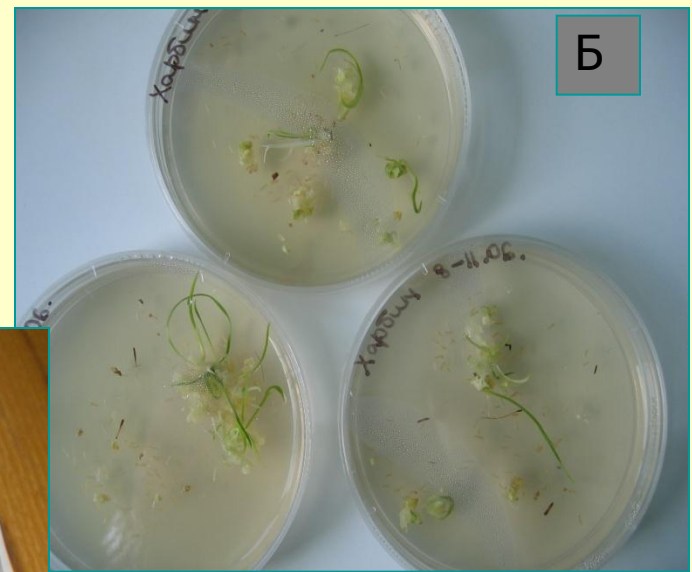
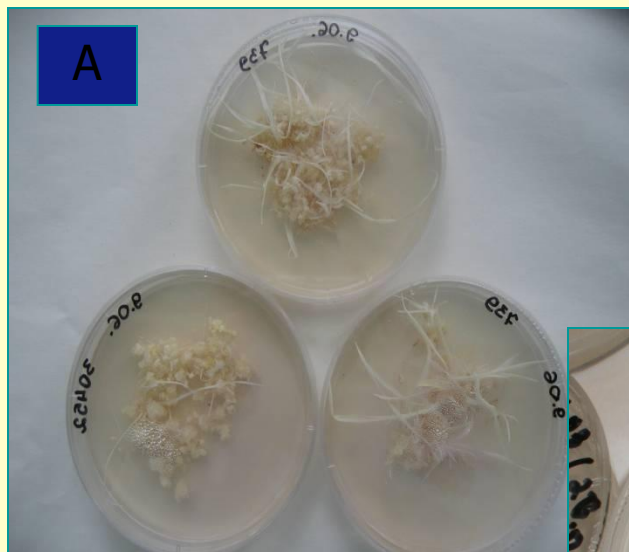
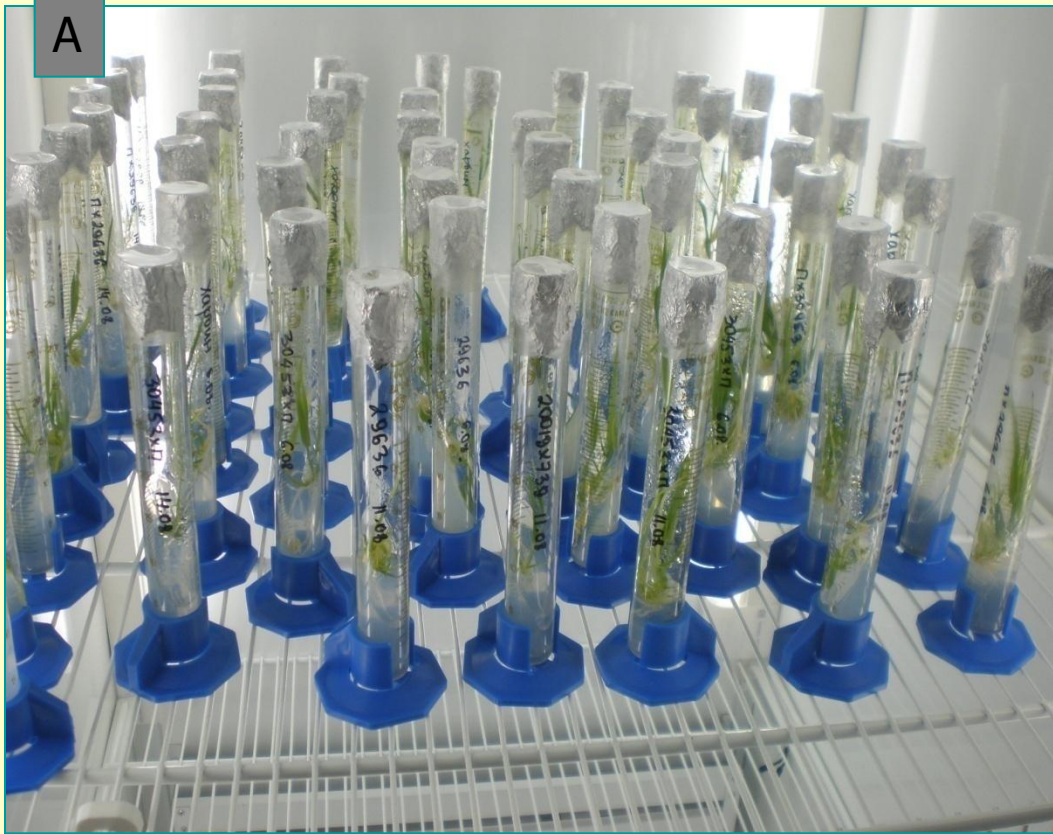


Стерилизация



Регенерация в культуре пыльников ячменя:
А- растения-альбиносы;
Б- зелёные растения-регенеранты;
В- оптимальная фаза развития растения для переноса его на среду для корнеобразования

А**Б**

Растения-регенеранты: А- растения на среде для индукции корнеобразования; Б-термостат, с расположенными в нем растениями на разных этапах развития

Инфекция, наблюдаемая в культурах растительных тканей, может быть систематической и случайной. В первом случае необходимо проанализировать все операции подготовки, стерилизации среды, тканей, помещений и изоляции и пересадки тканей, чтобы обнаружить ошибку, определяющую эту систематическую инфекцию.

Стерилизация

Стерилизация помещения. В больших операционных комнатах и боксах для стерилизации помещения ультрафиолетом могут быть использованы ртутно-кварцевые лампы группового облучения маячного типа- с горелкой ПРК-7, мощностью 1000 вт, или с горелкой ПРК-4, мощностью 350 вт (при меньшем объеме помещения).

Стерилизация обычно продолжается 2-3 час. Так как при этом образуются озон и окислы азота, токсичные в больших концентрациях и для человека и для растительных тканей, то, как правило, стерилизация комнаты для утренней работы в ней производится накануне вечером. При недостаточной герметичности помещения и отсутствии «подпора» воздуха в нем такой длительный промежуток времени между окончанием стерилизации помещения и началом работы может повысить процент инфицированности ткани. Однако при хорошей герметизации помещения такая предварительная стерилизация дает вполне удовлетворительные результаты. Кроме ртутно-кварцевых ламп в «операционных» комнатах или боксах могут быть успешно использованы бактерицидные аргонртутные лампы низкого давления с трубкой из увиолевого стекла. Наша промышленность выпускает их мощностью 15 и 30 вт (БУВ-15П и БУВ-30П). Эти лампы нуждаются в специальных пуско - регулирующих устройствах, состоящих из дросселя (марки КДБ-1), двух держателей и стартера (типа СК). Бактерицидные лампы экономичнее, чем лампы ртутно-кварцевые. Светильники из четырех-шести бактерицидных ламп можно расположить под потолком, по углам комнаты и над рабочим столом, а также и в тамбуре при входе в операционную комнату.

Стерилизация

Ультрафиолетовое облучение весьма эффективно против вегетирующих форм бактерий, но для уничтожения спорообразующих бактерий, а также грибной инфекции необходимо более массивное воздействие. Конидии плесени еще устойчивее против облучения, чем споровые формы. Для более полной стерилизации помещения рекомендуется время от времени применять стерилизацию паром. Для пропаривания комнаты в нее помещают открытый резервуар с водой (емкостью 5-6 л) и кипятят воду до тех пор, пока струйки конденсата не начнут стекать с потолка и стен комнаты. Конденсат смывает также имеющиеся в воздухе и в разных местах комнаты споры. После пропаривания перед работой, как обычно, комнату следует простерилизовать ультрафиолетовым облучением.

В тамбуре перед операционной комнатой рекомендуется положить коврик (паралоновый, резиновый), смоченный раствором стерилизатора (хлорная известь, хлорамин), чтобы не занести инфекцию в операционную комнату с обувью.

Стерилизация

Правила работы в операционной комнате. Перед самым началом работы все предметы, находящиеся в операционной комнате, протирают спиртом. Работающие надевают стерильные халаты, косынки, в некоторых случаях стерильные марлевые повязки. Халаты, косынки, и повязки стерилизуют в автоклаве, а перед работой раскладывают в операционной комнате для дополнительной стерилизации ультрафиолетовым облучением. Руки перед работой тщательно моют теплой водой с мылом и щеткой, а во время работы периодически протирают 50-ным спиртом или другими стерилизующими растворами. Движения и разговоры в операционной комнате должны быть сведены к минимуму.

Стерилизация

Стерилизация посуды и инструментов. Стерилизация сухим горячим воздухом. Стекланную посуду, инструменты обычно стерилизуют в сушильных шкафах сухим горячим воздухом. При стерилизации инструментов в автоклаве они ржавеют и тупятся. Предметы, требующие стерилизации, обортывают в бумагу и помещают в сушильные шкафы на 2 часа при температуре 140°. За температурой необходимо следить, так как около 170° начинает коричневеть и разрушаться бумага. После стерилизации посуду и инструменты, необходимые для пересадки, переносят в операционную комнату, где они могут быть поверхностно простерилизованы еще дополнительно ультрафиолетовым облучением при стерилизации комнаты.

Стерилизация пламенем. Во время работы инструменты, предварительно простерилизованные сухим, горячим воздухом, вынимают из бумаги, опускают в стакан с 96°-ным спиртом и стерилизуют еще раз обжиганием в пламени спиртовки. Немедленно после обжигания каждый инструмент закладывают между листами плотной оберточной бумаги, сложенной в пачки из 20-30-листов и предварительно простерилизованной в автоклаве. После использования для манипуляции с тканью пинцет или ланцет опять опускают в спирт и перед каждым последующим употреблением инструмент опять обжигают и закладывают уже под следующий (еще не использованный для хранения инструментов) лист бумаги. Инструменты во время работы можно стерилизовать также кипячением. Это рекомендуется для ножниц, шприцев, пробирок. Перчатки и перчатки обжигают пламенем только при работе с тканями.

Стерилизация

Стерилизация паром под давлением (автоклавирование). Вата, пробки, марля, халаты и косынки, бумага, целлофановые колпачки, фольга, пипетки, вода, питательные среды стерилизуются в автоклавах. Удобно для стерилизации иметь горизонтальный, автоматический автоклав с регулировкой давления. Автоклавы электрические, горизонтальные типа АЭ-3, удобны для работы с культурами растительных тканей, их следует только дополнительно оборудовать полками по размерам автоклава. Обычно в полках делают отверстия для стока конденсата, так как в противном случае положенные на них вещи будут влажными. Для стерилизации больших объемов жидкостей (в 10- и 20-литровых бутылках) необходимо иметь дополнительно большой вертикальный автоклав.

Предметы, подготовленные для автоклавирования, должны быть обернуты сначала в бумагу, затем в целлофан и обвязаны шпагатом. Вату, пробки, марлю, халаты можно стерилизовать в специальных металлических биксах. Вату из плотно свернутых пачек следует вынуть и разложить более рыхлым слоем. Материалы и оборудование рекомендуется стерилизовать в автоклаве при давлении 2 атм (температура 133°), в течении 30 мин.

Стерилизация

Стерилизация питательных средств. Автоклавирование. Среды стерилизуют при давлении 0,75 — 1 атм (температура 115-120°) в течение 15-20 мин. при объемах среды в пробирках и маленьких колбах по 25 мл и в течение 30-40 мин. при объемах среды 3-4 л (в больших колбах). Давление в автоклаве при стерилизации среды не следует поднимать выше 1 атм, так как это приведет к разрушению сахаров и других термолабильных компонентов среды. Для сохранения таких термолабильных веществ можно рекомендовать дробную стерилизацию. Среда стерилизуется в аппарате Коха или кипячением при 100° в течение 1 часа, а затем с промежутком в 1 сутки (провокация прорастания спор) операция повторяется 2 раза. По окончании стерилизации среды и воды в автоклаве не следует слишком резко снижать давление, т. е. полностью открывать спускной кран автоклава, так как это может привести к закипанию среды, смачиванию пробок, а иногда и к выбрасыванию жидкости из пробирок и колб из-за резкого изменения давления. Пробки для пробирок и колб со средой делают из предварительно проавтоклавленной ваты. Закрывать культуры резиновыми или корковыми пробками ни в коем случае нельзя, ибо это приведет к удушению ткани. Уайт (1954) рекомендует отказаться и от ватных пробок и перейти на алюминиевую фольгу. Ряд преимуществ имеют колпачки из полиэтиленовой пленки, так как она, хорошо пропуская воздух, препятствует испарению влаги, но пленку трудно стерилизовать ибо она не выдерживает стерилизации ни в автоклаве, ни сухим жаром. Стерилизация колпачков из пленки спиртом, по нашим данным, не достаточно эффективна и приводит к большому проценту инфекции.

Стерилизация

Концы пипеток перед автоклавированием закрывают ватным тампоном и каждую завертывают от дельно. Не рекомендуется переносить простерилизованную среду в операционную комнату перед стерилизацией помещения ультрафиолетовым облучением, так как озон и окислы азота, образующиеся при этом, могут привести к разрушению некоторых компонентов среды.

Стерилизация фильтрованием. Белковые компоненты среды, витамины, углекислые соли, аминокислоты, растительные экстракты и другие термолабильные вещества при автоклавировании могут разрушаться или превращаться в другие соединения. Для сохранения их в составе стерильной среды рекомендуется следующий способ стерилизации. Предварительно в автоклаве стерилизуют пустые культуральные сосуды, закрытые пробками и колпочками. Режим стерилизации обычный, т. е. 2 атм в течение 30 мин. Питательную среду, из состава которой исключены термолабильные компоненты, автоклавируют в течение 20 мин. при 1 атм. Раствор термолабильных веществ стерилизуют фильтрованием через бактериальные фильтры и в стерильной комнате приливают к основной среде, охлажденной до 50-60°, добавляют отфильтрованный раствор, среду взбалтывают и быстро разливают по простерилизованным культуральным сосудам.

Стерилизация

Стерилизация растительного материала.

Начальное получение стерильного растительного материала является трудной задачей и часто, несмотря на все страдания экспериментатора, 75% или даже больше культур отказываются инфицированными. По данным Готре, в случае культуры тканей сахарной свеклы трудно получить более 50% асептических культур. В опытах Зелинского со стеблевыми сегментами дуба через две-три недели культивирования инфекция постоянно наблюдалась в отдельных пробирках, несмотря на тщательную стерилизацию. То же самое наблюдали мы для корневой ткани жень-шеня и раувольфии и стеблевой ткани пилокарпуса. В этих случаях неинфицированными оставались ткани в 3-4 пробирках из 10-15. однако, если в результате изоляции из растения получена растущая стерильно ткань, то в дальнейшем легко поддерживать ее стерильность при пассировании, т.е. пересадках ткани маленькими кусочками на свежую питательную среду для продолжения культуры. При соблюдении всех правил асептической работы процент случайной инфекции при пассировании тканей редко превышает 1-3%.

Стерилизация

Для стерилизации органов и тканей растений, из которых будет изолироваться ткань для культуры, применяют обычно большой набор различных стерилизующих веществ.

Правило, по которому следует выбирать наиболее пригодный стерилизующий раствор, просто. Это вещество должно обеспечить наибольший процент неповрежденных тканей, способных к росту и новообразованиям, при наименьшем проценте инфекции. Этому правила следует придерживаться и при выборе длительности стерилизации.

Наиболее распространенными стерилизующими растворами являются растворы, содержащие активный хлор: гипохлориты кальция и натрия, хлорамины, хлорная известь. Растворы эти готовят следующим образом: определенное количество стерилизатора перед употреблением взбалтывают в 1 л воды в течение 10 мин., затем отфильтровывают и используют для стерилизации растительного материала.

Стерилизация

Хлорная известь рекомендуется для стерилизации различного растительного материала в концентрации 90 г/л. продолжительность стерилизации для тканей мясистых корней –20 –25 мин., для побегов древесных и лиан –15 –30 мин., для молодых побегов и стеблей травянистых растений –5 –10 мин. Для точек роста стебля рекомендуется использовать более низкую концентрацию: 50 г/л при 15-минутной стерилизации. Для семян концентрация хлорной извести может быть снижена до 35 г/л.

Гипохлорит кальция применялся Лиоре для стерилизации корневой ткани скорцонеры в концентрации 90 г/л в течение 15 мин. Лингаппа стерилизовал кусочки побегов картофеля в течении 5 мин. 75°-ным спиртом и затем 15 мин. 1%-ным гипохлоритом натрия.

Стерилизация

Стерилизующие растворы, содержащие ртуть (сулема и диацид). Сулема (HgCl_2) не смотря на на ее токсичность для тканей, часто применяется для стерилизации растительного материала и при правильном выборе ее дозировки и времени стерилизации дает удовлетворительные результаты. Мы применяли сулему для стерилизации самых разнообразных растительных объектов, начиная от пластинок ряски и растущих вертушек разных растений и кончая двух — трехлетними побегами древесных растений с удовлетворительными и хорошими результатами для большинства объектов. Обычно сулема применяется для всех этих объектов, кроме древесных, в концентрации 0,1%. Время стерилизации различных растительных объектов в 0,1%-ном растворе сулемы, по наших данным, варьирует существенно.

Эффективность стерилизации значительно повышается при добавлении к раствору сулемы детергентов типа Твин-80, Твин-20 (5–6 капель на 1 л) или ОП-7; ОП-10, - 300 мг/л .

Стерилизация

После стерилизации ткани в сулеме необходимо тщательно промыть ее в 4-5 порциях стерильной воды, по 5-15 мин. в каждой порции. Начиная работу с новым растительным объектом необходимо предварительно найти удовлетворительные условия для его стерилизации, для чего рекомендуется испробовать несколько вариантов, значительно различающихся между собой по времени стерилизации, а затем, сужая эти интервалы, найти условия, оптимальные для данного объекта.

Кроме сулемы, для стерилизации может быть рекомендован другой ртутный препарат диацид (этанолртутихлорид и борная кислота с цетилпиридинбромидом в качестве детергента), но он действует слабее сулемы, и, по нашим наблюдениям, никакими преимуществами по сравнению с ней не обладают.

Стерилизация

Перекись водорода. Концентрация 10-12%, время стерилизации сухих семян –10–12 мин., набухших семян 6 –8 мин., сегментов стебля травянистых растений –8 –10 мин.

Преимуществом перекиси водорода в качестве стерилизующего агента является то, что после нее не нужно так долго и тщательно отмывать ткань, как после сулемы: достаточно только один раз промыть стерильной водой. Оставшаяся в тканях перекись быстро разрушается.

Стерилизация спиртом и обжиганием пламенем. Часто применяется при стерилизации крупных семян, завязей, плодов. Материал опускается в спирт и затем обжигается в пламени; эта операция повторяется несколько раз.

Стерилизация

Применение антибиотиков. Антибиотики редко применяются для поверхностной стерилизации растительного материала, но они необходимы в тех случаях, когда инфицирование культуры связано с наличием спор грибов или бактерий во внутренних полостях ткани. Несмотря на все усилия, простерилизовать ткань обычными способами не удастся, и споры, попадая при выращивании тканей в благоприятные условия, прорастают и начинают быстро размножаться на питательных средах. Чтобы подавить этот процесс часто в питательную среду вводят антибиотики: пенициллин, биомицин, тетрациклин, стрептомицин, гризеофульвин и др. (после фильтрования через фильтр по способу, описанному выше).

Так, по данным Монтана (1957) добавление пенициллина в количестве 1 мг на 1 л питательной среды помогло получить стерильную культуру стебля молочая. По данным Штихеля (1959) ауреомицин или его аналог ахромицин, добавленные к среде в концентрации 50 мг/л, оказались очень эффективными при культивировании тканей клубнелуковицы цикламена. Морель (1950) применял для получения стерильных культур тканей ауреомицин в концентрации 1/10000.

Стерилизация

Используя антибиотики для получения стерильных культур, необходимо помнить, что они также оказывают влияние на рост растительной ткани. Как показали Де Ропп и Никель, в слабых концентрациях пенициллин, тетрацилин, стрептомицин, бацитрацин значительно стимулируют рост ткани вирусной опухоли щавеля и нормальной ткани подсолнечника, а при повышении концентрации вызывают его угнетения. Наш опыт работы с антибиотиками (пенициллином, стрептомицином, тетрацицином, биомицином и гризеомином) показал, что часто концентрации угнетающие рост ткани или вызывающие нарушение ее обмена, еще бывают недостаточными для подавления развития инфекционных микроорганизмов. Так, при выращивании верхушечных почек сорта Мерилендский мамонт путем добавления в среду стрептомицина в концентрации в 5 мг/л удалось получить культуры, которые были лишены инфекции. Однако растения, полученные из этих почек, имели явные признаки хлороза. Образование хлорофилла под влиянием стрептомицина в этих растениях было подавлено. Для почек вообще не были найдены условия, позволяющие получить асептическую культуру. При применении стрептомицина рост почки полностью ингибировался, но стерильность не была достигнута. Трудность применения антибиотиков для культуры растительных тканей заключается еще и в том, что спектр бактерицидного действия каждого из них довольно узок, а среди облигатных паразитов растительных тканей встречаются микроорганизмы, весьма разнообразные по систематическому положению. Можно было бы рекомендовать использовать смеси разных антибиотиков или применять один, но с наиболее широким спектром действия. По нашим данным, перспективным антибиотиком в этом отношении является гризеолин. Он сильно угнетает прорастание семян рудбекии в концентрации 1/1000 и 1/500 и может применяться только в очень низких концентрациях – 1/50¹⁹000. однако его действие на другие растительные ткани необходимо проверить.

Стерилизация

Техника стерилизации растительного материала. Перед стерилизацией объекты должны быть тщательно вымыты теплой водой с мылом и щеткой и промыты дистиллированной водой. Особенно тщательно должны быть отмыты ткани корня и клубнеплодов, побегов древесных растений, толстых стеблей. Рекомендуется перед стерилизацией опустить ткани на несколько секунд в спирт, а потом в стерилизующий раствор.

Для стерилизации побегов древесных растений Зелинский рекомендует следующую последовательность операций: отрезки (длиной 20–30 см) одно-двухлетних побегов дуба, бука и березы моют в проточной воде, протирают ватой, смоченной сначала 95°-ным, затем 100°-ным спиртом, и стерилизуют в 0,2%-ном растворе сулемы в течение 45 мин. Затем промывают 3 раза стерильной водой и используют для изоляции из них определенных тканей.

Стерилизация

Для стерилизации мелких объектов, используемых в большом числе, т. е. семян, почек травянистых и древесных растений и т. д., мы обычно помещаем их в марлевый мешочек, затянутый длинной ниткой, и в этом мешочке, чтобы не растерять материал, проводим его последовательно через операции промывки в мыльной воде, нескольких порциях водопроводной и дистиллированной воды, затем через стерилизацию и промывки в нескольких порциях стерильной воды. При стерилизации отрезков стебля или верхушечных стеблевых почек в растворах сулемы или гипохлорита рекомендуется парафинировать срезы, чтобы стерилизатор не проник во внутрь сосудистого цилиндра, что может привести к значительной интоксикации ткани. Если парафинирование не было проведено, рекомендуем подрезать концы сегмента или стеблевую часть почки на значительном расстоянии от места первоначального среза, чтобы удалить части ткани, которые могут содержать стерилизатор. И для стерилизации объектов и для промывки в стерильной воде обычно используют простерилизованные сухим горячим воздухом стаканы, закрытые чашками Петри. Если объект не тонет в стерилизующем растворе, рекомендуется сверху поместить вату.