



УДК 614.763:599.742.7:616-093:593.192.1:616.993.192.1 DOI: 10.36718/1819-4036-2020-12-249-254

Николай Дмитриевич Шамаев

Казанский (Приволжский) федеральный университет, аспирант кафедры прикладной экологии, Россия, Казань

E-mail: nikolai.shamaev94@mail.ru

СРАВНИТЕЛЬНАЯ ОЦЕНКА ФЛОТАЦИОННЫХ МЕТОДОВ ВЫЯВЛЕНИЯ ООЦИСТ *TOXOPLASMA GONDII* В ПОЧВЕННЫХ ОБРАЗЦАХ

*Цель работы – подбор оптимального способа определения уровня контаминации почвы ооцистами протист. Был проведен отбор проб почвы с придомовых, детских площадок и других объектов г. Казани для проведения сравнительного анализа флотационных методов с точки зрения их пригодности для определения уровня контаминации объектов окружающей среды ооцистами паразитических протист *Toxoplasma gondii*. Установлено, что среднее время на одну пробу при постановке модифицированной флотации с сульфатом цинка является самым меньшим – 5 мин. Центрифугирование суспендированного образца почвы с раствором Шезера занимает 15 мин при 3100 об/мин. Микроскопические исследования полученных флотатов, вне зависимости от способа флотации во всех образцах, в равной степени выявляли присутствие ооцист представителей родов *Hammondia*, *Neospora*, *Toxoplasma* и других морфологически родственными кокцидий. Эффективность применения варьирует в зависимости от сложности состава рабочих растворов и продолжительности проведения исследования. Использование формальдегида при проведении флотации с использованием раствора Шезера и формалина в модифицированной флотации с сульфатом цинка не отвечает критериям простоты и дешевизны. Низкая эффективность флотации с хлоридом натрия связана с продолжительными рабочими циклами центрифугирования, увеличивающими время проведения исследования пробы. Результаты данной работы свидетельствуют, что сахарозная флотация является наиболее эффективной по компонентному составу и времени проведения исследования. Модификация метода с добавлением желатина повышает степень очистки ооцист из образцов почвы, при этом не усложняет процедуру флотации.*

Ключевые слова: токсоплазмоз, *Toxoplasma gondii*, ооцисты, флотационный анализ, контаминация почвы, сравнительная оценка.

Nikolay D. Shamaev

Kazan (Volga) Federal University, post-graduate student of the chair of applied ecology, Russia, Kazan, e-mail: nikolai.shamaev94@mail.ru

COMPARATIVE ASSESSMENT OF FLOTATION METHODS FOR THE DETECTION OF *TOXOPLASMA GONDII* OOCYSTS IN SOIL SAMPLES

The aim of the study was to select the optimal method for determining the level of soil contamination by protist oocysts. Soil samples were taken from housing area, playgrounds and other objects of Kazan city to conduct a comparative analysis of flotation methods in terms of their suitability for determining the level of

contamination of environmental objects with parasitic protists *Toxoplasma gondii* oocysts. It was found that the average time per sample when setting modified flotation with zinc sulfate was the smallest – 5 minutes. Centrifuging of suspended soil sample with a Sheather solution takes 15 minutes at 3100 turns/minute. Microscopic studies of the obtained flotates, regardless of the flotation method, in all the samples equally revealed the presence of oocysts of the genera *Hammondia*, *Neospora*, *Toxoplasma* and other morphologically related coccidia. The effectiveness of the application varies based on the complexity of the composition of the working solutions and the duration of the study. The use of formaldehyde in flotation using a Sheather solution and formalin in modified flotation with zinc sulfate does not meet the criteria of simplicity and cheapness. Low efficiency of flotation with sodium chloride is associated with long centrifugation operating cycles, which increase the time of the sample research. The results of this work indicate that sucrose flotation is most effective in terms of component composition and time of the study. Modification of the method with the addition of gelatin increases the degree of purification of oocysts from soil samples, while not complicating the flotation procedure.

Keywords: toxoplasmosis, *Toxoplasma gondii*, oocysts, flotation analysis, soil contamination, comparative assessment.

Введение. Токсоплазмоз – биоинвазия человека и животных, биопатогеном которой является протиста *Toxoplasma gondii*, приводящая в подавляющем большинстве случаев к бессимптомному течению инвазионного процесса [1]. *T. gondii* представляет собой важную медико-социальную проблему, поскольку может формировать тяжелые патологии у новорожденных и приводить к самопроизвольному выкидышу у беременных женщин. По оценкам исследователей, в разных странах хронически инфицированы от 15 до 85 % населения [2]. Инфицирование людей происходит при близком контакте с кошкой, при употреблении инфицированного сырого мяса, а также при контакте с ооцистами, которые выделяются вместе с кошачьими фекалиями [3]. Часть цикла развития возбудителя токсоплазмоза проходит в почве, при этом активному распространению паразита в объектах окружающей среды, в т.ч. во дворах, на детских площадках, в парках и других общественных местах, способствует загрязнение почвы фекалиями кошек в стадии выделения ооцист [4].

Ранее проведенными исследованиями установлена высокая серопревалентность *T. gondii* в популяциях кошек, коз и человека в отдельных регионах Российской Федерации [5]. Актуальным при этом остается вопрос о контаминации объектов окружающей среды ооцистами данного паразита.

Цель работы. Подбор оптимального способа определения уровня контаминации почвы ооцистами протист.

Задачи: провести сравнительную оценку флотационных методов с точки зрения их пригодности для определения уровня контаминации объектов окружающей среды ооцистами. При этом учитывали комплексность состава рабочих растворов, степень сложности процесса и общее время проведения флотации.

Материалы и методы. В работе использовали пробы почв с придомовых, детских площадок и других объектов г. Казани. Отбор проб почвы проводили согласно ГОСТ 17.4.3.01-83 [6]. Для пробоподготовки использовали набор ручных почвенных пробоотборников с буром Эдельмана для комбинированных почв (Eijkelkamp, Нидерланды). Пробы отбирали методом ручного бурения на глубину 10–15 см. Погруженный в почву бур поворачивали на 90°, образец помещали в полиэтиленовый пакет размером 150x200 мм с замком zip-lock (гриппер).

В работе использовали лабораторные сита диаметром 15 см с размерами ячеек не менее 100 mesh (0,15 мм) и не более 50 mesh (0,3 мм). Осаждение частиц в рабочем растворе проводили с использованием центрифуги 5804R (Eppendorf) с бакет-ротатором А-4-44 и адаптерами для центрифужных пробирок типа Falcon объемом 50 мл. Для дозирования исходных компонентов использовали одноканальные пипетки переменного объема Ленпипет Колор (Thermo Fisher Scientific).

Были подвергнуты сравнительной оценке сахарозная флотация, модифицированная сахарозная, с раствором Шезера, с хлоридом натрия и модифицированная флотация с сульфатом цинка.

Для измерения массовой доли сахара в водных растворах применяли стеклянный ареометр АС-3, а для измерения плотности рабочих растворов – ареометр АОН-1 (НПО «Лаборкомплект»). Измерения проводили согласно ГОСТ 18481-81 [7].

Результаты исследования и их обсуждение

Сравнительная оценка этапа пробоподготовки и состава рабочих растворов. Для

наших исследований были выбраны 5 способов флотации: сахарозная, модифицированная сахарозная, с раствором Шезера, с хлоридом натрия, модифицированная с сульфатом цинка. При сравнительном анализе учитывали массу образца почвы, а также объем и компонентный состав рабочих растворов (табл. 1) для проведения флотации.

Таблица 1

Сравнительный анализ этапа пробоподготовки

Показатель	Сахарозная	Модифицированная сахарозная	Раствор Шезера	Хлорид натрия	Сульфат цинка
Масса образца почвы, г	30	30	5	30	5
Компоненты рабочего раствора	Tween 80, сахар	Tween 80, желатин, сахар	Сахар, формальдегид	Tween 80, NaCl	ZnSO ₄ , формальдегид
Гомогенизация и фильтрация суспензии	+	+	+	+	+

Для сахарозной флотации образец почвы в объеме 30 г фильтровали через сито, затем суспендировали в 50 мл 0,1 % раствора Tween 80.

Для модифицированной сахарозной флотации к суспендированному образцу почвы, описанному выше, добавляли 0,1 % раствор желатина, что повышает степень выделения ооцист из проб почвы.

Для флотации с использованием раствора Шезера брали образец почвы в объеме 5 г, затем суспендировали в 10 мл раствора сахара и формальдегида с дальнейшей фильтрацией через сито.

Для проведения флотации с использованием хлорида натрия смешивали 25 г почвы и 100 мл 0,5 % раствора Tween 80 (диспергирующий раствор). Полученную смесь эмульгировали в течение 15 мин с помощью ручного перемешивания. Суспензию пропускали через сито и промывали в 100 мл диспергирующего раствора. Этот метод был рекомендован для проведения дешевых паразитологических исследований [3].

Для флотации с сульфатом цинка суспендировали образец почвы в объеме 5 г в смеси-

тельном сосуде с винтовой крышкой, содержащей 15 мл 10 % формалина и 5 мм стеклянных шариков. Полученную смесь подвергали фильтрации через сито. Этот метод был рекомендован для исследования образцов почвы более 30 лет назад.

Установлено, что модифицированная сахарозная флотация требует более тщательного подхода к этапу пробоподготовки, чем остальные методики, к тому же она сложна по своему компонентному составу. Остальные методики по этим показателям не отличаются друг от друга, но проведение флотации с раствором Шезера и с сульфатом цинка позволяет исследовать образцы с минимальной массой 5 г, в то время как для других способов требуется минимум 25–30 г.

Сравнительный анализ процесса флотации. В ходе наших исследований мы определяли и учитывали в сравнительном анализе плотность рабочего раствора для флотации и среднее время, затраченное на проведение флотации одной пробы (табл. 2).

Сравнительный анализ процесса флотации

Показатель	Сахарозная	Модифицированная сахарозная	Раствор Шезера	Хлорид натрия	Сульфат цинка
Плотность раствора для флотации, Н/м ³	1,21	1,27	1,27	1,21	1,23
Среднее время флотации одной пробы, мин	20	20	15	53	5

При проведении сахарозной флотации суспендированную пробу центрифугировали при 3250 об/мин в течение 10 мин, отделяли супернатант, а осадок ресуспендировали в 5 мл раствора сахарозы с удельный весом 1,2 Н/м³. Суспензию вновь центрифугировали при 3250 об/мин в течение 10 мин, супернатант перенесли в отдельную пробирку и разбавляли дистиллированной водой в соотношении 1:10. На последнем этапе центрифугировали при тех же условиях, а полученный цельный осадок использовали для микропирования.

Для модифицированной сахарозной флотации выполняли все этапы, описанные выше, с добавлением 0,1 % желатина во флотационный раствор.

При проведении флотации с раствором Шезера нагревали дистиллированную воду до кипения, добавляли сахарозу и перемешивали ее до полного растворения (удельный вес 1,27 Н/м³). После остывания смеси до комнатной температуры добавляли формальдегид. Раствор Шезера добавляли в равном объеме к суспендированному образцу почвы, встряхивали в вортексе, а затем центрифугировали 15 мин при 3100 об/мин. Осадок подвергали микропированию.

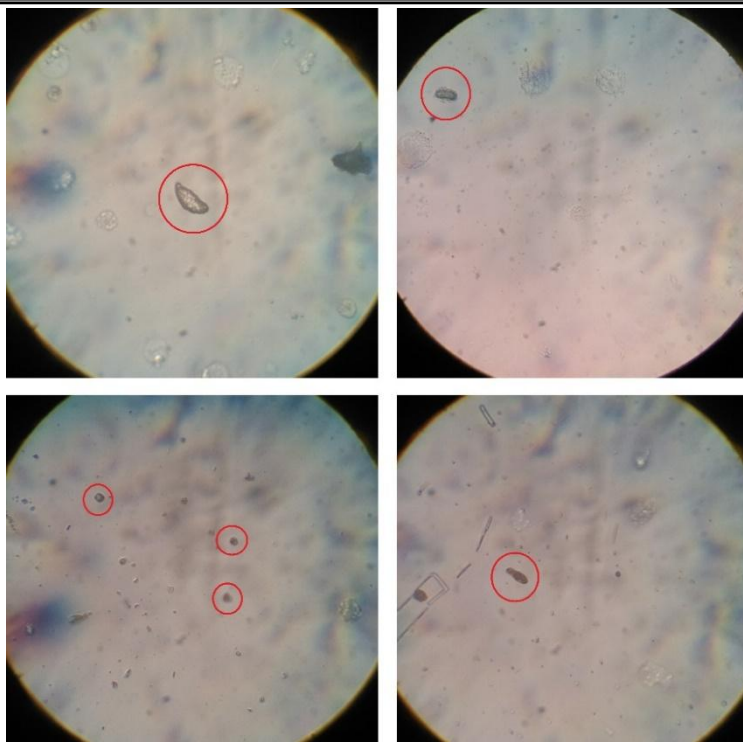
При постановке флотации с хлоридом натрия готовили рабочий раствор соли с удельным весом 1,21 Н/м³, который смешивали с пробой. Суспензию центрифугировали в 5 циклов по 10 мин при 3300 об/мин с отделением супернатанта, каждый раз разбавляя его дистиллированной водой. Шес-

той цикл проходил в течение 3 мин при 2200 об/мин. Конечный ресуспендированный в 100 мл дистиллированной воды осадок микропировали.

Для проведения флотации с использованием сульфата цинка (удельный вес 1,00–1,22 Н/м³) суспендированную пробу центрифугировали в течение 3,5 мин при 1800 об/мин. Сначала отделяли супернатант, затем к осадку добавляли дистиллированную воду. На следующем этапе пробы центрифугировали при 2200 об/мин в течение 1,5 мин. Осадок микропировали.

В рамках подсчета времени флотации на одну пробу среднее время при постановке модифицированной флотации с сульфатом цинка является самым меньшим – 5 мин. Сахарозный и модифицированный сахарозный способы – 20 мин, флотация с раствором Шезера – 15 мин. Самой трудоемкой является флотация с использованием хлорида натрия, на проведение которой затрачивается 53 мин.

Обнаружение ооцист с помощью световой микроскопии. Микроскопические исследования полученных флотатов при использовании различных методик флотации не имеют своих особенностей и проводятся одинаково. Независимо от способа флотации во всех образцах в равной степени обнаруживались ооцисты протист – представителей родов *Hammondia*, *Neospora*, *Toxoplasma* и других морфологически родственных кокцидий (рис.).



Микроскопия образцов пробы, полученной методом флотации почвы. Нижний левый снимок представлен ооцистами, морфологически схожими с представителями родов *Hammondia*, *Neospora* и *Toxoplasma*. Верхний правый и левый, а также нижний правый – ооцистами, морфологически схожими с представителями рода *Eimeria*

Выводы. В сравнительном аспекте пяти способов флотации (сахарозная, модифицированная сахарозная, с раствором Шезера, с хлоридом натрия, модифицированная с сульфатом цинка) установлено, что они в равной степени позволяют выявлять ооцисты представителей протистов разных видов, в т.ч. и *T. gondii*, в образцах почвы. Однако эффективность их применения варьирует, на что влияет комплексность состава рабочих растворов и продолжительность проведения исследования.

Результаты данной работы свидетельствуют, что сахарозная флотация является наиболее эффективной по компонентному составу и времени проведения исследования. Модификация метода с добавлением желатина повышает степень очистки ооцист из образцов почвы, при этом не усложняет процедуру флотации. Использование формальдегида при проведении флотации с использованием раствора Шезера и формалина в модифицированной флотации с сульфатом цинка не отвечает критериям простоты и дешевизны. Низкая эффективность флотации с NaCl связана с продолжительными

рабочими циклами центрифугирования, увеличивающими время проведения исследования пробы.

Ввиду того, что ооцисты разных видов простейших могут иметь разную массу и плотность, для их обнаружения флотационным методом эффективно использовать более плотные растворы, такие как раствор Шезера и раствор для модифицированной сахарозной флотации. В ходе эксперимента мы не выявили существенных различий между плотностью использованных растворов для флотации и качеством флотации, так как показатели находились на одинаковом уровне (1,27 Н/м³). Мы не обнаружили очевидных различий между временем и качеством флотата. Для более детального анализа флотационных методов необходимо подготовить контрольные образцы с известным количеством ооцист одного вида и времени созревания.

Литература

1. Hunter C.A., Sibley L.D. (2012) Modulation of innate immunity by *Toxoplasma gondii* virulence effectors // Nature reviews. Microbiology. Vol. 10. № 11. P. 766-778.
2. Remington J.S., McLeod R., Thulliez P., Desmonts G. (2006) Infectious diseases of the fetus and newborn infant // Philadelphia: W.B. Saunders. P. 1313.
3. Kuczynska E., Shelton D.R. (1999) Method for detection and enumeration of *Cryptosporidium parvum* oocysts in feces, manures, and soils // Appl Environ Microbiol.. Vol. 65. № 7. P. 2820–2826.
4. Lass A., Pietkiewicz H., Modzelewska E. (2009) Detection of *Toxoplasma gondii* oocysts in environmental soil samples using molecular methods // European J Clinical Microbiology & Infectious Diseases. Vol.28. № 6. P. 599–605.
5. Shuralev E.A., Shamaev N.D., Mukminov M.N. et al. *Toxoplasma gondii* seroprevalence in goats, cats and humans in Russia // Parasitology International. 2018. Vol. 67. № 2. P. 112–114.
6. ГОСТ 17.4.1.02-83. Охрана природы. Почвы. Классификация химических веществ для контроля загрязнения / Электронный фонд правовой и научно-технической документации. URL: <http://docs.cntd.ru/document/1200012797> (дата обращения: 20.10.2020).
7. ГОСТ 18481-81. Ареометры и цилиндры стеклянные. Общие технические условия / Электронный фонд правовой и научно-технической документации. URL: <http://docs.cntd.ru/document/1200003855> (дата обращения: 20.10.2020).

Literatura

1. Hunter C.A., Sibley L.D. (2012) Modulation of innate immunity by *Toxoplasma gondii* virulence effectors // Nature reviews. Microbiology. Vol. 10. № 11. P. 766-778.
2. Remington J.S., McLeod R., Thulliez P., Desmonts G. (2006) Infectious diseases of the fetus and newborn infant // Philadelphia: W.B. Saunders. P. 1313.
3. Kuczynska E., Shelton D.R. (1999) Method for detection and enumeration of *Cryptosporidium parvum* oocysts in feces, manures, and soils // Appl Environ Microbiol.. Vol. 65. № 7. P. 2820–2826.
4. Lass A., Pietkiewicz H., Modzelewska E. (2009) Detection of *Toxoplasma gondii* oocysts in environmental soil samples using molecular methods // European J Clinical Microbiology & Infectious Diseases. Vol.28. № 6. P. 599–605.
5. Shuralev E.A., Shamaev N.D., Mukminov M.N. et al. *Toxoplasma gondii* seroprevalence in goats, cats and humans in Russia // Parasitology International. 2018. Vol. 67. № 2. P. 112–114.
6. GOST 17.4.1.02-83. Ohrana prirody. Pochvy. Klassifikacija himicheskikh veshhestv dlja kontrolja zagriznenija / Jelektronnyj fond pravovoj i nauchno-tehnicheskoy dokumentacii. URL: <http://docs.cntd.ru/document/1200012797> (data obrashhenija: 20.10.2020).
7. GOST 18481-81. Areometry i cilindry stekljannye. Obschie tehnicheckie uslovija / elektronnyj fond pravovoj i nauchno-tehnicheskoy dokumentacii. URL: <http://docs.cntd.ru/document/1200003855> (data obrashhenija: 20.10.2020).