

Jacek Malicki, Agnieszka Montusiewicz, Kazimierz Stelmach

## Szybka metoda oceny liczebności jaj helmintów w ściekach

Wymagania sanitarne dotyczące rolniczego wykorzystania ścieków powodują m.in. konieczność określenia w ściekach używanych do nawodnień liczebności jaj pasożytów jelitowych, których nie powinno być więcej niż 10 szt./dm<sup>3</sup> [1], przy czym odpowiednie wytyczne WHO zalecają aby ich średnia liczebność nie przekraczała 1 szt./dm<sup>3</sup> [2]. Metodyka badań liczebności jaj pasożytów polega najczęściej na sedymentacji i dekantacji próbek ścieków w polu grawitacyjnym (lub przy użyciu wirówki) [3] oraz flotacji jaj pasożytów z badanego materiału w wodnych roztworach soli o gęstości 1,2÷1,39 g/cm<sup>3</sup> [4]. Zawiesiny otrzymane metodą sedymentacji–dekantacji–flotacji są następnie kontrolowane mikroskopowo. Sprawność tych metod nie przekracza 80% [5], a z reguły osiąga nie więcej niż 50% [6,7]. Rozmiary jaj pasożytów wynoszą 50×90 μm, w przypadku *Ascaris lumbricoides hominis* L.1758 (glista ludzka) i 30×65 μm, w przypadku *Trichocephalus trichiuris* L.1771 Schrank 1788 (włosogłówka). Gęstość jaj tych pasożytów wynosi około 1,1 g/cm<sup>3</sup>, więc przy ich rozmiarach i liczebności masa jaj stanowi minimalny udział w masie osadów ściekowych (ok. 6·10<sup>-6</sup>%) [8] i z reguły są one maskowane przez inne elementy składowe tych osadów.

Podczas badań wody, a także ścieków i osadów ściekowych, wymagane jest uzyskanie informacji o jakości analizowanego materiału oraz jej zmienności w czasie. Jeżeli jakość może ulegać zmianom, a w przypadku ścieków współczynniki zmienności są zwykle znaczne, to wartości otrzymanych statystyk (średnia arytmetyczna, odchylenie standardowe, wartość najwyższa) są tylko estymatorami parametrów rzeczywistych i na ogół różnią się od nich. Różnice pomiędzy estymatorami i wartościami rzeczywistymi maleją wraz ze wzrostem liczby badanych próbek.

Podczas badań związanych z oceną stanu sanitarnego ścieków miejskich Lublina kierowano się normą [9] oraz normami związanymi z badaniem wody i ścieków [10,11]. Przestrzeżenie zawartych w tych normach zaleceń, ze względu na charakterystykę badanego materiału, wymagałoby pobierania dla potrzeb jednej analizy 218 dm<sup>3</sup> ścieków i dzielenia ich na 8704 próbki [8]. W związku z tym podjęto próbę opracowania metodyki pozwalającej na uzyskanie zadowalających rezultatów (przedział i poziom ufności odpowiednio 0,1 $\bar{x}$  i 0,9) znacznie mniejszym nakładem pracy. Niniejszy artykuł jest prezentacją opracowanej metody.

### Materiał i metodyka

Materiałem użytym w badaniach były:

– ścieki miejskie z sieci kanalizacyjnych Lublina (352 tys. mieszkańców) i Świdnika (23 tys. mieszkańców) dopływające

łącznie w ilości 80÷100 tys.m<sup>3</sup>/d do oczyszczalni „Hajdów” (średni ładunek zawiesin ogólnych 23,1 t/d),

– jaja *Ascaris lumbricoides suis* L.1758 (glista świni) w zawieszynie wodnej, uprzednio utrwalone 3% roztworem formaliny, zabarwione fioletem krystalicznym i policzone w hemocytometrze Fuschy-Rosenthala.

Przy opracowaniu metody posłużono się pomysłem opisanym przez Hellwiga [12] polegającym na tym, że przy liczeniu ryb w jeziorze odławia się jakąś ich liczbę i znakuje zakładając na płetwy znaczniki, po czym z powrotem wpuszcza się je do jeziora. Następnie ponownie przeprowadza się połów i całkowitą liczbę ryb w jeziorze oblicza się z proporcji ryb znakowanych i nie znakowanych w nowym połowie. Pomysł ten zmodyfikowano używając do określenia liczby jaj pasożytów jelitowych w ściekach materiału pochodzącego z zewnątrz badanego obiektu. Wykorzystano tu sposób służący do oceny dokładności metod analitycznych z użyciem tzw. odzysku [5], polegający na oznaczeniu nieznanego stężenia badanej próbki oraz ponownym oznaczeniu tej samej próbki po dodaniu określonej ilości wzorca. Uzyskana różnica pomiędzy stężeniem próbki wzbogaconej i nie wzbogaconej do ilości wzorca jest miarą odzysku. Odzysk wynoszący 100% jest idealną dokładnością metody.

Jako wzorzec posłużyły jaja *A. lumbricoides suis* pozyskiwane z samic glist znajdujących w treści jelitowej świń rzeźnych. Ponieważ *A. lumbricoides hominis* i *A. lumbricoides suis* (glista ludzka i glista świni) w zasadzie nie różnią się od siebie i często traktowane są jako jeden gatunek [13], stąd ich jaja są w zasadzie jednakowe (z uwzględnieniem zróżnicowania wewnątrzgatunkowego i np. tego, że jaja niezaplodnione mają większą gęstość od zapłodnionych).

Z pozyskanych z rzeźni okazów, po ich utrwaleniu w 3% formalinie, wypreparowano macice (długie parzyste nitkowate twory znajdujące się wewnątrz jamy ciała glist – samice są wyraźnie większe od samców) i z nich, korzystając z generatora ultradźwięków, ekstrahowano jaja. Wodną zawiesinę jaj oczyszczono z resztek zdeintegrowanych tkanek poprzez kolejne sedymentacje i dekantacje. Czystość zawiesiny jaj badano mikroskopowo. Po otrzymaniu czystego zagęszczonego materiału barwiono jaja fioletem krystalicznym. Zabarwioną zawiesinę płukano wodą wodociągową, a następnie sedymentowano i dekantowano aż do uzyskania bezbarwnej cieczy nadosadowej. Stężenie zawiesin określono przy pomocy hemocytometru Fuschy-Rosenthala o głębokości komory 0,2 mm i całkowitej powierzchni pomiarowej 34 mm<sup>2</sup>. Z mianowanej zawiesiny macierzystej sporządzono – poprzez rozcieńczenie – zawiesinę jaj o liczebności 100 szt./cm<sup>3</sup> (kontrolowaną tym samym hemocytometrem).

Badania prowadzono wg następującej procedury:

– próbki do badań pobierano, transportowano i przechowywano zgodnie z normami [9–11,14],

– pobrano 5 próbek, każda o objętości 1 dm<sup>3</sup>,

– do każdej z próbek dodano 1 cm<sup>3</sup> zawiesiny zawierającej 100 zabarwionych fioletem jaj glisty,

– próbki sedymentowano, dekantowano i homogenizowano mikserem w celu dokładnego wymieszania wzorca z badanym materiałem, a także dla rozdrobnienia fragmentów zawieszin, mogących maskować (oblepiać) dopływające ze ściekami jaja pasożytów jelitowych,

– ze zdekantowanego i wymieszanego osadu ściekowego (zawierającego dodane zabarwione jaja glisty i ewentualnie jaja znajdujące się w ściekach) sporządzono preparaty mikroskopowe,

– z każdej z 5 próbek sukcesywnie sporządzano po 40 preparatów, przeglądano je w powiększeniu 75-krotnym i liczono znajdujące jaja barwne (dodane) i nie zabarwione (naturalne, nie zabarwione fioletem jaja glist i włosogłówek są brunatne); każdą liczoną sztukę kontrolowano w powiększeniu 150 i 600-krotnym,

– liczbę jaj naturalnych (q) określono z zależności:

$$q = (q_0 \cdot p) / p_0 \quad (1)$$

gdzie:

q – znajdująca się w sposób naturalny w badanej próbce frakcja jaj pasożytów jelitowych,

q<sub>0</sub> – obserwowana w próbce frakcja jaj naturalnych (nie zabarwionych fioletem); jest to suma wszystkich znalezionych jaj naturalnych we wszystkich preparatach z próbki,

p – dodana do próbki frakcja jaj zabarwionych (100 szt.),

p<sub>0</sub> – obserwowana w próbce frakcja jaj zabarwionych.

## Wyniki badań

Uzyskane rezultaty wykazały, że w badanym materiale liczebność jaj pasożytów jelitowych mieściła się w przedziale 3,84+8,51 szt./dm<sup>3</sup> (tab.1).

Tabela 1. Rezultaty badań

Nr próby	p <sub>0</sub>	q <sub>0</sub>	p	q
1	51	3	100	5,88
2	47	4	100	8,51
3	47	3	100	6,38
4	48	2	100	4,16
5	52	2	100	3,84
–	$\bar{x}=49 \pm 2,23$	$\bar{x}=2,8 \pm 0,79$	–	$\bar{x}=5,75 \pm 0,84$

Przy 40 preparatach, sporządzonych z osadu po sedymentacji i dekantacji 1 dm<sup>3</sup> ścieków, dokładność metody mieściła się w granicach 47+52%. Zwiększając liczbę preparatów z próbki można (kosztem czasu użytego na badania) zwiększyć jej dokładność. Jednakże uzyskane wyniki w zasadzie nie zależały od dokładności metody, gdyż w pięciu próbkach, przy źródnicowa-

nej liczebności naturalnych jaj pasożytów, odzysk wzorca był prawie jednakowy. Wyniki stosowanej metody zależały więc od fluktuacji liczebności szukanych elementów w próbkach, przy mniej więcej wyrównanej dokładności pomiaru.

Gdyby uzyskiwane wyniki potraktować rutynowo, wówczas w badanych próbkach liczebność jaj wynosiłaby średnio 2,8 szt./dm<sup>3</sup>, mieszcząc się w przedziale 2+4 szt./dm<sup>3</sup>, a więc znacznie poniżej wyliczonych rezultatów. Można zatem stwierdzić, że zastosowana metoda pozwoliła na skrócenie czasu badań oraz na uzyskanie wiarygodnych wyników.

*Praca została wykonana w ramach tematu nr PZB-31-03/7.*

## LITERATURA

- Zarządzenie Ministra Ochrony Środowiska i Zasobów Naturalnych z dnia 7 lipca 1986 r. w sprawie rolniczego wykorzystania ścieków. MP nr 23, poz. 170.
- WHO: Health guidelines for the use of wastewater in agriculture and aquaculture. Technical Report, No. 778, Genève 1989.
- B. EL HAMOURI et al.: High-rate algal pond performances in fecal coliforms and helminth egg removals. Wat. Res., 1994, Vol. 28, No. 1, pp. 171–174.
- R. M. AYRES et al.: Comparison of techniques, for the enumeration of human parasitic helminth eggs in treated wastewater. Environ. Technol., 1989, 12, pp. 617–623.
- A. ZGIRSKI, R. GONDKO: Obliczenia biochemiczne. PWN, Warszawa 1983.
- P. GASPARD, I. SCHWARTZBROD: Determination of the parasitic contamination of irrigated vegetables. Wat. Sci. Tech., 1993, 27, No. 7–8, pp. 295–302.
- P. GASPARD, I. SCHWARTZBROD: Helminth eggs in wastewater: quantification technique. Wat. Sci. Tech., 1995, 31, No. 5–6, pp. 443–446.
- J. MALICKI, A. MONTUSIEWICZ, K. STELMACH: Liczebność jaj helminatów w ściekach miejskich Lublina. Raport nr 1/w, umowa nr PBZ-31-03/7, Lublin 1995.
- PN-87/C-04632/02. Woda i ścieki. Ogólne zasady pobierania próbek do badań fizycznych, chemicznych i biologicznych. Planowanie i programowanie pobierania próbek.
- PN-87/C-04632/01. Woda i ścieki. Ogólne zasady pobierania próbek do badań fizycznych, chemicznych i biologicznych. Postanowienia ogólne i zakres normy.
- PN-88/C-04632/04. Woda i ścieki. Ogólne zasady pobierania próbek do badań fizycznych, chemicznych i biologicznych. Utrwalanie i przechowywanie próbek.
- Z. HELLWIG: Elementy rachunku prawdopodobieństwa i statystyki matematycznej. PWN, Warszawa 1971.
- R. KADŁUBOWSKI: Zarys parazytologii lekarskiej. PZWL, Warszawa 1983.
- PN-88/C-04632/03. Woda i ścieki. Ogólne zasady pobierania próbek do badań fizycznych, chemicznych i biologicznych. Technika pobierania próbek.

## A Quick Method for the Quantification of Helminth Ova in Wastewater

*The method proposed in this paper applies to the parasitological analysis of sewage which is to be used in agriculture (irrigation of crops). With the methods that are in use now only 30 to 75% of eggs can be determined in the sample. Our investigations have shown that the addition of a certain number of *Ascaris lumbricoides suis* L. 1758 ova (coloured with crystal-*

*line violet) to the investigated sample makes it possible to control the accuracy of the method proposed, as well as to determine the actual number of helminth eggs. The method has two major advantages – it shortens considerably the duration of the analytical procedure and yields reliable results.*