

Renata Matuszewska, Maciej Szczotko, Radosław Giziński, Bożena Krogulska

Ocena skuteczności procesów oczyszczania wód powierzchniowych ujmowanych w województwie podkarpackim na podstawie występowania pierwotniaków z rodzaju *Cryptosporidium* i *Giardia* oraz klostridiów redukujących siarczyny

Pierwotniaki pasożytnicze z rodzaju *Cryptosporidium* i *Giardia* powinny być elementem kontroli jakości wody pochodzącej z ujęć powierzchniowych lub mieszanych, w przypadku gdy w wodzie oczyszczonej zostanie wykryta obecność bakterii z rodzaju *Clostridium*, na co wskazują dyrektywa UE 98/83/EC oraz rozporządzenie Ministra Zdrowia w sprawie jakości wody przeznaczonej do spożycia przez ludzi [1,2]. W dokumentach tych umieszczono również zapis, że woda powinna być wolna od mikroorganizmów chorobotwórczych i od pasożytów w liczbie stanowiącej potencjalne zagrożenie dla zdrowia ludzkiego. Pierwotniaki, podobnie jak niektóre bakterie, mogą długo utrzymywać się w środowisku, gdyż wytwarzają formy przetrwalnikowe odporne na niekorzystne warunki [3–7]. Ma to również istotne znaczenie w przypadku oceny skuteczności zastosowanych metod i procesów oczyszczania wody.

Cel i zakres badań

Celem prowadzonych badań było określenie częstości występowania pierwotniaków pasożytniczych z rodzaju *Cryptosporidium* i *Giardia* w wodzie z ujęć powierzchniowych województwa podkarpackiego oraz ocena skuteczności procesów oczyszczania wody stosowanych przez zakłady wodociągowe. Równoległe przeprowadzono ocenę jakości bakteriologicznej pobranych próbek wody, wykonując badania w kierunku oznaczania liczby bakterii grupy coli, *Escherichia coli*, enterokoków oraz przetrwalników klostridiów redukujących siarczyny.

Materiały i metody

Do badań pobierano próbki wód powierzchniowych, ujmowanych przez zakłady wodociągowe województwa podkarpackiego. Badaniami objęto 6 ujęć – łącznie wykonano analizy 18 próbek wody. W celu sprawdzenia skuteczności działania poszczególnych etapów oczyszczania wody, próbki pobrano na ujęciu (obj. 20÷40 dm³), po

procesach koagulacji i filtracji (obj. 70÷100 dm³) oraz po dezynfekcji końcowej (obj. 200÷300 dm³). Pobrane próbki wody były badane w kierunku wykrywania oocyst i cyst pierwotniaków pasożytniczych z rodzaju *Cryptosporidium* i *Giardia* na podstawie normy ISO 15553:2006, z zastosowaniem automatycznej stacji płuczającej Filta-Max xpress (IDEXX) [8,9]. Wykrywanie pierwotniaków pasożytniczych w próbkach wody przebiegało w następujących etapach: zagęszczenie próbek, separacja immunomagnetyczna (IMS), barwienie preparatów i obserwacje mikroskopowe z wykorzystaniem mikroskopu epifluorescencyjnego. W filtracie zagęszczonej próbki oocysty *Cryptosporidium* sp. i cysty *Giardia* sp. wyodrębniano metodą separacji immunomagnetycznej przy użyciu testu GC-Combo (Invitrogen). Potwierdzenie obecności i określenie liczby pierwotniaków dokonano na podstawie obserwacji mikroskopowych preparatów barwionych: FITC – znakowanie struktur zewnętrznych oocyst/cyst, obserwacja przy długości fali 480 nm; DAPI – znakowanie materiału jądrowego, obserwacja przy długości fali 350 nm (UV).

W próbkach wody pobranych do badań w kierunku wykrywania obecności pierwotniaków pasożytniczych równoległe oznaczano metodą filtracji membranowej: liczbę bakterii grupy coli, *E. coli* na podłożu Endo Les (PN ISO 9308-1:1999) według procedury własnej, liczbę enterokoków według PN-EN ISO 7899-2:2004 oraz liczbę przetrwalników klostridiów redukujących siarczyny według PN-EN 2646-2:2001, przy czym próbki do oznaczania przetrwalników klostridiów podgrzewano w temperaturze 75°C przez 15 min.

Wyniki badań

Wyniki przeprowadzonych badań (tab. 1) wykazały obecność pierwotniaków pasożytniczych z rodzaju *Giardia* i *Cryptosporidium* w większości próbek wody pobranych bezpośrednio na ujęciach. Obecność oocyst *Cryptosporidium* sp. wykryto w 5/6 pobranych próbek z ujęć, przy czym zanieczyszczenie wody było stosunkowo nieduże. Oznaczona liczba oocyst tych pierwotniaków wynosiła od 0,025 do 0,1 oocyst w 1 dm³ wody (śr. 0,06 oocyst w 1 dm³). Oznaczona liczba cyst *Giardia* sp. była większa i wynosiła od 0,025 do 0,4 cyst w 1 dm³ wody (śr. 0,18 cyst w 1 dm³). Cysty pierwotniaków z rodzaju

Giardia zostały wykryte we wszystkich próbkach (6/6) pobranych na ujęciach wody. Jednocześnie we wszystkich próbkach wykryto obecność przetrwalników klostridiów redukujących siarczyny w liczbie od $1,6 \cdot 10^2$ jtk/100 cm³ do $1,7 \cdot 10^3$ jtk/100 cm³. W 5 na 6 próbek wody pobranych z ujęć stwierdzono obecność bakterii grupy coli w liczbie od $3,4 \cdot 10^2$ jtk/100 cm³ do $2,1 \cdot 10^3$ jtk/100 cm³. Wyniki badań potwierdzających w kierunku bakterii *E. coli* wykazały obecność tych bakterii w 3 z 6 badanych próbek pobranych z ujęcia wody w zakresie od $2,5 \cdot 10^2$ jtk/100 cm³ do $1,1 \cdot 10^3$ jtk/100 cm³. We wszystkich próbkach pochodzących z ujęć wody stwierdzono obecność enterokoków w zakresie od 24 jtk/100 cm³ do $1,1 \cdot 10^3$ jtk/100 cm³. Największy stopień zanieczyszczenia mikrobiologicznego bakteriami grupy coli, *E. coli* i enterokokami stwierdzono na ujęciu wody w Brzozowie, natomiast najmniejszy na ujęciu w Rzeszowie. Jednocześnie ujęcie w Rzeszowie cechowało się największą liczbą spor klostridiów redukujących siarczyny ($1,7 \cdot 10^3$ jtk/100 cm³), w porównaniu z liczbą przetrwalników oznaczonych w próbkach pochodzących z pozostałych badanych ujęć wody, która wynosiła od $1,6 \cdot 10^2$ jtk/100 cm³ do $3,4 \cdot 10^2$ jtk/100 cm³.

Na żadnym z wodociągów w próbkach po koagulacji lub po filtracji nie wykryto obecności pierwotniaków. W przypadku dwóch wodociągów (na 4 badane), ujmujących wodę z Wisłoka, stwierdzono obecność klostridiów redukujących siarczyny w próbkach po procesie filtracji w liczbie 17 jtk/100 cm³ i $1,0 \cdot 10^3$ jtk/100 cm³, jednak nie stwierdzono ich obecności po dezynfekcji. Tylko w przypadku jednego wodociągu spory klostridiów redukujących siarczyny wykryto zarówno po filtracji (23 jtk/100 cm³), jak i po dezynfekcji (46 jtk/100 cm³). W przypadku dwóch wodociągów woda po filtracji była wolna od bakterii grupy coli.

W pozostałych próbkach liczba tych bakterii wynosiła od 20 jtk/100 cm³ do $1,4 \cdot 10^3$ jtk/100 cm³. Z kolei bakterie *E. coli* wykryto w jednej próbce po koagulacji (42 jtk/100 cm³) oraz w dwóch próbkach po filtracji ($3,8 \cdot 10^2$ jtk/100 cm³ i $7,0 \cdot 10^2$ jtk/100 cm³). W żadnej próbce wody pobranej po dezynfekcji końcowej nie wykryto obecności bakterii grupy coli, *E. coli* i enterokoków, jak również pierwotniaków pasożytniczych z rodzaju *Cryptosporidium* i *Giardia*.

Dyskusja wyników

Przeprowadzone badania wykazały obecność pierwotniaków pasożytniczych w wodzie powierzchniowej ujmowanej przez przedsiębiorstwa wodociągowe województwa podkarpackiego. Również wcześniejsze badania wody pobranej z ujęć na Wiśle (Płock, Warszawa – Wodociąg Centralny i Wodociąg Praski) i Zalewie Zegrzyńskim (Warszawa – Wodociąg Północny) wykazały obecność oocyst *Cryptosporidium* sp. i cyst *Giardia* sp [10]. Liczba wykrytych oocyst *Cryptosporidium* sp. na ujęciach wody w województwie mazowieckim była tylko nieznacznie większa od liczby oocyst na ujęciach w województwie podkarpackim i wynosiła od 0,05 do 0,3 oocyst w 1 dm³ wody (śr. 0,23 oocyst w 1 dm³). Liczba cyst *Giardia* sp. na ujęciach województwa mazowieckiego była natomiast zdecydowanie większa i wynosiła od 0,3 do 3,55 cyst w 1 dm³ wody (śr. 1,1 cyst w 1 dm³). Należy też zauważyć, że największą liczbę oocyst (0,3) i cyst (3,55) pierwotniaków pasożytniczych w 1 dm³ wody odnotowano w próbkach pobranych podczas stanu powodziowego na Wiśle.

Z danych literaturowych wynika, że w wodach powierzchniowych, poza ośrodkami miejskimi i terenami rolniczymi, liczba *Cryptosporidium* sp. zazwyczaj wynosi

Tabela 1. Charakterystyka mikrobiologiczna badanych próbek wody
Table 1. Microbiological characteristics of tested water samples

Wodociąg	Punkt poboru próbki wody	Liczba oocyst/cyst w 1 dm ³		Liczba mikroorganizmów, jtk/100 cm ³			
		<i>Cryptosporidium</i> sp.	<i>Giardia</i> sp.	klostridia*	bakterie grupy coli	<i>E. coli</i>	enterokoki
Brzozów	ujęcie (potok Jakła Wielka)	0,025	0,025	$2,3 \cdot 10^2$	$2,1 \cdot 10^3$	$1,0 \cdot 10^3$	$1,1 \cdot 10^3$
	po filtracji (+woda podz.)	0	0	23	$1,4 \cdot 10^3$	$7,0 \cdot 10^2$	$1,1 \cdot 10^2$
	po dezynfekcji	0	0	46	0	0	0
Dębica	ujęcie (Wisłok)	0,075	0,25	$3,1 \cdot 10^2$	$3,4 \cdot 10^2$	$2,5 \cdot 10^2$	24
	po filtracji	0	0	0	0	0	0
	po dezynfekcji	0	0	0	0	0	0
Jasło	ujęcie (Wisłok)	0,075	0,15	$1,7 \cdot 10^2$	$3,6 \cdot 10^2$	0	$1,0 \cdot 10^2$
	po filtracji	0	0	0	20	0	0
	po dezynfekcji	0	0	0	0	0	0
Mielec	ujęcie (Wisłok)	0	0,1	$3,4 \cdot 10^2$	$1,1 \cdot 10^3$	$1,1 \cdot 10^3$	$3,4 \cdot 10^2$
	po filtracji	0	0	17	$3,8 \cdot 10^2$	$3,8 \cdot 10^2$	0
	po dezynfekcji	0	0	0	0	0	0
Przemyśl	ujęcie (San)	0,05	0,175	$1,6 \cdot 10^2$	$9,2 \cdot 10^2$	0	68
	po koagulacji	0	0	22	42	42	5
	po dezynfekcji	0	0	0	0	0	0
Rzeszów	ujęcie (Wisłok)	0,1	0,4	$1,7 \cdot 10^3$	0	0	35
	po filtracji	0	0	$1,0 \cdot 10^3$	0	0	0
	po dezynfekcji	0	0	0	0	0	0

*spory klostridiów redukujących siarczyny

średnio 0,001 oocyst w 1 dm³ wody. Na obszarach, gdzie znajdują się ośrodki miejskie lub prowadzona jest intensywna działalność rolnicza, szacunkowa liczba wykrywanych oocyst tych pierwotniaków może wahać się od 0,1 do 10 w 1 dm³ wody, przy jednocześnie znacznej liczbie bakterii kałowych (*E. coli* 10²–10³ jtk/100 cm³) [6, 7]. W badaniach przeprowadzonych w Holandii odnotowano zanieczyszczenie wód powierzchniowych pierwotniakami *Cryptosporidium* sp. w liczbie 0,04–7,3 i 0,6–13 oocyst w 1 dm³ wody [11].

W próbkach wody pobranych w zakładach wodociągowych województwa podkarpackiego po procesie koagulacji oraz filtracji pospiesznej nie wykryto obecności pierwotniaków z rodzaju *Cryptosporidium* i *Giardia*, co może świadczyć o skuteczności tych procesów technologicznych. Również w przypadku próbek wody po koagulacji i sedymentacji (przed filtracją pospieszną) w żadnym z zakładów wodociągowych Warszawy i Płocka nie stwierdzono obecności oocyst *Cryptosporidium* sp. i cyst *Giardia* sp., wykrywano natomiast niewielką liczbę (1–4 jtk/100 cm³) przetrwalników klostridiów redukujących siarczynę. Po filtracji pospiesznej klostridia zostały wykryte tylko w jednym przypadku (Wodociąg Północny).

Dane literaturowe potwierdzają także obecność pierwotniaków pasożytniczych w próbkach wody oczyszczonej, np. obecność *Cryptosporidium* sp. wykryto w wodzie po pełnym procesie oczyszczania między innymi w Niemczech (0,0013–0,21 oocyst w 1 dm³), Wielkiej Brytanii (0,007–1,36 oocyst w 1 dm³), Szkocji (0,007–0,7 oocyst w 1 dm³) i Hiszpanii (0–0,02 oocyst w 1 dm³) [5, 6, 12]. Istotny jest zawsze stan zanieczyszczenia ujmowanej wody, który w przypadku ujęć analizowanych w niniejszej pracy był niski.

Należy podkreślić, że w wielu krajach, w tym i w Polsce, nie prowadzi się rutynowo tego typu oznaczeń, przez co określenie rzeczywistego zagrożenia zdrowotnego wynikającego z obecności tych patogenów w wodzie przeznaczonej do spożycia jest bardzo trudne. Wyniki badań wskazują na istotne znaczenie pierwotniaków pasożytniczych, szczególnie z rodzaju *Cryptosporidium*, jako organizmów, które mogą mieć zastosowanie do oceny jakości wody przeznaczonej do spożycia przez ludzi, podobnie jak bakterie wskaźnikowe [3, 5, 13, 14]. Niektóre prace sugerują również, że istnieje korelacja między występowaniem bakterii wskaźnikowych a obecnością tych pierwotniaków w wodzie [3, 15, 16].

Podsumowanie

Przeprowadzone badania mikrobiologiczne wód powierzchniowych ujmowanych i oczyszczanych w zakładach wodociągowych województwa podkarpackiego wykazały, że zastosowane w nich procesy technologiczne (m.in. koagulacja i filtracja pospieszna oraz dezynfekcja) stanowiły skuteczną barierę zabezpieczającą wodę przed pierwotniakami pasożytniczymi, ale nie zawsze wystarczającą wobec obecnych w wodzie przetrwalników beztlenowców z rodzaju *Clostridium*. W celu zwiększenia bezpieczeństwa zdrowotnego, wykrywanie obecności pierwotniaków pasożytniczych w wodzie przeznaczonej do spożycia przez ludzi, pochodzącej z ujęć powierzchniowych lub mieszanych, szczególnie w przypadku wykrycia przetrwalników klostridiów redukujących siarczynę, w tym *Clostridium perfringens*, powinno być rutynowo wykonywane zgodnie z obowiązującymi przepisami.

LITERATURA

1. Dyrektywa Rady UE 98/83/WE z 3 listopada 1998 r. w sprawie jakości wody przeznaczonej do spożycia przez ludzi. Dz. U. UE 15, 4, ss. 90–112.
2. Rozporządzenie Ministra Zdrowia z 29 marca 2007 r. w sprawie jakości wody przeznaczonej do spożycia przez ludzi. Dz. U. nr 61, poz. 417; rozporządzenie Ministra Zdrowia z 20 kwietnia 2010 r. zmieniające rozporządzenie w sprawie jakości wody przeznaczonej do spożycia przez ludzi. Dz. U. nr 72, poz. 466.
3. Risk Assessment of *Cryptosporidium* in Drinking Water. Public Health and Environment. Water, Sanitation, Hygiene & Health, WHO 2009.
4. P.R. HUNTER: Waterborne Disease. Epidemiology and Ecology. John Wiley & Sons, Chichester 1997.
5. Guidelines for Drinking-water Quality. First addendum to third edition, Vol. 1, WHO, 2006.
6. H.C. SMITH, A.M. GRIMASON: *Giardia* and *Cryptosporidium* in water and wastewater. In: D. MARA, N. HORAN [Eds.]: The Handbook of Water and Wastewater Microbiology, Elsevier Science Ltd., Oxford 2003.
7. R. MATUSZEWSKA: Pierwotniaki pasożytnicze z rodzaju *Cryptosporidium* i *Giardia*. Część I. Występowanie w środowisku wodnym i zagrożenia zdrowotne. *Roczniki Państwowego Zakładu Higieny* 2007, vol. 58, nr 3, ss. 569–577.
8. R. MATUSZEWSKA, M. SZCZOTKO, B. KROGULSKA: Optymalizacja metody wykrywania i izolacji pierwotniaków pasożytniczych. *Roczniki Państwowego Zakładu Higieny* 2012, vol. 63, nr 4, ss. 499–506.
9. The Microbiology of Drinking Water. Part 14 – Methods for the isolation, identification and enumeration of *Cryptosporidium* oocysts and *Giardia* cysts. Environment Agency, Leicester (UK) 2010.
10. R. MATUSZEWSKA, M. SZCZOTKO, M. BARTOSIK, B. KROGULSKA: Występowanie pierwotniaków z rodzaju *Cryptosporidium* i *Giardia* w wodzie powierzchniowej ujmowanej przez wybrane zakłady wodociągowe (Occurrence of *Cryptosporidium* and *Giardia* in the surface water intakes of selected waterworks). *Ochrona Środowiska* 2011, vol. 33, nr 3, ss. 67–69.
11. F.M. SCHETS, J.H. van WIJNEN, J.F. SCHIJVEN, H. SCHOON, A.M. de RODA HUSMAN: Monitoring of waterborne pathogens in surface waters in Amsterdam, the Netherlands, and the potential health risk associated with exposure to *Cryptosporidium* and *Giardia* in these waters. *Applied and Environmental Microbiology* 2008, Vol. 74, No. 7, pp. 2069–2078.
12. D. DRURY: Data analysis UK CryptoReg data. Proc. International *Cryptosporidium* and *Giardia* Conference. Amsterdam 2004.
13. A.HORMAN, R. RIMHANEN-FINNE, L. MAUNULA, C.H. von BONSDORFF, N. TORVELA, A. HEIKINHEIMO, M.L. HANNINEN: *Campylobacter* spp., *Giardia* spp., *Cryptosporidium* spp., noroviruses and indicator organisms in surface water in Southwestern Finland 2000–2001. *Applied and Environmental Microbiology* 2004, Vol. 70, No. 1, pp. 87–95.
14. R.S. BARWICK, D.A. LEVY, G.F. CRAUN, M.J. BEACH, R.L. CALDERON: Surveillance of waterborne disease outbreaks – United States, 1997–1998. *MMWR CDC Surveillance Summaries* 2000, Vol. 49, pp. 1–35.
15. P. PAYMENT, E. FRANCO: *Clostridium perfringens* and somatic coliphages as indicators of the efficiency of drinking water treatment for viruses and protozoan cysts. *Applied and Environmental Microbiology* 1993, Vol. 59, No. 8, pp. 2418–2424.
16. V.J. HARWOOD, A.D. LEVINE, T.M. SCOTT, V. CHIVUKULA, J. LUKASIK, S.R. FARRAH, J.B. ROSE: Validity of the indicator organism paradigm for pathogen reduction in reclaimed water and public health protection. *Applied and Environmental Microbiology* 2005, Vol. 71, No. 6, pp. 3163–3170.

Matuszewska, R., Szczotko, M., Gizinski, R., Krogulska, B. Assessment of Effectiveness of Surface Water Treatment Processes in Podkarpackie Region Based on Protozoa, *Cryptosporidium* and *Giardia* sp., and Sulfite-reducing Clostridia Occurrence. *Ochrona Srodowiska* 2013, Vol. 35, No. 3, pp. 49–52.

Abstract: According to Polish Ministry of Health regulations, in case *Clostridium perfringens* spores are identified in treated water samples, *Cryptosporidium* and *Giardia* protozoan parasites detection should be part of drinking water quality supervision procedure, both for surface and mixed water intake sites. The study assessed effectiveness in removing of protozoan parasite cysts and oocysts as well as sulfite-reducing clostridia in surface water treatment processes in Podkarpackie region waterworks. Presence of

Cryptosporidium sp. oocysts was detected in 83% of surface intake water samples but the contamination was low. The number of protozoa was a mean of 0.06 oocysts in 1 dm³. *Giardia* sp. cysts were detected in all raw water samples and their number was a mean of 0.18 cysts in 1 dm³. Spores of sulfite-reducing clostridia were also detected in all water samples (>10² cfu/100 cm³). Parasitic protozoa were not present in samples of treated (coagulation/filtration) and disinfected water. This study demonstrated that the water treatment technologies applied in Podkarpackie region waterworks constitute an effective barrier against protozoan parasites, but are not always sufficient against spores of anaerobic *Clostridium* sp. present in the raw water.

Keywords: Parasites, *Cryptosporidium* oocysts, *Giardia* cysts, surface intake, drinking water, water treatment.