

# 植物组培污染的原因及防控

吴婷婷

(广东省湛江市林业科学研究所, 广东 湛江 524000)

**摘要:**详细分析了植物组织培养污染的种类及其发生的原因:污染的种类有细菌和真菌,真菌污染主要来源于环境,细菌污染主要来源于接种材料、接种工具、接种无菌操作过程不规范等。由此提出了做好培养基消毒、环境清洁卫生等日常工作流程、接种过程严格按无菌操作、无菌材料的及时更新等防控措施,以期将污染率控制在合理低范围内。

**关键词:**植物组培;污染;防控措施

中图分类号:S188

文献标识码:A

文章编号:1674-9944(2017)21-0114-02

DOI:10.16663/j.cnki.lskj.2017.21.046

## 1 引言

由于植物组培繁殖育苗周期短、可以大批量生产、成本低、可控性强,能为商品林(如桉树)及花卉工厂化育苗方面做出很大贡献。但在组培工厂化育苗的日常生产中,污染问题难以回避,而且污染率的增加必然提高生产成本,在市场竞争中,如何降低经济成本提高经济效益是工厂化育苗的首要问题,因此防治污染是组培育苗中不可忽视的技术环节<sup>[1]</sup>。笔者以林科所的组培厂为实例,在分析植物组织培养过程中产生污染的原因及其性状的基础上,提出了防治措施,为植物工厂化育苗提供技术参考。

## 2 组培污染的原因及防控措施

植物组培是在无菌条件下进行的,若有微生物进入培养瓶中,引起污染,组织培养将无法进行<sup>[2]</sup>。污染主要是真菌、细菌引起的。真菌在培养条件下生长快,很容易观察到,一般在接种3~5 d后出现,主要症状是培养基表面或材料附近出现绒毛状菌丝,然后形成不同颜色的孢子层,黑色、白色和黄色的孢子层较多见。孢子层从培养基表面长起,逐渐沿着瓶身长到瓶盖,甚至蔓延到瓶外。孢子在空气中扩散,对培养室造成严重污染。所以发现受到真菌污染的瓶苗,要即时清除出培养室,防止其变成一个污染源,引起其它瓶苗污染。真菌污染主要是由于培养室和接种室的空气受污染或者室内环境不卫生造成,它的重要特点是发展迅速、难控制。

细菌潜伏期长,很难在前期肉眼观察到,一般5~10 d后,会在培养基表面、材料附近或在培养基里面形成(多见白色、黄色)黏液状菌斑、鼻涕状或丝状的菌落,混浊水迹并伴有发酵状泡沫。其原因是由于使用了未消毒完全的工具引起,也可能是操作人员呼吸排出的气体中带细菌或培养材料带细菌等。

植物组培污染的控制取决于灭菌技术、灭菌设备、组培材料的继代时间、无菌操种过程和条件等许多方面<sup>[3,4]</sup>。污染有霉菌、黄单胞菌属、芽孢杆菌属、假单

胞菌属、土壤杆菌属、棒状杆菌属、欧文氏菌属等。真菌污染主要是霉菌来源于环境,细菌污染主要来源于接种材料、接种工具、接种无菌操作过程不规范等,因此污染可通过如下措施克服:接种室与培养室要定期做好消毒与净化,保持清洁干净,定期进行熏蒸或用70%酒精、新洁尔喷雾消毒。在夏季,在高湿高温的天气条件下、或其他有利于真菌繁殖传播时,建议用甲醛(甲醛用量4~6 mL/m<sup>3</sup>+高锰酸钾用量3~6 mL/m<sup>3</sup>)熏蒸培养室杀菌,甲醛消毒效果好,但甲醛对瓶苗和人体都有一定的伤害,甲醛在灭菌过程中会对瓶苗造成一定的伤害,造成组培苗生长缓慢甚至部分干枯<sup>[5]</sup>,所以在瓶苗生产高峰期不用或少用甲醛消毒。在桉树生产淡季而且是真菌污染较严重时进行甲醛消毒。这样既保证降低污染的同时也不会影响瓶苗的出货量和质量。

在桉树生产淡季(主要是夏季)降温消耗电能很多,同时也易污染,所以夏季应减少生产量,以保种为主<sup>[6]</sup>。此时真菌污染比较严重可进行甲醛消毒。此外,湿度太高,可以用抽湿机除湿,应使培养室的空气相对湿度控制在70%左右。组培厂降温用的空调也有除湿功能,但在春夏季的多雨天气中,其除湿效果远远未够,所以使用抽湿机效果更好,而且从生产成本来说,抽湿机除湿的费用相对空调低。

秋季和冬季湿度渐渐降低,温度也渐渐下降,组培苗污染率也相应下降。真菌污染大大地减少,培养室内空气含菌量较少,因甲醛对瓶苗和人体都有一定的伤害,所以不用或少用甲醛消毒。平时培养室和接种室一定要保持干净整洁,下班后和上班前采用紫外灯照射培养室和接种室30 min消毒,臭氧消毒对环境效果较好,使用方便,对人体伤害小。关紫外灯后,工作人员不能立即进入室内,要打开抽风机20~30 min后再工作,防止紫外线辐射对人体造成伤害。常用70%的酒精、新洁尔喷洒培养室和接种室,进行室内消毒,使空气中真菌孢子、细菌沉降,重点喷洒培养架和培养瓶表面,用新洁尔擦洗培养室地面和门窗。

接种用的超净工作台(超净工作台内的洁净度应该

收稿日期:2017-10-09

作者简介:吴婷婷(1982—),女,助理工程师,主要从事林木培育方面等工作。

为100级)要定期检查(如定期对风机过滤网清洗更衣更换,每隔一段时间检测操作区的带菌量,如发现过滤网工作失败,要整个更换。此外,还需要测定操作区的风速,通过调压旋钮使操作区的网速达到无菌操作需要的标准),在使用超净台前开启通风装置并打开工作台紫外灯照射20~30 min,任何进入超净台的非无菌物件都要喷洒70%酒精消毒,培养瓶的瓶口位置用70%酒精重点擦拭。操作时戴一次性胶手套且接种前用70%酒精喷洒消毒、戴帽子(防止头发的灰尘对接种过程中造成污染)、戴口罩(防止呼吸中气流带菌对接种过程中造成污染)、穿着接种专用的工作鞋和工作服。接种人员应严格执行无菌操作,对接种中所需的工具,如碟子要经高温高压消毒,镊子和接种刀在每用一次后都要先用70%酒精擦拭,再放入120℃高温消毒器中消毒(特别在不小心中接触到污染物时,极易由于接种器具引起二次污染),待自然凉冷后再接种,防止接种器械太热会对接种材料造成热伤害,影响生长。接种时要在工作台的操作区域内,工作台内不要摆入过多待用材料,避免工作台净化气流被挡住,严格检查接种材料,舍弃被真菌和细菌污染的材料(一般真菌明显可见,细菌特别是培养基里面的呈白色浓状的细菌不易发现,在光线充足下要仔细才能认出,易被接种手忽略,经接种后造成继代分再污染,要对接种手辨认细菌进行严格训练)。接种中途不要将培养基、接种工具等拿入,破坏超净台的无菌环境。

经常检查消毒锅的灭菌质量,如严格按消毒规程操作后仍有污染现象,特别是在短时间内出现大批量的污染苗时(除考虑环境、气候外,消毒锅灭菌质量也是一个重要考虑因素),应及时检查灭菌锅的性能,若发现问题立即修复。培养基需要在高压而且在121~123℃条件下灭菌20~30 min,若灭菌时间或灭菌温度、压力不够,培养一段时间后就会在培养基表面产生污染,所以要严格按照操作规程进行。

对于被污染物件的处理:在春、夏季真菌污染严重时,被污染的瓶苗须高温高压消毒灭菌再清洗,如果直接清洗,瓶内的孢子等污染物扩散到空气中,造成二次污染。对于其他被污染的器械也要单独清洗,有条件的要高温高压灭菌后再使用。

检查培养瓶盖是否存在问题。培养瓶封口多用塑料盖,塑料盖用久了易老化,密封性差,空气中真菌、细菌会进入到瓶内造成污染,特别是在真菌污染严重季节

更需要特别注意这个问题。当发现培养瓶盖存在问题时,应及时更换。

桉树初代培养或前几代培养中存在污染,并不形成明显菌落而只在培养基内部形成“丝状物”、“晕状物”,肉眼观测不易发现,随着时间过长,材料的健康状况不断恶化,造成材料自带内生菌,也是造成污染的一个重要原因。这种情况下可以通过在培养基中添加抗菌素抑制内生菌,但很多抗菌素一般不耐高温,需要采用过滤灭菌。在工厂化育苗生产过程中添加起来不方便。而且针对不同的植物品种要想找到一种合适的抗生素处理组合是较困难的,工作也相对繁琐,没有一种抗生素对所有的细菌都有效,即使有效,抗生素消除植物组培污染的方法也只是暂时的解决方法,如果长期使用抗生素消除污染,必然对组培苗的生长、分化、生根造成一定的影响。因此,还可以通过对材料的更新来避免污染,通过采伐外植体,进行外植体诱导分化丛生芽得到新的无菌材料,这样得到的无菌材料形态性状最稳定。但耗时长工作量大,应在生产淡季就作无菌材料准备,这样就可以防止在生产中出现分化材料断档情况。

### 3 结语

植物组培污染种类虽然多种多样,但只要针对不同的污染情况,做好防控措施,如接种过程严格按无菌操作;培养基和接种器械的消毒在规定的时间内高温高压消毒;室内环境清洁卫生等日常工作流程严格按规程做好;在生产淡季可以通过做外植体获得新的无菌材料,既使分化材料得到更新,又为生产旺季继代材料作好准备等,这样可以将污染控制在合理的低范围内。

#### 参考文献:

- [1] 严华兵, 闭志强. 组培工厂化生产成本降低措施 [J]. 植物快繁技术网, 2007; 1~3.
- [2] 王 瑛, 高新一. 植物组织培养技术手册 [M]. 北京: 金盾出版社, 2006.
- [3] 蔡炳华, 陈丽娟, 江 文, 等. 植物组培生产污染控制技术 [J]. 中国南方果树, 2012(5).
- [4] 方 丽, 汪一婷, 吕永平, 等. 植物组培产业化生产中污染防控技术研究 [J]. 浙江农业学报, 2016(6).
- [5] 谢颖苑, 廖飞扬. 桉树组培厂季节性污染及防控 [J]. 绿色科技, 2015(1).
- [6] 谢颖苑, 容世清, 廖飞扬, 等. 提高桉树组培厂生产效率研究 [J]. 绿色科技, 2016(10).