

Из Бактериологического Института Казанского Университета.
(Директор—проф. В. М. Аристовский).

О культивировании зубных спирохэт.

Сообщено в Обществе Врачей при Казанском Университете
9 ноября 1922 г.).

Ассистента Р. Р. Гельтцера.

Хотя вопрос о возможности культивирования на искусственных питательных средах спирохэт *Duttoni*, *Koch'a*, *Novu*, *spir. icterogenes* (болезнь *Weil'a*), *spir. icteroides* (желтая лихорадка), *spir. hebdomadis* (японская семидневная лихорадка), *spir. gallinarum*, *spir. pallida*, *s. dentium*, *s. refringens*, *s. balanitidis* и *s. pertinuis*—рядом работ *Noguchi*, *Plotz'a*, Аристовского, *Uhlenhutta*, *Mühlens'a*, *Hoffmann'a*, *Shamaine*, *Schereschewsk'ogo*, *Sowade* и др. решен в настоящее время в положительном смысле, но все же методы культивирования по крайней мере для некоторых видов спирохэт, как *sp. pallida*, *s. dentium* и др., до сих пор являются не вполне надежными, так как в руках далеко не каждого исследователя дают положительные результаты. Методика культивирования большей части спирохэт не является еще общедоступной для каждой бактериологической лаборатории, культивирование это сопряжено со значительными, иногда даже непреодолимыми трудностями, как в отношении приготовления питательных сред и самой техники культивирования, так и в особенностях—в смысле получения чистых культур.

Для приготовления питательных сред обычно необходима кровяная сыворотка человека, лошади, пролика, барана или морской свинки, или асцитическая жидкость, или жидкость *hydrocele*. Имеются указания (*Noguchi*, Аристовский), что не каждая сыворотка или асцитическая жидкость, по неизвестным еще причинам, может быть пригодна для выращивания спирохэт. По *Unger-тапп'у* лучшие результаты дает кровяная сыворотка молодых животных. Мало того, лошадиная сыворотка, полученная от одной и той же лошади в различное время, с промежутками в 7—10

дней, является, повидимому, не всегда одинаковой по своему составу, о чем можно заключить из наблюдений над культивированием спирохэт Обермейера, когда в одном случае получается богатый рост спирохэт с длинными формами, в другом—бедный рост с преобладанием мелких форм. Далее, по более распространенному методу Noguchi, в питательных средах необходимо прибавление свежих стерильных кусочков какого-либо органа,—обычно яичка или почки кролика,—что представляет иногда большую техническую трудность.

Предложенная проф. Аристовским простая среда для культивирования *sp. Obermeieri*, с заменой кусочков свежего органа сгустком крови или кусочками свернутого куриного белка, значительно упростила технику в этом отношении, но и при ней для поддержания штамма необходимо чередовать питательную среду, производя пересев со среды со сгустком на 2 среды, с белком и сгустком, и со среды с белком—на питательную среду со сгустком; кроме того, так как почему-то пересев не каждой культуры дает хороший рост, необходимо делать пересевы из нескольких культур одновременно.

В особенности трудным и почти совершенно неразработанным до сих пор является вопрос о способах выделения чистых культур спирохэт, когда последние находятся в смеси с другими микробами.

При культивировании кровяных спирохэт дело в этом отношении обстоит просто, так как исходный материал для получения культуры,—кровь больного организма,—помимо спирохэт никаких посторонних микробов обычно не содержит, и потому засев нескольких капель такой крови на питательную среду дает непосредственно чистую культуру. Однако, если в кровь случайно попадут при этом посторонние бактерии, то отсутствие более или менее надежной методики для выделения чистой культуры спирохэт тотчас же сказывается,—такие культуры неминуемо погибают. Подобным же образом при культивировании таких спирохэт, как *sp. pallida*, из соевых мокнущих папул и первичных склерозов, или *sp. dentium*—из зубного налета, где наряду со спирохэтами встречается множество посторонних микробов, наши попытки выделения этих спирохэт в чистой культуре наталкиваются на значительные трудности.

Неудивительно поэтому, что получать чистые культуры *sp. dentium* и *pallida* удалось лишь немногим авторам (Mühlens, Shamine, Noguchi, Hoffmann, Sowade, Scherschewsky, Tomaschewsky, Baeslack, Arnheim), и то после ряда многочисленных опытов и кропотливых исследований. Так, Mühlens'у пришлось засеять 3000 пробирок с сывороточным агаром, прежде чем удалось выделить колонии *sp.*

pallida, Hoffmann получил 10 чистых культур в результате многих тысяч опытов культивирования и изолирования *sp. pallida*, и лишь Shmamine выделил колонии *sp. pallida* несколько быстрее,—при засеве 50—70 пробирок; изолированные колонии *sp. dentium* в Schüttelkultur на сывороточном агаре Mühlens получил лишь в 4-ой генерации; Shmamine по методу Mühlens'a не удалось культивировать ни *sp. dentium*, ни *sp. pallida*, а Noguchi получил 6 штаммов *sp. pallida*, по его словам, „в результате ряда безчисленных и бесплодных опытов“.

Трудность получения в чистой культуре этих спирохэт и то обстоятельство, что каждый, работавший по данному вопросу, автор более или менее изменял предложенную до него методику, указывают на полное несовершенство существующих методов, которые в руках различных авторов давали самые ненадежные результаты, — так, что удачу при попытках получения чистых культур в том или другом случае нужно приписать скорее случайности, нежели сущности самой методики.

Трудность изолирования *sp. dentium* и *pallida* усугубляется еще тем, что выращивание на Platten, даже при строго-анаэробных условиях, насколько нам известно, никому пока не удавалось.

Все приемы, при помощи которых различные авторы пытались выделить чистую культуру спирохэт из смеси их с другими бактериями, или сводились к получению изолированных колоний спирохэт путем так наз. Schüttelkultur, или были основаны на более быстром, по сравнению с сопровождающими бактериями, проростании спирохэтами твердых питательных сред и преодолении встречающихся на пути их роста препятствий чисто-механического характера (метод Noguchi с фильтром Berkefeld'a).

Как ни просты по своей идее эти методы, однако на практике ни один из них не дает более или менее надежных результатов. Не вдаваясь в рассмотрение причин, почему это так, мы все же думаем, что, какую-бы идею мы ни положили в основу метода выделения культуры спирохэт в чистом виде, прежде всего необходимо разрешить другую задачу, задачу предварительного характера, — получить подходящий материал, хотя-бы и в виде смешанной культуры, но в которой-бы спирохэты находились в преобладающем количестве по сравнению с другими микробами. Другими словами говоря, необходимо предпослать задаче выделения чистой культуры — задачу предварительного обогащения спирохэтами смешанной культуры, т. е. проделать то, что мы делаем при выделении холерного вибриона, дифтерийной палочки и т. п.

Целью настоящей работы и явилось исследование вопроса именно в этом направлении. Попутно, однако, нам пришлось рассмотреть вообще всю методику получения смешанных культур по отношению к избранной нами спирохете, — *spiroch. dentium*.

Попытки культивирования зубных спирохет были впервые произведены Goadbi, которому в 1903 г. удалось получить смешанную культуру на бульоне. В 1905 г. Veszprémi сообщил о полученной им смешанной культуре „спирилл“ с *bac. fusiformis* в нескольких генерациях на бульоне с перикардиальной жидкостью или с кровяной сывороткой кролика, причем выращивание производилось им без удаления кислорода. В том же году Weaver и Funicliff получили смешанную культуру „спирилл“ на бульоне с плевритическим экссудатом, причем рост „спирилл“ у них всегда был ограничен. Чистые культуры *sp. dentium* удалось до сего времени получить, по видимому, лишь Mühlensy (1906 г.), Shamine (1910—11 г.) и Noguchi (1912 г.).

Приступая к опытам культивирования *sp. dentium*, мы прежде всего попытались получить Schüttelkultur по методу Mühlens'a. Предложенная им питательная среда, сывороточный агар, готовится след. образом: стерильно собранная лошадиная сыворотка нагревается на водяной бане в течение $\frac{1}{2}$ часа при 60°C , причем происходит выделение пузырьков воздуха. Одновременно на другой водяной бане расплавляется и выпячивается в течение одного часа, для удаления воздуха, $2\text{—}2\frac{1}{2}\%$ агар нейтральной или слабощелочной реакции; агар необходимо иметь разлитым в высоких (20 сант. высоты) пробирках. По охлаждении сыворотки и агара до 45°C , сыворотку осторожно приливают к агару в отношении 1:2, причем смесь эта должна занимать $\frac{3}{4}$ пробирки и быть совершенно прозрачной. Исходным материалом служит взвесь частиц зубного налета в сывороточном бульоне или физиологическом растворе NaCl, содержащая большое количество спирохет. Посев производится при охлаждении сывороточного агара до $42\text{—}40^{\circ}\text{C}$, следующим образом: длинную платиновую иглу проводят через взвесь частиц зубного налета и заражают пробирку с питательной средой, стараясь погрузить иглу почти до дна и производя помешивание; затем этой же иглой и таким же образом быстро заражают следующие 10—12 пробирок. После посева пробирки сразу же погружают в холодную воду для быстрого затвердения среды. Выращивание производится при $t^{\circ} 3^{\circ}\text{C}$.

Уже в течение 2—3 дней среда в тех пробирках, которые были засеяны первыми, мутнеет, в ней появляются пузырьки газа, столбик сывороточного агара разрывается; в последующих же про-

бирках можно отметить образование отдельных колоний, сначала в верхней части питательной среды, затем, начиная с 3—4 дня, — и в нижней части. Колонии эти имеют разнообразный вид — от грубых больших до мелких, беловатого или сероватого цвета; иногда они окружены зоной легкого, едва заметного помутнения. По описанию Mühlens'a колонии спирохэт, вначале едва заметные, начинают появляться на 9—11 сутки и представляют собой незначительные нежные помутнения, без резкой границы, в виде легких прозрачных облачностей (hauchartig), незаметные при проходящем свете и обнаруживаемые лишь при рассматривании пробирки на фоне пола или серой стены при падающем свете.

По указанному методу Mühlens'a мы произвели около 55 посевов с целью получить Schüttelkulturen, выдерживали их в термостате до 14—17 суток, но при исследовании колоний, где можно было заподозрить наличие спирохэт, ни разу не обнаружили присутствия этих последних. Таким образом результаты и наших попыток оказались одинаковы с результатами опытов Shmashine, которому тоже не удалось получить по методу Mühlens'a изолированных колоний *sp. dentium*.

Далее мы пытались получить Mischkulturen по способу Noguchi. Питательная среда этого автора состоит из 4 куб. сант. лошадиной сыворотки (кроличьей или бараньей) и 12 куб. сант. дистиллированной воды, в котором прибавляется кусочек стерильной свежей ткани животного (почка или яичко кролика). До прибавления кусочков органа жидкая среда стерилизуется три дня подряд в течение 15 минут ежедневно при 100°C, после чего уже в нее опускается кусочек, затем среда должна быть испытана на стерильность, для чего пробирки ставятся в термостат на двое суток при t°37°C. После засева 1—2 каплей исходного материала среда в высоких и узких пробирках (20 сант. > 1,5 сант.) заливается слоем жидкого парафина в 1,5—2 сант. высоты. Выращивание нами производилось при t°35°C. На 5—6-е сутки среда свертывалась, на 8-ой день в ней удавалось отметить развитие спирохэт, достигавших maximum'a роста на 11—14-й день, а на 20-е сутки спирохэты погибали. Особым богатством эта культура не отличалась: в каждом поле зрения можно было встретить не более 10—12 подвижных спирохэт.

Еще до применения оригинального метода Noguchi, после неудачных попыток получения Schüttelkultur по способу Mühlens'a, мы, в виду недостатка кроликов, попробовали применить для нашей цели среду, состоящую из сывороточной же воды по Noguchi (лошадиная сыворотка), но в которой, вместо кусочков

свежих органов, прибавлялись сгустки лошадиной крови. Производя эту замену, мы имели в виду опыты культивирования спирохэт Обермейера проф. Аристовского и полагали: если допустить, что в опытах культивирования спирохэт Обермейера по способу проф. Аристовского кровяной сгусток играет ту же роль, что кусочек свежего органа в методе Noguchii, то можно ожидать, что и выращивание *spir. dentium* не потерпит ущерба от замены свежего органа кровяным сгустком; а такая замена, конечно, значительно упрощает технику. Выращивание зубных спирохэт на видоизмененной таким образом среде в дальнейшем мы производили так же, как и при применении оригинальной методики Noguchii.

При такой технике культивирования на 4—5-е сутки пребывания пробирок в термостате нами отмечался рост спирохэт; наиболее интенсивное размножение их наступало на 6—8-е сутки, на 9—16-е сутки они погибали. Но все же и эта смешанная культура оказалась небогатой: 12—15 экземпляров в поле зрения; пересевы на свежую среду 1—2 капель культуры с подвижными спирохэтами давали новую генерацию спирохэт. Таким образом рост спирохэт на этой среде ничем не отличался от роста на оригинальной среде Noguchii.

Возможность культивирования зубных спирохэт и при замене свежих органов кровяным сгустком с одной стороны и недостаточно богатый рост спирохэт на такой питательной среде с другой — заставили нас, опять-таки по аналогии с опытом культивирования спирохэт Обермейера, применить для нашей цели среду со свернутым белком куриного яйца. Эту питательную среду мы готовили следующим образом: в смеси 4 куб. сант. лошадиной сыворотки и 12 куб. сант. дистиллированной воды прибавлялись небольшие кусочки белка круто сваренного свежего куриного яйца, затем среда стерилизовалась текучим паром в течение 15 минут три дня подряд, после чего она становилась несколько опалесчающей при падающем свете и прозрачной, зеленоватого цвета — при проходящем. После обычного засева среда в высоких пробирках заливалась слоем жидкого парафина. Выращивание производилось также при $t^{\circ}35-37^{\circ}\text{C}$. На 3—5-е сутки после посева среда становилась мутной и свертывалась, приобретая молочно-белый оттенок; затем постепенно, вследствие свертывания сыворотки, среда становилась плотной, а на дне появлялось, сперва едва заметное, незначительное свопление прозрачной, бесцветной жидкости, впоследствии увеличивавшееся в количестве и окружавшее массу свернутой среды уже со всех сторон.

Спирохеты в этих культурах при исследовании материала, взятого со дна пробирки, могли быть обнаружены, начиная с 9—15-го дня, но в небольшом количестве, как и в предыдущих опытах: 8—15 в поле зрения; в дальнейшем, однако, шло усиленное размножение их, и на 15—30-е сутки количество спирохет достигало до 40 и более в каждом поле зрения; с увеличением возраста культуры начинали появляться спирохеты с вялой подвижностью, неподвижные и, наконец, так наз. трупы спирохет, т. е. образования с неясными контурами, матовые, состоявшие из мельчайшей зернистости. Если в капле исследуемого материала попадались частицы свернутой среды, то под микроскопом можно было нередко наблюдать, как спирохеты, лежащие в толще этих частиц, как-бы вытолзали в окружающую жидкость; очень часто также встречались формы, состоящие из двух особей, соединенных между собой нежной, короткой нитью, — это, по видимому, спирохеты в стадии поперечного деления. В некоторых случаях, наконец, от неизвестных ближе причин, отмечалась наклонность спирохет соединяться в кучи и давать красивые образования звездобразной формы.

Жизнеспособность этих культур на средах с кусочком белка длится от 4 до 8 недель, при сохранении пробирок при температуре 35°C; при более низкой температуре культуры беднеют спирохетами. Пересевы культур на такую же питательную среду, произведенные нами в различные периоды развития спирохет, как правило, давали начало новым генерациям. В течение 3 месяцев нам удалось вырастить 6 генераций. Необходимо отметить, при этом, что смешанные культуры в позднейших генерациях медленнее развивались и дольше сохраняли жизнеспособность (до 8 недель).

Все смешанные культуры, полученные по методу Noguchi и нашему, имели противный запах, напоминающий foetus ex ore при кариозном процессе зубов.

Получив, таким образом, на средах с куриным белком уже значительно лучшие результаты, как в смысле богатства культуры спирохетами, так и в смысле постоянства результатов, по сравнению с опытами культивирования по способу Mühlens'a и Noguchi, мы все же не были удовлетворены достигнутыми данными. Все же и на средах с куриным белком спирохеты находились далеко не в преобладающем количестве по сравнению с другими микробами, и то обогащение культуры спирохетами, к которому мы стремились, нами не было достигнуто, почему мы и продолжали наши поиски дальше.

Стремясь получить более богатую смешанную культуру и при том такую, в которой имело-бы место решительное преобладание спирохэт над посторонними формами, мы попробовали сделать пересев из культуры на сывороточной воде с белком на полусвернутую лошадиную сыворотку, рассчитывая, что спирохэты, как анаэробы, стремясь удалиться от поверхности среды, проростут ее по направлению к дну пробирки, и этим самым произойдет уже некоторое изолирование их от посторонних бактерий, как то мы наблюдали при получении смешанных культур *spir. pallida* на полусвернутой лошадиной сыворотке по Schereschewsk'ому.

Для этой цели стерильно собранная и разлитая по пробиркам ($\frac{2}{3}$ объема) сыворотка нагревалась нами на водяной бане в течение часа при 60°C, в продолжение 3 дней; при 4-ой стерилизации температура постепенно повышалась до 70°C, причем происходило медленное свертывание сыворотки; нагревание прекращалось в тот момент, когда среда оставалась еще прозрачной, но при горизонтальном положении пробирки поверхность сыворотки не опадала. После каждой стерилизации, для быстрого охлаждения, пробирки погружались в холодную воду. Посевной материал вводился в полусвернутую сыворотку помощью капиллярной пипетки, причем 1—2 капли содержимого последней осторожно выдувались на уровне границы верхней и средней трети.

Начиная уже с первых дней пребывания в термостате, на месте введения посевного материала обнаруживался усиленный рост в виде тяжа беловатого цвета; на 6—9-е сутки среда мутнела по направлению к периферии, ниже же места введения посевного материала и на дне пробирки сыворотка оставалась неизменной и попрежнему совершенно прозрачной; только при наступлении разжижения среды, вследствие усиленного роста посторонних микробов, вся среда становилась мутной, беловатого цвета.

На 7—10-е сутки в капле неизменной микроскопически сыворотки, взятой со дна пробирки, можно было обнаружить, как мы и предполагали, спирохэт. Количество их в каждом поле зрения было настолько велико, что встречались участки, сплошь состоявшие из одних спирохэт. В более старых; 2—3 недельных культурах подвижность спирохэт оказывалась ограниченной, а иногда они казались совершенно неподвижными; однако пересев из таких культур на свежие питательные среды продолжал давать рост, что указывало, конечно, на сохранившуюся их жизнеспособность, продолжительность которой в среднем равнялась 3—4 неделям.

При дальнейших пересевах этих культур на полусвернутую лошадиную сыворотку, нам удалось получить культуры с сравнительно малой примесью посторонних бактерий.

Таким образом применение полусвернутой лошадиной сыворотки дало нам наилучшие результаты: на этой питательной среде спирохеты размножались настолько пышно, что по сравнению с ростом их на других питательных средах мы имеем основание говорить о реальном обогащении культуры спирохетами. Можно было бы думать, что полусвернутая лошадиная сыворотка может служить прекрасной питательной средой для получения сразу богатых культур зубных спирохет и при непосредственном посеве на нее частиц зубного налета, а не только смешанных культур, предварительно выращенных на других питательных средах (в нашем случае на среде с куриным белком). Однако опыт показал нам, что при посеве частиц зубного налета непосредственно на полусвернутую сыворотку роста спирохет или совсем не наблюдается, или он бывает очень скуден. Почему мы считаем эту питательную среду неподходящей для получения первых генераций.

Последнее мнение подтверждается и наблюдениям и других авторов. Так, Shmamine, не получив изолированных колоний зубных спирохет по методу Mühlens'a, рекомендует для получения смешанной культуры пользоваться полусвернутой лошадиной сывороткой с прибавлением *patrii nucleinici*, так как на одной сыворотке роста зубных спирохет ему не удавалось получить. Но и пользуясь средой с прибавлением *patrii nucleinici*, этот автор все же приходит к выводу, что получение именно первой смешанной культуры является самым трудным моментом в деле культивирования спирохет.

Со своей стороны мы проверили наблюдения Shmamine, сделав попытку получения смешанной культуры из зубного налета путем параллельного посева на полутвердую сыворотку, как с прибавлением к ней *patrii nucleinici*, так и без него; однако существенной разницы мы при этом не подметили: и в том, и в другом случае результаты были непостоянны, и, если и наблюдался рост спирохет, то количество их было ограничено. Поэтому мы думаем, что полусвернутая сыворотка не годится для получения первой смешанной культуры, и что лучшей средой для этой цели является сывороточная вода с кусочком белка куриного яйца, применение которой в наибольшей степени обеспечивает постоянство положительных результатов. Впрочем на основании приведенных в настоящей работе наблюдений применение этой среды мы можем рекомендовать только для целей получения первых смешанных культур, так как в дальнейшем она не обеспечивает того максимального роста спирохет, которого можно достигнуть, применяя просто полусвернутую лошадиную сыворотку.

Таким образом, по нашим наблюдениям, путь, по которому нужно идти, чтобы в конце концов получить богатейший рост зубных спирохет, хотя-бы с примесью посторонних бактерий, должен быть следующий:

1) для получения первой смешанной культуры этих спирохет следует делать посев из зубного налета на сывроточную воду с вкусоочном круто сваренного белка куриного яйца;

2) в дальнейшем пересев отсюда нужно производить на полусвернутую лошадиную сывротку.

Этим путем наверняка достигается, в конце концов, получение чрезвычайно богатой спирохетами смешанной культуры, из которой, мы думаем, можно уже исходить при практическом разрешении вопроса о надежной методике выделения чистой культуры.

Л и т е р а т у р а .

- 1) В. М. Аристовский. О культивировании спирохеты Обермейера. Каз. Мед. Журнал, 1921 № 1.—2) В. М. Аристовский и Н. Н. Благовещенский. О некоторых особенностях культивирования спирохеты Обермейера. Jbid., 1922, № 3.—3) P. Mühbens u. M. Hartmann. Über Bac. fusiformis und Spir. dentium. Zeitschr. f. Hyg., Bd. 55.—4) P. Mühlens. Über Züchtung von Zahnspirochäten und fusiformen Bacillen auf künstlichen (festen) Nährböden. Deut. med. Woch., 1906, № 20.—5) P. Mühlens. Methoden der Reinkulturen von pathogenen Spirochaeta pallida und Spir. pertenuis. Münch. med. Woch., 1911, № 29.—6) P. Shamine. Über die Reinzüchtung der Spirochaeta pallida und der nadelförmigen Bakterien aus syphilitischen Material etc. Centralbl. f. Bakt., Bd. 65, 1912.—7) D. Weszpremi. Kultur und Tierversuche mit dem Bac. fusiformis und den Spirillen. Jbid., Bd. 38, 1905.
-