

О НЕПРЕРЫВНОМ КУЛЬТИВИРОВАНИИ ТРИХОМОНАД

И. К. Падченко

(Киевский научно-исследовательский институт эпидемиологии,
микробиологии и паразитологии)

Известно, что непрерывное культивирование микроорганизмов, в т. ч. и простейших, происходит лишь до тех пор, пока в культиваторе (сосуд для выращивания микроорганизмов) сохраняется стабильное динамическое равновесие между этими микроорганизмами и питательной средой. Такие условия в культиваторе создают путем регулируемого долива свежей питательной среды и удаления из него накапливающихся продуктов метаболизма, биомассы в суспензии культуры, а также использованной питательной среды. Однако эти технологические процессы не могут быть осуществлены без предварительного определения параметров, от которых зависит интенсивность роста и развития культивируемых организмов и непрерывность процесса культивирования (Семененко, Ничипорович, 1962; Владимирова, Семененко, 1962; Ковров, Буданов, 1964, 1964а; Рерберг, Кузьмина, 1964; Гительзон, Фиш, Чумакова, 1967; Новиков, 1967; Ковров, Мельников, Белянин и др., 1967 и др.). Самым существенным недостатком известного способа непрерывного культивирования микроорганизмов является то, что его осуществление связано со сложными технологическими процессами и операциями, требующими значительных затрат сил и средств и наличия в лаборатории квалифицированных специалистов для управления ими. Вследствие этого данный способ мало доступен в лабораторной практике. Важно отметить при этом, что многие проблемы, связанные с непрерывным культивированием, еще требуют, как совершенно правильно считает В. Н. Новиков (1967), своего дальнейшего разрешения. К ним относятся: 1) точный расчет питательной среды, основанный на пищевых потребностях культивируемых микроорганизмов; 2) обеспечение необходимой концентрации пищевых веществ в питательной среде и предупреждение накопления в ней продуктов метаболизма и биомассы в суспензии погибшей культуры; 3) поддержание оптимального рН среды; 4) предотвращение бактериального загрязнения; 5) обеспечение соответствующего режима аэрации и т. д. Необходимо также учитывать, что при указанном способе не удастся обеспечить на длительный срок непрерывное культивирование клеток животного происхождения (культура ткани), даже в случае обеспечения основных параметров, от которых зависит непрерывность процесса их роста и развития (Гительзон, Нефедов, Садовская, Терсков, 1967). Не представляют в этом отношении исключения также и трихомонады, относящиеся к числу одноклеточных микроорганизмов животной природы.

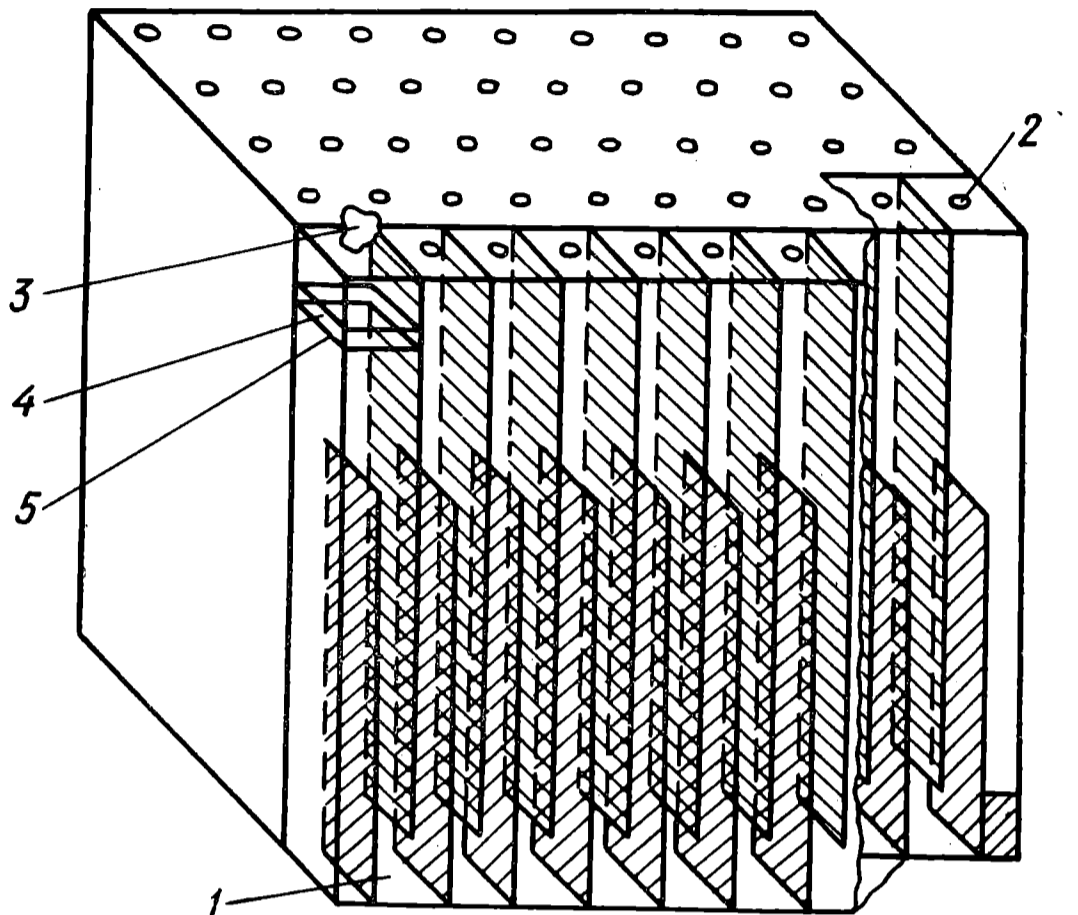
С целью упрощения процесса непрерывного культивирования мы попытались сконструировать такой прибор, в котором среда оказалась бы в общей емкости разобранной (изолированной) по вертикали в полых трубках или ячейках, соединенных между собой по типу сообщающихся сосудов. Исходили мы при этом из того, что такой способ разделения питательной среды позволит осуществить дозированное ее использование популяцией культивируемых микроорганизмов в процессе непрерывного культивирования. В этом случае станет излишней необходимость удаления из культиватора использованной питательной среды, продуктов метаболизма, накапливающейся биомассы в суспензии культуры, а также добавления в него свежей среды. Исчезнет, следовательно, и необходимость контролирования параметров, от которых зависит непрерывный рост и развитие культуры.

Впервые это было осуществлено нами в 1967 г. при помощи оригинального «Устройства для культивирования трихомонад», выполненного из полой волнообразно изогнутой стеклянной трубки (Падченко, авторское свидетельство № 211745; Падченко, 1968). Непрерывный рост культуры трихомонад в этом приборе продолжался без пересева в течение четырех и более месяцев. С целью удлинения сроков непрерывного культивирования данного вида жгутиковых простейших нами была сконструирована вторая модель «Устройства для культивирования трихомонад», в которой нефункциональное пространство было сведено до предельно возможной минимальной величины (Падченко, авторское свидетельство № 273370). Условно эта модель устройства обозначена: «Прибор для непрерывного культивирования трихомонад — 2». На рисунке изображен общий вид данного прибора и показано, что прибор выполнен в виде емкости прямоугольной формы, разделенной на ряды ячеек (1), соединенных по принципу сообщающихся сосудов. В целях экономного расходования питательной среды площадь

поперечного сечения каждой ячейки (1) не должна превышать 1 см^2 . Размеры сообщения по вертикали между парами смежных ячеек на верхнем полюсе прибора составляют не менее 6—7 см, а на нижнем они соответствуют поперечному сечению ячейки (до 1 см^2). Ряды ячеек последовательно сообщаются между собой в нижней его части при помощи отверстия, размеры которого также соответствуют поперечному сечению ячейки. У каждой двух смежных ячеек сверху имеется отводящее отверстие (2), предназначенное для удаления газа, образующегося при росте трихомонад. Диаметр отверстия не превышает 1 см^2 .

Для непрерывного культивирования трихомонад стерильный прибор заполняют свежей питательной средой так, чтобы ее уровень (5) находился на 2,0—2,5 см ниже ватно-марлевых пробок (3), которыми плотно закрывают отводящие отверстия (2). Поверхность питательной среды в каждой двух смежных ячейках заливают стерильным вазелиновым маслом (4) слоем 0,5—0,6 см. Культуру трихомонад вносят пастеровской пипеткой в крайнюю ячейку первого ряда прибора. За ростом простейших наблюдают в микроскоп или определяют по помутнению питательной среды.

Схематическое изображение прибора для непрерывного культивирования трихомонад — 2.



При помощи данного прибора удалось обеспечить непрерывное культивирование трихомонад, продолжающееся без пересева свыше восьми месяцев. Причем указанный срок не является предельным, т. к. интенсивность роста культуры в последней ячейке оставалась прежней. Предложенный способ непрерывного культивирования весьма прост и широко доступен для любой лаборатории, а необходимые для его действия затраты сил и средств оказываются самыми минимальными. Очень важно и то, что данный прибор может быть использован для непрерывного культивирования и длительного хранения не только трихомонад, но и других видов подвижных простейших и бактерий, размножающихся на жидких или полужидких питательных средах. Его можно также использовать для отделения подвижных видов микроорганизмов от неподвижных, что имеет большое значение в диагностической практике для их идентификации, а в лабораторных условиях — для очистки культур.

При изучении некоторых морфологических свойств (характер оболочки; ядерный и жгутиковый аппарат, размеры и т. д.), степени устойчивости и химическочувствительности трихомонад было установлено, что у одного и того же штамма простейших, подвергавшегося непрерывному культивированию, указанные признаки совершенно не изменялись. Так, неизменной была способность к разложению сахаров (мальтозы, глюкозы и др.) и образованию газа (преимущественно CO_2), хотя интенсивность этого процесса у различных штаммов сильно варьировала. Постоянной оставалась кислотообразующая функция: рН среды в приборе была исходной (6,2—6,0) до момента появления в соответствующей его части подвижных особей грушевидной формы культивируемой популяции простейших. При интенсивном накоплении в том или ином участке прибора ланцетовидных, вытянутых с перетяжкой и других делящихся форм паразита рН снижается до 5, при появлении овальных и округлых — до 4,5, а в случае массового разрушения последних — до 4. Строго индивидуальными, но неизменными для каждого штамма трихомонад оставались также интенсивность цикла развития и размножения, а также скорость перемещения культивируемой популяции в приборе.

Таким образом, важнейшие биологические свойства трихомонад, подвергавшихся непрерывному культивированию, остаются неизменными. В этом состоит отличие предлагаемого нами метода культивирования микроорганизмов от метода замораживания, используемого некоторыми авторами для длительного хранения штаммов (Равич-Биргер, 1960; Печникова, Орлова, 1965; Печникова, 1967; Straka, Stokes, 1959 и др.), а получаемые культуры трихомонад могут быть использованы для любых исследований без риска получения недостоверных результатов. Ценной особенностью предложенного прибора является и то, что он позволяет осуществить наблюдение за ростом и развитием трихомонад на любом этапе их развития, что почти неосуществимо при паразитировании этих жгутиковых простейших в организме хозяина или при эстафетных пересевах из пробирки в пробирку.

Л И Т Е Р А Т У Р А

- В л а д и м и р о в а М. Г., С е м е н е н к о В. Е. 1962. Интенсивная культура одноклеточных водорослей. М.
- Г и т е л ь з о н И. И., Н е ф е д о в В. П., С а д о в с к а я Г. М., Т е р с к о в И. А. 1967. Опыт непрерывного культивирования тканей. В кн.: «Непрерывное управляемое культивирование микроорганизмов». М.
- Г и т е л ь з о н И. И., Ф и ш А. М., Ч у м а к о в а Р. И. 1967. Исследование некоторых статистических и динамических характеристик метаболизма светящихся бактерий при непрерывном культивировании. Там же.
- К о в р о в Б. Г., Б у д а н о в А. С. 1964. Культиватор для интенсивного выращивания хлореллы в управляемых условиях среды. В кн.: «Управляемое культивирование микроводорослей». М.
- К о в р о в Б. Г., Б у д а н о в А. С. 1964а. О конструировании лабораторных культиваторов для выращивания хлореллы в интенсивном режиме. Там же.
- К о в р о в Б. Г., М е л ь н и к о в Е. С., Б е л я н и н В. Н. и др. 1967. Культиватор для интенсивного непрерывного выращивания микроводорослей. В кн.: «Непрерывное управляемое культивирование микроорганизмов». М.
- Н о в и к о в В. Н. 1967. Установка для культивирования дрожжевых культур в непрерывном режиме. Там же.
- П а д ч е н к о И. К. 1968. Об упрощенном способе культивирования и длительном хранении трихомонад. Вестн. зоол., № 2.
- П е ч н и к о в а И. В. 1967. Влияние состава среды высушивания на термоустойчивость чумной живой сухой вакцины ЕВ в процессе длительного хранения. Автореф. канд. дисс. Саратов.
- П е ч н и к о в а И. В., О р л о в а А. Н. 1965. Влияние температуры растворителя на число живых микробных тел в сухой живой противочумной вакцине, приготовленной с различным составом среды высушивания. В кн.: «Вопросы микробиологии и лабораторной диагностики особо опасных инфекций». Саратов.
- Р а в и ч - Б и р г е р Е. Д. 1960. О восстановлении культур микробов из высушенного состояния. Микробиол., эпидемиол. и иммунол. № 3.
- Р е р б е р г М. С., К у з ь м и н а Р. И. 1964. Опыт длительного ступенчатого культивирования протококковых водорослей в сообществе с бактериями на выделениях человека. В кн.: «Управляемое культивирование микроводорослей». М.
- С е м е н е н к о В. Е., Н и ч и п о р о в и ч А. А. 1962. Установка для изучения водорослей. Вестн. АН СССР, № 1.
- S t r a k a R., S t o k e s G. 1959. Metabolic injury to bacteria at low temperatures, J. Bact. v. 78, N 2.

Поступила 28.VII 1972 г.

ON CONTINUOUS CULTIVATION OF TRICHOMONADIDAE

I. K. Padchenko

(The Research Institute of Epidemiology, Microbiology and Parasitology, Kiev)

S u m m a r y

The designed peculiar device permits a continuous cultivation of Trichomonadidae to be provided under conditions of any laboratory. The process of the continuous cultivation in the device takes place without subculturing and replacing the nutrient medium for above 8 months. The device is made as a rectangular tank divided into rows of cells connected as communicating vessels. It is established that the cultivated strains of Protozoa in the process of continuous cultivation do not change their most important biological properties: morphological characters, stability, chemiosensitivity, biochemical activity and other properties typical of this species.