

Phát hiện vi khuẩn bằng đĩa giấy lọc hấp phụ luciferase và luciferin

Nguyễn Thị Dung*

Trường Đại học Công nghệ, Đại học Quốc gia Hà Nội

Ngày nhận bài 15/10/2018; ngày chuyển phân biện 19/10/2018; ngày nhận phân biện 26/11/2018; ngày chấp nhận đăng 18/12/2018

Tóm tắt:

Sự có mặt của các loại vi khuẩn trong môi trường không khí, đất và nước là một trong những nguyên nhân chính gây ra các bệnh về đường hô hấp và các bệnh ngoài da cho con người và các loại vật nuôi. Do đó, việc phát hiện sớm các vi khuẩn quanh môi trường sống là yếu tố then chốt để ngăn chặn mọi nguy hại phát sinh từ vi khuẩn. Trong nghiên cứu này, tác giả thiết kế và xây dựng một giấy lọc nhỏ có đường kính khoảng 0,5 cm được hấp phụ thêm luciferin và enzym luciferase. Giấy lọc này có khả năng định lượng được lượng vi khuẩn trong mẫu thông qua việc định lượng hàm lượng ATP có trong vi khuẩn. Quy trình chế tạo giấy lọc hấp phụ luciferase và luciferin đã được tối ưu hóa. Giấy lọc hấp phụ luciferase và luciferin cho thấy khả năng giữ ổn định luciferase và luciferin trong 30 ngày ở điều kiện nhiệt độ phòng, và khả năng phát hiện nồng độ *E. coli* có thể lên tới $1,17 \times 10^3$ CFU/ml. Phương pháp phát hiện vi khuẩn qua việc định lượng hàm lượng ATP bằng giấy lọc hấp phụ luciferase và luciferin có thể giảm thời gian phát hiện vi khuẩn xuống còn 5 phút. Phương pháp xác định hàm lượng vi khuẩn bằng giấy lọc hấp phụ enzym luciferase và cơ chất luciferin là một phương pháp mới, triển vọng cao trong việc phát triển các cảm biến hóa sinh có độ chính xác cao và cho kết quả nhanh.

Từ khóa: ATP, cảm biến điện hóa, giấy lọc, luciferase, luciferin, vi khuẩn.

Chỉ số phân loại: 2.7

Mở đầu

Các vi sinh vật như vi khuẩn, virus, nấm tiềm ẩn nhiều nguy cơ gây bệnh cho cộng đồng do khả năng phát tán mạnh mẽ qua các môi trường đất, nước, không khí [1, 2]. Con người gặp rất nhiều khó khăn để chống lại sự lây lan của những vi sinh vật này khi chúng bùng phát thành dịch bệnh. Vì chúng có kích thước nhỏ nên rất dễ dàng di chuyển và phát tán trong phạm vi rộng lớn nhờ các dòng dịch chuyển của không khí, gió, nước. Chúng có thể thâm nhập vào cơ thể con người và lây lan qua quá trình hô hấp, bài tiết; từ đó có thể gây ra đại dịch trên phạm vi rộng lớn [3, 4]. Chính vì những nguy cơ tiềm ẩn trên nên việc phát hiện vi sinh vật trong thời gian thực, cho kết quả chính xác là vô cùng cần thiết. Hiện nay có một vài phương pháp truyền thống được dùng để phát hiện vi khuẩn trong môi trường như phương pháp nuôi cấy [5, 6], phương pháp sinh hóa, phương pháp vi điện tử [7, 8], phương pháp xét nghiệm miễn dịch [9], PCR [10, 11]... Tuy nhiên, việc phát hiện vi khuẩn trong thời gian thực gặp nhiều khó khăn do các bước tiến hành thí nghiệm phức tạp và giá thành cao [1]. Cụ thể như, phương pháp nuôi cấy vi khuẩn tốn vài ngày để vi khuẩn có thể lớn và hình thành khuẩn lạc để có thể đếm bằng mắt thường [12, 13]. Hơn nữa, với phương pháp này, chỉ có một lượng nhỏ vi khuẩn (khoảng 10%) có thể nuôi cấy [14], phần lớn còn lại không thể nuôi cấy [2]. Một phương pháp phân tích khác cho độ chính xác cao hơn là PCR [15, 16] nhưng phương pháp này cũng tốn vài giờ để thực hiện, yêu cầu quy trình công nghệ phức tạp và buộc phải được tiến

hành bởi các chuyên gia [1]. Gần đây, phương pháp phát hiện vi sinh vật thông qua việc xác định lượng ATP trong phản ứng phát xạ giữa ATP và luciferin/luciferase đã được nhiều nhà khoa học quan tâm [12, 17]. Trong phản ứng phát xạ luciferin/luciferase, luciferin phản ứng với ATP dưới xúc tác của enzym luciferase để tạo ra oxyluciferin, adenosine monophosphate, và ánh sáng. Ánh sáng phát xạ có bước sóng từ 550 đến 570 nm và được đo lại bằng máy đo quang [18]. Từ tín hiệu cường độ sáng phát xạ đo được ta có thể tính toán được lượng ATP tương ứng tham gia phản ứng và lượng vi khuẩn tương ứng có trong mẫu đã thủy phân ra lượng ATP đó. Tuy nhiên, phương pháp này hiện có nhiều hạn chế, như hoạt độ của enzym luciferase bị giảm nhanh chóng trong điều kiện phòng và dung dịch phản ứng chứa luciferin và luciferase thường tốn thời gian để chuẩn bị. Vậy nên việc phát hiện vi sinh vật theo thời gian thực với các bước tiến hành đơn giản, giá thành thấp vẫn còn là một thách thức lớn.

Trong nghiên cứu này, chúng tôi đề xuất một giải pháp có thể đo lượng vi khuẩn tại thời gian thực sử dụng giấy lọc đã được tối ưu hóa quá trình hấp phụ hỗn hợp luciferase và luciferin lên bề mặt. Phương pháp này có thể giảm thời gian phát hiện, tăng thời gian hoạt hóa của enzym luciferase ở điều kiện nhiệt độ phòng. Giấy lọc sau khi được hấp phụ enzym luciferase và cơ chất luciferin, có thể bảo quản tại điều kiện nhiệt độ phòng và có thể sử dụng trực tiếp không cần qua các bước tiền xử lý. Khả năng phân tích của giấy lọc với *Escherichia coli* (*E. coli*) theo thời gian bảo quản cũng được khảo sát.

*Email: dung.nguyenthi.tunhien@gmail.com.

Detection of bacteria by adsorption of luciferase and luciferin in paper discs

Thi Dung Nguyen*

University of Engineering and Technology, Hanoi VNU

Received 15 October 2018; accepted 18 December 2018

Abstract:

There are numerous microbes in the air, soil, and water, which is one of the main cause of some respiratory diseases and external ailments in human and livestock. Therefore, the early detection and identification of microorganisms is a key factor to prevent the risks associated with microbial infections. In this study, paper discs (0.5 cm in diameter) was prepared with the adsorption of luciferase and luciferin and used to determine the adenosine triphosphate (ATP) in bacteria. The repetition of sequential adsorption/drying of the reaction solution (luciferase and luciferin) on the paper discs was optimised. The storage stability of the paper discs was about one month at room temperature after the preparation. The paper discs adsorbed with luciferase/luciferin could detect the ATP extracted from *Escherichia coli* (*E. coli*) as low as 1.17×10^3 CFU/ml. ATP evaluation using the paper discs for detection of bacteria may reduce the detection time to less than 5 min. The novel paper discs immobilized with luciferase and luciferin are valuable for the development of fast and sensitive sensors for early detection of microorganisms.

Keywords: ATP, bacteria detection, biosensor, luciferase, luciferin, paper disc.

Classification number: 2.7

Nguyên liệu và phương pháp

Hóa chất và vi khuẩn

Chúng tôi sử dụng luciferin, enzym luciferase, dung dịch đệm pH, dung dịch đệm thủy phân, và chất chuẩn ATP được chứa trong bộ KIT “Roche ATP Bioluminescence Assay Kit HSII” (Sigma-Aldrich; Merck KGaA, Darmstadt, Đức). Hỗn hợp luciferin và luciferase được trộn lẫn theo tỷ lệ nồng độ của bộ Kit và thêm vào 2,5 ml dung dịch đệm (có chứa sẵn ion Mg^{2+}). Dung dịch hỗn hợp luciferase và luciferin vừa pha sẽ được chia nhỏ làm nhiều phần, mỗi phần chứa 200 μ l và được bảo quản lạnh tại nhiệt độ $-20^\circ C$. Giấy lọc được sử dụng trong thí nghiệm này là giấy lọc cellulose Whatman được mua từ Công ty Sigma-Aldrich (Merck KGa A). Giấy lọc được cắt nhỏ thành những đĩa tròn với đường kính 0,5 cm.

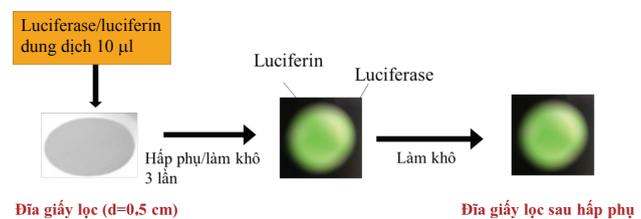
Ánh sáng phát ra từ phản ứng giữa ATP và luciferin/luciferase sẽ được đo cường độ ánh sáng bằng máy luminometer (spectramax-M2, Molecular devices corp., Sunnyvale, CA, USA). Dung dịch dinh dưỡng và agar dinh dưỡng được mua từ Becton & Dickinson, Co. (Franklin Lakes, NJ, USA).

Nuôi cấy vi khuẩn

Với quá trình tiền nuôi cấy, một khuẩn lạc *E. coli* từ trong đĩa thạch nuôi cấy được lấy ra và nhân nuôi trong dung dịch dinh dưỡng (5,0 g Peptone, 3.0 g protein trong 1 lít nước cất) lắc qua đêm với tốc độ 150 vòng/phút và nhiệt độ $37^\circ C$. Sau đó, *E. coli* được nuôi cấy lần hai, cũng trong dung dịch dinh dưỡng trên với tỷ lệ dung dịch chứa *E. coli* trong dung dịch dinh dưỡng ban đầu và dung dịch dinh dưỡng mới là 1:100. *E. coli* nuôi đến khi đạt nồng độ khoảng 10^8 CFU/ml sẽ được thu hồi bằng cách ly tâm với tốc độ 13.000 vòng/phút trong 10 phút, sau đó rửa 3 lần với nước, và hòa tan lại với nước cất ở cùng thể tích để thu được dung dịch *E. coli* đã loại bỏ hoàn toàn dung dịch dinh dưỡng.

Tối ưu hóa quá trình hấp phụ luciferase và luciferin lên giấy lọc

Giấy lọc được cắt thành hình tròn với đường kính khoảng 0,5 cm và được tiệt trùng. Tiếp theo, dung dịch hỗn hợp luciferase và luciferin đã chuẩn bị được nhỏ trực tiếp lên trên bề mặt giấy. Sau quá trình nhỏ dung dịch hỗn hợp luciferase và luciferin, giấy lọc được làm khô từ từ trong 2 giờ trong bình kín chứa silica đặt ở nhiệt độ phòng. Quá trình nhỏ hỗn hợp dung dịch và làm khô tự nhiên này được lặp lại vài lần. Cuối cùng, giấy lọc sau khi đã được hấp phụ luciferase và luciferin lên bề mặt, sẽ được làm khô tự nhiên trong bình chứa silica thêm 24 giờ nữa để loại bỏ hoàn toàn nước ra khỏi giấy lọc trước khi có thể sử dụng. Các giấy lọc hấp phụ luciferase và luciferin sau đó sẽ được bảo quản trong bình chứa silica ở nhiệt độ phòng cho tới khi sử dụng. Quy trình chuẩn bị giấy lọc hấp phụ luciferase và luciferin được sơ đồ hóa như hình 1.



Hình 1. Quy trình chuẩn bị giấy lọc hấp phụ luciferase và luciferin.

Đo cường độ ánh sáng phát xạ khi sử dụng giấy lọc hấp phụ luciferase và luciferin

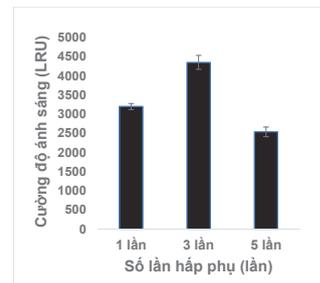
Giấy lọc hấp phụ luciferase và luciferin được lấy ra từ bình bảo quản và đặt vào đĩa 96 lỗ để đo cường độ ánh sáng. Dung dịch *E. coli* sau khi được loại bỏ hoàn toàn dung dịch dinh dưỡng, được lấy 100 μ l và đem thủy phân nhiệt ở $95^\circ C$ trong 10 phút. Quá trình thủy phân nhiệt này sẽ giúp giải phóng ATP ra khỏi tế bào. Sau đó 50 μ l dung dịch *E. coli* sau khi thủy phân sẽ được nhỏ lên trên bề mặt giấy lọc hấp phụ luciferase và luciferin đã được đặt bên trong

đĩa 96 lỗ. Ngay sau khi dung dịch thủy phân *E. coli* được nhỏ vào giấy lọc, chúng được chuyển đến máy đo cường độ ánh sáng và đo cường độ ánh sáng phát xạ ngay lập tức. Đối với thí nghiệm khảo sát khả năng phân tích của giấy lọc qua thời gian, giấy lọc hấp phụ luciferase và luciferin sẽ được chuẩn bị với số lượng lớn cùng một thời điểm, sau đó đem đi bảo quản trong bình chứa silica ở nhiệt độ thường. Giấy lọc sau đó sẽ được lần lượt lấy ra khỏi bình bảo quản (sau 1, 5, 7, 9, 11, 15, 19, 25, 30, 40, 50, 60 ngày) và đo cường độ ánh sáng phát ra từ mẫu *E. coli* có cùng 1 nồng độ ở tất cả các lần đo.

Kết quả và thảo luận

Tối ưu hóa quá trình hấp phụ luciferase và luciferin lên giấy lọc

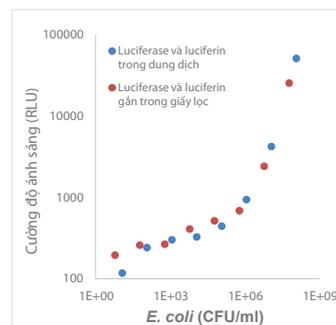
Để có thể đạt được kết quả tốt nhất từ phép đo sử dụng giấy lọc hấp phụ luciferase và luciferin, chúng tôi đã khảo sát để có thể tìm ra lượng dung dịch hỗn hợp luciferase và luciferin tối ưu nhỏ lên giấy lọc và số lần nhỏ/làm khô tối ưu. Đầu tiên, chúng tôi xác định lượng hợp chất luciferase, luciferin cần hấp phụ lên giấy lọc và tối ưu nó. Sử dụng dung dịch hỗn hợp luciferase, luciferin đã được chuẩn bị và giấy lọc thông dụng (kích thước lỗ 2,5 μm) được dùng như một giá đỡ có các lỗ trống nhỏ li ti có thể chứa các phân tử luciferase và luciferin bên trong nó. Để đảm bảo rằng dung dịch hỗn hợp luciferase và luciferin không bị tràn ra ngoài bề mặt giấy lọc, mà có thể từ từ hấp phụ vào bên trong giấy lọc, một lượng nhỏ (10 μl) của dung dịch hỗn hợp luciferase, luciferin được nhỏ lên giấy lọc và để yên trong bình chứa silica trong 2 giờ. Khảo sát số lần hấp phụ (nhỏ/làm khô) khác nhau (1, 3, 5 lần) lên những giấy lọc khác nhau để tìm ra số lần tối ưu. Mỗi giấy lọc sau đó được khảo sát với dung dịch chứa cùng lượng *E. coli* (~10⁷CFU/ml) đã được thủy phân. Hình 2 biểu thị sự khác nhau về cường độ ánh sáng phát xạ thu được khi sử dụng những giấy lọc có số lần hấp phụ khác nhau. Theo đó, số lần hấp phụ là 3 lần, tương đương 30 μl của dung dịch hỗn hợp luciferase và luciferin, cho tín hiệu cường độ ánh sáng là cao nhất. Khi 10 μl dung dịch hỗn hợp luciferase, luciferin được nhỏ lên trên bề mặt giấy lọc, chúng sẽ từ từ di chuyển vào bên trong lỗ trống (2,5 μm) của giấy lọc, và bị giữ ở trong đó. Do đó, cấu trúc không gian của enzym luciferase và cơ chất luciferin được đảm bảo, và có thể duy trì trạng thái hoạt động trong thời gian dài ở điều kiện nhiệt độ phòng. Khi dung dịch hỗn hợp luciferase và luciferin được nhỏ lên trên bề mặt giấy lọc, một vài phân tử luciferase và luciferin sẽ không được cố định trong lỗ trống của giấy lọc mà vẫn tồn tại trên bề mặt giấy, chúng sẽ dần dần hạn chế sự hấp phụ của luciferase, luciferin đi vào bên trong lỗ trống khi số lượt hấp phụ tăng lên. Hơn nữa, những phân tử luciferase và luciferin trên bề mặt giấy lọc này sẽ dễ bị thay đổi cấu trúc không gian, dẫn đến enzym bị bất hoạt. Do đó, có thể thấy là không có sự tăng cường độ ánh sáng phát xạ nào khi sử dụng những giấy lọc được nhỏ/làm khô trên 3 lần (hình 2). Quá trình hấp phụ luciferase và luciferin lên giấy lọc được tối ưu nhất với 3 lần hấp phụ, mỗi lần hấp phụ 10 μl dung dịch hỗn hợp luciferase và luciferin. Ở những thí nghiệm tiếp theo, chúng tôi chỉ sử dụng giấy lọc được hấp phụ dung dịch phản ứng luciferase và luciferin với ba lần hấp phụ.



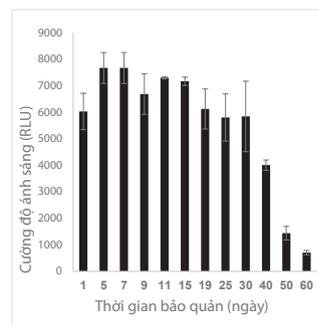
Hình 2. So sánh cường độ ánh sáng phát xạ khi sử dụng những giấy lọc có số lần hấp phụ khác nhau.

Đánh giá khả năng phát hiện E. coli của giấy lọc hấp phụ luciferase và luciferin

Sau quá trình tối ưu hóa sự hấp phụ luciferase và luciferin, chúng tôi khảo sát khả năng phát hiện vi khuẩn *E. coli* ở những nồng độ khác nhau của giấy lọc và so sánh nó với kết quả thu được từ việc sử dụng luciferase và luciferin dưới dạng dung dịch (theo quy trình đã được thương mại hóa từ bộ Kit của Công ty Sigma-Aldrich). Bước đầu khảo sát mối tương quan giữa hàm lượng ATP và cường độ ánh sáng thu được bằng phương pháp đo quang cho thấy, khi nồng độ ATP tăng thì cường độ ánh sáng tăng và trùng với kết luận của Công ty Sigma Aldrich. Từ đồ thị hình 3 cho thấy, khi nồng độ vi khuẩn tăng thì cường độ ánh sáng phát xạ tăng. Vậy nên, khi nồng độ vi khuẩn tăng lên thì hàm lượng ATP trong mẫu cũng tăng lên. Hình 3 biểu thị mối liên hệ giữa nồng độ *E. coli* với cường độ ánh sáng phát xạ với hai phương pháp đo (phương pháp sử dụng luciferase và luciferin được hấp phụ trên giấy lọc và phương pháp sử dụng luciferase và luciferin ở dạng dung dịch đã được thương mại hóa). Từ đồ thị chúng ta thấy cường độ ánh sáng phát xạ từ thí nghiệm sử dụng giấy lọc hấp phụ luciferase và luciferin là gần như tương đương với cường độ ánh sáng thu được từ thí nghiệm sử dụng dung dịch chứa luciferase và luciferin. Từ đó, có thể kết luận rằng luciferase và luciferin hấp phụ trên giấy lọc có thể cho kết quả tương đương và đáng tin cậy như kết quả thu được từ việc sử dụng luciferase và luciferin dưới dạng dung dịch đã được thương mại hóa. Cường độ ánh sáng phát xạ tăng tỷ



Hình 3. Cường độ ánh sáng phát xạ thu được khi khảo sát mẫu với những nồng độ *E. coli* khác nhau và sử dụng hỗn hợp luciferase và luciferin được hấp phụ trong giấy lọc và ở dạng dung dịch.



Hình 4. Cường độ ánh sáng thu được khi sử dụng những giấy lọc hấp phụ luciferase và luciferin cùng lúc và có thời gian bảo quản khác nhau.

lệ thuận với nồng độ vi khuẩn *E. coli* như được dự đoán. Hình 3 cho thấy, cường độ ánh sáng phát xạ đo được từ giấy lọc hấp phụ luciferase và luciferin luôn cao hơn kết quả thu được từ dung dịch hỗn hợp luciferase và luciferin. Hơn nữa, thời gian phát hiện vi khuẩn trong mẫu sử dụng giấy lọc là khoảng 1-2 phút, tiết kiệm hơn rất nhiều so với việc phát hiện vi khuẩn sử dụng dung dịch phản ứng luciferase và luciferin khoảng 1 giờ.

Độ bền phân tích của giấy lọc sau thời gian bảo quản

Tiếp theo thí nghiệm kiểm tra khả năng phát hiện vi khuẩn của giấy lọc hấp phụ luciferase và luciferin, nghiên cứu tiếp tục kiểm tra độ bền phân tích của giấy lọc sau một thời gian bảo quản ở điều kiện nhiệt độ thường. Hay nói cách khác là khảo sát thời gian duy trì hoạt tính của enzym luciferase sau thời gian bảo quản. Giấy lọc sau khi được hấp phụ luciferase và luciferin được bảo quản trong bình kín chứa silica ở nhiệt độ phòng. Như vậy, trong quá trình bảo quản, giấy lọc hấp phụ luciferase và luciferin đã luôn được giữ ở trạng thái khô và enzym luciferase được cố định trong lỗ trống của giấy lọc, giúp enzym giữ được cấu trúc không gian bền vững. Hình 4 cho thấy cường độ ánh sáng phát xạ đã hầu như không đổi trong suốt 1 tháng bảo quản và từ từ giảm dần ở những ngày sau đó. Cường độ ánh sáng giảm sau 30 ngày là do sự giảm hoạt độ của enzym trong giấy lọc theo thời gian bảo quản. Enzym dễ dàng mất đi hoạt tính khi để ở điều kiện nhiệt độ thường do biến đổi về cấu trúc không gian của vùng hoạt động. Nhưng khi enzym được hấp phụ trên giấy lọc, cấu trúc không gian của enzym được duy trì bền vững trong khoảng 30 ngày tại điều kiện thường. Những kết quả này chỉ ra rằng, giấy lọc là một nguyên liệu đơn giản, hiệu quả, tiết kiệm cho việc hấp phụ enzym luciferase và giúp giữ cấu trúc của enzym ở trạng thái bền trong ít nhất 30 ngày. So sánh với độ bền của enzym luciferase trong dung dịch từ bộ Kit (1 ngày ở nhiệt độ 15-25°C), chúng ta thấy rằng hoạt độ của luciferase được hấp phụ trên giấy lọc bền vững hơn rất nhiều. Hơn nữa, với thời gian bảo quản là 30 ngày từ ngày hấp phụ luciferase và luciferin lên bề mặt, việc chuẩn bị giấy lọc hấp phụ luciferase và luciferin cho việc phân tích lượng vi khuẩn có trong mẫu trở nên đơn giản, tiết kiệm và có thể thương mại hóa.

Kết luận

Từ những kết quả thực nghiệm trên có thể kết luận rằng, giấy lọc hấp phụ luciferase và luciferin có thể được sử dụng để phân tích lượng ATP được thủy phân từ mẫu chứa vi khuẩn. Giấy lọc sau khi được hấp phụ luciferase và luciferin có thể duy trì trạng thái bền hoạt hóa, ổn định trong 30 ngày ở nhiệt độ phòng trong bình kín chứa silica, và có thể được lấy ra sử dụng ngay lập tức cho việc phát hiện vi khuẩn bất cứ lúc nào thông qua xác định hàm lượng ATP được thủy phân ra từ mẫu chứa vi khuẩn đó. Giới hạn phát hiện của giấy lọc hấp phụ luciferase và luciferin là $1,7 \times 10^3$ CFU/ml *E. coli*. Vậy nên, giấy lọc hấp phụ luciferase và luciferin có khả năng ứng dụng cao trong việc phát triển hệ cảm biến sinh hóa nhằm phát hiện vi khuẩn trong môi trường và cho kết quả đo trong thời gian thực.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] B. Ghosh, H. Lal, and A. Srivastava (2015), "Review of bioaerosols in indoor environment with special reference to sampling, analysis and control mechanisms", *Environment International*, **85**, pp.254-272.
- [2] P. Blais-Lecours, P. Perrott, and C. Duchaine (2015), "Non-culturable bioaerosols in indoor settings: Impact on health and molecular approaches for detection", *Atmospheric Environment*, **110**, pp.45-53.
- [3] L.D. Stetzenbach, M.P. Buttner, P. Cruz (2004), "Detection and enumeration of airborne biocontaminants", *Current Opinion in Biotechnology*, **15(3)**, pp.170-174.
- [4] J.K. Louie, et al. (2005), "Characterization of Viral Agents Causing Acute Respiratory Infection in a San Francisco University Medical Center Clinic during the Influenza Season", *Clinical Infectious Diseases*, **41(6)**, pp.822-828.
- [5] S. Dutil, et al. (2008), "Measurement of Airborne Bacteria and Endotoxin Generated During Dental Cleaning", *Journal of Occupational and Environmental Hygiene*, **6(2)**, pp.121-130.
- [6] K. Fallschissel, et al. (2010), "Detection of Airborne Bacteria in a German Turkey House by Cultivation-Based and Molecular Methods", *The Annals of Occupational Hygiene*, **54(8)**, pp.934-943.
- [7] L.M.E Vanhee, H.J. Nelis, T. Coenye (2009), "Detection and quantification of viable airborne bacteria and fungi using solid-phase cytometry", *Nature Protocols*, **4**, p.224.
- [8] Y.-L. Pan (2015), "Detection and characterization of biological and other organic-carbon aerosol particles in atmosphere using fluorescence", *Journal of Quantitative Spectroscopy and Radiative Transfer*, **150**, pp.12-35.
- [9] T.W. Owen, et al. (2007), "Microgravimetric immunosensor for direct detection of aerosolized influenza A virus particles, Sensors and Actuators B", *Chemical*, **126(2)**, pp.691-699.
- [10] R.H. Williams, E. Ward, H.A. McCartney (2001), "Methods for Integrated Air Sampling and DNA Analysis for Detection of Airborne Fungal Spores", *Applied and Environmental Microbiology*, **67(6)**, pp.2453-2459.
- [11] T. Rinsoz, et al. (2008), "Application of real-time PCR for total airborne bacterial assessment: Comparison with epifluorescence microscopy and culture-dependent methods", *Atmospheric Environment*, **42(28)**, pp.6767-6774.
- [12] D.J. Squirrell, R.L. Price, M.J. Murphy (2002), "Rapid and specific detection of bacteria using bioluminescence", *Analytica Chimica Acta*, **457(1)**, pp.109-114.
- [13] W.D. Griffiths, G.A.L. DeCosemo (1994), "The assessment of bioaerosols: A critical review", *Journal of Aerosol Science*, **25(8)**, pp.1425-1458.
- [14] J. Peccia, M. Hernandez (2006), "Incorporating polymerase chain reaction-based identification, population characterization, and quantification of microorganisms into aerosol science: A review", *Atmospheric Environment*, **40(21)**, pp.3941-3961.
- [15] M. Kubist, et al. (2006), "The real-time polymerase chain reaction", *Molecular Aspects of Medicine*, **27(2)**, pp.95-125.
- [16] R. Singh, et al. (2014), "Biosensors for pathogen detection: A smart approach towards clinical diagnosis. Sensors and Actuators B", *Chemical*, **197**, pp.385-404.
- [17] S.J. Lee, et al. (2008), "A microfluidic ATP-bioluminescence sensor for the detection of airborne microbes. Sensors and Actuators B", *Chemical*, **132(2)**, pp.443-448.
- [18] J.M.M. Leitão, J.C.G. Esteves da Silva (2010), "Firefly luciferase inhibition", *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, **101(1)**, pp.1-8.