

Г. М. ПАРОНИКЯН

К ВОПРОСУ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ *TRICHOMONAS*
VAGINALIS НА ТВЕРДОЙ СРЕДЕ

Культивирование вагинальной трихомонады на твердой среде несомненно можно считать важным достижением и дальнейшим шагом в вопросе выращивания и изучения трихомонад. Первые сообщения по культивированию *T. vaginalis* на твердой среде в литературе появились сравнительно недавно [1, 4, 5, 6]. Этот метод культивирования имеет ряд преимуществ перед существующими, но еще не разработан и нуждается в дальнейшем усовершенствовании.

В настоящем сообщении приводятся результаты наших исследований по культивированию *T. vaginalis* на твердой среде в пробирках и в чашках Петри.

Материалы и методы. Культивировать трихомонад на твердой среде мы начали десять лет назад на предложенной нами твердой печеночно-агаровой среде № 3 с целью выделения и выращивания чистой культуры *T. vaginalis* [2, 3]. На указанной среде в течение длительного периода мы успешно выращивали этих простейших. В дальнейшем для культивирования трихомонад на твердой среде оказалось целесообразнее использовать видоизмененную жидкую среду № 2, описанную нами ранее [2, 3]. В состав этой твердой среды входят: воды дистиллированной — 900 мл, хлористого натрия — 6,5 г, хлористого кальция — 0,1 г, хлористого калия — 0,1 г, соды двууглекислой — 0,3 г, пептона — 32,0 г, мальтозы — 1,6 г, агара — 15,0 г. и печеночного экстракта — 300,0 мл.

Среда кипятится в водяной бане до растворения агара, фильтруется через ватно-марлевый фильтр, разливается в стерильные колбы по 50—200 мл, автоклавируется при 1 атмосфере в течение 20 мин. и хранится в прохладном месте. рН среды после автоклавирования становится слабокислой (6,2—6,3). Печеночный экстракт готовится следующим образом: свежая печень кролика режется на мелкие куски, к ней добавляется дистиллированная вода в двойном количестве. Через 2 ч. смесь кипятится в водяной бане в течение 15 мин. и пропускается через ватно-марлевый фильтр. Полученный фильтрат вносится в среду из расчета 1 на 3.

Опыты проводились на четырех штаммах культуры *T. vaginalis*, выделенных в разное время от больных, страдающих трихомонадным кольпитом. Чистая культура этих штаммов была получена с помощью антибиотиков — пенициллина и стрептомицина и сохранялась в течение 2—36 месяцев на среде № 2.

Культивирование трихомонад в пробирке. Перед употреблением среда подогревается в водяной бане для расплавления агара, после охлаж-

дения до 42—45° к среде добавляется 15% сыворотки человека и по 50 единиц пенициллина и стрептомицина на каждый миллилитр среды. После размешивания среду разливают в пробирки по 4 мл и дают застыть в наклонном положении. Для посева берется 24-часовая культура *T. vaginalis*. На скошенную поверхность среды наносится 0,1 мл посевного материала, содержащего не менее 100 тыс. лептомонад.

Культивирование трихомонад на чашках Петри. Трихомонады на чашках Петри культивировались двумя способами: на поверхности среды и по всей толще агаровой пластинки. Для получения поверхностного роста трихомонад применяется та же самая среда с сывороткой и антибиотиками, которая разливается в стерильные чашки Петри по 20—25 мл. После затвердения среды 0,2—0,3 мл 24 час. культуры трихомонад наносятся на чашку и равномерно расстилаются шпателем по агаровой пластинке. Для получения роста трихомонад внутри среды в колбу со средой, остывшей до 40°, вносится сыворотка, антибиотики и культура *T. vaginalis* по 1,0 мл на чашку, размешивается и по 25 мл разливается по чашкам Петри. С целью сравнения роста простейших, полученных на плотной среде, с ростом на жидкой трихомонады одновременно засеваются и на обычную среду № 2.

Трихомонады культивировались в присутствии воздуха, в вакууме, в атмосфере углекислого газа или азота. Для создания этих условий удобным оказался обычный вакуумный эксикатор, откуда воздух при необходимости удалялся водоструйным насосом. Для сохранения влажности на поверхности плотной среды, на дне эксикатора помещается небольшой сосуд с водой. Засеянные пробирки и чашки Петри в эксикаторах инкубируются в термостате при 37°. Наблюдения за ростом трихомонад производятся в течение 10 дней, путем микроскопирования свежих и окрашенных по Романовскому-Гимза препаратов.

Средние данные опытов по культивированию 4 штаммов *T. vaginalis* в пробирках и на чашках Петри приведены в табл. 1 и 2; рост трихомонад условно обозначен: + до 10 трихомонад в поле зрения микроскопа, при увеличении 300 $\times$; „++“ до 25; „+++“ до 50; „++++“ свыше 50; „—“ подвижных тригистов не обнаружено.

Результаты исследования. Как видно из данных табл. 1, рост простейших в пробирках, на скошенной поверхности описанной выше твердой среде № 2, в атмосфере углекислого газа, начинается со второго дня посева и продолжает увеличиваться к 4 дню культивирования. Далее кривая роста трихомонад падает и уже к концу недели остаются в живых только одиночные особи. Нередко к этому времени наступает и гибель всех простейших. При культивировании трихомонад на этой же среде в присутствии воздуха простейшие растут менее интенсивно и менее продолжительно. В атмосфере азота или в вакууме размножение трихомонад не имеет места, число их постепенно убывает и уже через 2—3 дня после посева тригисты погибают.

В конденсационной жидкости испытываемой среды в атмосфере CO_2

Т а б л и ц а 1

Рост *T. vaginalis* на твердой и жидкой среде № 2 в пробирках

№ штамма	Культуральная среда	Аэрация	Рост трихомонад по дням					
			1	2	4	6	8	10
41	Твердая среда (на скошенной поверхности)	CO ₂	+	++++	++++	+	—	—
		воздухом	+	++	+	—	—	—
		азотом	+	—	—	—	—	—
53	"	CO ₂	+	++	+++	+	—	—
		воздухом	+	+	—	—	—	—
		азотом	+	—	—	—	—	—
54	"	CO ₂	+	++++	+++	+	—	—
		воздухом	+	+++	+	—	—	—
		азотом	+	+	—	—	—	—
55	"	CO ₂	++	++++	++	—	—	—
		воздухом	+	+	+	—	—	—
		в вакууме	+	—	—	—	—	—
41	Твердая среда (в конденсационной жидкости)	CO ₂	+	++	+++	+++	+++	+
		воздухом	+	++	+++	+++	+	—
		воздухом	+	++	+++	+	—	—
53	"	CO ₂	+	++	+++	+++	+	—
		воздухом	+	++	+++	+	—	—
		воздухом	+	++	+++	+	—	—
54	"	CO ₂	+++	++++	+++	+++	+++	+
		воздухом	+	++	+++	+++	—	—
		воздухом	+	++	+++	+	—	—
55	"	CO ₂	+++	++++	+++	+++	+	—
		воздухом	+	+++	+++	+	—	—
		воздухом	+	+++	+++	+	—	—
54	Жидкая среда	воздухом	+++	++++	++	+	+	—
55	"	"	++	++++	++	+	+	+

жизнь трихомонад несколько удлинена и доходит до 6—8 дней. В присутствии воздуха протисты растут менее интенсивно.

На плотной среде не отмечается существенной разницы в росте взятых в опыт штаммов, за исключением штамма 53, который несколько отстает в росте. Следует также отметить, что по морфологическим свойствам трихомонады, выращенные на плотной среде, существенно не отличаются от культивируемых на жидкой среде № 2, хотя на последней, в первые дни культивирования наблюдается более интенсивный рост трихомонад.

Из приведенных в табл. 2 данных видно, что хороший рост трихомонад был получен также при поверхностном культивировании их в чашках Петри, в атмосфере CO₂. Интенсивный рост простейших наблюдается начиная со второго дня посева. Число трихомонад на агаровой пластинке возрастает к четвертому дню, далее оно заметно уменьшается, а к 8—10 дню подвижных протистов найти не удастся; как и в предыдущих опытах исключение составляет штамм 53, который размножается несколько медленнее и менее интенсивно. В присутствии воздуха или азота рост трихомонад не имеет места.

На поверхности твердой среды в пробирках и в чашках Петри в атмосфере CO₂ простейшие растут в виде отдельных, небольших, иногда

Таблица 2
Рост *T. vaginalis* на твердой среде в чашках Петри

№ штамма	Способ культивирования	Аэрация	Рост трихомонад по дням				
			2	4	6	8	10
41	Внутри среды	углекислым газом	+	++	+++	+	+
	На поверхности	.	+++	++++	+++	++	—
53	.	.	++	+++	+	—	—
	.	.	+	+	+	+	—
54	Внутри среды	.	+	++	++	+	—
	На поверхности	.	+++	++++	+++	++	—
.	.	азотом	—	—	—	—	—
	.	воздухом	+	—	—	—	—
55	Внутри среды	углекислым газом	+	++	++	+	+
	На поверхности	.	+++	++++	+++	++	—
.	.	азотом	+	—	—	—	—
	.	воздухом	+	—	—	—	—

прозрачных скоплений, внешне похожих на колонии бактерий, или же в виде тонкого слоя, состоящего из колоний трихомонад.

При росте *T. vaginalis* по всей толще агаровой пластинки простейшие вначале размножаются медленно, но уже к 4—6 дню число их заметно увеличивается. В дальнейшем количество трихомонад падает и жизнь их в среде длится до 8—10 дней. Внутри среды простейшие растут отдельными колониями, которые по мере увеличения в размере становятся видимыми невооруженным глазом в виде мелких белесоватых точек или пятен.

Обсуждение результатов. Новый метод культивирования трихомонад на плотной среде в пробирках и на чашках Петри перспективен, поможет исследователям в дальнейшем изучении трихомонад. Этот метод заметно упростит выделение чистого потомства трихомонад из отдельных колоний и даст возможность методом диффузии в агар проводить испытание и отбор новых противотрихомонадных соединений.

Наши опыты показали, что на твердой среде № 2 возможно успешно культивировать вагинальную трихомонаду в пробирках и в чашках Петри как на поверхности агаровой пластинки, так и внутри среды. Хороший рост трихомонад возможно получить только в атмосфере углекислого газа. Нам не удалось выращивать простейших на поверхности твердой среды в атмосфере азота, воздуха или в вакууме. Используемая нами техника анаэробного культивирования трихомонад в эксикаторах по своей простоте и надежности выгодно отличается от способа применяемых Asami и др. [4]. Полученные результаты по культивированию трихомонад внутри твердой среды в чашках Петри в основном совпали с данными, полученными Filadaro и Orsi [5], но следует указать, что размножение простейших внутри твердой среды нами наблюдалось не во всех случаях.

Интенсивный и продолжительный рост трихомонад наблюдается только при наличии достаточной влаги на поверхности твердой среды.

Этого можно достигнуть созданием высокой относительной влажности окружающей атмосферы в вакуумном эксикаторе, путем помещения на дне эксикатора сосуда с водой.

Следует отметить, что максимальный рост трихомонад в наших опытах наступал позднее и жизнь их продолжалась дольше по сравнению с приведенными в литературе данными [4, 5], что, по-видимому, обусловлено составом твердой среды и условиями культивирования простейших.

В ы в о д ы

1. Твердая среда № 2 пригодна для культивирования *Trichomonas vaginalis* в пробирках и чашках Петри как на поверхности, так и внутри среды.

2. Вагинальные трихомонады культивировались на твердой среде № 2 в атмосфере воздуха, углекислого газа, азота и в вакууме. Наиболее интенсивный и продолжительный рост трихомонад получен в атмосфере углекислого газа.

Институт тонкой органической химии
АН АрмССР

Поступило 2.II 1965 г.

Գ. Մ. ՊԱՐՈՆԻԿՅԱՆ

ԿԱՐԾՐ ՄԻՋԱՎԱՑՐԻ ՎՐԱ TRICHOMONAS VAGINALIS-Ի ԿՈՒՆՏԻՎԱՑՄԱՆ ՀԱՐՑԻ ՇՈՒՐՋԸ

Ա մ փ ո փ ո լ մ

Կարծր միջավայրի վրա *T. vaginalis*-ի կուլտիվացումը հանդիսանում է տրիխոմոնադների ուսումնասիրման համար նոր և հեռանկարային մեթոդ։ Այսպիսով այդ մեթոդը լավ մշակված չէ և կարոտ է հետադա կատարելագործման։

Ներկա հաղորդման մեջ բերվում են մեր պատրաստած № 2 կարծր միջավայրի վրա տրիխոմոնադների կուլտիվացման վերաբերյալ մեր հետազոտությունները։ *T. vaginalis*-ի շորս շտամները մենք հաջողությամբ աճեցրել ենք այդ միջավայրի վրա երկու եղանակով։ Փորձանոթների մեջ աճեցրել ենք թեև միջավայրի մակերեսին և Պետրիի թասերում՝ միջավայրի մակերեսին ու խորքում։

Տրիխոմոնադները աճեցվել են աերացիայի տարբեր պայմաններում (օդ, ածխաթթու գազ, ազոտ և վակուում)։ Փորձարկված պայմաններում ամենալավ արդյունքն ստացվեց ածխաթթվային գազի միջավայրում։ Կարծր միջավայրի վրա կուլտիվացման այս նոր մեթոդը հնարավորություն կտա այն հաջողությամբ օգտագործել նոր տրիխոմոնադիչ պրեպարատների ընտրության և ուսումնասիրման համար։

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Лаан И. А. Лабораторное дело, 4, 41—43, 1960.
2. Пароникян Г. М. Экспериментальное обоснование химиотерапии трихомонадной инфекции (*Trichomonas vaginalis*) Дисс. канд., Ереван, 1954.
3. Пароникян Г. М. Изв. АН Арм. ССР (биол. и сельхоз. наук), 8, 4, 99—107, 1955.
4. Asami K., Nodake V. and Ueno T. Exper. parazitol, 4, 1, 34—39, 1955.
5. Jiladaro J. and Orsi N. Antibiotics and chemotherapy 8, 11, 561—563, 1958.
6. Ivey M. J. Parasit. 47, 4 (1), 539—544, 1961.