

**УДАЛЕНИЕ СОПУТСТВУЮЩИХ ДРОЖЖЕВЫХ ГРИБКОВ  
ИЗ КУЛЬТУР ШТАММОВ ТРИХОМОНАД (POLYMASTIGINA)**

**Э. М. Рыйгас, Х. Я. Сардис, В. А. Кааль**

Отдел протозоологии Института экспериментальной биологии  
АН ЭССР, Таллин

Для освобождения *Trichomonas vaginalis* и *T. hominis* от сопутствующих дрожжевых грибков использовали специальную вискозную среду (с 0.1%-ным агаром) в бюретке, а для освобождения *T. tenax* — добавляли леворин к полутвердой (с 0.5%-ным агаром) яичной среде в U-образной трубке.

Возможность разрешения проблемы аксенизации культур трихомонад стала реальной только после начала применения антибиотиков. Эффективность применения этих средств подтверждает тот факт, что, по данным Гонигберга (Honigberg, 1970), к 1970 г. были получены аксенические культуры уже многих видов трихомонад, обитающих как в организме человека и других млекопитающих, так и у птиц, амфибий и рептилий.

Все же опыт показал, что аксенизация культур различных видов трихомонад удается далеко не одинаково. Так, уже в первые годы производства антибиотиков удалось выращивать штаммы *Trichomonas vaginalis* без сопутствующих микроорганизмов (Johnson a. o., 1945), но аксенизация многих других видов трихомонад оказалась значительно более сложной задачей. В виде примера можно сказать, что только спустя почти два десятилетия получили чистые культуры *T. hominis* и *T. tenax* (Kott, Adler, 1961; Diamond, 1962).

Но при использовании рекомендованных методов трудности, связанные с получением аксенических культур трихомонад, полностью не преодолены. Например, дрожжи такими способами устранить нельзя.

Очищение штаммов трихомонад от сопутствующих дрожжей нам удалось произвести при помощи специального метода, в основе которого лежат наблюдения, показавшие, что при культивировании штаммов *T. vaginalis* в вязкой питательной среде TV-1 (Терас, 1955), содержащей 0.1% агара, дрожжи растут в поверхностных слоях, а трихомонады проникают в глубину среды.

Исходя из этих наблюдений, при культивировании штаммов *T. vaginalis*, уже освобожденных от сопутствующих бактериальных микроорганизмов, мы применяли обыкновенные бюретки, упакованные в бумагу с отдельно обернутым нижним концом и закрытым ватной пробкой верхним отверстием. Бюретки стерилизовали и, не снимая бумагу с нижнего конца, заполняли около 10 мл среды TV-1.

При наклонном положении бюретки в верхнюю часть питательной среды инокулировали 0.1—0.2 мл культуры *T. vaginalis*, содержащей дрожжи. Затем бюретку помещали в термостат при 37°. Через 48—72 ч после посева с крана бюретки снимали покрывающую его бумагу, кран открывали и осторожно делали посев нескольких капель культуры в обыкновенные пробирки со средой TV-1. В этих субкультурах можно было наблюдать типичный для *T. vaginalis* рост без дрожжей. Очистку считали успешной тогда, когда в контрольных посевах и последующих пассажах в среде TV-1 рост дрожжей отсутствовал.

Такие же результаты мы получили, используя для очистки от дрожжей метод U-образной трубки по де Карнери (de Carneri, 1956). Принцип этого способа в основном такой же, как при использовании бюретки: в вязкой среде, в данном случае в TV-1, трихомонады проходят из одного колена трубки в другое, а дрожжи как неподвижные микроорганизмы остаются на месте инокуляции.

Оба вышеописанных метода мы применяли и при очистке культур *T. hominis* от дрожжей, используя при этом среду TH-1 (Томпель, Терас, 1976). Необходимо отметить, что в отдельных случаях ни первый, ни второй методы не дали желаемых результатов: отдельные штаммы *T. vaginalis* или *T. hominis* освободить от дрожжей не удалось.

Но с особыми трудностями мы столкнулись при устранении дрожжей из культур *T. tenax*. В этих случаях вначале мы применяли метод U-образной трубки по де Карнери. В качестве среды, подходящей для роста *T. tenax*, мы использовали жидкую яичную среду Уонтланда и других (Wantland a. o., 1963), куда добавляли 0.1% агара. Кроме того, в эту среду мы прибавляли еще витамин B<sub>12</sub> (20 мкг/мл), лошадиную сыворотку (10%) и рисовый крахмал (1.0—1.5 мг/мл) и суспендировали кусочки твердой яичной среды, приготовленной по Галлманну (Hallmann, 1953).

Очищаемую культуру мы осторожно инокулировали в верхнюю часть среды одного колена трубки. После этого, избегая встряхивания, помещали трубку в термостат (37°), а через каждые 24 ч с помощью пипетки из другого колена трубки брали капельки культуры и инокулировали их в бифазную яичную среду.

Однако вышеизложенным способом нам удалось освободить от дрожжей лишь 4 штамма *T. tenax* из 28. В дальнейшем для повышения вязкости среды мы добавляли 0.2, 0.3 или 0.5% агара. Ввиду того, что в последнем случае среда становилась полутвердой, мы наливали на нее в оба колена трубки по столбику жидкой яичной среды. При помощи таких модификаций мы освободили от дрожжей еще 9 штаммов *T. tenax*. При использовании в среде 0.75% агара дополнительно ни одного штамма трихомонад очистить от дрожжей не удалось. Следовательно, степень вязкости среды, зависящая от добавления агара, имеет определенное значение, но в 15 случаях из 28 не помогла достигнуть цели.

Для выяснения причин неудач мы провели некоторые дополнительные исследования и установили, что, несмотря на вязкость среды, через U-образную трубку проходили именно такие дрожжи, у которых имеются длинные и быстро растущие нити мицелий. В связи с этим мы решили выяснить возможности применения микостатических препаратов.

При использовании леворина, прибавленного в дозах от 50 до 1000 ед./мл к жидкой фазе бифазной яичной среды, выяснилось, что этот микостатикум действовал на оба вида микроорганизмов. Так, в более сильных концентрациях леворина ( $\geq 600$  ед./мл) рост как дрожжей, так и трихомонад был полностью задержан. В более слабых концентрациях ( $\leq 500$  ед./мл) этого микостатикума и тот, и другой виды оказались жизнеспособными, но характерно то, что рост мицелия дрожжей сильно страдал: они образовывались поздно и оставались короткими.

Следовательно, в обычных пробирках, где оба вида находятся под действием леворина в одинаковых условиях, изоляция *T. tenax* от дрожжей не явилась бы реальной. По этой причине мы вновь стали использовать U-образную трубку. Нижнюю часть, т. е. изгиб трубки, мы заполняли полутвердой средой, приготовленной из жидкой яичной среды с добавлением 0.5% агара. Эта среда содержала все вышеупомянутые ингредиенты (витамин B<sub>12</sub>, лошадиную сыворотку, рисовый крахмал и кусочки твердой яичной среды Галлманна), но, кроме того, еще леворин от 50 до 600 ед./мл. На эту среду в оба колена трубки мы наливали жидкую яичную среду, не содержащую леворин. Инокуляция очищаемого материала, инкубация культур и изолирование трихомонад производились аналогично вышеизложенному.

При помощи этого метода нам удалось освободить от дрожжей 14 штаммов *T. tenax* (из 15), для которых другие способы были не эффективными. В зависимости от чувствительности штаммов трихомонад и дрожжей эффективная концентрация леворина была разной — от 100 до 500 ед./мл. Неодинакова была и продолжительность процедур очищения: промежутки времени от инокуляции очищаемой культуры в одно колено U-образной трубки до изолирования трихомонад из другого колена длился от 2 до 12 дней. По всей вероятности, при применении последней модификации неудача в одном случае зависела от слишком низкой чувствительности этого штамма к леворину. Очищение от дрожжей удалось при помощи нистатина, а подходящей в данном случае оказалась концентрация 200 ед./мл и продолжительность очищения — 6 дней.

Мы предполагаем, что вышеизложенные различные модификации использования U-образной трубки можно успешно применять и в аналогичных случаях с другими видами трихомонад.

#### Л и т е р а т у р а

- Т е р а с Ю. X. 1955. О выращивании *Trichomonas vaginalis* в чистых культурах. — Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунобиол. (8) : 64—66.
- Т о м п е л ь X. Я., Т е р а с Ю. X. 1976. Методика аксенического культивирования *Trichomonas hominis*. — Лаб. дело (6) : 368—370.
- de C a r n e r i I. 1956. Isolation of *Trichomonas vaginalis* from fungi and bacteria. — Amer. J. Trop. Med. Hyg., 5 (2) : 210—212.
- D i a m o n d L. S. 1962. Axenic cultivation of *Trichomonas tenax*, the oral flagellate of man. I. Establishment of cultures. — J. Protozool., 9 (4) : 442—444.
- H a l l m a n n L. 1953. Bakteriologische Nährböden. Georg Thieme Verlag. Stuttgart: 207—208.
- H o n i g b e r g B. M. 1970. Trichomonads. Immunity to parasitic animals, Meredith Corporation, vol. 2, N. Y.: 469—550.
- J o h n s o n G., T r u s s e l l M., J a h n F. 1945. Isolation of *Trichomonas vaginalis* with penicillin. — Science (102) : 126—128.
- K o t t H., A d l e r S. 1961. A serological study of *Trichomonas* sp. parasitic in man. — Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg., 55 (4) : 333—344.
- W a n t l a n d W. W., W a n t l a n d E. M., W i n q u i s t D. L. 1963. Collection, identification and cultivation of oral protozoa. — J. Dental Res., 42 (5) : 1234—1241.

ELIMINATION OF ASSOCIATING YEASTS FROM CULTURES  
OF TRICHOMONAD STRAINS (POLYMASTIGINA)

E. Roigas, H. Sardis, V. Kaal

S U M M A R Y

For purifying the cultures of *Trichomonas vaginalis* and *T. hominis* from associating yeasts we inoculated them into the upper layer of a viscous medium containing 0.4% agar (Teras, 1955; Tompel, Teras, 1976) poured into a burette. On the 2nd or 3rd day after inoculating the first drops obtained from the lower end of the burette contained as a rule only trichomonads. For purifying the cultures of *T. tenax* from associating yeasts we prepared a special semisolid medium from the liquid egg medium (Wantland e. a., 1963) by adding agar (0.5%), levorine (50—600 units / 1 ccm) and some pieces of solid egg medium (Hallmann, 1953). The curve of an U-tube was filled with this medium and into both branches pure liquid egg medium was poured. In a few days after inoculating the culture of *T. tenax* with yeasts into one branch of the tube we obtained from the other branch of the tube trichomonads without yeasts.

---