژی و زیست تقلید، کد پستی ۵۷۱۳۱-۱۴۳۹۹

۲- تهران، مرکز مطالعات و همکاری‌های علمی بین‌المللی، کد پستی ۸۳۶۵۵-۱۳۱۴۹

۳- ترکیه، آناتاکیا-هاتای، دانشگاه مصطفی کمال هاتای، دانشکده پزشکی، گروه میکروبیولوژی، کد پستی ۳۱۰۶۰

۴- تهران، دانشگاه تهران، دانشکده‌های علوم و فناوری‌های میان‌رشته‌ای، دانشکده مهندسی علوم زیستی، گروه فناوری

پزشکی و مهندسی بافت، کد پستی ۵۷۱۳۱-۱۴۳۹۹

۵- بیرجند، دانشگاه علوم پزشکی بیرجند، دانشکده داروسازی، گروه فارماسیوتیکس و نانوفناوری، کد پستی ۵۳۰۷۶-۹۷۱۷۸

دریافت: ۱۴۰۳/۷/۲، پذیرش: ۱۴۰۳/۱۲/۲۵

چکیده

فرضیه: تشخیص باکتری‌های بیماری‌زا در نمونه‌های غذایی و بالینی بسیار ارزشمند است و انجام چنین تشخیصی در بازه زمانی کوتاه همچنان به عنوان چالش باقی مانده است. در این پژوهش، از نانوحسگر نوری بر پایه طیف‌سنجی تبدیل فوریه تداخل بازتابی از سیلیکون متخلخل ادغام‌شده با هیدروژل ژلاتین، برای تشخیص رشد باکتری استفاده شد. ژلاتین، هیدروژلی حساس به pH است که با رشد باکتری و تغییر pH محیط، به سرعت متورم می‌شود. هیبرید این هیدروژل با نانوساختار سیلیکون متخلخل، ساختاری حساس به pH ایجاد کرده که ضریب شکست آن با رشد باکتری و تغییر pH، تغییر می‌کند. این تغییر، سبب تغییر ضخامت اپتیکی مؤثر نانوساختار هیبریدی می‌شود و با روش طیف‌سنجی تبدیل فوریه تداخل بازتابی، قابل بررسی است.

روش‌ها: ابتدا به منظور ساخت سیلیکون متخلخل از فرایند خوردگی الکتروشیمیایی استفاده شد. در مرحله بعد، سطح سیلیکون متخلخل اکسیدشده با آمینوپروپیل تری‌اتوکسی سیلان (APTES) عامل‌دار شد که گروه‌های آمین را برای مزدوج‌سازی با ژلاتین روی سطح به جای می‌گذارد. در نهایت، رفتار تورم هیدروژل در هیبرید سیلیکون متخلخل-ژلاتین در پاسخ به تغییرات pH محیط و سپس در مجاورت غلظت‌های مختلف باکتری بررسی شد.

یافته‌ها: با طیف‌سنجی پاشنده انرژی پرتو X در حالت نقشه‌برداری و بررسی توزیع عناصر کربن، نیتروژن، اکسیژن و سیلیکون، نفوذ ژل به درون حفره‌های سیلیکون متخلخل مشاهده شد. با بررسی پرتو بازتابیده و طیف‌سنجی تبدیل فوریه تداخل بازتابی از هیبرید سیلیکون متخلخل-ژلاتین در مجاورت بافر با pHهای مختلف، به دلیل تورم لایه ژل و نزدیک شدن ضریب شکست این لایه به ضریب شکست محیط پیرامون از مکان قله اول (پیک سیلیکون متخلخل) به عنوان نقطه تشخیصی استفاده شد. نتایج نشان داد، ساختار حاصل، قدرت تشخیص تغییرات pH محیط و نیز رشد باکتری را در محدوده غلظت‌های 10^2 تا 10^6 کلنی بر میلی‌لیتر دارد.

واژه‌های کلیدی

نانوحسگر،

حساس به pH،

ژلاتین،

سیلیکون متخلخل،

طیف‌سنجی تبدیل فوریه تداخل

بازتابی

* مسئول مکاتبات، پیام‌نگار:

rahimi.f@gmail.com

مقدمه

رشد و تکثیر باکتری‌ها در آب و مواد غذایی و انتقال آن‌ها به انسان، یکی از مهم‌ترین عوامل مرگ‌ومیر در جوامع بشری شناخته شده است [۱،۲]. از این‌رو، تشخیص سریع و دقیق وجود و رشد باکتری‌ها نقش حیاتی در افزایش بقا بیماران مبتلا به بیماری‌های عفونی و جلوگیری از فجایع انسانی ایفا می‌کند. از روش‌های مرسوم تشخیص باکتری می‌توان به روش‌های زیست‌شیمیایی بر پایه کشت و روش‌های مولکولی مبتنی بر واکنش زنجیری پلیمر (polymerase chain reaction, PCR) و ریزآرایه (microarray) اشاره کرد [۳]. این روش‌ها قابل اعتمادترین روش‌های موجود هستند. اما، نیاز به مقادیر زیاد باکتری، زمان‌بر بودن کشت آن‌ها و آماده‌سازی‌های پیچیده از جمله عواملی هستند که این روش‌ها را محدود می‌سازند [۴-۶]. امروزه، انواعی از روش‌های مختلف در اختیار پژوهشگران قرار دارد تا در تشخیص باکتری‌ها مؤثر واقع شود و محدودیت‌ها را مرتفع سازد [۷-۱۰].

هیدروژل‌ها، شبکه‌ای سه‌بعدی از زنجیرهای پلیمری آب‌دوست هستند که به‌طور متقاطع با یکدیگر پیوند برقرار کرده‌اند [۱۱،۱۲]. سطح ویژه بزرگ و تخلخل زیاد این مواد، سبب شده تا در معرض کامل با محیط اطراف خود باشند و به محرک‌های خارجی از قبیل تغییر دما، pH، نور، غلظت گلوکوز و بارگذاری مکانیکی به‌خوبی پاسخ دهند [۱۳-۱۶]. هیدروژل‌های حساس به pH، به‌طور عمومی دارای گروه‌های جانبی یونش‌پذیر هستند. این گروه‌های جانبی، می‌توانند اسید ضعیف (مانند مشتقات اسیدهای کربوکسیلیک) یا باز ضعیف (مانند آمینو یا ایمین) باشند که در شرایط اسیدی یا بازی تبادل پروتون انجام داده و دارای بارهای مثبت یا منفی شوند [۱۷-۲۰]. این بارها، منشأ دافعه بین زنجیرها، نفوذ مولکول‌های آب و در نهایت تورم هیدروژل‌های حساس به pH هستند [۲۱-۲۳]. از سوی دیگر، هنگام تکثیر باکتری، متابولیسم گلوکوز که منبع کربن عالی به‌شمار می‌آیند، به آزادسازی اسیدهای آلی (مانند اسیدهای پیروویک، سیتریک و لاکتیک) منجر شده و در پی آن باعث اسیدی شدن محیط برون‌یاخته‌ای می‌شود [۲۴-۲۶]. از این‌رو، می‌توان تورم هیدروژل‌های حساس به pH را معیاری برای سنجش رشد باکتری در نظر گرفت [۲۴،۲۵]. طیف‌سنجی تبدیل فوریه تداخل بازتابی، روشی برای اندازه‌گیری ضخامت اپتیکی مؤثر (effective optical thickness, EOT) لایه‌هاست. این کمیت با معادله (۱) تعریف می‌شود:

$$EOT = 2nL \quad (1)$$

در این معادله، n ضریب شکست و L ضخامت لایه است. برای

اندازه‌گیری این کمیت، کافی است تا بازتاب امواج نور در ناحیه مرئی و زیرقرمز را از یک لایه نازک، ثبت و سپس منحنی تبدیل فوریه آن را استخراج کرد. محل پیک ظاهرشده در منحنی تبدیل فوریه، مقدار ضخامت اپتیکی مؤثر را مشخص می‌کند. به همین ترتیب، می‌توان برای یک دو-لایه‌ای نازک، اندازه‌گیری طیف بازتاب و سپس تبدیل فوریه را انجام داد. در مورد اخیر، منحنی تبدیل فوریه دارای سه پیک در محل ضخامت اپتیکی مؤثر هر یک از اجزا و مجموع آن‌ها خواهد بود. مبنای نظری این روش در مورد یک تک‌لایه‌ای نازک [۲۵] و دو لایه‌ای نازک [۲۶] قبلاً با جزئیات بررسی شده است. در چند گزارش منتشرشده از روش طیف‌سنجی تبدیل فوریه تداخل بازتابی برای تشخیص تغییر pH محیط [۲۷،۲۸] و رشد باکتری [۲۹]، از هیدروژل حساس به pH استفاده شده است. برای غلبه بر مشکل ضریب شکست نسبتاً کوچک هیدروژل‌ها (کمتر از حدود ۱/۵) که حتی در محیط‌های آبی و با جذب مولکول‌های آب، این مقدار کاهش بسیار بیشتری نیز خواهد داشت و در نتیجه یافتن پیک‌ها را از نوفه‌های (noise) زمینه دشوار خواهد کرد [۲۵،۲۶]، اندازه‌گیری ضخامت اپتیکی مؤثر هیدروژل به‌طور مستقیم در این روش، تقریباً غیرعملی است. برای غلبه بر این مشکل، می‌توان از یک لایه سیلیکون متخلخل با ضخامت اپتیکی مؤثر بزرگ استفاده کرد. سیلیکون متخلخل به‌راحتی با روش خوردگی الکتروشیمیایی قابل تولید است و با کنترل شرایط خوردگی به‌سادگی می‌توان ضخامت اپتیکی مؤثر آن را تنظیم کرد. از این‌رو، در پژوهش‌های یادشده، دو رویکرد به‌کار گرفته شده است: در رویکرد اول، از یک دو لایه‌ای شامل لایه هیدروژل کیتوسان و لایه‌ای از سیلیکون متخلخل با ضریب شکست بیشتر استفاده شده است [۲۹]. در رویکرد دوم، لایه سیلیکون متخلخل به‌عنوان بستری برای تولید هیدروژل پلی(ایزوپروپیل آکریل آمید-co-آکرلیک اسید)، poly(NIPAM-co-AAc)، در درون حفره‌های آن [۲۷] در نظر گرفته شده است.

در پژوهش حاضر، از ژلاتین به‌عنوان هیدروژل طبیعی، در دسترس و ارزان‌قیمت به‌عنوان هیدروژل حساس به pH برای تشخیص رشد باکتری استفاده شد. ژلاتین به‌عنوان پلیمر پروتئینی از آب‌کافت کلاژن طبیعی موجود در پوست و بدن پستانداران، آبزیان و حشرات تولید می‌شود و از ۱۸ نوع اسید آمینه با بارهای مثبت و منفی تشکیل شده است که با پیوندهای پپتیدی به یکدیگر متصل شده است. خاصیت کاتیونی ژلاتین به‌طور اساسی ناشی از وجود اسید آمینه‌های لیزین و آرژنین در زنجیر است [۲۸،۲۹]. به‌دلیل گران‌روی بسیار کمتر ژلاتین نسبت به هیدروژل‌های به‌کاررفته در پژوهش‌های پیشین، بخشی از این هیدروژل به‌راحتی وارد حفره‌های سیلیکون متخلخل می‌شود و به روش پیچیده‌تر تولید هیدروژل در درون حفره‌های

هم‌زده شد تا ژلاتین به‌طور کامل حل شده و محلول شفاف به‌دست آید. پس از حل شدن کامل ژلاتین، محلول ۲/۵٪ گلو تارآلدئید (GA) (۲۵٪) به‌عنوان شبکه‌ای‌کننده قطره‌قطره به محلول ژلاتین اضافه شد تا با گذشت زمان، هیدروژل ژلاتین تشکیل شود.

لایه‌نشانی سیلیکون متخلخل با ژلاتین

پس از آماده‌کردن محلول ژلاتین و پیش از آنکه ژل به‌طور کامل بسته شود، مقادیر حجمی مختلف ۷، ۱۰، ۱۳، ۱۶ و ۱۹ μL از این محلول روی سطح سیلیکون‌های متخلخل اصلاح‌شده قرار داده شد. سپس، نمونه‌ها به‌مدت ۲۴ h در دمای معمولی قرار گرفتند تا حلال تبخیر و سطح کاملاً خشک شود.

مشخصه‌یابی ساختارهای سیلیکونی

مشخصه‌یابی ساختارهای طراحی‌شده با میکروسکوپ الکترونی پویشی (SEM) و طیف‌سنجی پاشنده انرژی پرتو X (EDX) انجام شد. برای تصویربرداری از مقطع عرضی سیلیکون متخلخل پیش و پس از لایه‌نشانی ژلاتین از SEM (شرکت Zeiss آلمان و Hitachi ژاپن) استفاده شد و EDX (شرکت Hitachi ژاپن) برای بررسی نفوذ ژل به درون حفره‌ها استفاده شد.

کشت باکتری

ابتدا در کنار شعله با استفاده از حلقه سترون (sterile loop) مقدار بسیار کمی از کلنی باکتری *E. coli* برداشته شده و به‌صورت چهارمرحله‌ای کشت انجام شد. در مرحله آخر، ظرف کشت در دمای 37°C به‌مدت ۲۴ h درون گرم‌خانه قرار داده شد. سپس، مقداری از کلنی باکتری کشت داده‌شده برداشته شده و در بافر نمکی فسفات حل شد. برای بررسی صحیح بودن کدورت استاندارد از طیف‌نورسنج استفاده شد. در طول موج ۶۲۵ nm جذب برای استاندارد ۰/۵ مک‌فارلند ($1 \times 10^8 \text{ cfu/mL}$) بین ۰/۱-۰/۸ است. سپس، از لوله ۰/۵ مک‌فارلند رقت‌های سریالی باکتری تهیه شد.

طیف‌سنجی تبدیل فوریه تداخل بازتابی و بررسی پاسخ نانوحسگر برای بررسی طیف بازتاب نمونه‌های متخلخل و نیز بررسی خواص فیزیکی لایه متخلخل از طیف‌نورسنج (Ocean Optics USB400 آمریکا) در محدوده ۱۱۰۰-۳۵۰ nm و با دقت ۱ nm به‌همراه یک فیبر نوری بازتابی و منبع نور سفید هالوژن-تنگستن مطابق پژوهش پیشین استفاده شد [۳۰]. در هر مرحله از ساخت، اصلاح سطح و اضافه‌کردن لایه ژل، طیف تداخل بازتابی با نرم‌افزار IGOR (Webometrics آمریکا) به‌منحنی فوریه تبدیل شد. روش طیف‌سنجی

لایه متخلخل نیازی نیست [۲۷]. بخش باقی‌مانده ژلاتین (روی لایه متخلخل) نیز در محیط آبی با سرعت بسیار زیادی (در حد یک ثانیه)، آب جذب می‌کند و به‌دلیل تورم بسیار زیاد، دارای ضریب شکستی بسیار نزدیک به محیط آبی خواهد شد. این پدیده سبب می‌شود تا برای نور بازتابیده، عملاً لایه ژلاتین از محیط آبی قابل تشخیص نباشد و در عمل منحنی تبدیل فوریه طیف بازتاب آن فقط یک قله برای لایه سیلیکون متخلخل خواهد داشت که بررسی آن نسبت به نمونه‌های دولایه‌ای [۲۳، ۲۴] ساده‌تر خواهد بود.

تجربی

مواد

در این پژوهش، به‌منظور ساخت سیلیکون متخلخل، از ویفر سیلیکونی نوع p^+ (آلایده با بور) با ضخامت $250 \pm 50 \mu\text{m}$ ، مقاومت ویژه $0.009-0.01 \Omega \cdot \text{cm}$ با برش ۱۰۰ استفاده شد که از شرکت Latech سنگاپور خریداری شد. هیدروفلوئوریک اسید ۴۸٪، اتانول ۹۷٪، آمینوپروپیل‌تری‌اتوکسی‌سیلان ۹۸٪ (APTES) و محلول ۲/۵٪ گلو تارآلدئید (GA) همگی محصول Merck آلمان بودند. از پودر ژلاتین خوکی نوع A محصول Sigma-Aldrich استفاده شد. باکتری *E. coli* (O55: k59) از سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران خریداری شد.

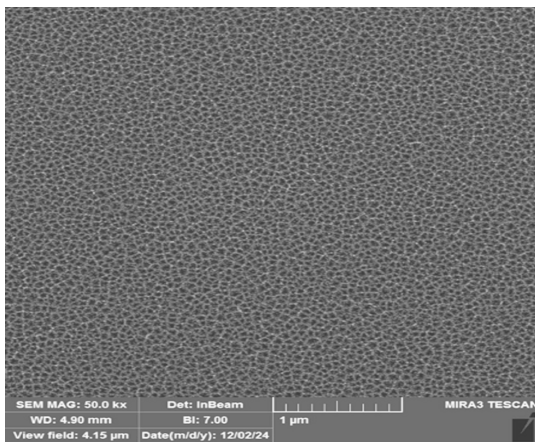
دستگاه‌ها و روش‌ها

ساخت و اصلاح سطح سیلیکون متخلخل

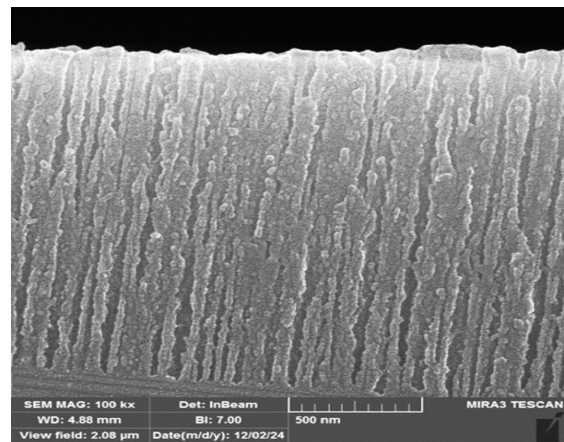
ویفر سیلیکونی به‌کمک برش لیزری به قطعات کوچک مربعی‌شکل با ابعاد $8 \times 8 \text{ mm}^2$ برش زده شد. فرایند تمیزکردن سطح سیلیکون و حذف لایه مزاحم همانند پژوهش پیشین انجام شد. برای ایجاد تخلخل با روش الکتروشیمیایی، از محلول الکترولیت شامل هیدروفلوئوریک اسید (۴۸٪) و اتانول (۹۷٪) با نسبت ۳:۱ استفاده شد. سایر جزئیات روش مطابق پژوهش پیشین بوده است [۲۵، ۳۰]. برای پایدارکردن و اصلاح سطح سیلیکون متخلخل، اکسایش شیمیایی و افزودن گروه‌های آمین به سطح با استفاده از ۳-آمینوپروپیل‌تری‌اتوکسی‌سیلان (APTES) (۹۸٪)، مطابق پژوهش قبلی انجام شد [۳۰].

ساخت هیدروژل ژلاتین

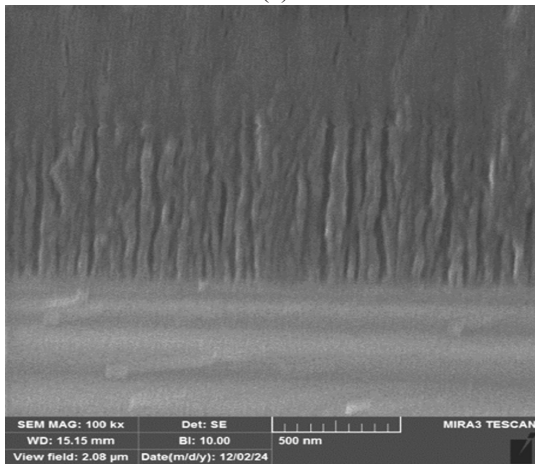
به‌منظور ساخت هیدروژل ژلاتین، از پودر ژلاتین خوکی نوع A استفاده شد. ابتدا، محلول ۴٪ ژلاتین در آب یون‌زدوده آماده شد. سپس، محلول به‌مدت ۱ h در دمای 40°C روی همزن مغناطیسی



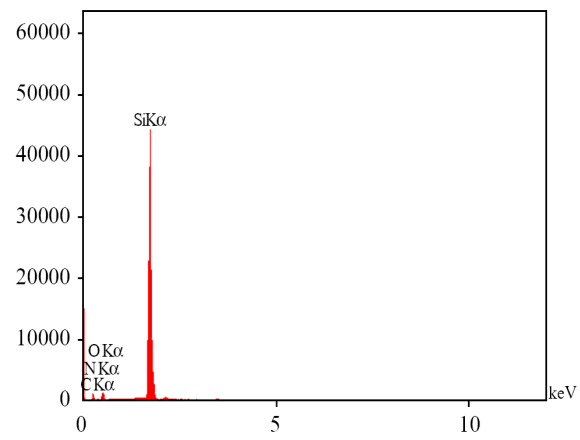
(a)



(b)



(c)



(d)

شکل ۱- تصاویر SEM سیلیکون متخلخل: (a) سطح مقطع، (b) مقطع عرضی و (c) مقطع عرضی پس از لایه‌نشانی ژلاتین، طیف‌سنجی پاشنده انرژی پرتو X در شیوه نقشه‌برداری از شکل بخش (c) برای بررسی توزیع عناصر.

Fig. 1. SEM images: (a) surface of porous silicon, (b) cross-section of porous silicon, and (c) cross-section of porous silicon after gelatin deposition, energy dispersive X-ray spectroscopy in shape mapping mode of part (c) to examine the distribution of elements.

می‌دهد. همان‌طور که دیده می‌شود، ژلاتین تا حدود نیمه ارتفاع حفره‌ها پیشروی کرده و آن‌ها را پر کرده است. طیف‌سنجی پاشنده انرژی پرتو X از نیمه بالایی حفره‌ها، وجود نیتروژن و کربن را در این مناطق تأیید می‌کند که ناشی از وجود ژلاتین در درون حفره‌هاست. ضخامت لایه متخلخل با روش SLIM و پردازش تصویر میکروسکوپی SEM به کمک نرم‌افزار ImageJ انجام شد. مقدار تخلخل 60 ± 4 درصد با روش SLIM برای سه نمونه محاسبه شد. همچنین، مقدار تخلخل ۵۰٪ با نرم‌افزار ImageJ به دست آمد. این اختلاف مقدار تخلخل ناشی از آن است که برای تهیه تصاویر میکروسکوپی SEM از لایه‌نشانی طلا استفاده می‌شود که دانه‌های طلا باعث کوچک شدن مقداری از ابعاد حفره‌های سیلیکون متخلخل و کاهش درصد تخلخل می‌شود، به همین دلیل نتایج حاصل از روش

نفوذ مایع (spectroscopic liquid infiltration method, SLIM) با استفاده از بازتاب‌سنجی تداخلی سطح لایه متخلخل در دو محیط هوا و متانول محاسبه شد [۳۰].

نتایج و بحث

مشخصه‌یابی لایه سیلیکون متخلخل

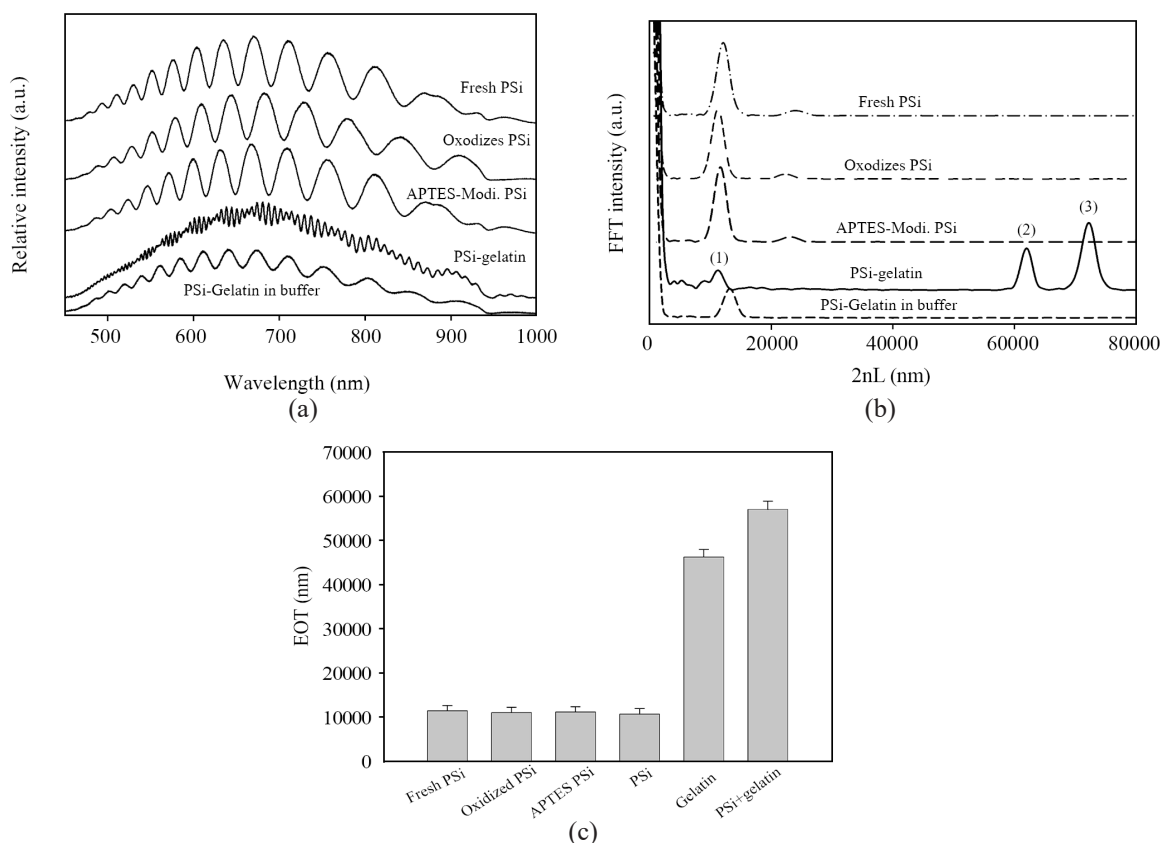
مشخصات لایه سیلیکون متخلخل با SEM و EDX مطالعه شد. شکل ۱ (a) و (b) به ترتیب سطح و مقطع عرضی لایه سیلیکون متخلخل را با حفره‌هایی در حدود ۵۰ nm نشان می‌دهد. شکل ۱ (c) مقطع عرضی سیلیکون متخلخل را پس از لایه‌نشانی ژلاتین نشان

نوری SLIM دقیق‌تر است [۲۲].

طیف‌سنجی تبدیل فوریه تداخل بازتابی در مراحل اصلاح سطح و لایه‌نشانی ژلاتین

که ضریب شکستی کمتر از ضریب شکست اتم‌های سیلیکون دارند و در نتیجه ضریب شکست مؤثر لایه را کاهش می‌دهند. در مرحله بعدی استفاده از APTES برای اصلاح سطح سبب شکل‌گیری یک لایه سیلان آلی (organosilan) بر سطح پیکره سیلیکونی شده و در نتیجه موجب افزایش ضریب شکست داخل حفره‌ها می‌شود. بدین ترتیب، مقدار EOT به 11610 nm می‌رسد. پس از اضافه‌شدن لایه‌ای از ژلاتین، منحنی تبدیل فوریه، سه مقدار EOT را نشان می‌دهد که پیک ۱ به سیلیکون متخلخل هیبرید شده با ژلاتین، پیک ۲ به لایه ژلاتین و پیک ۳ به دولایه‌ای سیلیکون متخلخل-ژلاتین مربوط است. اما بلافاصله پس از وارد کردن بافر، با توجه به تورم لایه ژلاتین باقی‌مانده در روی لایه متخلخل در محیط بافری و نزدیک‌شدن ضریب شکست ژلاتین به ضریب شکست بافر، ارتفاع پیک‌های دوم و سوم در بافر کاهش

شکل ۲ (a) طیف‌های بازتاب‌شده از نمونه سیلیکون متخلخل را پس از ساخت، بعد از مراحل به ترتیب اکسایش، اصلاح سطح با APTES، لایه‌نشانی ژل و بلافاصله پس از وارد کردن بافر (pH برابر ۷/۴) نشان می‌دهد. شکل ۲ (b) نشان‌دهنده منحنی‌های تبدیل فوریه از طیف‌های شکل ۲ (a) است. مکان قله‌های مشاهده‌شده در این شکل، کمیت EOT مربوط به لایه‌ها را نشان می‌دهد [۲۶]. مقدار اخیر برای لایه سیلیکون متخلخل، 12080 nm است که پس از اکسایش به 11220 nm کاهش می‌یابد. این کاهش ناشی از اکسایش اتم‌های سطحی سیلیکون درون حفره‌هاست



شکل ۲- (a) طیف بازتاب تداخلی از سیلیکون متخلخل پس از ایجاد تخلخل، اکسایش، اصلاح سطح با APTES، لایه‌نشانی ژل و هیبرید سیلیکون متخلخل-ژلاتین در مجاورت بافر، (b) طیف تبدیل فوریه مربوط به آن‌ها و (c) مقایسه مقدار تغییرات EOT سیلیکون متخلخل پس از ایجاد تخلخل، اکسایش، اصلاح سطح با APTES، لایه‌نشانی ژل و هیبرید سیلیکون متخلخل-ژلاتین (تمام آزمایش‌ها حداقل با سه تکرار انجام شده است).

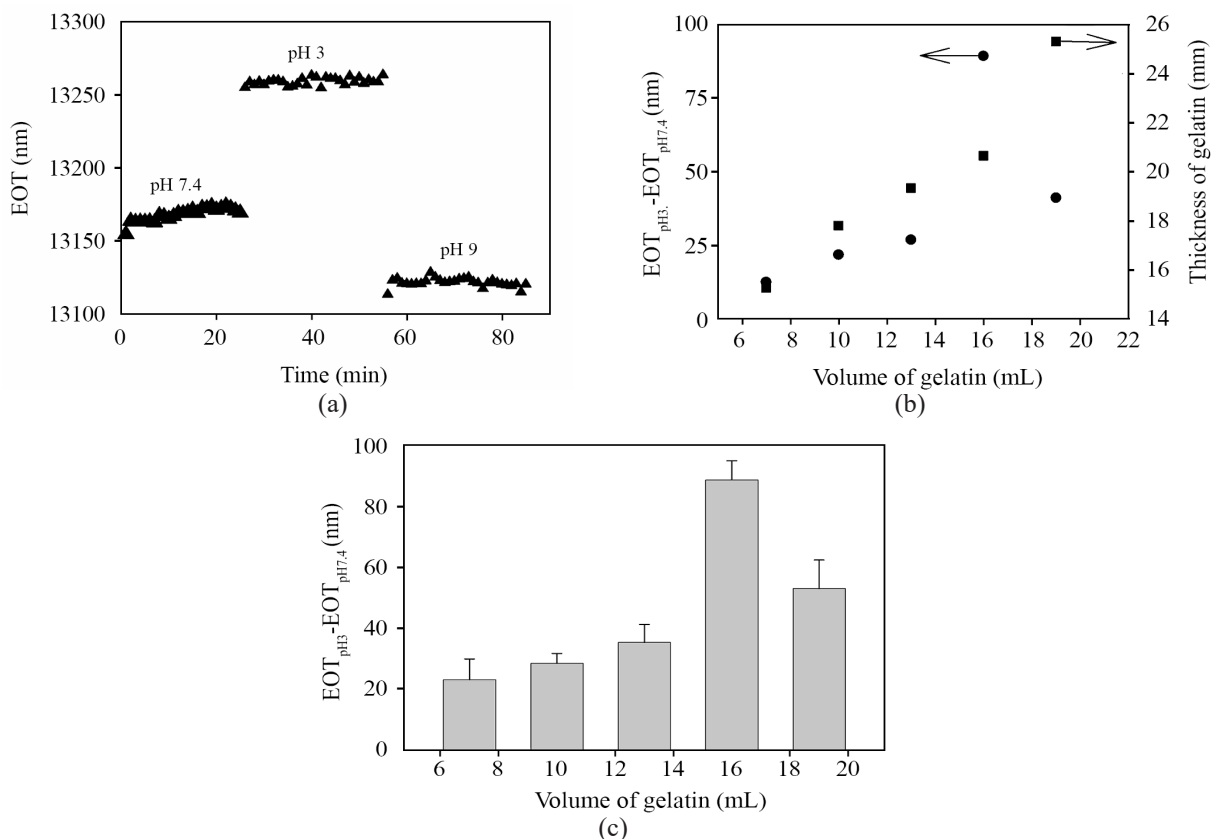
Fig. 2. (a) Interference reflection spectra of porous silicon after porosity creation, oxidation, surface modification with APTES, gel deposition and porous silicon-gelatin hybrid in the presence of buffer, (b) their corresponding Fourier transform spectra, and (c) comparison of the changes in EOT of porous silicon after porosity creation, oxidation, surface modification with APTES, gel deposition, and porous silicon-gelatin hybrid (all experiments were performed with at least three repetitions).

داده شد، با عبور اولین محلول از روی نمونه، پیک مربوط به لایه ژلاتین (پیک ۲ در شکل ۲ (b)) و نیز لایه ژلاتین-سیلیکون متخلخل (پیک ۳ در شکل ۲ (b)) به سرعت دچار افت شدت شد. به طوری که تشخیص محل این پیک‌ها از نوفه‌های موجود امکان‌پذیر نبود. این مشاهده، به دلیل تورم لایه ژل و نزدیک شدن ضریب شکست این لایه به ضریب شکست محیط پیرامونی اتفاق می‌افتد و با نتایج نظری تطابق کامل دارد [۲۶]. بنابراین، محل پیک اول، معیاری برای تشخیص انتخاب شد. شکل ۳ (a)، مقدار EOT استخراج شده (از مکان پیک ۱) حین آزمایش تغییر pH محلول‌ها را برای یکی از نمونه‌ها (مقدار حجمی ژلاتین ۱۶ μL)، نشان می‌دهد. همان‌طور که مشاهده می‌شود، با تغییر pH از ۷/۴ به ۳، مقدار EOT از میانگین ۱۳۱۷۰ nm به سرعت به مقدار ۱۳۲۶۰ nm افزایش می‌یابد. از آنجا که ژلاتین

شدید یافته [۲۶] و تشخیص آن‌ها را از نوفه مشکل می‌سازد. تنها پیک باقی‌مانده در این منحنی پیک مربوط به لایه سیلیکون متخلخل است که به دلیل نفوذ ژلاتین، ضریب شکست بزرگ‌تری پیدا کرده و به مقدار ۱۳۱۶۸ nm جابه‌جا شده است. بنابراین در ادامه این پژوهش، از مکان همین پیک به عنوان نقطه تشخیصی استفاده شد. شکل ۲ (c) مقایسه مقدار تغییرات EOT را پس از انجام چند آزمایش در تمام مراحل از ساخت سیلیکون متخلخل تا لایه‌نشانی ژلاتین را نشان می‌دهد.

مطالعه اثر pH‌های مختلف بر هیبرید سیلیکون متخلخل-ژلاتین

در این مرحله، نمونه هیبرید سیلیکون متخلخل-ژلاتین درون یک سلول سیالی قرار گرفت [۳۱] و محلول با pH‌های مختلف، به ترتیب از روی نمونه، عبور داده شد. همان‌طور که در بخش قبلی توضیح

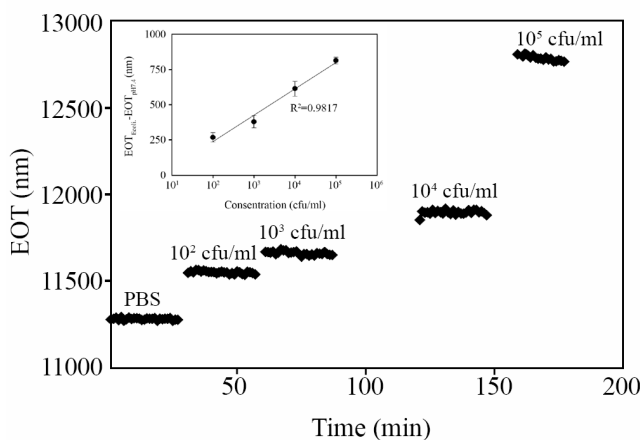


شکل ۳- (a) مقدار EOT در سه محیط با pH‌های ۷/۴ (خنثی)، ۳ (اسیدی) و ۹ (بازی) مربوط به نمونه‌ای با مقدار ۱۶ μL ژلاتین، (b) مقدار تغییرات EOT در دو محیط با pH‌های ۷/۴ (خنثی)، ۳ (اسیدی) در نمونه‌های با مقادیر و ضخامت‌های مختلف ژلاتین و (c) مقایسه مقدار تغییرات EOT در دو محیط با pH‌های ۷/۴ (خنثی) و ۳ (اسیدی) در نمونه‌های با مقادیر مختلف حجمی ژلاتین (تمام آزمایش‌ها حداقل با سه تکرار انجام شده است). Fig. 3. (a) The value of EOT in three environments with pH of 7.4 (neutral), 3 (acidic), and 9 (basic) corresponding to a sample with 16 microliter of gelatin, (b) the amount of changes in EOT in two environments with pH 7.4 (neutral), and 3 (acidic) in samples with different quantities and thicknesses of gelatin, and (c) comparison of the rate of EOT changes in two environments with pHs of 7.4 (neutral) and 3 (acidic) in samples with different volumetric amounts of gelatin (all experiments were performed with at least three repetitions).

EOT مربوط به لایه سیلیکون متخلخل-ژلاتین محاسبه شد (شکل ۴). نتایج نشان داد، با افزایش غلظت باکتری، به دلیل اسیدی شدن بیشتر محیط، تورم ژلاتین نیز بیشتر شده و بر مقادیر EOT اضافه می شود. در شکل ۴ (شکل داخلی) مشاهده می شود، رابطه بین تغییرات EOT برحسب غلظت باکتری بین غلظت های 10^2 تا 10^5 کلنی بر میلی لیتر، یک رابطه خطی است.

ارزیابی اثر زمان بر رشد باکتری *E. coli*

در این مرحله ابتدا تعلیق باکتری به مدت ۲۰ min در دمای معمولی قرار داده شد و پس از آن به منظور بررسی رشد باکتری، تعلیق در زمان های مختلف در دمای 37°C درون گرم خانه قرار گرفت. در مرحله بعد، پس از گذشت ۲۰، ۴۰، ۶۰، ۸۰ و ۱۰۰ min از کشت باکتری، تعلیق های حاصل از روی نمونه هیبرید سیلیکون متخلخل-ژلاتین درون سلول سیالی عبور داده شده و طیف بازتاب نمونه ها ثبت و تبدیل فوریه آن ها انجام شد. شکل ۵ مقدار تغییرات EOT هیبرید سیلیکون متخلخل-ژلاتین در نقاط مختلف زمانی طی گرم خانه گذاری (incubation) باکتری را نشان می دهد. همان طور که نشان داده شده با افزایش زمان گرم خانه گذاری (37°C)، باکتری رشد بیشتری داشته است در نتیجه تولید مقدار محصولات متابولیک بیشتر و محیط اسیدی تر شده و



شکل ۴- مقدار EOT هیبرید سیلیکون متخلخل-ژلاتین در غلظت های مختلف *Escherichia coli* (شکل داخلی: تغییرات EOT نسبت به حالت بافر در غلظت های مختلف باکتری) (تمام آزمایش ها حداقل با سه تکرار انجام شده است).

Fig. 4. The EOT value of porous silicon-gelatin hybrid in the presence of different concentrations of *Escherichia coli* bacteria (inner figure: EOT changes compared to the buffer state in different concentrations of bacteria).

نوع A دارای نقطه ایزوالکتریک حدود ۹-۶ است. در pH اسیدی بار مثبت گروه های آمین به جذب بیشتر بافر و تورم بیشتر هیدروژل منجر می شود که با افزایش EOT همراه است. در این پژوهش، از درصد بسیار کم گلو تار آلدهید (۲/۵٪) به عنوان شبکه ای کننده استفاده شد که با وجود اینکه استحکام و پایداری را با اتصال به گروه های آمین بهبود می بخشد، می تواند درصد تورم هیدروژل را کاهش دهد. اما، گلو تار آلدهید در غلظت های زیاد اثر بیشتری بر کاهش تورم خواهد داشت. بنابراین، برای استحکام بیشتر ساختار ژلاتین و تکرارپذیری آزمایش ها از غلظت بسیار کم گلو تار آلدهید (۲/۵٪) استفاده شد که این مقدار نیز بهینه سازی شد [۳۲].

اسیدی شدن محیط، می تواند دو اتفاق را هم زمان سبب شود. اول آنکه، ژلاتین داخل حفره ها، منبسط شود و حجم بیشتری را در داخل حفره ها به خود اختصاص دهد. دوم آنکه به دلیل تورم لایه ژلاتین که روی سطح سیلیکون متخلخل قرار گرفته است، ژلاتین بیشتری وارد حفره ها شود. در هر حال، اثر تجمعی این دو پدیده، سبب افزایش ضریب شکست لایه متخلخل می شود و افزایش EOT را به دنبال دارد. در مرحله بعدی آزمایش، با ورود محلولی با pH برابر ۹، این بار واکنش معکوسی با حالت قبل رخ می دهد و سبب کاهش ضریب شکست لایه سیلیکون متخلخل-ژلاتین می شود و EOT به مقدار ۱۳۱۲۲ nm کاهش می یابد.

شکل ۳ (b) مقدار تغییرات EOT ناشی از تغییر pH بین ۷/۴ و ۳ را برای نمونه های مختلفی نشان می دهد که مقادیر حجمی متفاوتی از ژلاتین برای ساخت آن ها استفاده شده بود. بیشترین تغییرات این کمیت را نمونه ای نشان می دهد که مقدار حجمی ژلاتین استفاده شده، ۱۶ μL بوده است. در این شکل، همچنین مقدار ضخامت لایه ژلاتین محاسبه شده است. این محاسبه با توجه به مکان EOT مربوط به قله دوم در شکل ۲ (b) و در نظر گرفتن ضریب شکست ژلاتین به دست آمده است. شکل ۳ (c) نمودار ستونی مقدار تغییرات EOT ناشی از تغییر pH بین ۷/۴ و ۳ را برای نمونه های مختلف با مقادیر حجمی متفاوتی از ژلاتین را نشان می دهد. همان طور که مشاهده می شود، مقدار حجمی ۱۶ μL از ژلاتین بیشترین مقدار تغییرات را نشان می دهد.

ارزیابی غلظت های مختلف باکتری *E. coli* روی هیبرید سیلیکون متخلخل-ژلاتین

برای انجام این آزمایش، ابتدا بافر با pH خنثی از روی نمونه هیبرید سیلیکون متخلخل-ژلاتین درون سلول سیالی عبور داده شد. سپس به ترتیب تعلیق باکتری *E. coli* (suspension) با غلظت های 10^2 ، 10^3 ، 10^4 و 10^5 کلنی بر میلی لیتر عبور داده شد. حین تمام این مراحل، طیف بازتاب نمونه ها ثبت و تبدیل فوریه آن ها انجام شد. سپس،

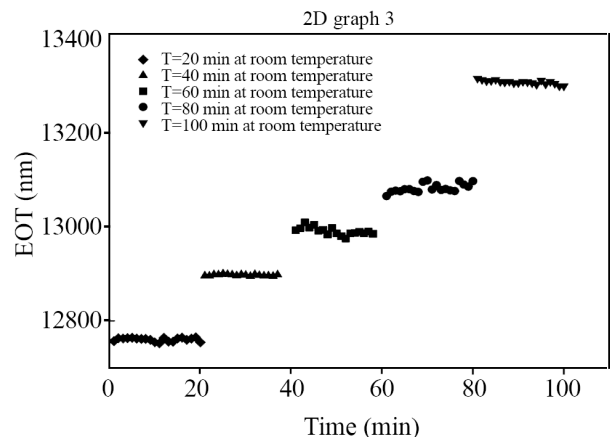
این ساختار به کمک APTES اصلاح شد. سپس، لایه‌ای از هیدروژل ژلاتین روی سطح قرار گرفت. آزمون EDX نشان داد، نفوذ ژلاتین به درون حفره‌ها انجام شده است. از آنجا که انقباض و انبساط ژلاتین تابعی از pH محیط است، بررسی و تحلیل طیف‌های بازتاب‌شده از نمونه‌ها در ناحیه مرئی و زیرقرمز و سپس تبدیل فوریه آن‌ها نشان داد، EOT (به همین ترتیب ضریب شکست) لایه متخلخل با کاهش pH محیط، افزایش و با افزایش آن، کاهش می‌یابد. افزایش ضریب شکست لایه متخلخل می‌تواند ناشی از انبساط لایه ژلاتین روی سطح و نفوذ بیشتر آن به درون حفره‌ها باشد. در حالی که به نظر می‌رسد، با انقباض ژلاتین، کاهش مقدار ژلاتین درون حفره‌ها مشاهده شد. از این خاصیت نمونه‌های هیبریدی سیلیکون متخلخل-ژلاتین برای تشخیص رشد باکتری استفاده شد. بدین منظور، نمونه‌ها ابتدا در معرض غلظت‌های مختلف باکتری قرار گرفتند. نتایج نشان داد، رابطه بین تغییرات EOT برحسب غلظت باکتری بین غلظت‌های 10^2 تا 10^6 کلنی بر میلی‌لیتر یک رابطه خطی است. همچنین داده‌ها نشان داد، افزایش زمان گرم‌خانه‌گذاری باکتری که به رشد باکتری منجر می‌شود، EOT را افزایش خواهد داد. از آنجا که ژلاتین، هیدروژلی در دسترس و ارزان‌قیمت بوده و از پایداری مناسبی برخوردار است، هیبرید این ماده با سیلیکون متخلخل، می‌تواند نانوحسگر مناسبی را برای نظارت بر وجود و رشد باکتری در اختیار قرار دهد.

قدردانی

این پروژه با حمایت مالی مرکز مطالعات و همکاری‌های علمی بین‌المللی وزارت علوم تحقیقات و فناوری انجام شده است.

مراجع

- Daszak P. and Jones K., Global Trends in Emerging Infectious Diseases, *Nature*, **451**, 990-993, 2008.
- Ikuta K.S., Swetschinski L.R., Aguilar G.R., Sharara F., Mestrovic T., and Gray A.P., 9: A Systematic Analysis for the Global Burden of Disease Study 2019, *The Lancet*, **400**, 2221-2248, 2022.
- Váradi L., Luo J.L., Hibbs D.E., Perry J.D., Anderson R.J., Orenge S., and Groundwater P.W., Methods for the Detection and Identification of Pathogenic Bacteria: Past, Present, and Future, *Chem. Soc. Rev.*, **46**, 4818-4832, 2017.
- Shen J., Zhou X., Shan Y., Yue H., Huang R., Hu J., and Xing D., Sensitive Detection of a Bacterial Pathogen Using Allosteric Probe-Initiated 267 Catalysis and CRISPR-Cas13a Amplification Reaction, *Nat. Commun.*, **11**, 267, 2020.
- Babalola O.O., Molecular Techniques: An Overview of Methods for the Detection of Bacteria, *Afr. J. Biotechnol.*, **2**, 710-713, 2003.
- Matys J., Kensy J., Gedrange T., Zawisłak I., Grzech-Leśniak K., and Dobrzyński M., A Molecular Approach for Detecting Bacteria and Fungi in Healthcare Environment Aerosols: A Systematic Review, *Int. J. Mol. Sci.*, **25**, 415, 2024.
- Nnachi R.C., Sui N., Ke B., Luo Z., Bhalla N., He D., and Yang Z., Biosensors for Rapid Detection of Bacterial Pathogens in Water, Food and Environment, *Environ. Int.*, **166**, 107357, 2022.
- Yi J., Wisuthiphaet N., Raja P., Nitin N., and Earles J.M., AI-Enabled Biosensing for Rapid Pathogen Detection: From Liquid Food to Agricultural Water, *Water Res.*, **242**, 120258, 2023.
- Vazquez-Gutierrez I.G., Reyes-López M.A., Ochoa S.A., Cruz-Córdova A., Hernández-Castro R., Orduña-Díaz A., and



شکل ۵- تغییرات EOT در نقاط زمانی مختلف طی گرم‌خانه‌گذاری باکتریایی.

Fig. 5. EOT changes at different time points during bacterial incubation.

مقدار EOT افزایش یافته است. این موضوع نشان‌دهنده افزایش مقدار متابولیت‌های ثانویه اسیدی با رشد باکتری‌ها بوده که کاهش pH را به همراه داشته است و موجب تورم لایه ژلاتین و افزایش EOT می‌شود.

نتیجه‌گیری

در این مطالعه، نانوحسگر نوری بر پایه بستر سیلیکون متخلخل و هیدروژل ژلاتین برای نظارت بر تغییرات اسیدی ناشی از رشد باکتری طراحی و مشخصه‌یابی شد. پس از ساخت سیلیکون متخلخل و اکسایش آن، سطح

- Xicohtencatl-Cortes J., Specific Detection of Uropathogenic *Escherichia coli* via Fourier Transform Infrared Spectroscopy Using an Optical Biosensor, *ACS Omega*, **9**, 27528-27536, 2024.
10. Vercauteren R., Gevers C., Mahillon J., and Francis L.A., Design of a Porous Silicon Biosensor: Characterization, Modeling, and Application to the Indirect Detection of Bacteria, *Biosens*, **14**, 104, 2024.
 11. Sun X., Agate S., Salem K.S., Lucia L., and Pal L., Hydrogel-Based Sensor Networks: Compositions, Properties, and Applications-A Review, *ACS Appl. Bio Mater.*, **4**, 140-162, 2020.
 12. Ma J., Zhong J., Sun F., Liu B., Peng Z., Lian J., and Zhang T., Hydrogel Sensors for Biomedical Electronics, *J. Chem. Eng.*, **481**, 148317, 2023.
 13. Sun X., Ding C., Qin M., and Li J., Hydrogel-Based Biosensors for Bacterial Infections, *Small*, **20**, 2306960, 2024.
 14. Deen G.R. and Loh X.J., Stimuli-Responsive Cationic Hydrogels in Drug Delivery Applications, *Gels*, **4**, 13, 2018.
 15. Samal S.K., Dash M., Van Vlierberghe S., Kaplan D.L., Chiellini E., Van Blitterswijk C., and Dubruel P., Cationic Polymers and Their Therapeutic Potential, *Chem. Soc. Rev.*, **41**, 7147-7194, 2012.
 16. Zwioerek K., Bourquin C., Battiany J., Winter G., Endres S., Hartmann G., and Coester C., Delivery by Cationic Gelatin Nanoparticles Strongly Increases the Immunostimulatory Effects of CpG Oligonucleotides, *Pharm. Res.*, **25**, 551-562, 2008.
 17. Dabbaghi A., Jamshidi H., Zohuriaan-Mehr M.J., Kabiri K., and Ramazani A., Biobased Acids in Production of Hybrid Superabsorbent Polymer Hydrogels: A Review, *Iran. J. Polym. Sci. Technol. (Persian)*, **34**, 207-231, 2021.
 18. Firouzabadi V.J. and Kokabi M., Triple Stimuli Responsive Poly(vinyl alcohol) Chitosan/Nanoclay/Nanosilver Nano-composite Hydrogel, *Iran. J. Polym. Sci. Technol. (Persian)*, **39**, 3-14, 2019.
 19. Geramipour M., Kurdtabar M., and Bardajee G.R., Synthesis and Characterization of Iron Magnetic Nanocomposite Hydrogel Based on Modified Sodium Carboxymethyl Cellulose Using Acrylamide and Acrylic Acid and Investigation of Drug Delivery Properties, *Iran. J. Polym. Sci. Technol. (Persian)*, **29**, 265-275, 2016.
 20. Eshagh S., Abbaspour-Fard M.H., Tabasizadeh M., and Hosseini F., Effect of Zinc Oxide Nanoparticles on Mechanical, Thermal and Biodegradability of Gelatin-Based Bio-composite Properties Films, *Iran. J. Polym. Sci. Technol. (Persian)*, **32**, 411-426, 2019.
 21. Ofridam F., Tarhini M., Lebaz N., Gagnière É., Mangin D., and Elaissari A., pH Sensitive Polymers: Classification and Some Fine Potential Applications, *Polym. Adv. Technol.*, **32**, 1455-1484, 2021.
 22. Kocak G., Tuncer C., and Büttin V., pH-Responsive Polymers, *Polym. Chem.*, **8**, 144-176, 2017.
 23. Wu J. and Sailor M.J., Chitosan Hydrogel-Capped Porous SiO₂ as a pH Responsive Nano-valve for Triggered Release of Insulin, *Adv. Funct. Mater.*, **19**, 733-741, 2009.
 24. Tang Y., Zhen L., Liu J., and Wu J., Rapid Antibiotic Susceptibility Testing in a Microfluidic pH Sensor, *Anal. Chem.*, **85**, 2787-2794, 2013.
 25. Rahimi F., Porous Silicon Biosensors Based on Reflectometric Interference Fourier Transform Spectroscopy-Theoretical Foundations and Experimental Results, *Iran. J. Phys. Res.*, **21**, 251-262, 2021.
 26. Mehmandoust S. and Rahimi F., BRCA1 Detection by Porous Silicon Double-Layer via Reflectometric Interference Fourier Transform Spectroscopy, *Sens. Actuators A: Phys.*, **364**, 114795, 2023.
 27. Perelman L.A., Moore T., Singelyn J., Sailor M.J., and Segal E., Preparation and Characterization of a pH and Thermally Responsive Poly (N-isopropylacrylamide-co-acrylic acid)/Porous SiO₂ Hybrid, *Adv. Funct. Mater.*, **20**, 826-833, 2010.
 28. Mushtaq F., Raza Z.A., Batool S.R., Zahid M., Onder O.C., Rafique A., and Nazeer M.A., Preparation, Properties, and Applications of Gelatin-Based Hydrogels (GHs) in the Environmental, Technological, and Biomedical Sectors, *Int. J. Biol. Macromol.*, **218**, 601-633, 2022.
 29. Shajari G., Fathi M., and Erfan-Niya H., In Situ Gelling Hydrogels Based on Biodegradable Polymers for Effective Ocular Drug Delivery: A Review, *Iran. J. Polym. Sci. Technol. (Persian)*, **36**, 575-604, 2024.
 30. Mohammadi S., Rahimi F., Rezayan A.H., Mehrizi A.A., and Sedighi M., CRP and TNF- α Detection Using Porous Silicon Substrate Based on Reflectometric Interference Fourier Transform Spectroscopy, *Adv. Mater. Eng.*, **41**, 2022.
 31. Ghiasi Tarzi M., Rahimi F., Abouei Mehrizi A., Jalili Shahmansouri M., and Ebrahimi Hoseinzadeh B., Real-Time Biosensing of Growth Hormone on Porous Silicon by Reflectometric Interference Fourier Transform Spectroscopy, *Appl. Phys. A*, **128**, 1-8, 2022.
 32. Rocha-García D., de Lourdes Betancourt-Mendiola M., Wong-Arce A., Rosales-Mendoza S., Reyes-Hernández J., González-Ortega O., and Palestino G., Gelatin-Based Porous Silicon Hydrogel Composites for the Controlled Release of Tramadol, *Eur. Polym. J.*, **108**, 485-497, 2018.