

УПРОЩЕННЫЕ СПОСОБЫ ДЛЯ ВЫДЕЛЕНИЯ И СОХРАНЕНИЯ АКСЕНИЧЕСКИХ КУЛЬТУР ЛЯМБЛИЙ

Г. М. Лахонина, Ю. Х. Тeras

Сектор протозоологии Института экспериментальной биологии АН ЭССР,
Таллин

Для упрощения получения аксенических культур лямблий разработан оригинальный способ культивирования этих простейших в плотной питательной среде. Кроме очищения лямблий от дрожжей плотная питательная среда подходит и для сравнительно длительного сохранения аксенических культур лямблий без пересева.

Благодаря составленной Мейером (Meuer, 1970) оригинальной питательной среде и методике аксенического культивирования лямблий открылись несомненно совершенно новые перспективы для исследования биологических свойств этого, широко распространенного у человека и многих видов животных, простейшего. Особое значение имеет представившаяся возможность получения аксенических культур лямблий для выяснения механизмов патогенности их и изучения патогенеза лямблиоза, так как на эти вопросы, несмотря даже на достаточно длинную историю моноксенического культивирования лямблий (Карапетян, 1960, 1961), до сих пор еще не найдено убедительного ответа.

Поставив главной целью наших исследований именно изучение механизмов патогенности лямблий, мы приступили к данной работе с получения аксенических штаммов лямблий, обитающих в кишечном тракте кроликов, для чего использовали составленную Мейером питательную среду М-3 и выработанную им методику.

Однако, получив способом Мейера первые три штамма аксенических культур лямблий (Teras, Lahhonina, 1975), мы убедились в том, что прежде всего следует найти возможность для упрощения как получения, так и сохранения аксенических культур лямблий, так как очищение по методике Мейера оказалось не только сложным, но и очень длительным, причем сохранение аксенических культур также являлось довольно трудоемким процессом, особенно при накоплении большого количества штаммов.

МЕТОДИКА И РЕЗУЛЬТАТЫ

Основываясь на богатом опыте, полученном в нашем секторе при аксеническом культивировании *Trichomonas hominis*, *T. vaginalis*, и *T. tenax* (Teras, 1955; Лаан, 1960; Тeras, Томпель, 1969; Тeras и др., 1970; Томпель, Тeras, 1976), мы решили для изыскания возможности получения и сохранения аксенических культур лямблий начать с изменения жидкой среды М-3 Мейера на твердую.

В связи с этим нам пришлось частично изменить и методику приготовления питательной среды М-3, причем для компонента А, входящего в питательную среду, мы брали 140 мл солевого раствора Хэнкса с феноловым красным, 2.0 г дрожжевого экстракта «Дифко», 0.2 г L-цистеина гидрохлорида и добавляли на 100 мл среды от 1 до 15 г агара «Дифко».

Смесь стерилизовали в автоклаве при 1 атмосфере в течение 15 мин. Готовый компонент А хранили при температуре 4°. Компонент Б, который мы обычно готовили непосредственно перед использованием среды, получали путем смешивания следующих стерильных ингредиентов: 10 мл среды NCTC-109; 50.0 мл фильтрованной, инактивированной при 56° в течение 30 мин человеческой сыворотки; 1.0 мл раствора натриевой соли бензилпенициллина (100 000 ЕД/мл); 0.6 мл сульфат стрептомицина (0.34 г/мл); 2.0 мл 1.4%-го раствора бикарбоната натрия и 7.0 мл восстановительного раствора. Последний готовится следующим образом: 0.1 г глутатиона восстановленного и 0.1 г L-цистеина гидрохлорида растворяют в 10.0 мл солевого раствора Хэнкса с феноловым красным, причем рН этой смеси доводится до 9.0 раствором 1.0 н NaOH. Затем раствор стерилизуется фильтрацией через мембранный фильтр № 3, разливается в стерильные пенициллиновые флаконы и хранится при температуре 4°.

В день использования среды для посева лямблий компонент А расплавляли на водяной бане, затем охлаждали до 43° и добавляли в сосуд с компонентом Б, также заранее нагретым до 43°. Полученные таким образом питательные среды с рН 6.8, содержащие от 1.0 до 1.5 г агара на 100 мл среды, мы быстро разливали по 10—12 мл в обычные лабораторные пробирки, куда предварительно было внесено от 0.3 до 0.5 мл суспензии аксенической культуры лямблий, полученной способом Мейера и содержащей от 200 000 до 300 000 особей. После закрытия пробирок ватными пробками мы тщательно встряхивали их до того, как застывал агар. Затем ватные пробки заменяли резиновыми для предохранения агаровой среды от высыхания, а также для меньшего попадания воздуха, способствующего подщелачиванию среды. Пробирки в вертикальном положении помещали в термостат при 37°. Рост и размножение лямблий мы проверяли через каждые 24 ч непосредственным просмотром пробирок под микроскопом при малом увеличении.

В такой среде уже через 24—48 ч после посева в нижней части пробирки были видны как на стекле, так и в среде отдельные подвижные трофозиты и небольшие колонии лямблий. Зоны размножения простейших на стекле ежедневно увеличивались и расширялись в сторону верхних слоев среды, причем к 10—14-му дням, начиная с нижней части пробирки, на стекле образовывался монослой из лямблий на протяжении 2/3 высоты агарового столбика питательной среды. Одновременно увеличивалось количество лямблий и в среде.

При культивировании лямблий в такой среде они сохраняли жизнеспособность в зависимости от штамма даже до 4—6 мес., а способность к размножению при пересеве в оригинальную среду М-3 гарантирована в течение не менее 2 мес. Таким образом, в питательных средах, содержащих от 1.0 до 1.5 г агара на 100 мл среды, можно культивировать лямблии без пересева и замены среды значительно дольше, чем в оригинальной среде М-3. Если бы мы культивировали лямблии в течение такого же времени в среде М-3, то нам пришлось бы пересевать или заменять среду по крайней мере 8, 9 раз.

Как выяснилось из результатов, полученных нами при наблюдении за ростом и размножением лямблий в плотной среде, нам удалось при помощи сравнительно простого модифицирования питательной среды М-3 Мейера, состоящего в основном в увеличении содержания агара в питательной среде до 1.0—1.5% и некоторого изменения в ее приготовлении, прежде всего, существенно упростить пассирование и сохранение аксенических культур лямблий, обитающих в кишечном тракте кроликов.

Большое значение при культивировании лямблий в плотной питательной среде имеет и возможность постоянного пересева их, причем начиная с 21—28-го дня жизнеспособных особей можно извлекать уже и из верхней части среды.

Именно это свойство лямблий — постепенно мигрировать в верхние слои, — отмеченное при культивировании в плотной питательной среде,

привело нас к мысли использовать эту способность лямблий и для упрощения сложного, по способу Мейера, процесса освобождения их от дрожжей. На основе данной идеи мы разработали сравнительно простой и быстрый способ для получения аксенических культур штаммов лямблий, изолированных из кишечного тракта кроликов.

Для получения аксенических культур мы использовали штаммы лямблий, которые культивировали в жидкой питательной среде М-3 в инсулиновых флаконах совместно с дрожжами *Saccharomyces cerevisiae* при 37° до образования монослоя из лямблий на внутренней поверхности стекла флакона.

Как правило, материал, полученный из кишечника кролика, мы засеивали в среду М-3 после первоначальной обработки по методике Карапетяна (1961), причем питательную среду в этих флаконах заменяли трижды в неделю. Непосредственно перед посевом моноксенической культуры в плотную питательную среду, мы удаляли из флакона всю культуральную жидкость и вносили туда 1.0 мл стерильного физиологического раствора, с помощью которого при осторожном вращении флакона в горизонтальном положении старались отмыть лямблии от возможно большего количества дрожжевых клеток. После удаления физиологического раствора в флакон добавляли 0.3 мл питательной среды М-3 и энергично встряхивали его для отделения лямблий от стекла.

Полученную таким образом суспензию моноксенической культуры, мы осторожно вносили стерильным 1.0-миллилитровым шприцом с иглой длиной 13.5 см на дно пустой стерильной лабораторной пробирки, не касаясь ее стенок. Сразу после этого мы наливали в пробирку первую (нижнюю) порцию (5.0 мл) заранее расплавленной плотной питательной среды, но в отличие от вышеописанной при приготовлении компонента Б было взято вместо 2.0 мл 1.4%-го раствора бикарбоната натрия 4.0 и вместо 7.0 восстановительного раствора — 14.0 мл с тем, чтобы довести рН среды до 7.2, так как в процессе жизнедеятельности дрожжей происходит подкисление среды. После того как нижняя, содержащая моноксеническую культуру лямблий, порция плотной питательной среды застывала, мы добавляли вторую (верхнюю) порцию (7.0 мл) такой же расплавленной плотной среды, а затем пробирку закрывали резиновой пробкой. Инкубирование культур вели при температуре 37°, просматривая каждый день пробирки.

Основываясь на наблюдениях, полученных нами в ходе очищения моноксенических культур 20 штаммов лямблий от дрожжей, мы можем сказать, что последние, хотя и видны в виде отдельных колоний по всему слою нижней порции плотной питательной среды, уже после 24 ч инкубирования, никогда из этой части питательной среды выше не мигрировали.

Лямблии впервые обнаруживаются микроскопически, начиная с нижней части первой порции плотной питательной среды, обычно со 2—7-го дня. Вначале видны единичные, подвижные особи в среде и маленькие колонии лямблий на внутренней поверхности стекла пробирки, где начиная с 7-го дня образуются уже отдельные большие участки монослоя. К 11—14-му дню на стекле появляется сплошной монослой из лямблий на протяжении всей нижней порции плотной питательной среды, а с 14—15-го дня лямблии начинают мигрировать уже в верхнюю порцию среды, образуя скопления из активно движущихся трофозоитов в среде и одновременно постепенно увеличивающийся монослой на стенках пробирки.

Когда лямблии, мигрируя во вторую порцию плотной среды, достигают ее верхней трети и образуют на этом уровне сплошной монослой, их можно извлекать оттуда стерильной пипеткой с широким отверстием в аксеническом виде и делать посев в среду М-3 для дальнейшего пассирования уже без дрожжей. Контроль аксеничности культуры мы проводили в средах Китт-Тароцци, глюкозном бульоне, на агаре Сабуро и на кровяном агаре.

Как видно из данных, представленных в таблице, нам удалось из 20 исследованных штаммов лямблий изолировать культуры от дрожжей в большинстве случаев на 18—21-й день, в 6 случаях — на 24-й день, а в 1 случае (штамм 10) — даже на 15-й день. По всей вероятности, различия во времени получения аксенических культур зависели, с одной стороны, от приспособляемости штамма, а с другой стороны, от количества простейших, внесенных в нижнюю порцию плотной питательной среды.

Результаты использования плотной питательной среды для получения аксенических культур лямблий

№ штамма	Время выделения аксенических культур лямблий (в сутках)									
	15-е	16-е	17-е	18-е	19-е	20-е	21-е	22-е	23-е	24-е
4				+						
5										+
6						+				
7							+			
8										+
9				+						
10	+									
11										+
12								+		
13								+		
14				+						
15										+
16								+		
17										+
18				+						
19										+
22								+		
25								+		
26								+		
27								+		

Примечание. Плюс — сутки выделения.

ОБСУЖДЕНИЕ

Как явствует из вышеизложенных результатов, использованные нами плотная питательная среда и методика подходят как для сравнительно длительного сохранения аксенических культур лямблий без пересева, так и для получения этих простейших в чистом виде. Сравнительно рекомендованную Мейером (Meyer, 1970) питательную среду и методику для получения аксенических культур лямблий, которую вначале использовали и мы для изолирования первых трех аксенических штаммов, можно сказать, что выработанная нами плотная питательная среда и методика имеют ряд преимуществ. Так, освобождение моноксенической культуры лямблий от дрожжей происходит в плотной питательной среде в обычных лабораторных пробирках, причем в течение этого, длящегося 15—24 суток, процесса культуры надо лишь только инкубировать при 37°. В оригинальной питательной среде М-3 по методу Мейера отделение лямблий от дрожжей проводится в узких, диаметром 3.5 мм, специальных У-образных трубочках в два этапа с ежедневной заменой, в течение всего первого этапа, жидкой питательной среды свежей. При этом на первом этапе делается посев моноксенической культуры лямблий в одно плечо У-образной трубочки, а через 3—4 недели в противоположном плече можно уже найти только лямблий. Однако они еще не способны размножаться в питательной среде М-3 без дрожжей и поэтому, согласно рекомендации Мейера, необходимо провести и второй этап в У-образных трубочках. На этот раз в одно плечо данной трубочки монтируется диализный мешок, содержащий 48-часовую суспензию культуры дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*, а в другое — вводятся лямблии, полученные

после первого этапа. В этой трубочке на протяжении месяца происходит адаптация лямблий уже к существованию без дрожжей, в процессе которой они получают продукты обмена дрожжей через диализную мембрану. Таким образом, весь процесс очищения по методу Мейера занимает не менее двух месяцев и требует большого расхода дорогостоящей питательной среды.

Предложенный нами способ очищения лямблий от дрожжей в плотной питательной среде, кроме упрощения самого процесса и значительной экономии как времени, так и питательной среды, позволяет сохранять полученную аксеническую культуру в верхней порции среды без пересевов в течение не менее двух месяцев так же, как в плотной среде, используемой нами специально для длительного культивирования лямблий.

Подходит ли используемая нами плотная питательная среда для получения и сохранения аксенических культур и лямблий, обитающих в организме других видов животных несомненно требует дальнейших исследований.

Л и т е р а т у р а

- К а р а п е т я н А. Е. 1960. Методика культивирования лямблий. Цитология, 2 (3): 379—384.
- К а р а п е т я н А. Е. 1961. Методика получения культуры *Lamblia duodenalis*. Мед. паразитол. и паразитарн. болезни, (6): 691—693.
- Л а а н И. А. 1960. Культивирование *Trichomonas vaginalis* в плотной среде. Лаб. дело, (4): 41—43.
- Т е р а с Ю. Х. 1955. О выращивании *Trichomonas vaginalis* в чистых культурах. ЖМЭИ, 8: 64—66.
- Т е р а с Ю. Х., Т о м п е л ь Х. Я. 1969. Культивирование и получение аксенических культур *Trichomonas hominis*. Успехи протозоологии. Л.: 343—344.
- Т е р а с Ю. Х., Т о м п е л ь Х. Я., М и р м е Э., К а л л а с Э. 1970. Изыскание питательных сред для культивирования и получения аксенических культур *Trichomonas hominis* и *Trichomonas tenax*. Проблемы паразитол. в Прибалтике. Изд. «Зинатне», Рига: 251-252.
- Т о м п е л ь Х. Я., Т е р а с Ю. Х. 1976. Методика аксенического культивирования *Trichomonas hominis*. Лаб. дело, (6): 368—370.
- М е у е р Е. А. 1970. Isolation and axenic cultivation of *Giardia trophozoites* from the rabbit, chinchilla and cat. Exp. Parasitol., 27 (2): 179—183.
- Т е р а с J., L a k h o n i n a G. 1975. Solid medium for prolonged cultivation and testing of biological properties of *Giardia*. Proceedings of Second European Multicolloquy of Parasitol., Trogir, Medena: 30—31.

SIMPLIFIED METHOD OF OBTAINING AND PRESERVING AXENIC CULTURES OF LAMBLIAS

G. Lakhonina, J. Teras

S U M M A R Y

The complexity and high cost of the existing methods of obtaining and preserving axenic cultures of *Giardia* (Meyer, 1970) have motivated the authors to look for new ways and means of simplifying the procedure. Solid media gave fair results which substantially simplified and accelerated the process and proved to be favourable for preserving the cultures longer without repassaging. Accordingly, the method recommended by the above authors facilitates the elimination of yeast from the cultures of *Giardia* in 15 to 24 days and the preservation of the axenic cultures over a period of 4 to 6 months without passaging, and within first two months at least the cultivation of new populations is guaranteed.