

X. Évfolyam 2. szám - 2015. június

KURILLA Boldizsár
kurilla.boldizsar@gmail.com

BIOLÓGIAI ÁGENSEK LÉZERES FELDERÍTÉSE ROBOTOKRÓL

Absztrakt

A robotokon alkalmazható felderítési céllal megépített lézerek fejlesztése szempontjából a robotok hasznos teher vizsgálata fontos feladat, mellyel számos kutatás foglalkozott már. [1][2][3][4] Jelen cikk a lézer technológiákon alapuló, környezetben lévő biológiai ágensek felderítési lehetőségeiről szól. A lézeres felderítési lehetőségeken belül számos alkalmazás alapjául szolgál a LIDAR technológia. Napjainkban különösen fontos a lézertechnológia alapjául szolgáló bio- és kémiai detektorok, felderítő rendszerek elterjesztése a környezeti biztonság ellenőrzése céljából.

The robots payload analysis is an important task in the view of the lasers development used on robotic vehicles for reconnaissance, from which a lot of studies have already dealt with. [1][2][3][4] This article is about exploration opportunities of biological agents in the environment based on laser technology. Within the laser detection possibilities, many applications are based on LIDAR technology. In present days it is particularly important the dissemination of biological and chemical detectors underlying laser detection systems in order to control the safety of environment.

Kulcsszavak: bontási spektroszkópia, aeroszol, UV lézer, LIDAR ~ *breakdown spectroscopy, aerosol, UV laser, LIDAR*

BEVEZETÉS

A biológiai harcanyagok komoly veszélyt jelentenek mind a polgári lakosság, mind a katonai létesítmények számára. A biológiai ágensek legvalószínűbb terjesztési módja az aeroszolokon keresztül, belélegezhető részecskék formájában történhet meg, melyek méretei 1-10 μm közé is eshetnek. Ezért a környezetben lévő légúti patogének és egyéb szennyező anyagok, biológiai hulladékok, égéstermékek felismerése nagy jelentőséggel bír. Ebből kifolyólag a katonai alkalmazásban élő, biztonsági és környezetvédelmi szempontból hasznos technológiák hazai, civil életbe történő átvitele különösen fontos és célszerű feladat. Rendkívül komoly kihívást jelent az egyes felhők, légrétegek háttérben lévő aeroszolok megkülönböztethető biológiai ágenseinek detektálása, mert az ártalmatlan környezeti baktériumok és más élőlények, illetve virulens mikrobák összessége rendkívül finom különbségeket mutatnak detektálásukat illetően molekuláris összetevőikre vonatkozólag. Mivel ezek a finom változások, különbségek a molekuláknak igen kis százalékát érintik, ezért csak csekély hatással vannak a megfigyelhető optikai jelekre. Ennek köszönhetően a detektálásban a különböző jelek megkülönböztetése igen nehéz feladat. Mindezek mellett külön nehézséget jelenthet a közeg térfogatának, sűrűségének változása, különböző szennyező anyagok jelenléte, amelyek befolyásolhatják a közegben levő biológiai ágensek optikai „alírását”. Mindezek megnehezítik az elemző feladatokat és az egyes ágensek megkülönböztetését. [10]

Néhány új technológiai eljárásnak köszönhetően megvalósítható az egyes biológiai ágensek megkülönböztetése a levegőben, illetve a környezetben. Ilyen technológiák és eljárások közé tartozik az ultraviola lézer indukált fluoreszcencia (UV-LIF) különböző gerjesztő hullámhosszakkal, a lézer indukált bontási spektroszkópia (LIBS), az infravörös depolarizáció és a hosszuhullámú infravörös (LWIR) differenciál-szórás (DISC). Mindegyik technológiának megvannak a maga erősségei és a vele járó kihívások is, de már mindegyikkel sikerült demonstrálni a biológiai aeroszol felhők detektálását és megkülönböztetését.

A „Light detection and ranging” (LIDAR) technológiák képesek mikrométeres aeroszolókat detektálni térben meghatározott (akár több kilométeres távolságból) valós idejű mérések keretében.[5] A távolságot illetően a mérés néhány kilométerrel több, mint 10 kilométerre is hatásos lehet néhány faktor figyelembe vételével. Ilyen a hullámhossz, az optikai konfiguráció, a környezeti körülmények és a lézer teljesítménye.

Jelen cikk célja néhány lézertechnológián alapuló eljárás bemutatása a környezetben lévő, elsősorban biológiai ágensek detektálására.

MIKROMÉTER ÁTMÉRŐJŰ AEROSZOLÓK BIODETEKTÁLÁSA UV LÉZERREL

A mikrométer átmérőjű aeroszolok biodetektálása leginkább a lézer indukált fluoreszcenciával (LIF) valósítható meg. LIF kísérletekhez mindenképpen az UV tartományba eső hullámhosszra van szükség. Triptofán (a fehérjealkotó aminosavak egyike) gerjesztésre a 260 nm és 300 nm közötti tartomány a legoptimálisabb, míg a NADH (koenzim, mely megtalálható minden élő sejtben) gerjesztésére a 350 nm körüli hullámhossz az alkalmasabb. Különböző flavinok (elsősorban riboflavinok) gerjesztése is lehetséges. Riboflavin esetén a közös gerjesztési hullámhossz 450 nm körül van. Ahhoz, hogy jó jel-zaj arányhoz jussunk, intenzív lézerimpulzusokat kell használnunk (több tíz ns-os impulzusok néhány mJ energiával). Mivel átlagosan igen rövid idő alatt sok impulzusra van szükség, magas impulzus ismétlési sebesség kívánatos (több száz Hz). [6]

Jelen helyzetben a legnagyobb impulzus energiákat UV tartományban a következő lézerekkel lehet elérni:

- Frekvencia háromszorozott (355 nm) és négyszerezett (266 nm) villanó-lámpa pumpált Nd: YAG lézer. Ez egy jól bevált koncepció a korlátozott élettartam ellenére (30 millió lövés 100 Hz-es pulzusokkal), ugyanis 5-50 ns-os impulzusok előállítása lehetséges akár néhány száz mJ energiával.
- Egy excimer lézer. Ez egy gáz lézer, melynek kimeneti hullámhossza a felhasznált gázok keverékétől függ. Xenon és klorid keveréke 308 nm-es hullámhossz előállítását teszi lehetővé, míg Xenon és fluorid 351 nm-eset. Mindkettő alkalmas magas impulzus arányok és magas energia előállítására, de maga a lézer tömege nagy (100 kg fölötti). Ebből kifolyólag csak makro robotok fedélzetén lehetne alkalmazni. A legnagyobb probléma vele mégis az, hogy nem hatékony az általunk végrehajtandó mérések elvégzéséhez.

Egy másik megközelítés:

- Frekvencia háromszorozott és négyszerezett dióda pumpált Nd: YAG lézer. Egy ilyen rendszer meglehetősen kis mérete mellett lehet nagy hatásfokú és hosszú élettartamú. Ezek azonban a nagy impulzusismétlési mérték mellett mérsékelt impulzusenergiával bírnak vagy nagy impulzusenergia mellett mérsékelt az impulzusismétlési szám. A legtöbb diódapumpált lézerrendszernek ez egy alapvető tulajdonsága. Ettől függetlenül elő lehet állítani igen magas impulzusenergiával bíró rendszereket óriási költségek mellett.
- Ha 266 nm-en és 355 nm-en kívül más hullámhosszúságú fénysugarat akarunk előállítani, akkor ez egyéb nemlineáris optikai eljárásokkal megvalósítható. A triptofán esetén az optimális gerjesztési hullámhossz 280-290 nm. Ezt 589 nm-es és 532 nm-es hullámhossz frekvencia egyesítésével lehet megvalósítani egy optikai parametrikus oszcillátor 266 nm-es hullámhosszúságú fényforrással való pumpálásával. Az ilyen lézerberendezéseknél a nagy impulzusenergiák előállítása már nagyobb kihívás és a rendszer összetettsége is komplikáltabb. [6]

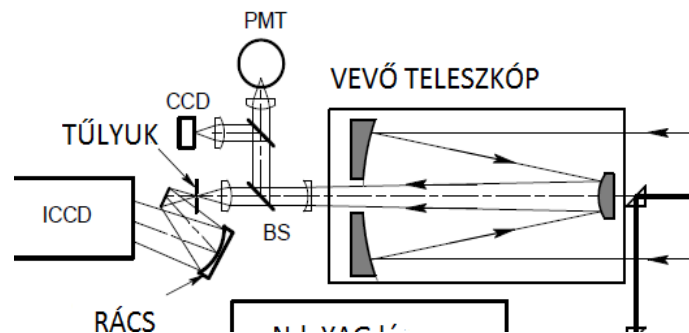
BIOLÓGIAI ÁGENSEK LÉZERES DETEKTÁLÁSA LIDAR TECHNOLÓGIÁVAL

Ha LIDAR technológiát alkalmazunk, ahol fényforrásként ultraviola (UV) fényt használunk, akkor a sugárzás a fénysugár útjában indukálhat fluoreszcenciát aeroszollá alakult anyagból. Ez az úgynevezett lézer indukált fluoreszcencia (LIF), mellyel azt is ki lehet mutatni, hogy az adott felhő biológiai ágensekkel rendelkezik a természetben. Természetesen más anyagok is jelen vannak a környezetben, melyek fluoreszkáló hatást mutatnak UV fényvel való megvilágítás esetén. Ilyenek a pollenek, fűtőolajok és a mezőgazdasági vegyszerek is. Az UV fény gerjesztési hullámhosszra jelenleg a LIF LIDAR technológia a legjelentősebb eszköz az érzékelési távolságot és hatékonyságot illetően. Ezek az eszközök általában 266 nm-es és 355 nm-es hullámhosszú fényt használnak, mely Nd: YAG lézerekből relatíve könnyen előállítható. Hogy melyik hullámhosszra van szükség, az attól függ, hogy a környezetben milyen biológiai ágenseket akarunk elsősorban detektálni. A 266 nm-es UV fény elsősorban a triptofán által gerjeszt fluoreszcens hatást, mely egy aminosav a bakteriális sejtfalon belül és hasonló hatást lehet elérni a tirozin által is. NADH és flavinok esetén csak alacsonyabb mértékben érhető el ez a hatás ezen a hullámhosszon, míg 355 nm-es gerjesztési hullámhossz esetén a fluoreszcencia sokkal intenzívebb a NADH-nál, illetve flavinoknál, de triptofán esetén nem mutatható értékes eredmény ennél a hullámhossznál. [6] A fentiekből kifolyólag a 266 nm-es hullámhossz a legmegfelelőbb a triptofán gerjesztésére és mindemellett magasabb fluoreszcencia

keresztmetszete van. [7] A NADH 355 nm-es hullámhosszon történő gerjesztése során a bakteriális spórák életképességéről kaphatunk információt. [8] Ezek mellett nagyon fontos kiemelni, hogy a légköri ózon csillapítási tényezője a 266 nm-es hullámhosszúságú fényre vonatkozólag 10-szer nagyobb, mint a 355 nm-es fény esetén. Ebből kifolyólag a 355 nm-es LIDAR érzékenységi tartománya jóval nagyobb távolságra mutat.

Utahban terveztek egy UV lézer indukált fluoreszcencia (LIF) távérzékelési rendszert, melynek célja az volt, hogy megépítsenek egy olyan LIDAR technológián alapuló rendszert, mely alkalmas a környezetben lévő biológiai aeroszolok detektálására minél nagyobb távolságból, emellett olcsó legyen és relatíve kicsi méretű. Végeredményképpen sikerült megépíteni a rendszert, mely egy kisebb teherautóra, vagy terepjáróra felszerelhető és 0.5 km-től 5 km-es távolságig alkalmazható (időjárástól függően) a biológiai ágensek érzékelésére. [9]

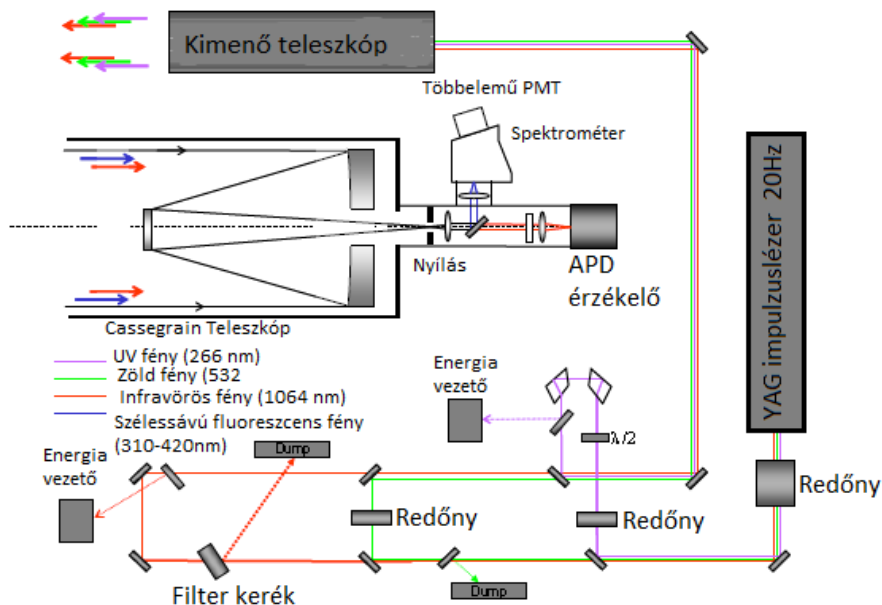
A rendszerben egy villanólámpa által pumpált, frekvenciaháromszorozott, Q-kapcsolt ND:YAG lézer produkálja a 10 ns hosszúságú, 355 nm-es gerjesztési impulzusokat. A visszavert és fluoreszcens nyalábot egy ún. Maksutov teleszkóp gyűjti be és irányítja át egy hosszán áteresztő, kettőstörő nyalábosztón, mely a 360 nm-nél alacsonyabb hullámhosszúságú fényt visszatükrözi, tehát effektíven elválasztja a visszavert lézert fényt a LIF fénytől. A szórt fényt a rendszer belefókuszálja egy fotoelektron sokszorozóba (PMT), mely ezt érzékeli és ezt követően a rendszer digitális jellé alakítja, hogy eredményt lehessen kapni az aeroszokról visszavert fény intenzitásáról a távolság függvényében 1.5 m felbontással. A LIF-et egy teleszkóp gyűjti be, mely átmegy egy hosszán áteresztő szűrőn és végül a képalkotó spektrométer bemeneti nyílásába van fókuszálva. A LIF spektrumot egy kapuzott, intenzív töltéscsatolású eszköz érzékeli (ICCD). [9] Az alábbi ábrán az Ares LIDAR rendszer optikai vázlatát látható.



1. ábra. Az Ares UV LIF LIDAR rendszer optikai sematikus ábrája [9]

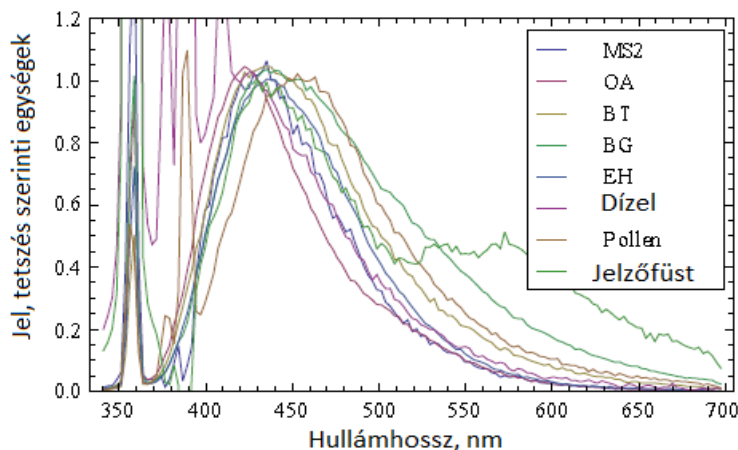
A német CBRN központban már több hullámhosszú LIDAR rendszert is teszteltek, mely működik 1064 nm-en, 532 nm-en depolarizációs mérésekhez és 266/355 nm-en, hogy a felhőkből fluoreszcenciát váltsanak ki. [6]

Az alábbi ábrán egy több hullámhosszú LIDAR rendszer ábrája látható.



2. ábra. Egy több hullámhosszúságú LIDAR rendszer sematikus ábrája [6]

A norvég rendszer valamivel egyszerűbb, mégis igen hasznos eredményeket lehet vele elérni. A biológiai anyagokról nagy felbontású spektrumot tud készíteni és egy 355 nm-es frekvencia háromszorozott ND:YAG lézerforrás segítségével megy végbe a fluoreszcencia gerjesztés. A lézer ismétlési sebessége 10 Hz és 150 mJ energiát eredményez mindössze 5 ns impulzus hosszal. A berendezés össztömege mindössze 70 kg. A rendszerben lévő PMT által érzékelt fény adja az információt az aeroszok jelenlétéről és a LIDAR rendszertől való távolságukról. Az érzékelő rendszer spektrális felbontása 7 nm. A rendszer tartalmaz egy 300 μm átmérőjű optikai szálát és egy 300 vonal/mm-es rácsot a spektrográfban. [6] Az alábbi ábrán a különböző szennyezőanyagok jelerősségét figyelhetjük meg a hullámhossz függvényében 340 nm és 680 nm között.



3. ábra. A szennyezőanyagok jelerőssége a hullámhossz függvényében [6]

Megfigyelhetjük, hogy az erős jelek 350 nm és 410 nm között vannak. Ez köszönhető a rugalmas visszaszórásnak (355 nm), az oxigénről történő Stokes-eltolt Raman visszaverődésnek (376 nm), a nitrogénnek (386 nm) és a vízpárának (408nm). [6]

BIOLÓGIAI ÁGENSEK DETEKTÁLÁSA LÉZER INDUKÁLT BONTÁSI SPEKTROSKÓPIÁVAL

Általánosan elfogadott, hogy egy tipikus bontási eljárás során egy adott energiamennyiség befektetésével a mikro méretű részecskék párologtatása és a molekulák atomi szintre bontása az adott plazmában megvalósulhat. A legnagyobb részecskék, melyeket el lehet párologtatni a részecskék LIBS detektálási eljárásával követve, a becslések szerint 2,5 mm és 10 mm közé esik. Ez természetesen függ a részecske összetételétől és a lézer teljesítményétől. A LIBS technológiai eljárás alapján egy lézer impulzust nagyon kis pontra fókuszálunk össze, hogy létrehozzunk egy mikro plazmát a környezetben lévő, adott levegő tartalomából származó mintának lézerrel történő bontása során. A plazmaköteg belsejében az anyag ionizálódik, és atomi összetevőire lebomlik. A forró plazma egy termikus gerjesztési forrás az atomizált részecskék számára a plazma térfogatán belül. A kisugárzás spektrálisan bontott az elektromosan gerjesztett atomokból és ionokból. Ezeket arra használjuk, hogy meghatározzuk a minta elemi összetételét.

Egyetlen bioaeroszol detektálása úgy valósulhat meg, ha figyelembe vesszük a részecskében az összes jelen levő elemek abszolút tömegét és szem előtt tartjuk a LIBS detektálási határait. Egyetlen baktérium spóra általában kisebb méretű, mint egy tipikus bioaeroszol részecske. Ezt leginkább egy henger alakú részecskéhez lehet hasonlítani 2,5 µm hosszúsággal, 1,5 µm átmérővel, melynek sűrűsége 1 g/cm³. [10] A biológiai organizmusok sokféle szerves elemet tartalmaznak, melyek könnyen detektálhatók. Ilyenek a kalcium (Ca), magnézium (Mg), mangán (Mn), vas (Fe), foszfor (P), kálium (K) és a szilícium (Si). [11] Korábban már sikerült hordozható LIBS technológiával a nátrium, kalcium, magnézium és alumínium kimutatása és mérése a környezeti aeroszolokban. [12] Az abszolút tömegüket 0,5 (Ca), 1,2 (Mg), és 3,3 (Na) fg-ra (10⁻¹⁵g) határozták meg. Egyes esetekben ezen elemek relatív mennyisége a különböző osztályú organizmusokban változhat. Az jól ismert, hogy a spóráképződés folyamán a bakteriális spórák kalcium dipicolinátumba koncentrálnak. [13]

Az első táblázat hét elem laboratóriumi elemzését mutatja három típusú spórás szénabacillusra (*Bacillus subtilis*, Bg), a lépfenebacillusra (*Bacillus anthracis*) és három különböző fajtájú gomba spórára vonatkozólag.

1. Táblázat. A Bg és a szennyező anyagok elemi analízise [10]

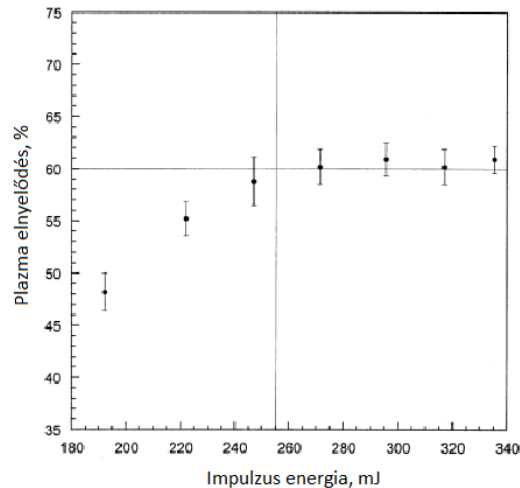
Elem*	Bg			Gomba spórák (szennyezőanyagok)		
	1	2	3	Zab	Búza	Kukorica
Ca	1.16	1.08	10.21	0.16	0.0147	0.12
Mg	0.30	0.37	2.80	0.20	0.0937	0.19
Na	0.45	0.38	5.82	0.0132	0.0110	0.0171
K	0.49	0.49	0.68	1.60	2.24	1.63
Fe	0.67	0.57	0.0088	0.0253	0.0032	0.0081
P	2.30	2.32	8.52	0.44	0.41	0.58
Mn	0.0081	0.0122	0.10	0.006	0.0024	0.0037

*Elemi koncentráció tömegszázalékban

A Bg a talajban általánosan fellelhető Gram-pozitív, kataláz-pozitív baktérium. Ez pálcika formájú, és képes a kedvezőtlen környezeti körülmények közti túlélést biztosító, szívós endospórát létrehozni. [14] Bár a Bg mintákon belül a szerves fajok tömegszázalékos aránya változik, a relatív arányok meglehetősen hasonlóak maradnak. További érdekesség a Bg minták és a gomba spórák között a P, Ca, K és Na arányai közti jelentős különbségek. Ez arra utal, hogy az elemi analízis széles körű osztályozási lehetőséget kínál a biológiai aeroszolok területén. Ezekre alapozva ki lehet mutatni az egyes elemeket egyetlen bioaeroszol részecskében 0.1%-os tömegkoncentrációval. Ismerve a Bg-ben szereplő elemek

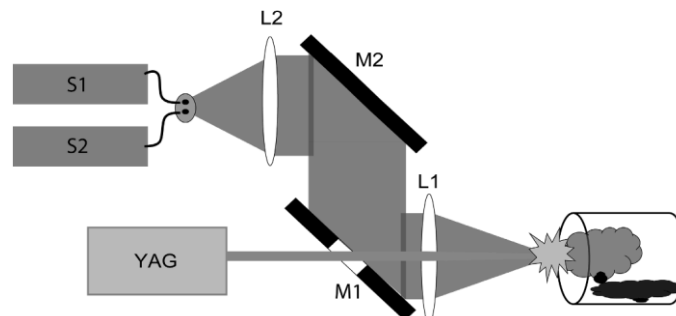
koncentrációját arra lehet következtetni, hogy a LIBS képes detektálni őket egyetlen spórában is.

Fontos kiemelni, hogy a plazma a felelős a mintában lévő elemek párolgásáért és gerjesztéséért is. Ebből kifolyólag a kedvező jel-zaj arány és reprodukálhatóság szempontjából a plazma stabilitása kritikus tényező a LIBS technológiai eljárás folyamán. A lézer teljesítményének növelésével a levegőben lévő plazmák telítettségi hatást mutatnak. Korábban már megfigyelték, hogy a plazma a beeső lézertény energiájának egyre nagyobb százalékát nyeli el. Ha az impulzus energia 192 mJ, ami 100%-os bontási frekvenciát biztosít, akkor a plazma a bemenő impulzus energiájának 48%-át nyeli el. Ezen érték felett, az elnyelt energia százalékos aránya folyamatosan növekszik maximum 60% körüli értékre 250-260 mJ impulzus energia szintig. [15] Az alábbi ábrán ez a folyamat jól megfigyelhető.



4. ábra. A lézer indukált plazma által elnyelt beeső impulzus energia százalékos aránya a lézer impulzus energia függvényében. A folytonos vonalak jelenti a látszólagos telítettségi értéket 60%-on 255 mJ impulzus energiával. [15]

A későbbiekben a mérések elvégzéséhez egy szélessávú LIBS berendezést alkalmaztak a sűrűbb aeroszolok spektrumának megszerzéséhez, mely a 200-825 nm-es hullámhossz tartományban meg is valósult. Ez azért is volt fontos, hogy minél jobban ki tudják mutatni a különbséget a különböző aeroszolok között. Mivel a szélessávú rendszer nem volt képes egyedi részecskék detektálására, ezért egy sokkal érzékenyebb spektrométer segítségével, illetve intenzív töltés csatolású CCD rendszerrel egy keskeny spektrális ablakban demonstrálták a szimpla Bg részecske detektálását. Az alábbi ábrán egy olyan berendezés látható, melyet a multi-részecske LIBS spektrum rögzítésére használtak. [10]



5. ábra. A kísérleti LIBS rendszer. A plazma előállítására a Big Sky Ultra CFR-GRM Nd: YAG lézer (YAG) szolgál. [10]

Egy 75 mm-es fókuszáló lencse (L1) szolgál mind a lézer impulzus fókuszálására és mind a plazma kisugárzás begyűjtésére az ellenkező irányban. Egy átfűrt alumínium tükör segítségével a plazmakisugárzás a gyűjtő optika irányába terelődik. Egy 100 mm fókusz távolságú lencse

(L2) segítségével a kisugárzás egy kettéosztott szálkötegbe (BF) terelődik. A szálak a sugárzást két Ocean Optics HR2000 spektrométerbe (S1: 613-825 nm és S2: 200-650 nm) vezetik.

Szimpla Bg részecskék méréséhez azonban egy sokkal érzékenyebb CCD rendszert alkalmaztak, melyben a frekvencia kétszerezett Big Sky CFR-400 Nd: YAG lézer névleges impulzus energiája 200 mJ. Egy mintaküvetében lévő levegő plazma előállításához az impulzus üzemmódot 1 Hz és 10 Hz között kellett tartani. [10]

ÖSSZEGZÉS, KÖVETKEZTETÉSEK

Ahogy társadalmunkban a környezetben lévő (veszélyes) biológiai ágensek terjedése, egyre aktuálisabb problémákat vet fel, kimutatásuk és azonosításuk mára már nagyon fontos feladattá vált. A cikkben több technológiai eljárásba kaphattunk betekintést, melyek a légkörben lévő biológiai ágensek kimutatására szolgálnak. A kimutatáshoz mindenképp célszerű UV lézert alkalmazni. A LIDAR rendszer számos alkalmazása mellett a biológiai szennyező anyagok, ágensek érzékelése és kimutatása akár több km-es távolságból is megvalósulhat. Emellett egyértelművé vált, hogy a LIBS jelentős potenciállal bír a bioaeroszolok osztályozása területén. Ha kültéri környezetben kis mennyiségben előforduló aeroszolok detektálását vesszük figyelembe, akkor mindenképpen a laboratóriumi mérésekhez kell visszanyúlni, de a LIBS képességeit a kültéri környezetben kell kiértékelni. A közeljövőben már sokkal intenzívebb, érzékenyebb CCD kamerák alkalmazására kerülhet sor a mérések elvégzéséhez. A PMT-polikromátor érzékelő konfiguráció alkalmas arra, hogy szimpla részecskéket detektáljunk a széles spektrális tartománynak és a magas érzékenységek köszönhetően.

Felhasznált irodalom

- [1] Enric Pastor, Juan Lopez and Pablo Royo: A hardware/software architecture for uav payload and mission control, 2006
- [2] Silviu S. Craciunas, Christoph M. Kirsch, Harald Röck, Rainer Trummer: The JAviator: A High-Payload Quadrotor UAV with High-Level Programming Capabilities, letöltés ideje: 2014. 12.02
- [3] P. Molina et. al: Navigation and remote sensing payloads and methods of the sarvant unmanned aerial system, 2013
- [4] Calvin Coopmans: Architecture, inertial navigation, and payload designs for low-cost unmanned aerial vehicle-based personal remote sensing, MSc thesis, Utah State University, 2010
- [5] Measures, R.M., "Laser Remote Sensing – Fundamentals and Applications", Kreiger Publishing Company, Krieger Drive, Malabar, Florida, 32950, 1992.
- [6] Laser based stand-off detection of biological agents, RTO technical report, 2010
- [7] Seaver, M., Roselle, D.C., Pinto, J.F. and Eversole, J.D., "Absolute Emission Spectra from *Bacillus subtilis* and *Escherichia coli* Vegetative Cells in Solution", Applied Optics, 37, 5344-5347, 1998.
- [8] Laflamme, C., Verreault, D., Lavigne, S., Trudel, L., Ho, J. and Duchaine, C., "Autofluorescence as a Viability Marker for Detection of Bacterial Spores", Front Biosci 10, 1647-1653. 2005.
- [9] R. L. Schmitt et al: Ares Ultraviolet Laser Induced Fluorescence (UV LIF) Standoff System Development and Testing

- [10] JOHN D. et al: Laser-Induced Breakdown Spectroscopy Detection and Classification of Biological Aerosols, *Applied spectroscopy*, Volume 57, Number 10, 2003
- [11] M. T. Madigan, J. M. Martinko, and J. Parker, *Brock Biology of Microorganisms* (Prentice Hall, Upper Saddle River, New Jersey, 1997), 8th ed., p. 5.
- [12] J. E. Carranza, B. T. Fisher, G. D. Yoder, and D. W. Hahn, *Spectrochim. Acta, Part B* 56, 851, 2001
- [13] G. Gould and A. Hurst, *The Bacterial Spore* (Academic Press, London, 1969), p. 247.
- [14] Madigan M, Martinko J (editors).. *Brock Biology of Microorganisms*, 11th, Prentice Hall (2005).
- [15] J. E. Carranza and D. W. Hahn, *Spectrochim. Acta, Part B* 57, 779 (2002).