EESTI NSV TEADUSTE AKADEEMIA TOIMETISED. 27. KÖIDE
BIOLOOGIA. 1978, NR. 1

ИЗВЕСТИЯ АКАДЕМИИ НАУК ЭСТОНСКОЙ ССР. ТОМ 27
БИОЛОГИЯ. 1978, № 1

https://doi.org/10.3176/biol.1978.1.06

УДК 576.893.161.22.083.81

Галина ЛАХОНИНА

О ВОЗМОЖНОСТИ ВЫРАЩИВАНИЯ И ОПРЕДЕЛЕНИЯ САХАРОЛИТИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ АКСЕНИЧЕСКИХ КУЛЬТУР ЛЯМБЛИЙ В ПЛОТНОЙ СРЕДЕ

Как известно, уже в 1960 году А. Карапетяном была разработана оригинальная питательная среда и методика моноксенического культивирования лямблий, однако выращивать эти простейшие до настоящего времени удавалось лишь некоторым авторам (Карапетян, 1961а; Соловьев, 1962; Meyer, Pope, 1965; Roux, Ecalle, 1968; Соловьев и др., 1971; Meyer, Radulescu, 1975). Объясняется это сложностью не только состава питательной среды, получения и обработки исходного материала для выделения лямблий, но и режима культивирования этих простейших, предусматривающего частую замену свежей питательной среды и частые пересевы. Поэтому как А. Карапетян (Карапетян, 1961б; Karapetyan, Manucharian, 1973), так и другие исследователи (Meyer, Pope, 1965; Roux, Ecalle, 1968; Шарапов, Соловьев, 1976) неоднократно пытались изменить состав питательной среды и упростить методику культивирования лямблий, а также продлить промежутки между заменами среды. Однако эти модификации существенно не облегчили выделения и поддержания культур лямблий. Тем не менее в 1970 году Е. А. Мейер (Meyer, 1970) предложил совершенно новый, еще более сложный состав питательной среды и режим уже аксенического культивирования лямблий, который также требует для поддержания культур еженедельной полной замены питательной среды и частых пересевов.

Такой методикой сначала пользовались и мы, но в связи со все возрастающим количеством изолированных культур и субкультур аксенических штаммов лямблий было решено изыскать возможности для более длительного, исключающего необходимость частой замены среды и пересевов культивирования этих простейших. Одновременно мы пытались найти и способ для определения сахаролитической активности этих простейших, о чем в литературе никаких сведений найти не удалось.

Материал и методика

Использовались культуры 13 штаммов лямблий, изолированных из тонкого кишечника кроликов и очищенных от сопутствующей микрофлоры либо по методу Мейера (Meyer, 1970), либо по разработанному нами методу (Лахонина, Терас, 1976).

Основываясь на результатах опытов, полученных в секторе протозоологии ИЭБ АН ЭССР при культивировании разных видов трихомо-

над (Терас, 1955; Рыйгас, 1960; Лаан, 1960, 1963; Мирме и др., 1971), мы решили прежде всего выяснить, размножаются ли лямблии в вязкой, полуплотной и плотной средах, так как в литературе соответствующих сведений найти не удалось.

Для этого на каждые 100 *мл* среды М-3, предложенной Мейером (Meyer, 1970), добавлялось от 0,1 до 1,5 *г* агара. Если приготовление питательной среды М-3, содержащей до 0,3 *г* агара на 100 *мл* среды, не требовало изменения способа Мейера, то для составления среды с большей плотностью было необходимо внести некоторые модификации в оригинальную методику. После многократных опытов для приготовления как вязкой и полуплотной, так и плотной среды представилась целесообразной следующая методика: для одного компонента (*А*) питательной среды брали 140 *мл* солевого раствора Хэнкса с феноловым красным, 2,0 *г* дрожжевого экстракта «Дифко», 0,2 *г* *L*-цистеина гидрохлорида и на 100 *мл* среды добавляли от 0,3 до 1,5 *г* агара «Дифко». Смесь стерилизовали в автоклаве при 1,0 *атм* в течение 15 *мин*. Готовый компонент *А* хранили при 4 °С. Второй компонент (*Б*) обычно непосредственно перед использованием среды получали путем смешивания в стерильном сосуде следующих стерильных ингредиентов: 10,0 *мл* среды NCTC-109, 50,0 *мл* фильтрованной, инактивированной (при 56° в течение 30 *мин*) человеческой сыворотки, 1,0 *мл* раствора пенициллина (100 000 *ЕД/мл*), 0,6 *мл* раствора сульфатстрептомицина (0,34 *г/мл*), 2,0 *мл* 1,4%-ного 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 pH 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°.

Для выяснения сахаролитической активности лямблий в сосуд с готовым компонентом *Б* добавляли 10%-ный стерильный раствор одного из исследуемых сахаров или высших спиртов с таким расчетом, чтобы окончательная концентрация требуемого углевода равнялась 0,5%.

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 pH 6,8, содержащие различные количества агара и разные углеводы, быстро разливали (10—12 *мл*) по обычным лабораторным пробиркам, куда предварительно вносилось 0,3 — 0,5 *мл* суспензии аксенической культуры лямблий в изотоническом растворе, содержащей от 200 000 до 300 000 особей. Для равномерного распределения простейших в среде пробирки, закрытые ватными пробками, тщательно встряхивались до того, как застыл агар. Затем ватные пробки заменяли резиновыми с целью предохранения агаровой среды от высыхания, а также меньшего попадания воздуха, способствующего подщелачиванию среды. Пробирки в вертикальном положении помещали в термостат при 37°.

Рост и размножение лямблий проверяли через каждые 24 *ч* путем непосредственного просмотра пробирок под бинокулярным микроскопом при малом увеличении (окуляр 10, объектив 10), причем из культур, содержащих 0,1—0,6% агара, т. е. из жидких и вязких сред, помимо этого, готовили еще и нативные препараты.

Результаты работы

Анализ результатов, полученных при культивировании лямблий в питательных средах с разным количеством агара, показал, что как в оригинальной среде М-3, так и в средах с содержанием агара до 0,3 *г* на 100 *мл* среды, лямблии остаются жизнеспособными только в течение 10 дней. Обычно лямблии при культивировании в таких средах прикрепляются к нижней внутренней поверхности пробирки (инкубирование ведут в горизонтальном положении), образуя на стекле сначала отдельные колонии, а затем большие монослойные участки. В процессе деления трофозоиты лямблий отделяются от стекла, а затем оседают в большом количестве на нижней стороне пробирки и просматриваются в виде треугольника или продольной полосы. В течение 5—7 суток размножается количество лямблий, достаточное для обеспечения получения новой популяции при пересеве.

В средах, содержащих от 0,3 до 0,6 *г* агара на 100 *мл*, т. е. в вязких, где инкубирование велось уже в вертикальном положении, лямблии прикреплялись к стеклу по всей окружности пробирки, образуя сначала маленькие, а затем постепенно увеличивающиеся колонии, а также размножались в середине питательной среды.

Начиная с 7—8-го дня на протяжении всего слоя питательной среды на стекле по всей окружности пробирки был виден сплошной монослой из лямблий. Из таких культур нам удалось получить последующие популяции простейших при пересеве уже и на 12—14-е сутки.

Увеличив содержание агара до 0,75 *г* на 100 *мл* питательной среды (полуплотная) выяснили, что помимо сплошного монослоя на стекле лямблии образуют колонии и в середине среды, а также скопления на дне пробирки. Активно движущиеся трофозоиты в этих средах наблюдались до 18—20-го дня опыта.

Еще дольше лямблии сохраняли жизнеспособность и способность к размножению в питательных средах, содержащих от 1,0 до 1,5% агара, т. е. в плотных, где уже через 24—48 *ч* после посева в нижней части пробирки были видны как на стекле, так и в среде, отдельные подвижные трофозоиты и небольшие колонии лямблий. Зоны размножения простейших на стекле ежедневно увеличивались и расширялись в сторону верхних слоев среды, причем к 10—14-му дню начиная с нижней части пробирки на стекле образовывался монослой из лямблий на протяжении 2/3 высоты агарного столбика питательной среды. Одновременно увеличивалось количество лямблий и в среде.

Как выяснилось при более длительном наблюдении за культурами в таких средах, лямблии сохраняли в них жизнеспособность в зависимости от штамма даже до шести месяцев, а способность к размножению при пересеве в оригинальную среду М-3 — до четырех месяцев.

Учитывая, что популяции всех 13 аксенических штаммов лямблий, использованных нами в этих опытах, получены на среде М-3 после двухмесячного культивирования в плотной среде, с уверенностью можно сказать, что в питательных средах, содержащих 1,0—1,5 *г* агара на 100 *мл* среды, можно культивировать эти простейшие без пересева и замены среды на 50 дней дольше, чем в оригинальной среде М-3.

Установив способность лямблий размножаться в плотной среде, в дальнейших опытах мы пытались выяснить возможность использования этой среды и при определении сахаролитической активности данных простейших, для чего в плотную среду в ходе ее приготовления вносили один из изучаемых углеводов, причем всего их было исследовано 13 с тремя штаммами лямблий (глюкоза, сахароза, мальтоза, лак-

Таблица 1

Размножение лямблий в плотной питательной среде, содержащей различные углеводы

Углеводы	3-й день			6-й день			12-й день			18-й день		
	Штаммы											
	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
Глюкоза	+	+	+	+ +	+ + +		+ + +	+ + +	+	+ + +	+ + +	+ +
Сахароза	+	+	+	+	+ +		+ + +	+ + +	+	+ + +	+ + +	+ +
Мальтоза	+	+	+	+ +	+ + +		+ + +	+ + +	+	+ + +	+ + +	+ +
Лактоза	+	+	+	+ +	+ + +		+ + +	+ + +	+	+ + +	+ + +	+
Маннит	+	+	+	+ +	+ + +		+ + +	+ + +	+ +	+ + +	+ + +	+ + +
Галактоза	+	+	+	+ +	+ + +		+ + +	+ + +	+ +	+ + +	+ + +	+ +
Рамноза	+	+	+	+	+ +		+ +	+ +	+	+ + +	+ + +	+
Фруктоза	+	+	+	+ +	+ + +		+ + +	+ + +	+	+ + +	+ + +	+ + +
Раффиноза	+	+	+	+ +	+ + +		+ + +	+ + +	+ +	+ + +	+ + +	+ + +
Крахмал	+	+	+	+ +	+ + +		+ + +	+ + +	+	+ + +	+ + +	+ +
Инулин	+	+	+	+	+ +		+ +	+	+	+ + +	+ + +	+
Дульцит	+	+	+	+ +	+ +		+ +	+ +	+	+ + +	+ + +	+ + +
Сорбит	+	+	+	+	+ +		+ +	+	+	+ + +	+ + +	+

Примечание: + — скопление из лямблий в основном на дне пробирки, отдельные особи в питательной среде;
++ — отдельные монослойные участки из лямблий на стекле, большое количество особей в питательной среде;
+++ — сплошной монослой из лямблий на стекле, большое количество особей в питательной среде, а также скопление из лямблий на дне пробирки.

тоза, маннит, галактоза, фруктоза, рамноза, раффиноза, крахмал, инулин, дульцит и сорбит) и пять (малый пестрый ряд) с 12 штаммами лямблий.

Интенсивность размножения простейших оценивалась по скорости формирования монослоя лямблий на стекле и колоний в питательной среде (см. табл. 1), образование кислоты — по изменению цвета индикатора (фенолового красного), добавленного в среду, а газообразование — по появлению пузырьков в культурах.

В конце периода наблюдений из всех культур делались посевы в оригинальную среду М-3, на кровяной агар, в глюкозный бульон и на среду Китт-Тароцци для проверки аксеничности лямблий.

Полученные результаты показали (табл. 1), что два штамма лямблий (1 и 2) размножались на всех плотных питательных средах, содержащих исследуемые углеводы, почти с одинаковой интенсивностью, причем в конце периода наблюдения, т. е. на 18-й день после посева, на всех средах с этими двумя штаммами независимо от углевода был виден монослой из лямблий на стекле на протяжении 2/3 высоты всего слоя питательной среды в пробирке, а также большое количество простейших в среде.

Третий штамм лямблий в большинстве сред с исследуемыми углеводами размножался медленнее. Так, в конце периода наблюдений этот штамм достиг такой же интенсивности роста, как у штаммов 1 и 2, только в питательных средах, содержащих маннит, фруктозу, раффинозу и дульцит. Самая низкая интенсивность роста штамма 3 наблюдалась в присутствии лактозы, рамнозы, инулина и сорбита, причем в течение всего периода наблюдений лямблии присутствовали как в питательной среде, так и на стекле, в основном только в нижней части пробирки.

Разная интенсивность размножения лямблий отражалась всегда

и на изменении цвета питательной среды, который в зависимости от количества простейших, т. е. от образуемой ими при разложении углеводов кислоты, изменялся от первоначального красного к оранжевому до лимонно-желтого и лимонного.

При этом следует отметить, что все три штамма лямблий, несмотря на интенсивное образование кислоты, ни на одном из исследуемых углеводов в течение всего 18-дневного периода наблюдений не продуцировали газа.

Таблица 2

Интенсивность роста (и/р), образование кислоты (к) и газа (г) лямблиями в плотной питательной среде, содержащей углеводы малого пестрого ряда

Номер штамма	Глюкоза			Сахароза			Мальтоза			Лактоза			Маннит		
	и/р	к	г	и/р	к	г	и/р	к	г	и/р	к	г	и/р	к	г
1	≠	+	0	≠	+	0	≠	+	0	≠	+	0	≠	+	0
2	≠	+	0	≠	+	0	≠	+	0	≠	+	0	≠	+	0
5	≠	+	0	≠	+	/	≠	+	0	≠	+	0	≠	+	0
10	≠	+	0	≠	+	0	≠	+	0	≠	+	0	≠	+	0
11	≠	+	0	≠	+	0	≠	+	0	≠	+	0	≠	+	0
12	≠	+	0	≠	+	0	≠	+	0	≠	+	0	≠	+	0
15	≠	+	0	≠	+	0	≠	+	0	≠	+	0	≠	+	0
19	≠	+	0	≠	+	0	≠	+	0	≠	+	0	≠	+	0
20	≠	+	0	≠	+	0	≠	+	0	≠	+	0	≠	+	0
21	≠	+	0	≠	+	0	≠	+	0	≠	+	/	≠	+	0
22	≠	+	0	≠	+	0	≠	+	0	≠	+	0	≠	+	0
25	≠	+	0	≠	+	0	≠	+	0	≠	+	0	≠	+	0

Примечание: ≠ — интенсивное размножение,
+ — интенсивное образование кислоты,
0 — отсутствие газа,
/ — слабое газообразование.

То, что лямблии, обитающие в кишечном тракте кроликов, продуцируют из углеводов в основном кислоту, показывают и результаты опытов, полученные при более длительном — до 60 дней — культивировании их в плотных средах, содержащих сахары «малого пестрого ряда».

Как следует из данных табл. 2, образование небольшого количества газа установлено только в культурах двух штаммов (5 и 21) из 12, причем в одном случае (штамм 5) газ образовался на 37-е сутки в питательной среде, содержащей сахарозу, а в другом — на 27-е сутки (штамм 21) в среде, содержащей лактозу. Появившиеся вначале маленькие пузырьки газа постепенно увеличивались и не исчезали до конца наблюдений. В то же время все 12 исследуемых штаммов размножались в средах, содержащих либо глюкозу, либо мальтозу, маннит, сахарозу или лактозу, с одинаковой интенсивностью, причем при пересевах лямблий в конце срока наблюдений из всех культур в питательную среду М-3 уже в течение 24 *ч* были получены жизнеспособные новые популяции.

Обсуждение результатов

При помощи сравнительно простого модифицирования питательной среды М-3, состоящего в основном лишь в увеличении содержания агара в питательной среде до 1,0 — 1,5% и некотором изменении в ее при-

готовлении, удалось существенно облегчить пассирование и сохранение культур лямблий, обитающих в кишечном тракте кроликов. Так, культивирование лямблий в используемой данной плотной питательной среде не требует ни частых пересевов, ни добавления свежей питательной среды, что предусматривают другие методики.

Кроме существенной и значительной экономии питательной среды и времени, культивирование лямблий в плотной среде позволяет в течение не менее 60 дней сохранять их жизнеспособными и после этого всегда иметь способные к размножению трофозоиты, необходимые для получения субкультур.

Одновременно с упрощением пассирования и сохранения аксенических культур плотная питательная среда позволяет исследовать и сахаролитическую активность этих простейших. Таким образом, критерии сходства или различий лямблий, изолированных у разных видов животных, преимущественно основывающиеся на тинкториальных и морфологических признаках (Чалая, 1951; Filice, 1952; Levine, 1961; Соловьев, 1975), дополняются возможностью сравнивать их и на базе некоторых биохимических свойств этих простейших.

Для того, чтобы сопоставляемые данные были достоверными, прежде всего следует охарактеризовать биохимические свойства многих штаммов лямблий, обитающих в организме одного вида животных. В настоящей работе начато исследование штаммов лямблий, изолированных у кроликов.

Несмотря на небольшое количество исследованных штаммов, значение результатов, полученных при изучении сахаролитической активности, заключается не только в их новизне, но и в возможности сопоставления с последующими данными.

Нет сомнений, что с накоплением такой информации о биологических свойствах лямблий, обитающих в организме разных видов животных, уточнится и систематика этих простейших.

ЛИТЕРАТУРА

Карапетян А. Е., 1960. Методика культивирования лямблий. Цитология **2** (3) : 379—384.

Карапетян А. Е., 1961а. Методика получения культуры *Lamblia diodenalis*. Мед. паразитол. и паразитарн. болезни (6) : 691—693.

Карапетян А. Е., 1961б. К вопросу о культивировании лямблий. В кн.: Вопросы паразитологии в Прибалтийских республиках. Рига : 227—231.

Лаан И. А., 1960. Культивирование *Trichomonas vaginalis* в плотной среде. Лаб. дело (4) : 41—43.

Лаан И. А., 1963. Методика определения сахаролитических свойств *Trichomonas vaginalis*. В сб.: Трихомоноз урогенитального тракта. Таллин : 87—96.

Лахонина Г. М., Терас Ю. Х., 1976. Получение аксенических культур *Lamblia duodenalis* при помощи плотной среды. Мат. II Всесоюзн. съезда протозоологов, ч. II. Киев : 56—57.

Мирме Э. А., Терас Ю. Х., Терас Л. Э., 1971. Об активности гексокиназы и сахаролитических свойствах *Trichomonas hominis* Davaine. Мат. I съезда Всесоюзн. об-ва протозоологов. Баку : 139—140.

Рыйгас Э. М., 1960. Метод получения чистых культур *Trichomonas vaginalis* при наличии дрожжевых грибков в сопутствующей флоре. Лаб. дело (4) : 43—44.

Соловьев М. М., 1962. К методике культивирования лямблий. Мед. паразитол. и паразитарн. болезни (6) : 744.

Соловьев М. М., Акимова Р. Ф., Шмакова В. И., 1971. Выделение и поддержание культур *Lamblia duodenalis* на модифицированной среде Карапетяна. Мед. паразитол. и паразитарн. болезни (1) : 75—78.

Соловьев М. М., 1975. Биометрическое изучение трофозоитов лямблий млекопитающих в связи с вопросами систематики рода *Lamblia*. Паразитология **IX** (5) : 449—455.

Терас Ю. Х., 1955. О выращивании *Trichomonas vaginalis* в чистых культурах. ЖМЭИ (8) : 64—66.
Чалая Л. Е., 1951. Д. Ф. Лямбль, исследования его по паразитическим простейшим человека и вопрос о самостоятельности рода *Lamblia*. Мед. паразитол. и паразитарн. болезни (1) : 84—86.
Шарапов М. Б., Соловьев М. М., 1976. Изучение роста *Lamblia intestinalis* в культуре с целью совершенствования методики культивирования. Мед. паразитол. и паразитарн. болезни (6) : 655—659.
Filice, F. R., 1952. Studies on the cytology and life history of a Giardia from the laboratory rat. Univ. California Publ. Zool **57** : 53—146.
Karapetyan, A., Manucharian, D., 1973. Testing of anti-lamblial activity of some antibiotics on a polysynthetic medium for cultivating *Lamblia duodenalis*. Progress in Protozoology, Université de Clermont UER-Sciences Exactes et Naturelles : 212.
Levine, N. D., 1961. Protozoan parasites of domestic animals and of man. Minneapolis, Minn. Burgess Publ.
Meyer, E. A., 1970. Isolation and axenic cultivation of Giardia trophozoites from the rabbit, chinchilla and cat. Exptl Parasitol. **27** (2) : 179—183.
Meyer, E. A., 1976. Giardia lamblia: Isolation and axenic cultivation. Exptl Parasitol. **39** (1) : 101—105.
Meyer, E. A., Pope, B. L., 1965. Culture in vitro of *Giardia trophozoites* from the rabbit and chinchilla. Nature **207** : 1417—1418.
Meyer, E. A., Radulescu, S., 1975. Characteristics of *Giardia trophozoites* in culture. Second European Multicolloquy of Parasitology, Trogir-Medena : 30.
Roux, G., Ecalle, R., 1968. Influence du sac pancreatique sur la proliferation in vitro du *Giardia duodenalis*. C. R. Acad. Sciences Naturelles (Paris) **266** : 2434—2436.

Институт экспериментальной биологии
Академии наук Эстонской ССР

Поступила в редакцию
24/II 1977

Galina LAHHONINA

VÕIMALUSEST KULTIVEERIDA LAMBLIAID JA MÄÄRATA NENDE SAHHAROLÜÜTILISI OMADUSI TAHKES SÖÖTMES

Resümee

Et lihtsustada lambliate kultiveerimist, mis on keeruline mitte ainult söötmete koostise ning külvideks sobiva materjali saamise ja ettvalmistamise, vaid ka sagedase ümberkülvi ja värske söötme pideva lisamise vajaduse tõttu (Карапетян, 1960, 1961; Meyer, Pope, 1965; Roux, Ecalle, 1968; Соловьев jt., 1971; Шарапов, Соловьев, 1976), seadis autor endale ülesandeks koostada sööde, milles algloomade kultuurid säiliksid ümberkülvideta pikemat aega. Ühtlasi püüti leida võimalusi lambliate sahharolüütilise aktiivsuse määramiseks, mille kohta kirjanduses andmed puuduvad.

Katses kasutati küülikute peensoolest isoleeritud lambliaid (13 tüve), mis vabastati kaasnevast mikrofloorast kas Meyeri (1970) poolt soovitatud või Eksperimentaalbioloogia Instituudi protozooloogiasektoris väljatöötatud meetodi abil (Лахонина, Терас, 1976).

Tuginedes inimorganismis elutsevate trihhomoonaseliikide kultiveerimisel saadud tulemustele (Терас, 1955; Рыйгас, 1960; Лаан, 1960, 1963; Мирме jt., 1971), otsustati eelkõige selgitada, kas ja kuidas lambliad paljunevad viskoosses, pooltahkes ja tahkes söötmes. Selleks lisati Meyeri (1970) koostatud M-3 söötmele 100 ml kohta 0,1—1,5 g agarit (seetõttu tuli osaliselt muuta ka söötme valmistamise metoodikat). Lambliate sahharolüütilise aktiivsuse määramiseks kasutatud söötmetele lisati ka üht uuritud süsivesikut.

Katse tulemusi kontrolliti iga 24 tunni järel. Vähese agarisisaldusega, s. t. vedelates ja viskoossetes söötmetes kasvanud kultuure uuriti binokulaarse mikroskoobiga nii katseklaasides kui ka natiivpreparaatidena.

Selgus, et kõige kauem püsisid lambliad elu- ja paljunemisvõimelistena 1,0—1,5%-lise agarisisaldusega söötmeis. Juba 24—28 tundi pärast külvi oli katseklaaside seintel ja söötme sees näha üksikuid liikuvaid trofosoide ja lambliate kolooniaid. Edaspidi algloomade kasvu tsoonid katseklaaside seintel suurenesid ja laienesid söötme ülemiste kihtide suunas. 10.—14. päevaks kattis katseklaaside seinu söötmesamba alumise kahe kolmandiku ulatuses ühekordne tihe kiht lambliaid. Ühtlasi suurenesid kolooniate ary

ja mõõtmed ka söötme sees. Kultuuride pikaajalisel jälgimisel ilmnes, et lambliad püsisid eluvõimelistena kuni 6 kuud ja paljunemisvõimelistena kuni 4 kuud.

Lambliate sahharolüütilise aktiivsuse uurimisel selgus, et kõik tüved paljunesid sahharoosi, maltoosi, glükoosi, manniiti, laktoosi, inuliini, sorbiiti, rafinoosi, ramnoosi, galaktoosi, dultsiiti, fruktoosi või lahustuvat tärklist sisaldavais söötmeis ja produtseerisid kõigist neist süsivesikuist hapet. Gaasi (sedagi vähesel hulgal) moodustasid ainult kaks tüve. Ühel juhul oli see täheldatav alles alates 27. katsepäevast laktoosi ja teisel juhul alates 37. katsepäevast sahharoosi sisaldavais söötmeis.

Eesti NSV Teaduste Akadeemia
Eksperimentaalbioloogia Instituut

Toimetusse saabunud
24. II 1977

Galina LAKHONINA

ON THE FEASIBILITY OF CULTIVATING GIARDIA IN SOLID MEDIA AND DETERMINING THEIR SACCHAROLYTIC PROPERTIES

Summary

In view of the fact that the cultivation of Giardia is a very complicated process due not only to the composition of the media, the procuring of adequate material for inoculation and the preparation of such, but also owing to the necessity of passaging Giardia at short intervals and constantly having to add fresh media to the cultures (Карапетян, 1960, 1961; Meyer, Pope, 1965; Roux, Ecalle, 1968; Соловьев et al., 1971; Шарапов, Соловьев, 1976), we endeavoured to simplify the process and, accordingly, set out to compound a medium in which the protozoa would survive over a long period of time without passaging. At the same time we were on the lookout for ways and means of determining the saccharolytic activity of Giardia, concerning which no date have been published so far.

Thirteen strains of Giardia obtained from the small intestines of rabbits were used, having first been purified from microflora by Meyer's method (Meyer, 1970) or by a method devised at our laboratory (Лахонина, Тепас, 1976).

On the grounds of the results we had obtained when cultivating the species of trichomonads inhabiting the human organism (Тепас, 1955; Рыйгас, 1960; Лаан, 1960, 1963; Мирме et al., 1971), we decided, first of all, to elucidate whether Giardia multiplied in viscous, semi-solid and solid media. For that purpose we added 0.1 ... 1.5 g agar to 100 ml of M-3 medium compounded by Meyer (1970), for which we were obliged to modify, to some degree, the methods of preparing the medium. For the purpose of determining the saccharolytic activity of Giardia, one of the thirteen carbohydrates that we used was added to the medium.

In the course of the experiment, check-ups were made every 24 hours by means of a binocular microscope (objective 10, oculars 10), but for cultures grown in fluid and viscous media, wet smears were also used.

The results thus obtained confirmed that Giardia can survive and multiply longest in media with an addition of 1.0 ... 1.5 per cent agar. Individual mobile trophozoites and colonies of Giardia were visible on the walls of the test-tubes in 24 ... 48 hours after inoculation. Further the areas of the living protozoa grew and expanded steadily towards the upper layers. By the 10th ... 14th day the dense layer of Giardia forming on the walls of the test-tubes had covered all but the upper third of the medium. Likewise, the number of Giardia colonies and their areas within the medium were increasing. Regular observations over a long period of time showed that, depending on the strain, Giardia survived up to six months, and their ability to multiply was retained for four months.

In a solid medium, it was also possible to investigate the saccharolytic activity of Giardia, and it turned out that all the investigated strains multiplied in media containing glucose, sucrose, maltose, lactose, mannitol, galactose, fructose, rhamnose, raffinose, inulin, dissoluble starch, dulcite or sorbitol, producing acid in every case. Gas was detected only in the case of two investigated strains, and not much at that: in media containing lactose on the 27th day, and with sucrose on the 37th day.

Academy of Sciences of the Estonian SSR,
Institute of Experimental Biology

Received
Feb. 24, 1977