

四种方法对组培室空气消毒效果的研究

邹瑜¹, 林贵美¹, 韦华芳¹, 李朝生², 牟海飞²

(1. 广西农业科学院 生物技术研究所, 广西 南宁 530007; 2. 广西植物组培苗有限公司, 广西 南宁 530007)

摘要: 采用紫外线、空气灭菌器、艾叶+苍术、艾叶4种方法, 对组培实验室进行空气消毒试验, 分析其灭菌效果。结果表明: 空气灭菌器、0.5 g/m³艾叶+2.0 g/m³苍术熏蒸消毒方法灭菌效果很好, 灭菌率分别达 82.7%和 70.1%。达到了培养室含菌量低于 50 cfu/m³的基本要求, 在实际应用中, 2种方法轮换使用效果最佳, 组培污染率降低了 50%~60%。使用中草药如艾叶、苍术等进行空气消毒灭菌, 是植物组培生产中又一种新的空气灭菌方式。

关键词: 组培苗; 空气消毒; 污染; 苍术; 艾叶

中图分类号: Q 94-338 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-0009(2009)08-0117-03

组培苗实验室或生产车间空气消毒灭菌的方法有多种, 通常使用的方法是: 紫外灯照射、甲醛熏蒸、各种空气净化器、过氧化乙酸或乙醇喷雾等。这些方法都起到空气消毒灭菌作用, 但每种方法都有其优缺点, 灭菌效果不尽相同, 甚至差别很大。该研究目的是通过比较试验, 找到一种更有效的、成本更低的组培生产空气消毒方法。

保持组培实验室或生产车间空气洁净度是有效地减少组培污染的前提, 还有利于提高接种效率, 降低生产成本。紫外灯照射、甲醛熏蒸是最为常用的方法, 有一定灭菌效果, 但对人体有害, 不小心接触到容易致癌, 同时对组培材料会产生不良影响, 安全性差。过氧化乙酸或乙醇喷雾, 可以对各个死角或表面进行消毒, 但容易引起培养室湿度升高, 还要进行除湿工作。各种空气灭菌器由于其灭菌原理有多种, 消毒灭菌效果各异, 一次性投入大, 使用成本高。使用中草药对组培室空气进行熏蒸消毒灭菌, 很少有报导^[1-3], 但在医院使用报导较多, 特别是在医院的手术室^[4]、母婴室^[5]、产房^[6]、重症病房等对洁净度和安全性要求较高的地方, 使用中草药或制剂(品)熏蒸消毒, 效果很好, 且安全可靠, 副作用少。医院使用的中草药有艾叶、苍术、诃子、大青叶等^[7], 或者使用中草药制成的消毒剂、中药蜡烛等。李文凯^[1]、孟娉^[2]等报道利用苍术对组培环境(培养室、接种室)进行熏蒸降尘消毒, 灭菌效果良好, 与甲醛、紫外线照射消毒效果

无显著差异。

1 材料与方法

1.1 材料

紫外灯功率 30 W, 空气净化器为日本原产安居乐牌 EP-AV 500。艾叶采自野外, 晒干备用, 或在中草药市场采购, 艾叶为菊科植物艾(*Artemisia argyi* Lévl. et Vant.)的干燥叶, 主要成分是萜品烯醇-4,β-石竹烯、蒿醇等多种成分的混合油。苍术为菊科植物茅苍术(*Atractylodes lancea* (Thunb.) DC.)的根茎, 化学成分为挥发油, 主要含苍术素、β-桉油醇、茅术醇等。检测菌落用的培养皿直径 11.5 cm, 采用生产上用的香蕉组培继代培养基进行菌类培养, 更接近组培的实际。

1.2 方法

1.2.1 空气消毒方法 方法 1: 紫外线照射, 培养室 40 m², 紫外灯 2 支, 安装高度 1.5 m, 在对角装好, 开灯照射 6 h 后, 关灯 15 min 后采样。方法 2: 空气净化器, 培养室 40 m², 把空气净化器置于培养室中间, 开机灭菌 6 h, 停机后 15 min 采样。方法 3: 艾叶与苍术一起熏蒸, 培养室 40~120 m², 按培养室空间体积计算各自用量, 艾叶用量是 1 m³空间使用 0.5 g, 苍术是 1 m³空间使用 2.0 g, 干燥艾叶可直接点燃, 苍术要先用 95%酒精浸泡 24 h, 用时再以酒精为助燃剂点燃, 每间培养室分 3~5 个点均匀点燃, 约 30 min 后完成熏蒸, 15 min 后采样。方法 4: 单一用艾叶, 培养室面积 40~120 m², 熏蒸方法同方法 3。

1.2.2 菌类检测与统计 在消毒前采 1 次样, 消毒完后在规定时间内再采样 1 次, 采用自然沉降法检测: 在离地 40~50 cm 高度上打开培养皿盖暴露 10 min, 进行采样, 盖上盖后在室温下培养 2 d, 然后从其外观按霉菌、细菌进行菌落数分类和统计。以培养室为单位, 每个方法重复 3 次, 每个培养室分别在 4 个角(离墙 1 m)和中

第一作者简介: 邹瑜(1965-), 男, 广西容县人, 副研究员, 现主要从事生物技术组培以及香蕉和野生毛葡萄的品种选育和栽培研究工作。E-mail: zy@gxaas.net。

基金项目: 广西农业科学院科技发展基金资助项目(1999030); 广西“新世纪十百千人才工程”专项资金资助项目(2006225号)。

收稿日期: 2009-03-20

间两处共 6 处采样。统计方法: 根据奥氏公式计算培养室空气的含菌数(cfu/m^3), 再计算出消毒灭菌率, 分析各方法的灭菌效果。空气菌落总数(cfu/m^3) = $50\ 000\ N/A \times T$ 。公式中: A 为培养皿面积(cm^2), T 为培养皿暴露时间(min), N 为培养皿平均菌落数($\text{cfu}/\text{皿}$)。

2 结果与分析

2.1 对霉菌类的灭菌效果

从表 1 可见, 空气净化器、紫外线对霉菌的灭菌率达 80% 以上, 艾叶+苍术、艾叶方法的灭菌率也达 70% 以上, 效果有一定差别。从消毒后的含菌量来看, 艾叶是其它 3 种方法的 1.7~4.3 倍, 这可能与用量、消毒前室内含菌量很高有关。

表 1 不同消毒方法对霉菌类的灭菌效果

消毒方法	消毒前含菌量	消毒后含菌量	灭菌量	灭菌率
	$/\text{cfu} \cdot \text{m}^{-3}$	$/\text{cfu} \cdot \text{m}^{-3}$	$/\text{cfu} \cdot \text{m}^{-3}$	$\%$
紫外线	322	48	274	85.0
空气净化器	231	24	207	89.6
艾叶+苍术	61	19	42	71.6
艾叶	385	82	303	78.7

2.2 对细菌类的灭菌效果

从表 2 结果可见, 4 种方法的灭菌率都不高, 并且差异极大(34.5%~68.8%), 与表 1 的霉菌灭菌效果对照看, 细菌更难以灭杀, 这可能与细菌附着在尘埃上有关。艾叶对细菌灭杀率最差, 但艾叶+苍术的灭菌却达到 68.8%, 灭菌率是艾叶的 1 倍, 这主要是苍术的作用^[3]。

表 2 不同消毒方法对细菌类的灭菌效果

消毒方法	消毒前含菌量	消毒后含菌量	灭菌量	灭菌率
	$/\text{cfu} \cdot \text{m}^{-3}$	$/\text{cfu} \cdot \text{m}^{-3}$	$/\text{cfu} \cdot \text{m}^{-3}$	$\%$
紫外线	48	24	24	50.0
空气净化器	48	24	24	50.0
艾叶+苍术	77	24	53	68.8
艾叶	29	19	10	34.5

2.3 总的灭菌效果及实际应用情况

组培污染均可分为霉菌污染和细菌污染, 因此, 总灭菌率是恒量消毒方法优劣的标准。表 3 显示, 空气净化器、紫外线总灭菌率 80% 左右, 而艾叶+苍术、艾叶方法的灭菌率 70%~75%, 空气净化器总灭菌率最高, 达到 82.7%, 消毒后含菌量 $< 50\ \text{cfu}/\text{m}^3$, 艾叶与苍术组合使用, 灭菌率达 70.1%, 消毒后含菌量也 $< 50\ \text{cfu}/\text{m}^3$, 而艾叶消毒后的含菌量仍高达 $101\ \text{cfu}/\text{m}^3$, 因此单用艾叶灭菌效果不甚理想, 或者要加大用量。紫外线总灭菌率与时间长短有关, 开灯 3 h, 总灭菌率只有 7.5%。

角落是菌类滋生的死角, 角落的含菌量要比培养室中间高 10%~100%。在试验中发现, 艾叶+苍术组合对培养室 4 个角落霉菌和细菌的灭菌率是 72.2%、80.3%, 而空气净化器是 71.4% 和 0%, 紫外线是 80.8% 和 40.0%。因此在实际应用中, 要定时移动空气净化器到角落边上, 才能达到较彻底、全面的灭菌目的。此外, 经常轮换使用空气净化器、艾叶+苍术、艾叶 3 种消毒方法, 效果最好, 组培污染率从 8% 左右下降到 2.5%~

3%, 下降了 50%~60%。

表 3 不同消毒方法的总灭菌效果

消毒方法	消毒前含菌量	消毒后含菌量	灭菌量	灭菌率
	$/\text{cfu} \cdot \text{m}^{-3}$	$/\text{cfu} \cdot \text{m}^{-3}$	$/\text{cfu} \cdot \text{m}^{-3}$	$\%$
紫外线	370	72	24	80.5
空气净化器	278	48	230	82.7
艾叶+苍术	144	43	101	70.1
艾叶	414	101	313	75.6

3 小结与讨论

艾叶和苍术是中国常见的中草药, 资源丰富, 容易得到, 且价格低廉, 消毒时简单易行, 并且采用的是熏蒸消毒, 效果好且持续时间久长^[2]。经医学上证明, 使用时对人体无毒害等副作用, 在爱婴病房都可使用, 值得在组培实验室或生产车间推广, 但要考虑到其气味对组培培养物有无不良影响。目前还很少见有同时使用艾叶与苍术作为组培室消毒方法的报导^[3], 使用时要注意安全, 以防引起火灾。此外, 不同地方、不同的组培室菌类含量、种类可能有差异, 艾叶和苍术灭菌效果可能会有变化, 因此要经过试验选定适宜的组合、用量及熏蒸时间。

试验中, 空气灭菌器的灭菌效果最好(特别是对霉菌), 但对培养室角落细菌的灭菌效果很差, 而艾叶+苍术对细菌的灭菌效果最好, 对培养室角落霉菌和细菌的灭菌效果最好, 因此在实际组培生产中, 空气灭菌器与艾叶+苍术轮换使用, 灭菌效果完全可以与使用空气净化系统的组培室相媲美, 而且使用成本很低。赵俐玲^[8]报道苍术加艾叶组的消毒效果优于电子灭菌器, 这可能与电子灭菌器的型号、灭菌原理、灭菌时间等因素有关。

组培传统的方法有: 紫外线照射、甲醛熏蒸、乙醇或过氧乙酸喷雾, 都有灭菌效果, 甚至很好, 但都有其缺陷和局限性, 特别是前 2 种方法, 对人的眼睛、皮肤和培养材料具有很大的危险性, 更要慎用。

参考文献

- [1] 李文凯, 贾晓鹰, 郭海燕. 苍术控制植物组培环境污染的研究[J]. 石河子大学学报(自然科学版), 2003, 7(2): 90.
- [2] 孟婷, 吕国华, 潘新仿. 不同熏蒸方法对接种室空气粉尘浓度的影响[J]. 甘肃农业, 2005(3): 89.
- [3] 邹瑜, 林贵美, 韦华芳. 艾叶、苍术在香蕉组培苗工厂化生产间的空气消毒研究[J]. 广西农业科学, 2008, 39(6): 767-770.
- [4] 王沪渝, 吴燕, 徐平红. 中药苍术用于手术室空气消毒的临床研究[J]. 现代护理, 2005(8): 603-604.
- [5] 姜文全, 崔彩萍. 艾叶熏蒸用于母婴同室空气消毒[J]. 西北药学杂志, 2002(2): 80-81.
- [6] 黄丽华. 苍术用于产房空气消毒的效果观察[J]. 广西中医学院学报, 2000(2): 19.
- [7] 詹小平, 邓小微, 沈丽珍. 艾条、苍术、诃子熏蒸对病房空气消毒作用的对比实验[J]. 中医临床杂志, 2005(4): 350-351.
- [8] 赵俐玲, 余素飞. 3 种空气消毒法的效果比较[J]. 现代护理, 2001(12): 5-6.

(致谢: 广西植物组培苗有限公司的李小泉、张进忠、吴代东也参加了该研究部分工作, 在此表示感谢!)

花叶木槿的组培快繁技术

琚淑明, 徐德兰

(徐州工程学院 江苏 徐州 221008)

摘要:以花叶木槿带节茎段为外植体,用 MS+6-BA 3 mg/L+NAA 0.4 mg/L 为诱导与增殖培养基,MS+6-BA 1 mg/L+NAA 0.2 mg/L 为生根培养基进行快速繁殖效果较好。

关键词:花叶木槿; 组织培养; 快繁

中图分类号:S 685.99 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2009)08-0119-02

花叶木槿(*Hibiscus syriacus* 'Argenteo-variegata')为锦葵科木槿属木槿的一个栽培变种,具有较高的观赏、药用和食用价值^[1-2]。因其斑叶的颜色黄、白互映,大而鲜明;花色品种繁多,花期持久,喜光且耐荫,在园林中常用作花篱、绿篱等,是一个集观叶、观花、观果的优良园林绿化树种,受到人们特别关注。但迄今为止,虽然有人对木槿的叶、花及其食用价值进行全面报道,而关于花叶木槿组织培养快繁技术还尚未见报道。因此,通过对花叶木槿组织培养技术达到快速繁殖的目的,为进一步开发利用花叶木槿植物资源提供科学依据。

1 植物名称

花叶木槿(*Hibiscus syriacus* 'Argenteo-variegata')。

2 材料类别

幼枝带节茎段。

第一作者简介:琚淑明(1974),女,硕士,讲师,现主要从事植物生理和生物化学方面的研究工作。E-mail: qushm@tom.com。

基金项目:徐州市科技计划资助项目(X20052375);徐州工程学院课题资助项目。

收稿日期:2009-03-20

3 培养条件

诱导与增殖培养基①: MS+6-BA 3 mg/L(单位下同)+NAA 0.4; 生根培养基②: MS+6-BA 1+NAA 0.2。以上培养基蔗糖浓度为 3%,琼脂 0.7%。pH 5.8,培养温度(25±2)℃,连续光照时间为 12 h/d,光强为 2 000 lx。

4 生长与分化情况

4.1 外植体的灭菌

取花叶木槿当年生健壮枝条,除去叶片,留有少许叶柄,用软毛刷轻轻刷洗,再在流水下冲洗 1~2 h,然后在超净工作台上,放入 70%的酒精中浸 30 s,再用 10%的次氯酸钠浸泡 10 min,吸干表面材料水分后,去除将茎段剪成带 1 个腋芽的茎段,接种到培养基①上。

4.2 腋芽的诱导与增殖

接种到培养基①上小枝条 7 d 左右腋芽萌动,40 d 左右腋芽可以长成 4 cm 以上枝条,同时枝条上的腋芽有不同程度的萌动,此时将剪成的茎段(保留至少 1 个腋芽)转接增殖培养基①上,继续培养,增殖系数 4~5 倍,当幼苗长到 2 cm 时,将其沿茎基部剪断,接入培养基②中,进行生根培养。

Study on Air Disinfection of Tissue Culture Lab by Four Methods

ZOU Yu¹, LIN Gui-mei¹, WEI Hua-fang¹, LI Chao-sheng², MOU Hai-fei², LI Xiao-quan², ZHANG Jin-zhong², WU Dai-dong²

(1. Biological Technology Institute of Guangxi Academy of Agricultural Sciences, Nanning, Guangxi 530007, China; 2. Guangxi Plant Tissue Culture Co. Ltd, Nanning, Guangxi 530007, China)

Abstract: Four methods, ultraviolet radiation, air sterilizer, artemisia leaf, artemisia leaf with atractylodes were applied to sterilize the air of plant tissue culture lab. The result showed that two methods of air sterilizer, suffocating of 0.5 g/m³ artemisia leaf with 2.0 g/m³ atractylodes were preferable, and the rate of sterilize reach 82.7% and 70.1% respectively, fit for the standard of 50 cfu/m³ bacterium and fungi content of culture lab. The two methods can be applied in turn for sterilize of culture lab, and reduce the pollution rate by 50%~60%. Application of artemisia leaf and atractylodes could be utilized for air sterilize in culture lab.

Key words: Tissue culture plantlet; Air disinfection; Stain; Atractylodes; Artemisia leaf