

Е. С. Трепова, А. Г. Горяева

## БИОЛЮМИНЕСЦЕНТНЫЙ МЕТОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ ЗАРАЖЁННОСТИ ПОЛИМЕРНЫХ МАТЕРИАЛОВ

В библиотеках, архивах, музеях билюминесцентный метод определения зараженности полимерных материалов преимущественно предназначен для ламинированных документов, документов на мелованной бумаге, глянцевых обложек, а также для стеллажей, стен с лакокрасочным покрытием и др. [1–3, 6, 7]. На таких материалах микроорганизмы не так прочно прикрепляются, и их легче снять с гладкой поверхности, чем с шероховатой.

Полимерные покрытия (полиэтилен высокого давления, лавсан (полиэтилентерефталат), парилен (поли-пара-ксилилен) служат препятствием на пути проникновения микроорганизмов к материалу документов и увеличивают их износостойкость, однако в неблагоприятных условиях хранения полимерные покрытия могут быть повреждены плесневыми грибами, развивающимися на их

поверхности. В этом случае основную проблему представляет не только механическое разрушение полимера, но и появление пигментных пятен на бумаге, которые возникают даже при незначительном проникновении мицелия грибов в поры пленки [5]. Пигментация вызвана тем, что полимерные покрытия препятствуют росту грибов на бумаге, а невозможность их нормального развития приводит к активации защитной функции, то есть к выделению ими пигмента [6].

Для предупреждения поражения микромицетами и появления пигментных пятен целесообразно проводить регулярное обследование документов, содержащих композиты на наличие жизнеспособных микроорганизмов.

Этот метод рекомендуется в приложении к ГОСТ 9.049–91 «Методы лабораторных испытаний на устойчивость к воздействию плесневых грибов» и позволяет существенно сократить время проведения анализа на микробное загрязнение и быстро, затратив на него от 24 ч до 10 мин, получить адекватные данные о содержании живых микроорганизмов [5].

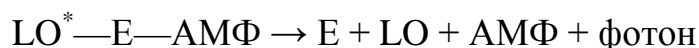
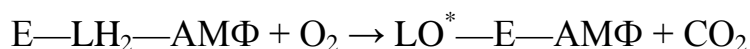
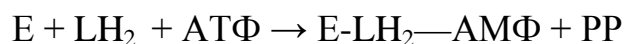
Биолюминесцентный метод широко применяется для аналитических целей, в основном в клинической медицине и в пищевой промышленности (для контроля качества пищевых продуктов), а также в научных исследованиях. Сущность метода заключается в определении грибостойкости исследуемого материала по количественному показателю развития грибов — концентрации внутриклеточного АТФ (аденозинтрифосфата) живых клеток, находящихся на поверхности материала.

В любой клетке живого организма содержится АТФ, необходимый для его существования, при расходовании которого высвобождается химическая энергия, содержащаяся в химической связи между фосфорными группами и аденозином. Биолюминесценция — результат биохимической реакции, в которой химическая энергия превращается в световую.

Люминесценция (свечение), которая измеряется на биолюминометре, — результат биохимической реакции окисления люциферина (субстрата) кислородом воздуха под действием люциферазы (фермента) только в присутствии АТФ. Люциферины представляют собой сложные органические молекулы разнообразной химической структуры.

Люциферины и люциферазы разных организмов отличаются по химическому строению, однако все хемилюминесцентные реакции требуют молекулярного кислорода и протекают с образованием промежуточных комплексов — органических пероксидных соединений. В процессе реакции эти комплексы распадаются и

высвобождается энергия фотона, возбуждающая молекулы вещества, ответственного за светоизлучение [4]:



Здесь АМФ — аденозинмонофосфат, РР — пирофосфат, Е — люцифераза, LH<sub>2</sub> — люциферин, LO\* и LO — продукт реакции (оксильюциферин) в возбуждённом и основном состояниях, соответственно, LO\*-Е-АМФ — промежуточный комплекс.

Квантовый выход биолюминесцентных реакций очень высок (от 10 до 100 %). Естественно, что столь значительная эффективность процесса достигается за счёт участия высокоспецифичного белкового биокатализатора — люциферазы.

В отсутствие АТФ, то есть при отсутствии живых микроорганизмов, биолюминесценция не наблюдается, на этом и основан один из самых чувствительных методов анализа АТФ.

Достоинствами метода являются:

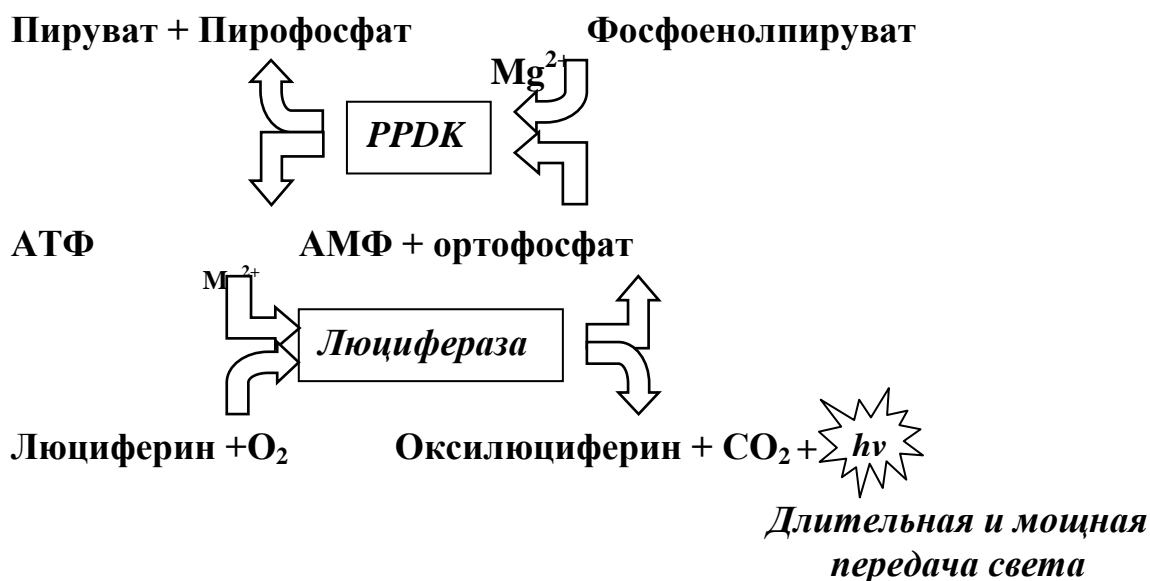
- быстрота;
- возможность обнаружить даже небольшое количество микроорганизмов (от 10 до 100 на см<sup>2</sup> поверхности);
- применение результатов новейших биохимических разработок и современного оборудования.

К недостаткам можно отнести:

- высокую скорость протекания самой люминесцентной реакции, что требует при работе с люминометром наличия опыта у специалиста, выполняющего анализ;
- высокую стоимость реактива.

Учитывая всё вышеизложенное, целесообразно использовать данный метод для экспресс-анализа с целью определения зараженности поверхности, а в случае высокой концентрации микроорганизмов — проводить дополнительное обследование (**форма № 13**).

В приборе Lumitester PD 10 и в реагенте к нему LuciPac W используется новая разработка — биолюминесценция циклической реакции при использовании пируватортофосфат дикиназы (PPDK):



При проведении анализа используют следующие приборы и реактивы: люминометр Lumitester PD 10N (или 20N), свабы одноразового использования (реагент LuciPac W для модели 10N и LuciPac Pen — 20N), которые хранятся при температуре +2–8 °С, стерильную дистиллированную воду или стерильный изотонический раствор (раствор NaCl концентрации 0,9 %), рамки площадью 10 см<sup>2</sup> (рис. 1).



Рис. 1. Материалы для отбора проб билюминесцентным методом: 1 — люминометр Lumitester PD 10N; 2 — свабы с реагентом LuciPac W; 3 — ампула стерильного изотонического раствора; 4 — рамка с фиксированной площадью

## Методика измерения уровня АТФ

Для предотвращения заражения обследуемого объекта посторонними примесями работают в стерильных перчатках.

Свабы, хранящиеся в холодильнике, перед использованием обязательно выдерживают при комнатной температуре в течение 30 мин до начала работы.

Во избежание отклонений в показаниях люминотестера Lumitester PD10 в процессе измерения прибор нельзя перемещать и наклонять более чем на 45 °.

Пробу с исследуемой поверхности определённой площади — 10 см<sup>2</sup> — отбирают свабом, увлажнённым стерильным раствором NaCl концентрации 0,9 % или стерильной дистиллированной водой.

Сваб помещают в пластиковую тубу и нажимают на его стержень, чтобы вскрыть капсулу, содержащую жидкий реагент.

Встряхивают тубу несколько раз в течение 30 сек, чтобы жидкий реагент попал в тестируемую часть тубы.

Тубу помещают в разъем люминометра, включают прибор нажатием кнопки «Enter». Внутренняя калибровка прибора выполняется автоматически, после чего через 10 сек на цифровом индикаторе прибора высвечивается результат, выраженный в относительных единицах света (RLU).

Результат, выраженный в относительных единицах света (RLU), по калибровочному коэффициенту пересчитывают в количество жизнеспособных микроорганизмов, выраженное в КОЕ/см<sup>2</sup>.

На основании полученных результатов оценивают степень заражённости поверхности библиотечных материалов.

Результаты обследования заносят в **форму № 15**.

**Графа 1** — данные о фонде, в котором отбирались пробы. Отмечают его общее состояние, количество ламинированных документов или документов с другими покрытиями в данном фонде, наличие протечек, плесени и другие особенности.

**Графа 2** — описание документа, с которого отбирались пробы, его название, шифр. Отмечают состояние документа, его запылённость, визуально определяемое наличие плесени.

**Графа 3** — участок документа и материал, с которого отбиралась проба.

**Графа 4** — площадь поверхности, с которой отбиралась проба (S).

**Графа 5** — порядковый номер пробы.

**Графа 6** — считываемые с цифрового индикатора прибора значения интенсивности свечения образца, RLU.

**Графа 7** — значение зараженности единицы площади,  $RLU/дм^2$ .

**Графа 8** — значение  $КОЕ/см^2$ , полученное после пересчёта при помощи коэффициента  $K_{RLU/КОЕ}$  и интенсивности свечения стерильного образца бумаги  $RLU_{стер}$  (см. Приложение).

Количество микроорганизмов ( $КОЕ/дм^2$ ) определяют по следующей формуле:

$$КОЕ/дм^2 = (RLU/дм^2 - RLU_{стер}/дм^2) \times K_{RLU/КОЕ},$$

где  $RLU_{стер}/дм^2$  — люминесценция пробы стерильного исследуемого материала;

$K_{RLU/КОЕ}$  — коэффициент пересчёта  $RLU$  в  $КОЕ/дм^2$ .

Каждому материалу соответствуют определенные значения коэффициентов  $K_{RLU/КОЕ}$  и  $RLU_{стер}/дм^2$ .

Для определения зараженности фильтровальной бумаги (тест-материала) получена следующая формула пересчёта:

$$КОЕ/дм^2 = (RLU - 1025) \times 101,4,$$

где  $RLU_{стер}/дм^2 = 1025$ ;  $K_{RLU/КОЕ} = 101,4$ .

**Графа 9** — при отсутствии коэффициентов пересчета для обследуемого материала определяют **степень зараженности**:

- высокая (более **50 000  $RLU/дм^2$** );
- умеренная (от **5000** до **50 000  $RLU/дм^2$** );
- незначительная или присутствие загрязнений (от **1500** до **5000  $RLU/дм^2$** );
- нет жизнеспособных микроорганизмов (**до 1500  $RLU/дм^2$** ).

При степени зараженности *высокая* или *умеренная* следует обработать документ биоцидом. В третьем случае — при *незначительной* степени зараженности — необходимо обеспыливание, так как количество  $RLU/дм^2$  до 5000 может свидетельствовать либо о фоновой концентрации микроорганизмов, либо о присутствии загрязнений, взаимодействующих с реагентом.

### Литература

1. Великова Т. Д. Выявление биоповреждений документов // Биоповреждение документов / РНБ СПб., 2009. С. 13–22.
2. Горяева А. Г., Хазова С. С. Методы консервации в реставрационных центрах Германии // Теория и практика сохранения памятников культуры : сб. науч. тр. / РНБ. СПб., 2009. Вып. 22. С. 152–158.
3. ГОСТ 9.049-91 Материалы полимерные и их компоненты. Методы лабораторных испытаний на стойкость к воздействию плесневых грибов. М. : Изд-во стандартов, 1995. С. 17.

4. Методики определения микробной зараженности [Электронный ресурс]. URL: <http://www.lumtek.ru/applications/detection.html#sterile> (дата обращения: 29.11.12).
5. Нюкша Ю. П. Биологическое повреждение бумаги и книг / Б-ка РАН. СПб., 1994. 235 с.
6. Пигментация бумаги и композитов бумага+ППКП при развитии *Penicillium ochro-chloron* / Т. Д. Великова, С. А. Добрусина, Н. Ю. Мамаева, А. Г. Горяева // Сборник материалов III Всерос. науч.-практ. конф. «Экологические проблемы биодegradации промышленных, строительных материалов и отходов производств» (18–19 октября 2000 г.) / Приволж. Дом Знаний. Пенза, 2000. С. 65–67.
7. Ребрикова Н. Л. Биология в реставрации / М. : РИО ГосНИИР, 1999. 183 с.
8. Тумерман Л. А. Биоллюминесценция // БСЭ. М. : Сов. энциклопедия, 1970. Т. 3. С. 1057.
9. Rebrikova N. L., Dmitrieva M. B. Determination of a level microbe contamination of stone and murals in architectural monuments by a bioluminescent method with use of mobile luminometer // Diagnostica e Conservazione Esperienze e Proposte per una Carta del Rishio. Palermo, 2007. P. 739–743.

**БИОЛЮМИНЕСЦЕНТНЫЙ МЕТОД ОЦЕНКИ РАЗВИТИЯ ПЛЕСНЕВЫХ ГРИБОВ  
НА ПОЛИМЕРНЫХ МАТЕРИАЛАХ**

Библиотека \_\_\_\_\_

Дата обследования \_\_\_\_\_

Дата снятия результатов \_\_\_\_\_

Фонд/ хранилище	Участок отбора пробы			№	Результаты обследования			
	Документ, название и шифр	Место и материал пробы*	S, см <sup>2</sup>		RLU	RLU/ дм <sup>2</sup>	КОЕ/дм <sup>2</sup>	Степень зараженности
1	2	3	4	5	6	7	8	9
			10	1	107	1070	—	незначительная
			10	2	18 96	18 960	—	умеренная
			10	3	24370	243700	—	высокая
				4				
				5				
				6				
				7				
				8				
				9				
				10				