

RĪGAS TEHNISKĀ UNIVERSITĀTE
Būvniecības fakultāte
Siltuma, gāzes un ūdens tehnoloģiju institūts

Jānis RUBULIS

Siltuma, gāzes un ūdens tehnoloģijas doktora programmas doktorants

**FOSFORA IETEKME UZ BIOPLĒVES VEIDOŠANOS DZERAMĀ
ŪDENĪ**

**THE INFLUENCE OF PHOSPHORUS ON THE FORMATION OF
BIOFILM IN DRINKING WATER**

Būvniecības nozarē,
Siltuma, gāzes un ūdens inženiersistēmu apakšnozarē "RTU P-12"

**Promocijas darba kopsavilkums
Summary of Ph.D. thesis**

Zinātniskie vadītāji/ Supervisor
Dr. sc. ing., asoc. profesors
T.JUHNA,
Dr. sc. ing., docents
J.SPROĢIS

Rīga 2006

UDK 338.24 (075.8)
E1 710

Rubulis J. Fosfora ietekme uz
bioplēves veidošanos dzeramā
ūdenī/ The influence of
phosphorus on the formation of
biofilm in drinking water
Promocijas darba
kopsavilkums.-R.:RTU, 2006.-
41 lpp.

Iespiests saskaņā ar SGŪT
institūta 2006.gada 7.novembra
lēmumu, protokols Nr. 3.

ISBN

**PROMOCIJAS DARBS
IZVIRZĪTS RĪGAS TEHNISKĀS UNIVERSITĀTĒ
INŽENIERZINĀTŅU DOKTORA GRĀDA IEGŪŠANAI**

Promocijas darbs inženierzinātņu doktora grāda iegūšanai tiek publiski aizstāvēts 2006.g. 21.decembrī, plkst. 16.00 Rīgas Tehniskās universitātes Būvniecības fakultātes Sēžu zālē, Āzenes ielā 16.

Adrese: Āzenes iela 16, LV-1048, Rīga, Latvija
Tālr./Fakss: +371 7089084, e-pasta adrese: janisrubulis@gmail.com

OFICIĀLIE OPONENTI

Profesors, Dr.habil.sc.ing. Ivars Veinbergs
Rīgas Tehniskā universitāte

Profesors, Dr.sc.ing. Ēriks Tilgalis
Latvijas Lauksaimniecības universitāte

Asoc.profesors, Dr.sc.ing. Vladimirs Jemeljānovs
Rīgas Tehniskā universitāte

Asoc.profesore, Dr.sc.ing. Vizma Nikolajeva
Latvijas Universitāte

APSTIPRINĀJUMS

Es apstiprinu, ka esmu izstrādājis doto promocijas darbu, kas iesniegts izskatīšanai Rīgas Tehniskā universitātē inženierzinātņu (vai cita) doktora grāda iegūšanai. Promocijas darbs nav iesniegts nevienā citā universitātē zinātniskā grāda iegūšanai.

Jānis Rubulis(Paraksts)

Datums:

Promocijas darbs ir uzrakstīts angļu valodā, satur ievadu, 4.nodaļas, secinājumus, literatūras sarakstu, 19 zīmējumus un ilustrācijas, 7 tabulas, kopā 73 lappuses. Literatūras sarakstā ir 105 nosaukumi.

„Šis darbs izstrādāts ar Eiropas Sociālā fonda atbalstu Nacionālās programmas „Atbalsts doktorantūras programmu īstenošanai un pēcdoktorantūras pētījumiem” projekta „Atbalsts RTU doktorantūras attīstībai” ietvaros”.

„Šis darbs izstrādāts kā daļā no Eiropas Savienības pētniecības un tehnoloģiju attīstības 5. programmas projekta "Mikrobioloģiskās stabilitātes nodrošināšana un kontrolē dzeramā ūdens sadales sistēmās (SAFER)" (grants EVK1-2001-00185). Ar šo atsauci informēju, ka vienīgi autors ir atbildīgs par darba rezultātiem un tie neatspoguļo Eiropas Komisijas viedokli un Komisija nav atbildīga par darbā iegūto rezultātu izmantošanu”

This work has been partly supported by the European Social Fund within the National Programme “Support for the carrying out doctoral study programm’s and post-doctoral researches” project “Support for the development of doctoral studies at Riga Technical University.”

This work was undertaken as part of the research project supported by the European Union within the Fifth Framework Programme, "Energy, environment and sustainable development programme", n° EVK1-2002-00108. There hereby follows a disclaimer stating that the authors are solely responsible for the work. It does not represent the opinion of the Community and the Community is not responsible for any use that might be made of data appearing herein.

Satura rādītājs/ Table of content

Darba vispārējs raksturojums	6
Tēmas aktualitāte	6
Darba mērķis un uzdevumi	6
Darba zinātniskā novitāte un praktiskais pielietojums	7
Darba saturs	8
Literatūras apskats	8
Darbā izmantotās pētījumu metodes	10
Fosfora izdalīšanas efektivitāte virszemes ūdens attīrīšanas stacijā	14
Oglekļa izdalīšanas efektivitāte virszemes ūdens attīrīšanas stacijā	15
Mikrobioloģiski izmantojamā fosfora koncentrācijas ietekme uz bioplēves baktēriju daudzumu sadales tīklā	17
Fosfora recirkulācija	19
Secinājumi	21
Outline	24
Background	24
Scope and goals	24
Scientific novelty and application	25
Summary of the thesis	26
Overview on earlier studies	26
Materials and methods	27
Removal efficiency of phosphorus at surface water treatment plant	31
Removal efficiency of carbon at surface water treatment plant	33
Effect of microbiologically available phosphorus concentration on biofilm quantities in drinking water distribution network	35
Phosphorus recycling	37
Conclusions	39
List of Publications (Publikāciju saraksts)	41

Darba vispārējs raksturojums

Tēmas aktualitāte

Pasaules Veselības Aģentūra ik gadu reģistrē 250 miljonus saslimšanas gadījumus, kurus izraisījis nekvalitatīvs dzeramais ūdens, no tiem 10 miljonus ar letālām sekām. Eiropā reģistrēti ap 6 tūkstoši šādi saslimšanas gadījumi ik gadu, tādejādi tiek zaudētas 500 000 līdz 3 000 000 cilvēku darba dienas. Latvijā šādas uzskaites trūkst, tomēr izmantojot Eiropas pieredzi, lietderīgi iespējamo saslimstības risku samazināt. Transportējot dzeramo ūdeni cauruļvados novērojama tendence ūdens kvalitātei pasliktināties. Pasliktinās ūdens organoleptiskās īpašības. Atsākas mikroorganismu attīstība. Dzeramais ūdens, kurā nenotiek mikroorganismu attīstība tiek saukts par mikrobioloģiski stabilu ūdeni. Tāpēc būtu jāsamazina iespēja, ka dzeramajā ūdenī vairojas mikroorganismi ūdenim atrodoties ūdensvada caurulēs.

Mikroorganismu attīstība jau pēc dzeramā ūdens sagatavošanas galvenokārt notiek uz cauruļu iekšējās virsmas veidojot bioloģisku apaugumu – bioplēvi, ja ūdenī ir mikroorganismiem nepieciešamās barības vielas. Viena no galvenajām mikroorganismu barības vielām ir fosfora savienojumi. Fosfora trūkums apstādāmajā un transportējamajā ūdenī var kavēt mikroorganismu augšanu un attiecīgi arī bioplēves veidošanos. Iepriekšējie pētījumi laboratorijas apstākļos parāda, ka samazinot fosfora koncentrāciju ūdens var kļūt mikrobioloģiski stabilāks, ūdens var kļūt drošāks lietošanai cilvēku uzturā. Literatūras pētījumi norādīja uz to, ka fosfora ietekme uz bioplēves veidošanos ir nepietiekami izpētīta.

Darba mērķis un uzdevumi

Šī promocijas darba mērķis bija izpētīt fosfora ietekme uz bioplēves veidošanos ūdensvada caurulēs, ja dzeramais ūdens iegūts ar humīnvielām bagātās ūdensgūtvēs. Lai mērķi sasniegtu bija jāveic sekojoši galvenie uzdevumi:

- jānovērtē mikrobioloģiski izmantojamā fosfora izdalīšanas efektivitāte ķīmiskās koagulācijas-nostādināšanas procesā dzeramā ūdens attīrīšanas stacijā;
- jānosaka organisko vielu izdalīšanas efektivitāte biofiltrās, kur baktēriju augšanu limitē fosfors;

- lauku eksperimentā uz speciālas iekārtas jāpārbauda baktēriju skaits bioplēvē dzeramā ūdens sadales sistēmā, kad augšanu limitē fosfors un ogleklis;
- jānosaka vai iespējama fosfora uzkrāšanās dzeramā ūdens sadales tīklā un vai varētu būt iespējama tā atkārtota izmantošana baktēriju augšanai (recirkulācija).

Darba zinātniskā novitāte un praktiskais pielietojums

Pirmie atklājumi, ka ar humīnvielām bagātos ūdeņos fosfors ir limitējošais baktēriju attīstības faktors parādījās jau vairāk nekā pirms 10 gadiem. Tomēr šo desmit gadu laikā nav dota atbilde vai samazinot mikrobioloģiski izmantojamā fosfora koncentrāciju ūdenī iespējams kontrolēt baktēriju attīstību sadales tīklā. Šis darbs pirmo reizi parāda, ka ar tradicionālajām tehnoloģijām efektīvi izdalot mikrobioloģiski izmantojamo fosforu (microbially available phosphorus, MAP) var tikai samazināt baktēriju attīstību un bioplēves veidošanos, bet nevar panākt mikrobioloģiski stabili ūdeni, tādu, kurā baktērijas neattīstās. Iemesls tam ir darbā konstatētā fosfora recirkulācija dzeramā ūdens sadales sistēmā.

Reģionos ar humīnvielām bagātos ūdeņos nepieciešamas lētas tehnoloģijas efektīvai bioloģiski degradējamo organisko vielu izdalīšanai. Šajā darbā konstatēts, ka bioloģiskā filtrācija aktīvās ogles filtros nav efektīva metode padziļinātai oglekļa izdalīšanai.

Novērtējot fosfora lomu baktēriju attīstībai, varētu veikt korekcijas dzeramā ūdens attīrīšanas tehnoloģijā, tādejādi novēršot ūdens kvalitātes pasliktināšanos sadales tīklā. Pētījuma rezultāti var tikt praktiski pielietoti Rīgas ūdens apgādes sistēmā un citos reģionos, kur ūdensgūtvēs bagātas ar humīnvielām. Rezultātu ieviešana uzlabos sabiedrības veselību.

Promocijas darba rezultāti ziņoti un apspriesti 6 starptautiskās konferencēs:

- Amsterdamā, Nīderlandē, 2006.g. 24.-27.septembrī, “Biofilm Systems VI”;
- Leipzīgā, Vācijā, 2006.g. 23.-24.martā, “Biofilms II, Attachment and Detachment in Pure and Mixed Cultures”;
- Rīgā, 2005.g. 12.-13.oktobrī RTU 46.starptautiskajā zinātniskajā konferencē;
- Rīgā, 2004.g. 14.-15.oktobrī RTU 45.starptautiskajā zinātniskajā konferencē;

- Adelaidā, Austrālijā, 2004.g. 2.-5.martā, „Natural Organic Material Research: Innovation and Applications for Drinking Water”;
- Jelgavā, 2003.g. 21.-24.maijā, starptautiskajā zinātniskajā konferencē “Pētniecība lauku attīstībai 2003”.

Galvenie rezultāti publicēti 6 publikācijās.

Darba saturs

Literatūras apskats

Ziemeļu reģionos, tādos, kā Baltijas valstis, Ziemeļvalstis un Ziemeļamerikā dzeramā ūdens ieguves avoti ir bagāti ar humīnvielām (humic substances, HS) koncentrāciju. To savos darbos ir atzīmējuši Miettinen (1997), Juhna (2000). Dzeramā ūdens sagatavošana šādos reģionos ir īsts izaicinājums ūdens piegādātājam, jo HS izraisa estētiskas un higiēniskas problēmas. Kā atzīmēts Letterman (1999) rediģētajā grāmatā ūdenī esošās dabiskās organiskās vielas (natural organic matters, NOM) reaģējot ar dezinficējošo līdzekli rada kancerogēnus savienojumus. No ūdens neizdalītās bioloģiski degradējamās organiskās vielas (biodegradable organic matter, BOM) kalpo kā barības vielas mikroorganismiem dzeramā ūdens sadales tīklā. Baktērijām attīstoties uz cauruļu virsmas veidojot bioplēvi un ūdens tilpumā pasliktinās ūdens kvalitāte, kā atzīmē Astier (1995) ūdenī veidojas smakas un piegaršas, Armon (1997) savos pētījumos konstatē, ka palielinās varbūtība oportunistu un patogēnu izdzīvošanai, LeChevallier (1988, 1993) konstatējis, ka samazinās paliekošā hlora koncentrācija, kā arī palielinās cauruļu korozivitāte. Kā atzīmēja Chandy un Angles (2001), heterotrofajām baktērijām attīstībai nepieciešamā oglekļa, slāpekļa un fosfora koncentrāciju attiecība ir 100C:10N:1P. Tradicionāli, kā to aprakstījis van der Kooij (1982) par baktēriju limitējošo barības vielu dzeramā ūdens sistēmās uzskata oglekli, ko mēra kā asimilējamo organisko oglekli (assimilable organic carbon, AOC) vai bioloģiski degradējamo izšķīdušo organisko oglekli (biodegradable organic carbon, BDOC). van der Kooij (1992) savā darbā atzīmē, ka dzeramajā ūdenī nenotiks baktēriju attīstība, ja AOC koncentrācija būs mazāka par 10 $\mu\text{g L}^{-1}$. Savukārt Laurent (1997) un Piriou (1998) ar pētījumiem parāda, ka BDOC koncentrācijai jābūt zem 150-200 $\mu\text{g L}^{-1}$. Tradicionāli oglekļa izdalīšanai dzeramā ūdens attīrīšanas procesā izmanto ķīmisko koagulēšanu-nostādināšanu un smilšu ātrfiltrus. Daudzviet pasaulē papildus padziļinātai oglekļa izdalīšanai

izmanto bioloģiski aktīvos ogles filtrus, padarot dzeramo ūdeni mikrobioloģiski stabilu (Letterman, 1999). Ūdeņos ar augstu organisko vielu koncentrāciju šāda padziļināta attīrīšana ir dārga un rodas grūtības sagatavot mikrobioloģiski stabilu ūdeni, tāpēc kā alternatīvu risinājumu var piedāvāt cita mikroorganismu augšanai nepieciešama elementa – fosfora izdalīšanu līdz tādai koncentrācijai, lai varētu kontrolēt mikroorganismu attīstību. Uz to norāda tādu autoru, kā Herson (1984), Haas (1988), Miettinen (1997), Sathasiavan (1999), Juhna (2000), Lehtola (2002) pētījumi pēdējā desmitgadē, ka reģionos ar augstu AOC koncentrāciju ūdenī, baktēriju augšanu limitē fosfors. Lehtola (2002) laboratorijas apstākļos konstatējis, ka mikroorganismu augšana ūdenī un bioplēvē var palielināties, ja fosfora koncentrācija pieaug par 1-5 $\mu\text{g L}^{-1}$. Citi Lehtolas (2002) un arī Yu (2003) pētījumi parāda, ka fosforu var efektīvi izdalīta ar ķīmisko koagulāciju. Tehnoloģijas pamatā ir koagulanta (piem. alumīnija sulfāta) izmantošana, lai destabilizētu ūdenī esošās suspendētās daļiņas, tādējādi liekot tām apvienoties lielākos agregātos (pārslās), kuras pēc tam ir vieglāk izdalīt no ūdens nostādinot un filtrējot. Šīs pārsļas absorbē ūdenī esošo izšķīdušo un suspendēto fosforu. Jāatzīmē, ka fosfora efektīva izdalīšana ar tradicionālo ķīmiskās apstrādes metodi noved pie biofiltru neefektīvas darbības un ūdenī esošo bioloģiski degradējamo organisko vielu neizdalīšanas (Juhna, 2004), kas kā jau atzīmēts reakcijā ar hloru veido kancerogēnus savienojumus.

Lai varētu ieviest dzeramā ūdens attīrīšanas tehnoloģijas, ar kurām varētu kontrolēt bioplēves veidošanos sadales sistēmās reģionos, kur ūdeni iegūst no gūtvēm, kas bagātas ar humīnvielām, būtu jāveic eksperimenti, lai noskaidrotu, vai dzeramā ūdens apgādes sistēmā ir iespējama fosfora atkārtota izmantošana (recirkulācija). Jo kā savos darbos atzīmē Wanner (1990), Egli (1995) un Vadstein (2000), tad oglekļa limitējošos ūdeņos baktēriju attīstība izbeidzas uzreiz pēc oglekļa iztērēšanas no ūdens tilpuma, savukārt fosforu limitējošos ūdeņos – baktēriju attīstība turpinās vēl ilgi pēc fosfora satura iztērēšanas ūdenī, kas norāda uz fosfora atkārtotu izmantošanu. Tas aprūtinātu dzeramā ūdens piegādātājus kontrolēt ūdens mikrobioloģisko stabilitāti izdalot fosforu.

Citi galvenie pētījuma virzieni, kurus jāva definēt literatūras apskats ir šādi: jānovērtē MAP ietekme uz mikroorganismu attīstību dzeramā ūdens sadales sistēmā (ūdens mikrobioloģisko stabilitāti) un MAP izdalīšanas ietekme uz bioloģiskās ogles filtru darbību dzeramā ūdens attīrīšanas

procesā ar ķīmiskās koagulācijas tehnoloģiju ar humīnvielām bagātās ūdensgūtvēs.

Darbā izmantotās pētījumu metodes

Tā kā liela daļa no zinātniskā darba apjoma veikta eksperimentāli, tad šajā nodaļā aprakstītas galvenās pētījumu metodes.

Lauku eksperimenti veikti Rīgas dzeramā ūdens sagatavošanas stacijās, kuru kopējā ražība ir $100\,000\text{ m}^3\text{ d}^{-1}$, kā arī pilsētas ūdens apgādes sadales tīklā. Rīgā dzeramo ūdeni iegūst no virszemes ūdens avota – Daugavas upes, kā arī no gruntsūdeņiem netālu no Mazā Baltezera, kur izmanto dabiskās un intensīvi papildinātās akas. Virszemes ūdens apstrādāšanai izmanto tradicionālo ķīmiskās koagulācijas – nostādināšanas metodi un filtrēšanu smilšu ātrfiltrros, kā arī ozonēšanu kopā ar bioloģiski aktīvajiem filtriem. Par paliekošo dezinficējošo materiālu izmanto hloru. Gruntsūdens sagatavošanā ietilpst vienīgi hlorēšana (Juhna un Kļaviņš, 2001).

Dzeramā ūdens fizikāli-ķīmiskās un mikrobioloģiskās analīzes veiktas atbilstoši Latvijas Standartam (LVS ISO).

Kopējā organiskā oglekļa (total organic carbon, TOC) koncentrācija un izšķīdušā organiskā oglekļa (dissolved organic carbon, DOC) koncentrācija noteikta ar Shimadzu 5000 A TOC analizatoru pēc LVS ISO.

BDOC ir daļa no DOC, kuru heterotrofās baktērijas spēj patērēt vairāku dienu vai dažu mēnešu laikā. Darbā izmantota Ribas un Frias (1992) aprakstītā metode BDOC noteikšanai, kuras pamatā ir baktēriju bioplēves audzēšana stikla kolonnās, kuras piepildītas ar smiltīm un DOC noteikšana kolonnu ieplūdē un izplūdē.

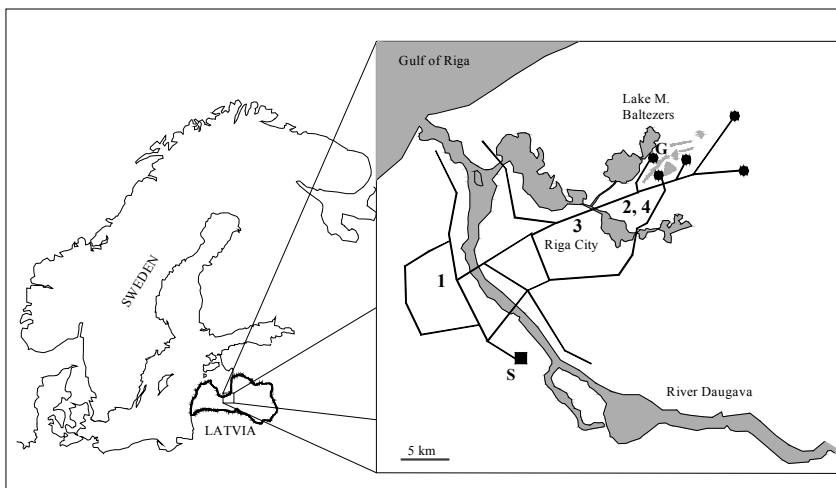
AOC ir DOC daļa, ko vairāku dienu laikā heterotrofās baktērijas var pārveidot jaunu šūnu masā. Darbā izmantota van der Kooij (1982) standartmetode AOC_{native} noteikšanai un šīs metodes uzlabojums $AOC_{\text{potential}}$ noteikšanai, kuru piedāvā Miettinen (1999) ar neorganisko sāļu pielikšanu, tajā skaitā fosfora. Metožu pamatā ir divu dzeramajā ūdenī raksturīgu baktēriju *Pseudomonas fluorescens* P17 celma un *Aquispirillum* sp. NOX celma izmantošana. AOC koncentrāciju nosaka pēc šo testa mikroorganismu skaita pieauguma ūdens paraugā. Ar AOC_{native} nosaka ūdens paraugā esošā oglekļa daļu, kuru baktērijas var asimilēt esošajos apstākļos, bet ar $AOC_{\text{potential}}$ to potenciālo oglekļa daļu, kuru baktērijas varētu asimilēt, ja ūdens paraugā limitējošas nebūtu neorganiskās vielas. Ūdens paraugos, kuros limitējošais ir ogleklis AOC_{native} ir vienāds ar $AOC_{\text{potential}}$.

MAP ir daļā no kopējā fosfora, kuru heterotrofās baktērijas var patērēt augšanai. MAP noteikts izmantojot Lehtola (1999) piedāvāto bioloģisko metodi, kuras pamatā ir *Pseudomonas fluorescens* P17 augšana ūdens paraugā, kurš papildināts ar neorganiskajiem sāļiem (izņemot fosforu) un nātrija acetātu kā oglekļa avotu. MAP koncentrāciju nosaka kā minēto testa baktēriju skaita pieaugumu ūdens paraugā. Metode noteikšanas robeža ir $0.08 \mu\text{g P L}^{-1}$. Kā metodes trūkumu var atzīmēt to, ka baktērijām pieejamā fosfora daļu nosaka tikai ar vienu baktēriju sugu, tas nozīmē, ka patiesā baktērijām pieejamā fosfora daļa ūdens paraugā varētu būt lielāka.

Heterotrofo baktēriju skaits (heterotrophic plate count, HPC) ūdens un bioplēves paraugos noteikts pēc Reasoner un Geldreich (1985) metodes, kad baktēriju daudzums Petri platēs skaitīts 7. vai 15. dienā pēc tam, kad parauga suspensija kultivēta R2A barotnē $22\text{ }^{\circ}\text{C}$ temperatūrā un baktēriju daudzums izteikts kā koloniju veidojošo vienību skaits tilpumā (bacterial colony forming unit, CFU). Kopējais baktēriju skaits (total bacteria number, TBN) ūdens un bioplēves paraugos noteikts ar Brunk (1979) metodi analizējot mikroskopā (Leica DM LB, Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Germany) paraugu pie 1000 reižu liela palielinājuma, kas iekrāsots ar 4',6-Diamidino-2-Phenylindole (DAPI) krāsu.

Lai pārbaudītu vai MAP ir baktēriju augšanu limitējošs biofiltrs, dzeramā ūdens stacijā veikts atsevišķs eksperiments, kad četru mēnešu laikā kontrolēta divu biofiltru attīrīšanas efektivitāte. Vienā no biofiltriem dozēts fosforskābes šķīdums ($50 \mu\text{g PO}_4^{3-}\text{-P L}^{-1}$), tādejādi nodrošinot filtrā optimālu barības vielu koncentrāciju baktērijām C:P=100:1. Otrs filtrs darbojās ikdienas rutīnrežīmā. Abu biofiltru efektivitātes salīdzināšanai to izplūdē mērīta TOC koncentrācija, kā arī citi fizikāli-ķīmiskie un mikrobioloģiskie parametri.

Lai pārbaudītu baktēriju augšanu dzeramā ūdens sadales tīklā, kad augšanu limitē gan MAP, gan AOC lauku eksperimenta apstākļos izmantota speciāla iekārta - Propella® (Xenard, Mechanique de Precision, Seichamps, Francija) reaktors. Tiek uzskatīts, ka Propella® reaktorā notiek pilnīga ūdens sajaukšanās (completely mixed, CM). Propella® reaktors sastāv no 100 mm diametra polietilēna caurules (garums 500 mm), kurā ieplūstošo ūdeni sajauc ar propellera palīdzību. Šajā caurulē ir ievietots vēl viens dobts cilindrs, caur kuru vajadzības gadījumā cirkulē karstu vai aukstu ūdeni, lai eksperimentālajā iekārtā nodrošinātu nepieciešamo temperatūru. Reaktora sienā ieskrūvēti 20 polivinila kuponi (1.7 cm^2), kurus izmanto bioplēves analizēšanai. Bioplēves atdalīšanu veic izņemto kuponu no



1.attēls Rīgas dzeramā ūdens sadales tīkls un attīrīšanas staciju atrašanās vietas (Juhna, 2002). Apzīmējumi: S – virszemes ūdens attīrīšanas stacija, G – pazemes ūdens attīrīšanas stacija ar vairākām dabiskās un intensīvās papildināšanas akām. Propella® reaktora atrašanās vieta atsevišķos izmēģinājumos apzīmētas ar 1, 2, 3 un 4.

reaktora un apstrādājot ar ultraskaņas iekārtu (EW-04714-51, Cole Parmer, ASV). Reaktors uzstādīts dažādās Rīgas ūdens apgādes tīkla vietās (1.attēls), gan tajā pilsētas daļā, kuru apgādā ar virszemes ūdeni, gan tajā, kuru apgādā ar gruntsūdeņiem, lai reaktorā ieplūstošā ūdenī būtu dažādas MAP koncentrācijas (Tabula). Reaktors kontrolētos apstākļos (temperatūra 15°C, bez paliekošā hlora, ūdens uzturēšanās laiks 15 h, caurplūde 0.25 m s⁻¹) darbināts mēnesi, tā lai baktēriju attīstība būtu atkarīga tikai no fosfora koncentrācijas (C:P attiecības). Kad baktērijas attīstība bioplēvē sasniedz līdzsvara stāvokli, noteikts TBN un HPC.

Lai pārbaudītu fosfora recirkulāciju veikts lauku eksperiments ar bioplēves reaktoriem Propella® un Pipeline (Valsts Sabiedrības Veselības institūts, Somija). Pipeline ir tipisks caurplūdes reaktors (plug flow, PF). Pipeline reaktors sastāv no 10 mm diametra un 100 mm garām polivinila

caurulēm. 24 šādas caurules savienotas savā starpā ar lodveida ventiļiem, kas nodrošina atsevišķu daļu izņemšanu no iekārtas neizlejot no tās ūdeni.

Mēģinājums	Reaktora atrašanās vieta	Eksperimentālā ūdens apstrādes tehnoloģija	MAP, $\mu\text{g L}^{-1}$
1.simulācija	Sadales tīklā	Ķīmiski apstrādāts virszemes ūdens	<1.0
2.simulācija	Attīrīšanas stacijas izplūdē pirms hlorēšanas	Intensīvi papildināts gruntsūdens ar koagulēšanas-filtrēšanas pilotiekārtu	1.0
3.simulācija	Sadales tīklā	Gruntsūdens un virszemes ūdens sajaukums	1.0 – 10.0
4.simulācija	Attīrīšanas stacijas izplūdē pirms hlorēšanas	Intensīvi papildināts gruntsūdens	10.0

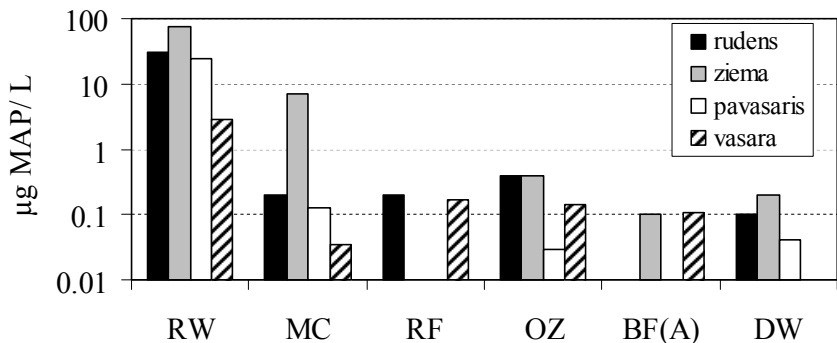
Tabula MAP koncentrācija Propella® reaktora ieplūdes ūdenī dažādos eksperimentālajos mēģinājumos.

Bioplēve no caurulītēm atdalīta uz speciāla kratītāja (Vortex Genie-2, model G-560E, Scientific Industries Inc., ASV) ar stikla bumbuņu palīdzību. Nodrošinot apstākļus, kad visi parametri izņemot uzturēšanas laiku (Propella® – 15 stundas, bet Pipeline – 0.006 stundas jeb 22 sekundes) ir vienādi abos reaktoros divus mēnešus audzēta bioplēve, kura kvantitatīvi analizēta izmantojot HPC un TBN metodes. Ieplūdes ūdens satur ļoti augstu organiskā oglekļa koncentrāciju $\text{AOC}_{\text{potential}}$ bija $659 \pm 591 \mu\text{g L}^{-1}$, un augstu fosfora koncentrāciju, nosakot kā MAP - $18 \pm 3.4 \mu\text{g L}^{-1}$ un kopējais baktēriju skaits bija 1.8×10^5 šūnas/ml, no kurām 3 % ir kultivējamas. C:P attiecība bija 37:1.

Ar bioplēves ražošanas potenciāla testu pēc van der Kooij (2003) metodes pārbaudīta abu reaktoru Propella® un Pipeline virsmas materiāla spēja izdalīt baktērijām nepieciešamās barības vielas. Rezultāti (nav iekļauti kopsavilkumā) parādīja, ka nav ievērojamas atšķirības starp reaktoru materiāliem.

Fosfora izdalīšanas efektivitāte virszemes ūdens attīrīšanas stacijā

Nodaļā aprakstīti fosfora, tajā skaitā, MAP izdalīšanas rezultāti, no dzeramā ūdens sagatavošanas stacijas, kurā sagatavo virszemes avota ūdeni. Pasaulē fosfora izdalīšanai tradicionāli izmanto ķīmiskās koagulācijas-nostādināšanas tehnoloģiju, kas ir ļoti efektīva. Pētījums parādīja, ka upes ūdenī kopējā fosfora koncentrācija bija $67 \mu\text{g P-tot L}^{-1}$ (vidējais lielums no gadalaika), kas noteikta ar ķīmisko metodi, bet MAP koncentrācija – $33 \mu\text{g P L}^{-1}$, kas noteikta ar bioloģiskās metodes palīdzību. Pēc ātrfiltriem kopējā fosfora koncentrācija samazinājās līdz $7 \mu\text{g P-tot L}^{-1}$, kas ir zem ķīmiskās metodes noteikšanas robežas. Turpmākajā attīrīšanas procesā kopējā fosfora samazināšanos nebija iespējams noteikt ar tradicionālo metodi, tāpēc izmantota tikai MAP metode. MAP koncentrācija pēc ātrfiltriem samazinājās par 2-log kārtām sasniedzot $0.19 \mu\text{g P L}^{-1}$ (2.attēls). Tālākajā attīrīšanas procesā ozonēšana palielināja MAP koncentrāciju, kas atkal samazinājās līdz iepriekšējam līmenim pēc biofiltriem un dzeramajā ūdenī tā bija $< 1 \mu\text{g P L}^{-1}$. Tādejādi virszemes ūdens apstrādes tehnoloģijas nodrošināja gandrīz pilnīgu MAP izdalīšanu, efektivitāte 99%.



2.attēls. MAP koncentrācijas izmaiņas ūdenī dzeramā ūdens attīrīšanas stacijā. Apzīmējumi: RW, upes ūdens, MC, izplūdē no sajaukšanas kameras, RF, izplūdē no smilšu ātrfiltra, OZ, izplūdē no ozonēšanas kameras, BF(A), izplūdē no aktīvās ogles biofiltra, DW, dzeramais ūdens no tīrā ūdens rezervuāra.

Pētījums apstiprināja Lehtolas (2002) un Yu (2003) iepriekš konstatēto faktu, ka koagulācijas-nostādināšanas procesā iespējams efektīvi izdalīt fosforu, kas mērīts ar ķīmisko metodi. Šajā promocijas darbā pierādīts, ka arī baktēriju augšanai izmantojamā fosfora (MAP) daļa efektīvi samazināta. Tādejādi izmantojot tradicionālās attīrīšanas metodes būtu iespējams kontrolēt baktēriju attīstību dzeramā ūdens sadales sistēmās reģionos, kuros ūdensgūtves bagātas ar humīnvielām.

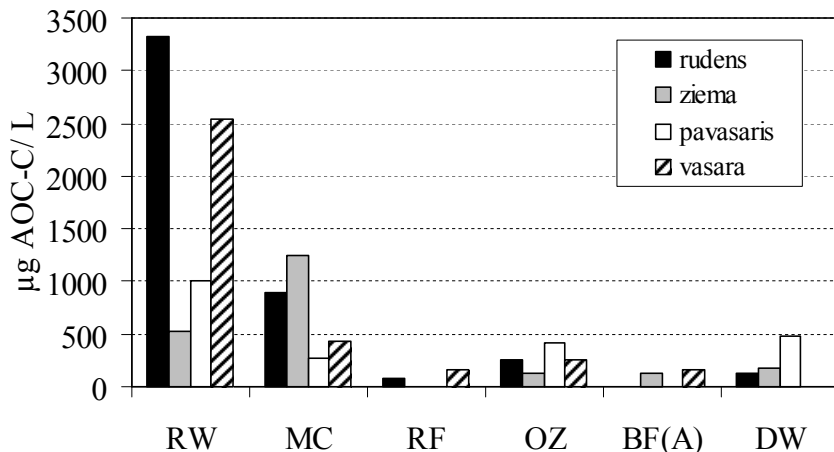
Oglekļa izdalīšanas efektivitāte virszemes ūdens attīrīšanas stacijā

Koagulācijas procesā panāktā efektīvā MAP izdalīšana varētu nodrošināt mikrobioloģiski stabilu ūdeni un panākt, ka sadales sistēma neveidojas biolpēve. Tomēr kā minēts ievadā tas nav vienīgais uzdevums dzeramā ūdens sagatavošanas procesā reģionos ar humīnvielām bagātos ūdeņos. Būtu jāpanāk arī minimālas organiskā oglekļa koncentrācijas, lai hlorēšanas procesā neveidotos kancerogēni savienojumi, piem. trihalogēnmetāni. Tāpēc promocijas darbā veikta arī oglekļa izdalīšanas efektivitātes novērtēšana. Upes ūdenī NOM analizēts kā TOC uzrādīja $15.25 \text{ mg C L}^{-1}$, kas bija augsta koncentrācija salīdzinot ar Eiropā konstatētajām koncentrācijām. Pēc ātrfiltriem TOC koncentrācija ievērojami samazinājās sasniedzot 5.78 mg C L^{-1} . Turpmākā apstrāde biofiltrā TOC koncentrāciju ūdenī neizmainīja un noteikta dzeramajā ūdenī tā sastādīja 5.15 mg C L^{-1} .

Baktērijām bioloģiski pieejamā oglekļa koncentrācijai, kas noteikta kā $\text{AOC}_{\text{native}}$ bija līdzīga samazināšanas tendence kā TOC. Upes ūdenī tā bija augsta (3.attēls), kas pēc ātrfiltriem ievērojami samazinājās sasniedzot $118 \pm 58 \text{ } \mu\text{g C L}^{-1}$ (vidējais lielums no gadalaika). Turpmākā ozonēšana $\text{AOC}_{\text{native}}$ koncentrāciju atkal palielināja divkārtīgi ($266 \pm 114 \text{ } \mu\text{g C L}^{-1}$), bet pēc biofiltriem sasniedza pirms ozonēšanas noteikto koncentrāciju ($139 \pm 20 \text{ } \mu\text{g C L}^{-1}$).

Ja ūdens kvalitātes raksturošanai izmanto $\text{AOC}_{\text{potential}}$ ar neorganisko vielu, tajā skaitā fosfora pielikšanu, atklājās, ka oglekļa koncentrācija attīrīšanas procesā nesamazinājās (4.attēls), tajā skaitā arī biofiltrā, oglekļa izdalīšanas efektivitāte sasniedz tikai 20%. Tas norāda, ka baktēriju augšanu noteikti nelimitēja ogleklis. Attīrīšanas procesā efektīvi bija izdalīts MAP. Abi šie secinājumi viennozīmīgi norāda uz fosforu limitējošiem apstākļiem un, ka biofiltru efektīvu darbību ietekmēja zemā MAP koncentrācija. Eksperiments, kurā pārbaudīta oglekļa izdalīšana biofiltrā pēc tam, kad tajā

pielikts fosfors uzrādīja par 7% labāku oglekļa izdalīšanu biofiltrā ar fosfora pielikšanu. Tomēr šis uzlabojums nav statistiski ievērojams ($T \leq 0, p < 0.1$).

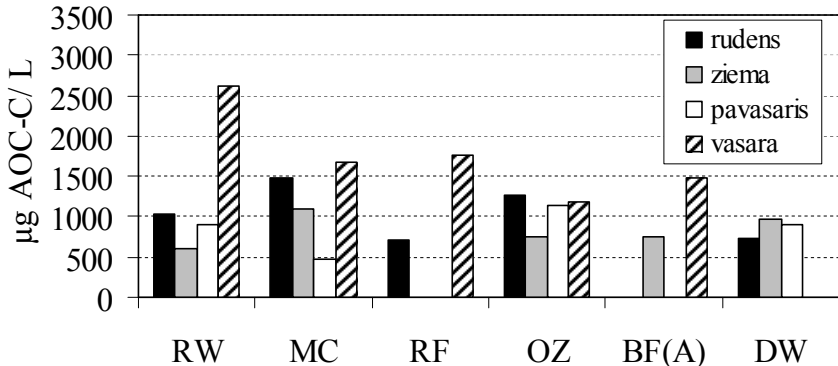


3.attēls. AOC_{native} koncentrācijas izmaiņas ūdenī dzeramā ūdens attīrīšanas stacijā. Apzīmējumi: skatīt 2.attēlu.

Fosfora dozēšana neietekmēja fizikāli-ķīmisko un mikrobioloģisko parametru koncentrāciju biofiltru izplūdēs izņemot HPC, kas biofiltrā ar fosfora dozēšanu bija par 1-log kārtu lielāks, kas sastāda 2573 ± 2817 CFU mL^{-1} nekā filtrā bez dozēšanas - 265 ± 223 CFU mL^{-1} . Šis fakts apstiprina, ka fosfors filtrā bija limitējošā barības viela, tomēr biofiltru neefektīvās darbības cēloņus ir jāturpina izmeklēt. Līdzīgus rezultātus ar nelielu oglekļa izdalīšanas uzlabojumu pieliekot fosforu bioloģiski aktīvajos filtros atspoguļo Sang (2003) un Yu (2003), kaut arī darbības efektivitātes noteikšanai izmantotas citas metodes.

Cēloņi tam, kāpēc nodrošinot optimālu barības vielu proporciju mikroorganismu attīstībai filtros tiek iegūts pašu mikroorganismu pieaugums filtrā, mērīts kā HPC, bet oglekļa izdalīšanas uzlabojums ir niecīgs varētu būt sekojoši – neefektīva ozonēšana pirms biofiltriem, tādejādi mikroorganismi biofiltrā nespēj izdalīt organiskās vielas; nepietiekošs kontaklaiks; augsta skābekļa koncentrācija vai citi.

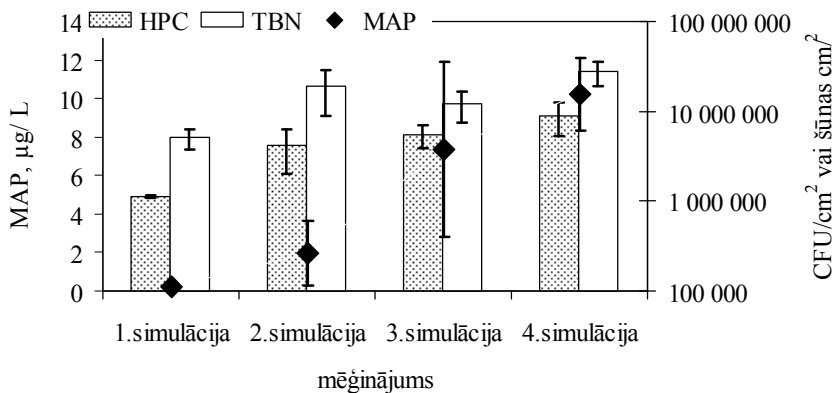
Jāatzīmē, ka Rīgā atšķirībā no virszemes ūdens, kur apstrādes laikā efektīvi izdalīts fosfors, gruntsūdeņu apstrādē panākta MAP izdalīšana par 60%, bet AOC par 30%.



4.attēls. AOC_{potential} koncentrācijas izmaiņas dzeramā ūdens attīrīšanas stacijā. Apzīmējumi: skatīt 2.attēlu

Mikrobioloģiski izmantojamā fosfora koncentrācijas ietekme uz bioplēves baktēriju daudzumu sadales tīklā

Efektīvā fosfora izdalīšana ar koagulācijas metodi, varētu kalpot kā instruments baktēriju attīstības un bioplēves veidošanās ierobežošanai dzeramā ūdens sadales sistēmās no humusvielām bagātām virszemes ūdensgūtvēm neskatoties uz to, ka padziļināta oglekļa izdalīšana biofiltrās ir neefektīva. Lai to pārbaudītu veiktas četras eksperimentālas simulācijas ar speciālu iekārtu bioplēves reaktoru Propella®. 1.simulācija izstrādāta pilsētas ūdens sadales tīkla daļā, kurā apgādāta ar virszemes ūdeni. Ar ķīmiskās koagulācijas-nostādināšanas attīrīšanas metodi panākta efektīva fosfora izdalīšana ($MAP < 1.0 \mu\text{g P L}^{-1}$) un C:P attiecība šādā ūdenī sasniedza 1000:1, kas raksturo vidi baktēriju attīstībai, kur limitējošā barības viela bija fosfors. Šādā ūdenī baktēriju skaits bioplēvē, kas sasniegusi līdzsvara stāvokli bija $5 \cdot 100'000$ šūnas/cm² un $1 \cdot 100'000$ CFU/cm² attiecīgi TBN un HPC (5.attēls).



5.attēls Korelācija starp mikrobioloģiski izmantojamo fosforu (MAP) ūdenī un kopējo (TBN) un heterotrofo (HPC) baktēriju skaitu bioplēvē. MAP punkti doti kā vidējie lielumi ($n = 10 - 12$), TBN un HPC kā vidējie lielumi ($n = 3-6$), ūsīņas attēlo standartnovirzi. HPC noteikts 15.dienā pēc kultivēšanas 22°C.

2.simulācijā intensīvi papildinātam gruntsūdenim, kur fosfora izdalīšanai izmantota koagulācijas-filtrācijas pilotiekārta fosfora koncentrācija tika panākta minimāla ($MAP=1.0 \mu\text{g P L}^{-1}$) un C:P attiecība 100:1. Salīdzinot ar RUN 1 baktēriju daudzums bioplēvē bija par 1-log kārtu lielāks, $19'000'000$ šūnas/cm² un $4'100'000$ CFU/cm² attiecīgi mērīts kā TBN un HPC.

3. un 4.simulācijā C:P attiecība ūdenī bija 20:1, un augšanu limitēja ogleklis. Attiecīgi reaktors tika barots ar ūdeni, kur bija gan gruntsūdens, gan virszemes ūdens (3.sim.) un tipisks gruntsūdens (4.sim.). Abos gadījumos baktēriju skaits bioplēvē bija līdzīgs un lielāks nekā 1. un 2.simulācijā.

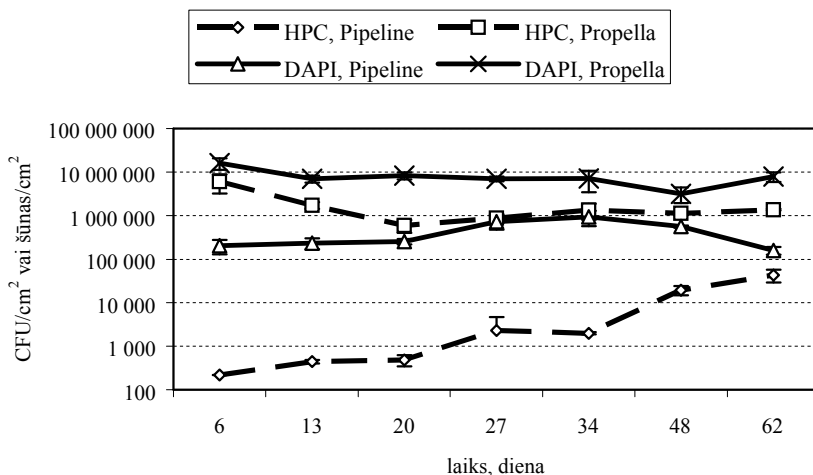
Šajās četrās simulācijās konstatēts, ka bioplēvē bija proporcionāli vairāk kultivējamo baktēriju (HPC) nekā iekļūdes ūdenī, attiecīgi 22–45% pret 3-10%. MAP koncentrācijas samazināšanās samazināja kultivējamo baktēriju daudzumu bioplēvē (5.attēls). To apstiprināja arī adenozintrifosforskābes (adenosine triphosphate, ATP) analīzes bioplēvē 514 ± 484 RLU, kas noteikti 2.simulācijā, kur C:P attiecība bija 100:1. Savukārt 4.simulācijā (C:P = 20:1) rezultāti bija 3436 ± 1892 RLU. MAP

koncentrācijas pieaugums ievērojami palielināja HPC daudzumu arī reaktora izplūdes ūdenī. Tā 1.simulācijā HPC bija tikai 6%, bet 3.simulācijā 55% izteikts pret TBN. Visās četrās veiktajās eksperimentālajās simulācijās novērota izteikta pozitīva korelācija starp MAP koncentrāciju ieplūdes ūdenī un HPC bioplēvē (korelācijas koeficients 0.95). Līdzīgi arī TBN gadījumā, korelācijas koeficients 0.71. Tas nozīmē, ka ūdens apgādes sistēmā, kura tiek barota gan ar ķīmiski apstrādātu virszemes ūdeni, gan intensīvi papildinātiem gruntsūdeņiem reģionā, kur ūdensgūtves bagātas ar humīnvielām baktērijām pieejamā fosfora koncentrācija nosaka bioplēves daudzumu sadales tīklā. Šis eksperiments apstiprina Lehtolas (2002) iepriekš konstatēto sakarību starp MAP koncentrāciju un baktēriju skaitu laboratorijas apstākļos. Kopējā fosfora ietekmi uz baktēriju attīstību pētījis arī Kasahara (2004) un konstatējis, ka specifiskos ūdeņos fosfora daudzums var pozitīvi ietekmēt baktēriju skaitu. Nodaļā aprakstītās eksperimentālās simulācijas parādīja, ka lauku apstākļos pie nelielas baktērijām izmantojamās fosfora daļas analizētas, kā MAP $<1.0 \mu\text{g P L}^{-1}$ un barības vielu attiecības C:P=1000:1, baktēriju skaits bioplēvē ir ievērojams $5 \cdot 10^6$ šūnas/cm², kas atšķiras no literatūrā minētajiem raksturīgajiem lielumiem tikai par 2-log kārtām (Kerr, 2003). Lai rastu atbildi uz jautājumu, kāpēc notiek baktēriju attīstība bioplēvē un nav iespējams to kontrolēt veikts papildus eksperiments, kurā apskatīta iespējamā fosfora uzkrāšanās sadales tīklā un tā atkārtota izmantošana (recirkulācija) baktēriju augšanai. Kā savos darbos atzīmējis Wanner (1990), Egli (1995) un Vadstein (2000) laboratorijas apstākļos novērota fosfora recirkulācija apstākļos, kad šis elements ir limitējošais baktēriju augšanai. Recirkulācija aprakstīta kā baktēriju membrānas citoplazmā esošā fosfora šķīšana ūdenī, ko var uzņemt jaunas šūnas un tendence, kad baktērijas uzņem vairāk fosforu nekā tām ir nepieciešams augšanai veidojot polifosfātu slēgumus, kuri fosfora iztrūkuma gadījumā tiek izmantoti kā enerģijas avots. Šo fenomenu dēvē par „pārmērīgu fosfora uzņemšanu” (*luxury phosphorus uptake*) (Vadstein, 2000).

Fosfora recirkulācija

Izmantojot pēc darbības atšķirīgus bioplēves reaktorus Propella® un Pipeline, kuriem ievērojami atšķirās kontakta laiks, lauku eksperimenta apstākļos pabaudīta fosfora recirkulācija. TBN daudzums reaktora Propella® bioplēvē, kas sasniegusi līdzsvara stāvokli bija robežās no $3.8 \times 10^6 - 1.9 \times 10^7$ šūnas/cm² un vienmērīgi samazinājās visā eksperimenta laikā

(6.attēls). Reaktorā Pipeline TBN bioplēvē bija tendence pieaugt un bija robežās no $2.0 \times 10^5 - 1.8 \times 10^6$ šūnas/cm². Analizējot HPC konstatēts, ka Propella® reaktora bioplēvē tās bija robežās no $7.0 \times 10^5 - 7.1 \times 10^6$ cfu/cm² (6.attēls), bet Pipeline - $4.4 \times 10^2 - 4.3 \times 10^4$ cfu/cm². Kultivējamo baktēriju daļa Propella® bija lielāka nekā Pipeline un sasniedza 7.3 – 40.1 % no kopējā baktēriju skaita. Savukārt Pipeline kultivējamo baktēriju skaits bioplēvē bija tikai 0.1– 10.7 %. Tātad eksperiments parādīja, ka reaktorā ar lielāku kontakta laiku baktēriju skaits bioplēvē ir ievērojami lielāks.



6.attēls Kopējais un heterotrofo baktēriju skaits bioplēvē Propella® un Pipeline reaktoros.

Varētu uzskatīt, ka bioplēves baktēriju augšanu ietekmē kāds cits faktors, nevis uzturēšanās laiks, ņemot vērā to, ka reaktoru darbības princips ir atšķirīgs, ko nosaka to uzbūve. Tomēr Pozos (2004) iepriekš veiktie eksperimenti apstiprina šeit konstatēto, pie tam Pozos savos pētījumos izmantoja divus vienādus reaktorus un tāpat ieguva lielāku baktēriju skaitu bioplēvē mēģinājumā ar ilgāku uzturēšanās laiku.

Pēc (Madigan and Martinko, 2006) domām viens no galvenajiem iemesliem, kāpēc baktērijas pāriet no ūdens fāzes un veido bioplēvi ir bioplēves baktēriju spēja veiksmīgāk uzņemt barības vielas. Eksperimentālie rezultāti apstiprina, ka pie lielāka uzturēšanās laika, kad

ūdens tilpumā ievērojami samazinās baktērijām nepieciešamo barības vielu daudzums jo baktērijas to patērē, gan HPC, gan TBN bioplēvē ir par vairākām log-kārtām lielāks, nekā apstākļos, kad barības vielu daudzums ir neierobežots. Pie tam barības vielu iztrūkuma gadījumā bioplēvē ir proporcionāli vairāk kultivējamo, tātad attīstīties spējīgo baktēriju skaits. MAP koncentrācija $1\ \mu\text{g P L}^{-1}$ caurplūdes reaktorā (uzturēšanās laiks 22 sek.) dod mazāk nekā $1000\ \text{CFU}/\text{cm}^2$, bet pilnīgi sajauktā reaktorā (uzturēšanās laiks 15 h) tāda pati MAP koncentrācija dod vairāk nekā $1'000'000\ \text{CFU}/\text{cm}^2$. Šis atklājums apstiprina hipotēzi, ka novērojama fosfora recirkulācija, t.i., jaunu baktēriju augšana iespējama, ilgi pēc tam, kad fosfors no ūdens fāzes ir patērēts. Oglekļa limitācijas gadījumā baktēriju augšana apstājas uzreiz pēc oglekļa iztērēšanas. Fosfora limitējošos apstākļos notiek baktēriju dalīšanās un jaunās baktērijas turpina attīstīties pateicoties tam, ka baktēriju membrānas citoplazmā esošais fosfors šķīst ūdenī un tam, ka baktērijām ir tendence uzņemt vairāk fosforu nekā tām ir nepieciešams augšanai veidojot polifosfātu slēgumus. Bez tam Hudsona (2000) pētījums ar dabisko ūdenstilpņu mikroorganismiem parāda, ka fosfora aprīte no ūdens fāzes uz šūnām un pretējā virzienā norit ļoti ātri. Kas nozīmē, ka fosfora patēriņš (uzņemšana) augšanai un pēc tam noritošā izdalīšana, lai augt varētu jaunas šūnas notiek nepārtraukti. Pieņemot, ka līdzīgā veidā norit fosfora aprīte dzeramā ūdens sistēmā, var secināt, ka ar tradicionālo tehnoloģiju palīdzību sasniegtā efektīvā fosfora izdalīšana nevar kalpot kā instruments baktēriju attīstības, konkrēti, bioplēves attīstības kontrolēšanai dzeramā ūdens sadales sistēmās, jo pat pie MAP koncentrācijas $< 1\ \mu\text{g P L}^{-1}$ bija saražotas $5'100'000$ šūnas/ cm^2 bioplēvē. Turpinoties fosfora recirkulācijai šūnu skaits nesamazināsies, kamēr par limitējošo nekļūs ogleklis vai kāds cits baktēriju attīstību ietekmējošs faktors.

Secinājumi

- Efektīvi samazināta mikrobioloģiski izmantojamā fosfora koncentrācija ūdenī gan dzeramā ūdens attīrīšanas stacijā, kur izmanto virszemes ūdeni, gan pilotiekārtā, kas barota ar intensīvi papildinātiem gruntsūdeņiem (dati nav doti kopsavilkumā), ja izmantota tradicionālā ķīmiskās koagulācijas-nostādināšanas metode. Upes ūdenī mikrobioloģiski izmantojamā fosfora koncentrācija bija $33\ \mu\text{g P L}^{-1}$, bet dzeramajā ūdenī $< 1\ \mu\text{g P L}^{-1}$ (zem ķīmiskās metodes noteikšanas robežas).

- Lai gan novērota kopējā organiskā oglekļa un asimilējamā organiskā oglekļa koncentrācijas samazināšanās virszemes ūdens attīrīšanas procesā, biofiltru oglekļa samazināšanas netika konstatēta. Papildus fosfora pievienošana biofiltrā nedeva gaidīto efektu – oglekļa izdalīšanās uzlabojās tikai par 7%, kas statistiski nav ievērojamas izmaiņas ($T \leq 0$, $p < 0.1$). Bez tam veicot asimilējamā organiskā oglekļa analīzes ar neorganisko sāļu pielikšanu, tajā skaitā fosfora, kas parāda to oglekļa daļu, kuru baktērijas varētu patērēt augšanai, ja pārējie elementi būtu nepieciešamajā koncentrācijā (konkrētajā gadījumā – fosfors) atklāja, ka šī oglekļa daļa attīrīšanas procesā nesamazinās. Augstākminētais norāda, ka virszemes ūdenī baktēriju attīstību limitē fosfors. Nākotnē ir jāturpina pētīt biofiltru neefektīvā darbība. Jāatzīmē, ka oglekļa koncentrācija apskatītajos ūdeņos ir ievērojami augstāka nekā lielākajā daļā Eiropas. Pētījums parādīja, ka ūdeņos, kas bagāti ar humīnvielām bioloģiskā filtrācija aktīvās ogles filtrs nav efektīva metode padziļinātai oglekļa izdalīšanai.
- Ūdeņos, kuri bagāti ar humīnvielām novērojama pozitīva korelācija starp mikrobioloģiski izmantojamo fosfora koncentrāciju ūdenī un heterotrofo baktēriju skaitu bioplēvē (korelācijas koeficients 0.95) kā arī ar kopējo baktēriju skaitu bioplēvē (korelācijas koeficients 0.71). Tātad pieaugot mikrobioloģiski izmantojamai fosfora koncentrācijai ūdenī, palielinās gan heterotrofo, gan kopējo baktēriju skaits bioplēvē. Šis fakts konstatēts lauku eksperimentos uz speciālas iekārtas (Propella® reaktora).
- Ūdeņos ar augstu humīnvielu koncentrāciju nav iespējams ar esošajām tradicionālajām tehnoloģijām kontrolēt baktēriju attīstību sadales tīklā un bioplēves veidošanos. Ja fosfora koncentrācija noteikta kā mikrobioloģiski izmantojamais fosfors un bija $< 1 \mu\text{g P L}^{-1}$, tad baktēriju skaits bioplēvē dzeramā ūdens sadales sistēmā bija $5 \cdot 10^6$ šūnas/cm². Tas nozīmē, ka, lai arī ar tradicionālo ķīmiskās koagulācijas-nostādināšanas metodi iespējams efektīvi samazināt mikrobioloģiski izmantojamo fosforu, tas nevar kalpot kā instruments bioplēves daudzuma kontrolēšanai sadales tīklā.
- Mikrobioloģiski izmantojamā fosfora koncentrācija $1 \mu\text{g P L}^{-1}$ caurplūdes reaktorā (uzturēšanās laiks 22 sek.) deva mazāk nekā 1000 CFU/cm², bet pilnīgi sajauktā reaktorā (uzturēšanās laiks 15 h) tāda pati mikrobioloģiski izmantojamā fosfora koncentrācija deva vairāk nekā

1'000'000 CFU/cm². Šo fenomenu var skaidrot ar literatūrā pieminēto „pārmērīgu fosfora uzņemšanu” (*luxury phosphorus uptake*), kad jaunu šūnu radīšanai izmantots fosfors, kurš uzkrāts esošo šūnu membrānas citoplazmā un pašā šūnā polifosfātu slēgumu veidā.

Outline

Background

There are 250 million registered disease cases arising from low-quality water registered by World Health Agency every year of which 10 million cases have lethal consequences. Only in Europe 500 000 to 3 000 000 man-days are lost due to about 6000 such emergencies. Such register is lacking in Latvia however is a good idea to diminish the risk of illness using the experience from other European countries. Drinking water in which there is no microbial growth is considered microbiologically stable. However, as the drinking water passes through the network a tendency of a quality decrease can be observed such as (i) decreased organoleptic quality and (ii) microbial regrowth. Thus one must strive to decrease the possibility of microbial growth in the drinking water distribution network.

The growth of microorganisms after the drinking water preparation provided there are the required nutrients in the water mainly occurs on the inner surface of pipelines forming biofilm, *i.e.* biological cover. Phosphorus (P) compounds are among the most important microbial nutrients. The lack of P in the water to be transported or raw water may hinder the growth of microorganisms thus preventing the formation of biofilm. Previous research has shown that by decreasing P concentrations water may become more microbiologically stable thus rendering the water safer for consumption. However the influence of P on the formation of biofilm has not been well understood and described so far.

Scope and goals

The aim of this thesis was to investigate the influence of P on the formation of biofilm in water distribution networks transporting water from humic substance-rich water sources. The main tasks to be performed in order to reach the goal were:

- to evaluate the efficiency of microbiologically available P extraction using the chemical coagulation-precipitation method in drinking water treatment plant;
- to evaluate the discharge efficacy of organic matter in biological filters where the bacterial growth is limited by P;
- to examine the number of bacteria in biofilm under P- and carbon-limited conditions in field experiments;

- to establish whether P can accumulate in drinking water network and whether it's reuse (recirculation) can support bacterial growth.

Scientific novelty and application

It was established that in humic waters phosphorus (P) is the limiting factor for bacterial growth already 10 years ago. However, it is still not clear whether it is possible to control bacterial growth in the water supply network by limiting the concentration of P in the water. This thesis shows that conventional technologies are not able to eliminate bacterial growth and biofilm formation albeit only decrease it. Thus they are unable to provide microbiologically stable water (where no bacterial growth occurs). This thesis shows that this inability is due to the recirculation of P in the water distribution networks.

In areas rich in humic waters there is a need for inexpensive technologies in order to effectively extract biodegradable organic matter. This thesis shows that in order to extract carbon extensively from such waters the biological method which uses activated carbon filter is not sufficient.

It would be possible to implement various adjustments in the drinking water purification technology if one took in account the role of P in bacterial regrowth thus preventing water quality decrease in the distribution network. The scientific findings shown in this thesis may be applied in areas rich in humic waters, *e.g.* Riga water distribution system. The implementation of the results presented in this thesis could significantly improve the public health.

The results shown in this thesis has been reported and discussed in 6 international meetings:

- “Biofilm Systems VI” in Amsterdam, the Netherlands, September 24th – 27th, 2006;
- “Biofilms II, Attachment and Detachment in Pure and Mixed Cultures”, Leipzig, Germany, March 23rd – 24th, 2006;
- 46th RTU International Scientific Conference, Riga, Latvia, October 12th-13th, Riga, 2005;
- 45th RTU International Scientific Conference, Riga, Latvia, October 14th-15th, Riga, 2004;

- „Natural Organic Material Research: Innovation and Applications for Drinking Water”, Adelaide, Australia, March 2nd-5th, 2004;
- International Scientific Conference “Research for Rural Development 2003”, Jelgava, Latvia, May 21st – 24th, 2003.

The main results have been presented in 6 publications.

Summary of the thesis

Overview on earlier studies

In Nordic regions, such as Baltic countries, Nordic countries and North America drinking water sources are rich in humic substances (HS) (Miettinen, 1997; Juhna, 2000). Supply of potable water in such areas is a real challenge for water suppliers since the presence of HS causes esthetical and hygienic problems. In addition, natural organic matters (NOM) in the water may react with disinfectants thereby creating carcinogenic compounds (Letterman, 1999). The biodegradable organic matter (BOM) which has not been extracted from the water serves as nutrient for microorganisms in the drinking water distribution network. The quality of water decreases as the bacteria develop on the inner surface of pipes and create biofilm causing odor and unpleasant taste (Astier *et al.*, 1995). The chances for survival of opportunists and pathogens increase (Armon *et al.*, 1997), the concentration of remaining chlorine decreases and the corrosion of the pipelines in the network increases (LeChevallier, 1988, 1993). Heterotrophic bacteria require carbon, nitrogen and P in concentrations 100C:10N:1P for growth (Chandy and Angles, 2001). For a long time carbon expressed as assimilable organic carbon (AOC) or biodegradable organic carbon (BDOC) has been considered limiting factor (see *e.g.* van der Kooij, 1982). According to van der Kooij (1992) bacterial growth will not occur if AOC is lower than 10 µg L⁻¹. It has been experimentally shown that BDOC must be lower than 150-200 µg L⁻¹ (Laurent *et al.*, 1997 and Piriou *et al.*, 1998). Conventionally chemical coagulation/precipitation and rapid sand filters are used for drinking water purification. The supplemental use of granular activated carbon (GAC) filters in order to extract the carbon more thoroughly thus rendering the drinking water microbiologically stable is quite common all over the world (Letterman, 1999). However production of microbiologically stable water from waters containing high concentration of NOM is difficult due to the cost of this extra step. Therefore removal or

partial removal of another nutrient necessary for microbial growth, P, can be an alternative solution. It is generally considered that in areas with high AOC concentration bacterial growth is limited by P (Herson, 1984; Haas, 1988; Miettinen, 1997; Sathasiavan, 1999; Juhna, 2000; Lehtola, 2002). It has been observed experimentally that the microbial growth in the water and in the biofilm increases with the increase of P concentration with 1-5 $\mu\text{g L}^{-1}$ (Lehtola, 2002). P can effectively be removed by chemical coagulation (Lehtola, 2002; Yu, 2003). This technology is based on the use of coagulant, such as aluminum sulphate in order to destabilize particles suspended in the water. These then aggregate forming larger flakes which are removed by precipitation and filtration. The removal of flakes is easier compared to the particles. These flakes absorb dissolved and suspended P. It however must be noted that efficient extraction of P using conventional chemical method decreases the efficiency of GAC filters so that the BOM in the water is not removed (Juhna, 2004). This, in turn, can lead to formation of carcinogenic substances after the reaction with chlorine (see above).

In order to implement water purification technologies for biofilm formation control in the areas obtaining drinking water from humic water sources there is a need for experimental to verify if reuse (recirculation) of P is possible in the drinking water network. It has been noted that in P-limited waters bacterial growth continues after all available P has been consumed as opposed to carbon-limited waters where the growth stops after carbon consumption (Wanner, 1990; Egli, 1995; Vadstein, 2000). This could indicate recirculation of P.

Other main research trends which were identified after the review of available literature were evaluation of (i) influence of P on microbial growth in water distribution network (microbial stability of water) and (ii) influence of P extraction on biological carbon filters during water purification process from humic – rich sources using chemical coagulation technology.

Materials and methods

Since during the thesis work considerable amount of experimental work was done the main methods are discussed in this chapter.

Field experiments were carried out in treatment plants of Riga city with daily consumption 100 000 m^3d^{-1} and in the drinking water network. Drinking water for Riga city is produced from both surface (river Daugava) and groundwater in region near Lake Mazais Baltezers where it is

abstracted in several naturally and artificially recharged groundwater abstraction sites. Surface water is conventionally treated with chemical coagulation, followed by precipitation and rapid sand filter filtration. Then water is secondary treated with ozone and GAC filters. Finally, chlorination takes place before water distribution into the network. The groundwater is only chlorinated (Juhna and Klavins, 2001).

Chemical and microbiological analyses of water were determined according to the Latvian Standard (LVS ISO).

The concentration of total organic carbon (TOC) and dissolved organic carbon (DOC) were determined with a 5000 A TOC analyzer (Shimadzu, Japan) according LVS ISO.

The BDOC is the fraction of the DOC in water which can be metabolized by bacteria within a period of a few days to a few months. Glass column system was used to growth bacteria in biofilm and the BDOC of water samples were measured according the method described by Ribas and Frias (1992). Columns were filled with sand that serves as a support material of biofilm. The BDOC value corresponds to the difference in DOC between inlet and outlet water samples of the column system.

The AOC is the fraction of the DOC in water which heterotrophic bacteria can utilize for growth. The AOC_{native} concentration was determined by a modification of the standard method (van der Kooij, 1982) using two bacteria strains: *Pseudomonas fluorescens* P17 and *Aquispirillum* sp. NOX. For humus-rich waters a modification of this method was used to measure $AOC_{\text{potential}}$, where mixture of inorganic nutrients is added (Miettinen, 1999). Concentration of AOC is determined according to the growth of test bacteria in the water sample. AOC_{native} is the part of carbon which can be assimilated by bacteria in given conditions and $AOC_{\text{potential}}$ is the part which can assimilate in conditions when inorganic compounds (for example P) are not limiting. In waters where limiting nutrient is carbon AOC_{native} equals $AOC_{\text{potential}}$.

Microbially available phosphorus (MAP) is the fraction of total P which supports bacteria growth. MAP concentration in water was determined relating the CFU instationary phase of *P. fluorescens* P17 in pasteurised water samples to P concentration (Lehtola, 1999). According to method water sample is supplemented with inorganic salts solution (except P) and sodium acetate as organic carbon source. The number of organisms in the stationary phase is assumed to be the maximum number of organisms that can be supported by the nutrients in the sample. The number of plate

counts is converted to MAP concentrations by an empirically derived yield factor of PO₄-P for the growth of *P. fluorescens* P-17 obtained from the calibration curve of the standardization. The detection limit of this method is 0.08 µg P L⁻¹. This bioassay is based on cultivation of one bacteria culture and that means that actual concentration of MAP in water samples can be higher which is a limitation of the MAP method.

Heterotrophic plate counts (HPC) in water and biofilm samples are estimated by spread plating method (Reasoner and Geldreich, 1985) where sample are spread on R2A-agar plates and incubated for 7 to 15 days at 22 ± 2°C before the colony forming units (CFU) are counted.

The total bacteria number (TBN) in water and biofilm samples was examined by 4',6-Diamidino-2-Phenylindole (DAPI) staining method (Brunk, 1979) and cell number was counted with epifluorescence microscope (Leica DM LB, Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Germany) amplified by 1000 magnitude.

To verify the effect of addition of phosphorus on removal efficiency of NOM during biological activated carbon (BAC) filtration, phosphorus was dosed as H₃PO₄ solution to provide C:P molar concentration 1:100 to support bacterial growth. P was added prior to treatment by the biofilter at the water treatment plant (WTP) during four month period. Another filter in daily routine conditions was controlled at same time. NOM removal efficiency was determined by TOC measurements in both biofilters. Other physico-chemical and microbiological parameters were measured as well.

To measure bacterial regrowth in drinking water distribution network where limiting nutrient is phosphorus and carbon, biofilm reactor Propella® (Xenard, Mechanique de Precision, Seichamps, France) was used for field scale experiments. Propella® is a completely mixed (CM) reactor which is made of a 500 mm long and 100 mm diameter wide water distribution pipe made of high-density polyethylene (HDPE) with approximate volume 2.23 L. The water velocity was controlled with a marine propeller forcing the water along an inner cylinder, giving a flow parallel to the pipe wall. Constant temperature in Propella® was maintained by circulation of raw water through the inner cylinder of the reactor. The formation of biofilm on the pipe wall and the concentration of embedded bacterial cells was studied using 20 PVC coupons (1.7 cm²) that were installed into the inner surface of the pipe wall. Biofilm removal was performed with sonificator (EW-04714-51, Cole Parmer, USA).

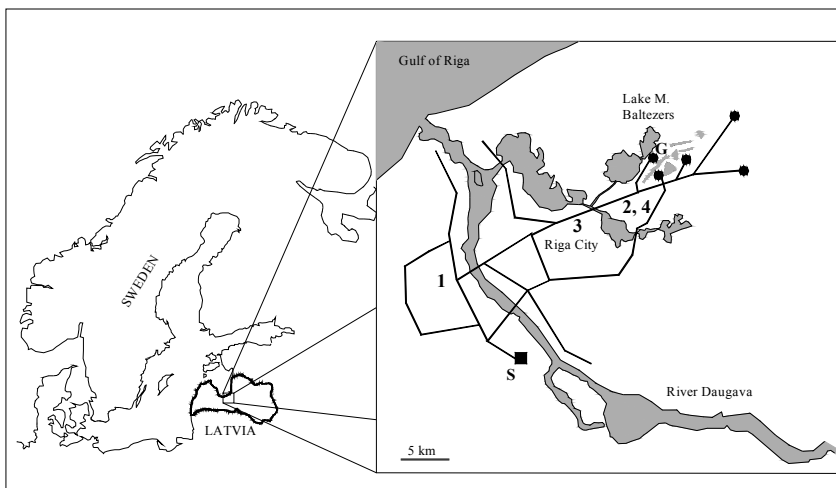


Figure 1 Drinking water distribution network and water treatment plant location in Riga city (Juhna, 2002). Legends: S – surface water treatment plant, G – groundwater treatment plant with several intake wells and artificially recharged wells. Location of Propella® reactors during experimental trials are marked with 1, 2, 3 and 4.

The reactors were installed in several locations (Fig.1) in water supply system of Riga and fed with water containing different levels of phosphorus (Table). Reactors were supplied with drinking water for about one month (to reach semi-steady state of biofilm formation) at controlled conditions (temperature 15°C, water detention time 24 h, flow rate 0.25 m s⁻¹, no chlorine) before PVC coupons were removed and bacteria in biofilm examined by HPC and TBN methods. In each separate trial the only different factor that influences biofilm development was C:P ratio.

Pipeline reactor is a plug flow reactor, which was made from 24 separate polyvinyl pipes with diameter of 10 mm and length 100 mm each and connected with valves that provide discharge of separate tiles without flushing of water.

Trial No.	Reactor location	Treatment process of experimental water	MAP, $\mu\text{g L}^{-1}$
RUN 1	At the distribution network	Chemically treated surface water	<1.0
RUN 2	At the plant effluent before chlorination	Artificially recharged groundwater treated with coagulation-filtration system at pilot scale	1.0
RUN 3	At the distribution network	Mix of groundwater and surface water	1.0 – 10.0
RUN 4	At the plant effluent before chlorination	Artificially recharged groundwater	10.0

Table MAP concentration in the experimental water of Propella® reactor runs

In order to compare biofilm formation under different hydraulic retention times and investigate P recycling experiments in Propella® reactor and Pipeline (National Public Health Institute, Finland) reactor were carried out. Pipeline is a plug flow (PF) reactor. Biofilm removal was performed with vortexing (Vortex Genie-2, model G-560E, Scientific Industries Inc., USA) by glass beads. For both reactors operation conditions was same except hydraulic retention times, for Propella® 15 h, for Pipeline 0.006 h or 22 seconds. Biofilm measurements with HPC and TBN methods were performed during 2 month operation period. Inlet water contained high concentration of carbon and phosphorus measured as $\text{AOC}_{\text{potential}} 659 \pm 591 \mu\text{g L}^{-1}$ and MAP $18 \pm 3.4 \mu\text{g L}^{-1}$. TBN in the water was 1.8×10^5 cells/ml from which 3% cells were viable. C:P ratio was 37:1.

Biofilm production potential test (van der Kooij, 2003) showed that there is no significant difference between both types of reactor materials regarding the release of nutrients that support bacterial growth (data not shown).

Removal efficiency of phosphorus at surface water treatment plant

In this chapter the extraction of P, including MAP in drinking water purification plant working with surface water is described. In many places

all over the world the very efficient chemical coagulation/ precipitation method is conventionally used for P extraction. The total P concentration in river water (determined by chemical method) was $67 \mu\text{g P-tot L}^{-1}$ (median seasonal value), and MAP concentration (determined using biological method) was $33 \mu\text{g P L}^{-1}$. After passing through rapid sand filters the total P concentration decreased to $7 \mu\text{g P-tot L}^{-1}$ which is under the detection limit of the chemical method. The chemical method could not be used for further monitoring of P concentration changes during the purification process therefore MAP method was used. The concentration of MAP after passing the rapid sand filters decreased by 2 orders of magnitude reaching $0.19 \mu\text{g P L}^{-1}$ (Figure 2).

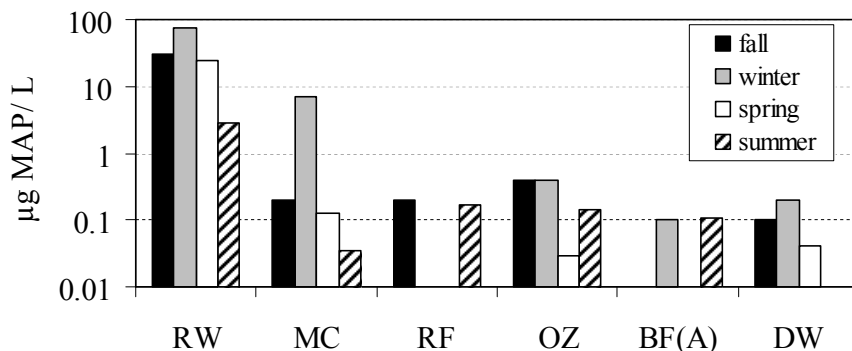


Figure 2. MAP concentration changes in drinking water in the water treatment plant. Abbreviations: RW, river water; MC, outlet from mixing chamber; RF, outlet from rapid sand filter; OZ, outlet from ozone chamber; BF(A), outlet from biological filter with active carbon; DW, drinking water from clean reservoir.

During further purification MAP concentration increased after ozonation and decreased again after biological filtration reaching the previous values. The MAP concentration in the drinking water was $< 1 \mu\text{g P L}^{-1}$. Thus the treatment of surface water resulted in almost complete P removal (efficiency 99%). This corresponds to earlier published results where P was effectively extracted by coagulation/precipitation process as measured by the chemical method (Lehtola, 2002 and Yu, 2003). This thesis shows that

also the microbially available part was efficiently decreased. Thus bacterial growth in water distribution systems in areas rich in humic water may be controlled using the conventional methods.

Removal efficiency of carbon at surface water treatment plant

The efficient removal of P by coagulation process may provide microbially stable water and prevent biofilm formation in the distribution networks. However, as mentioned in the Introduction section, this is not the only task to be performed in the process of drinking water purification in areas with humic rich water. One should also strive to decrease carbon concentration to a minimum so that the formation of carcinogenic substances, such as trihalogenmethanes, during the ozonation process is avoided. Therefore also the efficiency of carbon removal was evaluated in this thesis. NOM analysed as TOC in the river water was $15.25 \text{ mg C L}^{-1}$ which is a high concentration compared to those reported in Europe. After the water passed through rapid sand filters the concentration of TOC decreased to 5.78 mg C L^{-1} . Further treatment in biofilters did not decrease the TOC concentration and in the drinking water it was 5.15 mg C L^{-1} .

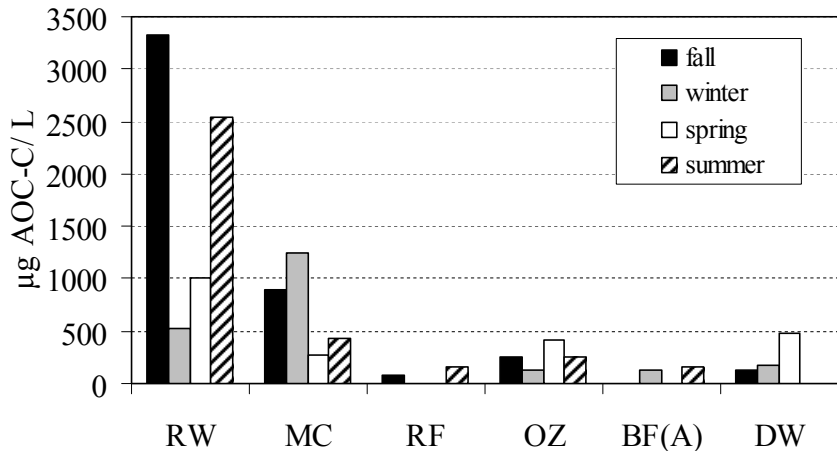


Figure 3. The changes in the concentration of $\text{AOC}_{\text{native}}$ in the water purification plant. For abbreviations, see Figure 1.

There was similar trend for the concentration decrease of microbially available carbon concentration, expressed as $\text{AOC}_{\text{native}}$. The concentration was high in the river water (Figure 3) and it decreased to $118 \pm 58 \mu\text{g C L}^{-1}$ (median seasonal value) after passing the rapid sand filters. Further treatment (ozonation) doubled $\text{AOC}_{\text{native}}$ concentration ($266 \pm 114 \mu\text{g C L}^{-1}$) after which it decreased to the concentration as measured before the ozonation step ($139 \pm 20 \mu\text{g C L}^{-1}$).

It was found that if one utilizes $\text{AOC}_{\text{potential}}$ with addition of inorganic matter such as P for drinking water characterization the concentration of carbon does not decrease during the purification process (Figure 4). This was observed also for biofilters where the decrease amounted to only 20%. This suggests that another substance apart from carbon is growth-limiting. MAP was effectively eliminated therefore it is possible that (i) P was growth-limiting and (ii) low MAP concentration was limiting the efficiency of biological filters. The results show 7% increase in the extraction of carbon after the addition of P however the improvement is not statistically significant ($T \leq 0, p < 0.1$). P dosing did not influence the concentration of physical and chemical parameters in the biofilter outlets with exception of HPC which was 1 order of magnitude higher in the dosed biofilter $2573 \pm 2817 \text{ CFU mL}^{-1}$ compared to the undosed filter - $265 \pm 223 \text{ CFU mL}^{-1}$). This supports the conclusion that P was the growth-limiting factor however the explanation for inefficient performance of biofilters still needs to be examined further. These results are similar to those described earlier (Sang, 2003 and Yu, 2003), even if the methods used for determining the efficiency of the filters were different.

The reason for microbial growth in the filters despite the negligible amount of carbon extraction could be non-efficient ozonation (so that microorganisms already in the biofilters are not able to excrete organic nutrients, not sufficient contact time, too high nitrogen concentration *etc.* It must be noted that unlike the surface water where P was effectively removed during the treatment in groundwater treatment 60% MAP and 30% AOC removal was achieved.

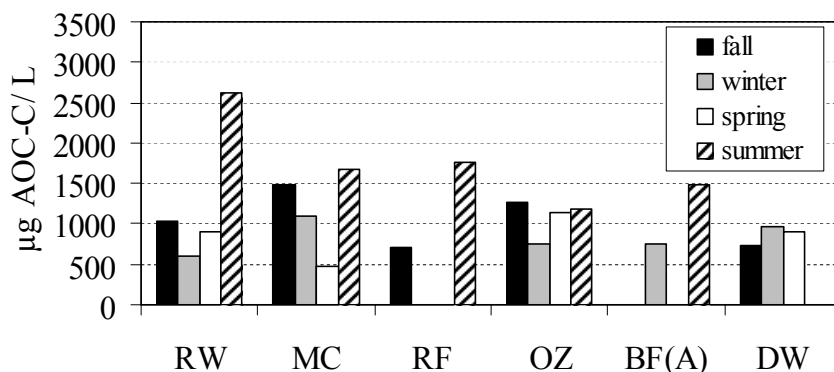


Figure 4. The changes in the concentration of AOC_{potential} in the water purification plant. For abbreviations, see Figure 1.

Effect of microbiologically available phosphorus concentration on biofilm quantities in drinking water distribution network

Removal of P using the coagulation method may serve as an instrument for control of bacterial growth and biofilm formation in drinking water distribution networks taking up water from humic rich surface water sources regardless of the fact that exhaustive carbon removal in the biofilters is non-efficient. In order to examine this possibility 4 experimental runs using particular equipment – biofilm reactor Propella® were made.

The first run was made in a part of municipal water distribution network which supplies surface water. Chemically treated (with alum) surface water (RUN 1) where extensive removal of P was done (MAP < 1.0 µg L⁻¹) and molar ratio between C:P was achieved as 1000:1. This situation represented typical P limiting environment for bacterial growth. For these waters TBN of steady-state biofilm was 5'100'000 cells/cm² and HPC was 1'100'000 CFU/cm² (Fig.5.).

RUN 2 was made with artificially recharged groundwater treated with coagulation-filtration system on a pilot scale system. After the treatment the concentration of P in the inlet water of Propella® was moderately low (MAP=1.0 µg L⁻¹) and C:P ratio was about 100:1. TBN in

biofilm was one fold higher than in RUN 1, 19'000'000 cells/cm² and 4'100'000 CFU/cm² for TBN and HPC, respectively.

The ratio of C:P ration in the RUN 3 and RUN 4 was about 20:1, thus carbon was limiting for bacterial growth. Pilot scale system was supplied with mix of groundwater and surface water for RUN 3 and with typical groundwater for RUN 4. In both cases bacterial concentration in biofilm was similar and much higher than that in the RUN 1 and RUN 2.

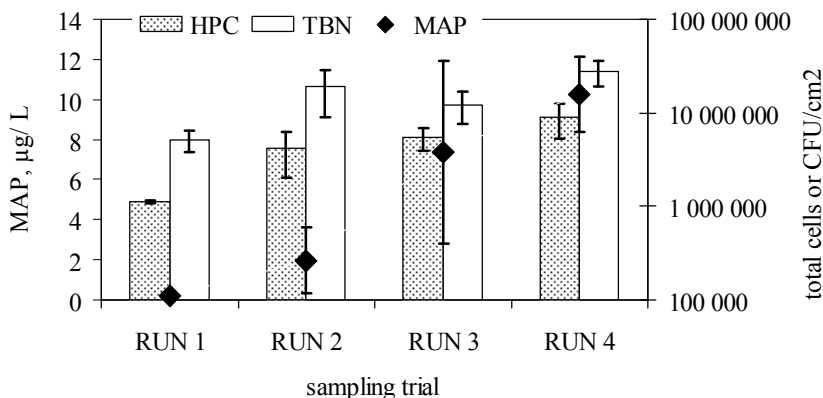


Figure 5. The relationship between microbially available phosphorus (MAP) in the inlet water and the total (TBN) and heterotrophic (HPC) bacteria number in biofilm. MAP data points represents average values (n=10-12), TBN and HPC are shown as average values (n=3-6), standard errors are indicated by the bars. HPC was determined after cultivation at 22^oC on 15th day.

In all the 4 runs it was found that biofilm was composed of significantly higher number of viable bacteria than inlet bulk water, 22–45% and 3-10%, respectively. It was also found that shortage of phosphorus decreases the viability of cells in biofilm (Fig. 5). Measurement of adenosine triphosphate (ATP) for biofilm samples supported that. In the RUN 2 where phosphorus was limiting ATP was 514 ± 484 RLU but for RUN 4 where phosphorus was in excess ATP was 3436 ± 1892 RLU. Another observation was that the increase of MAP markedly increases the percentage of HPC in effluent waters. In RUN 1 HPC was only 6% which increased to 55% in RUN 3. There is strong positive correlation between

average inlet water MAP values for all runs and HPC (correlation coefficient 0.95) and TBN (correlation coefficient 0.71) in biofilm. This indicates that MAP determines biofilm quantities in drinking water distribution network, which is supplied with chemically treated surface waters and artificially recharged groundwaters in areas where watershed contains high concentration of humic substances. These results are in agreement with what has been published earlier on the relationship between MAP and bacterial growth in lab scale experiments (Lehtola, 2002; Kashara, 2004). The experimental simulations described in this section showed that in field conditions in waters with low concentration of MAP ($<1.0 \mu\text{g P L}^{-1}$) and C:P ratio 1000:1 quantities of bacteria in biofilm can be as high as $5 \cdot 10^7$ cells/cm² which differs in 2 orders of magnitude from that mentioned in literature (Kerr, 2003). It seems that it is impossible to control biofilm formation in drinking water distribution network by phosphorus removal, probably due to phosphorus accumulation and recycling which supports bacterial growth in the water distribution network. To determine the reasons for bacterial regrowth a field scale experiment was made (described in the following section). P recycling in P limiting conditions has been described earlier in lab scale experiments (Wanner, 1990; Egli, 1995 and Vadstein, 2000). This phenomenon is also characterized by increased P uptake (to higher level than that needed for growth) and buildup of polyphosphate inclusion bodies. These inclusion bodies serve as a P source for growth when phosphorus in water is depleted.

Phosphorus recycling

To verify phosphorus recycling a field scale experiment with Propella® and Pipeline reactors, which operate under different hydraulic retention times was made. TBN level in steady state biofilm of Propella® reactor was in the range from 3.8×10^6 to 1.9×10^7 cells/cm² (Fig.6.) and decreased constantly during the experiment. TBN level in biofilm of Pipeline reactor was $2.0 \times 10^5 - 1.8 \times 10^6$ cells/cm². In contrast, for Pipeline reactor TBN in biofilm displayed a tendency to increase. HPC level in biofilm of Propella® reactor was in range $7.0 \times 10^5 - 7.1 \times 10^6$ cfu/cm² (Fig.6) but that of Pipeline reactor was $4.4 \times 10^2 - 4.3 \times 10^4$ cfu/cm². HPC in biofilm of Propella® reactor was 7.3 – 40.1 % of total bacteria cells whereas that of the Pipeline reactor was 0.1– 10.7 %.

Thus the experiment showed that in reactor with much higher retention time bacterial biomass quantities in biofilm are significantly

increased. One might object that the differences in the reactor operation principle which are due to different structures can be responsible for the fact that increased biofilm quantity is not due to retention time but rather another factor. However earlier findings by Pozos (2004) where similar reactors were used however the longer was the retention time the higher the biomass amount support the findings in this thesis.

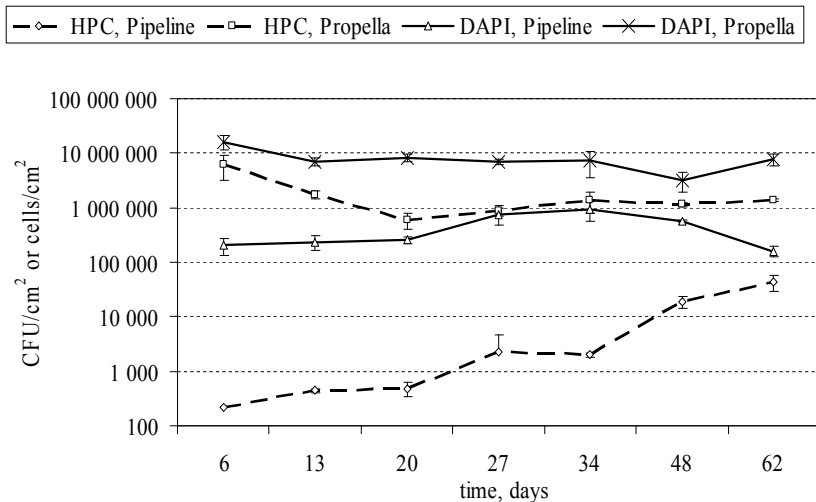


Figure 6 Total and heterotrophical bacteria number of biofilm in completely mixed biofilm reactor Propella® and plug flow reactor Pipeline®

It has been mentioned that one of the main reasons that bacteria attach to the surfaces and start forming biofilm is increased nutrient uptake in biofilm bacteria (Madigan and Martinko, 2006). The experimental results confirm that with longer retention time when nutrient concentration in the water decreases both HPC and TBN is several orders of magnitude higher than under conditions when nutrients are available in unlimited amounts. In the case of nutrient lack there are proportionally more viable bacteria in the biofilm. MAP of $1\mu\text{g P L}^{-1}$ in the flow-through reactor (retention time 22 sec) yields less than 1000 CFU/cm^2 wherea the same MAP concentration in the completely mixed reactor yields more than $1'000'000\text{ CFU/cm}^2$. This

finding supports the idea that there is a recirculation of P, *i.e.* bacterial growth happens long after P has been consumed from the water phase. Under carbon-limited conditions bacterial growth stops immediately after available carbon has been consumed. Under P-limiting conditions cell division and growth continues due to that (i) P in the cytoplasmic membrane is water soluble and (ii) cells display a trend to accumulate more P than needed for growth forming polyphosphate inclusion bodies. This phenomenon is called luxury phosphorus uptake. In addition it has been shown that P turnover from water phase to the cells and the opposite direction is a very fast process (Hudson, 2000). This means that P consumption (uptake) and following excretion to support the growth of new cells is a continuous process. Considering that turnover of P is similar in the drinking water distribution system it may be concluded that the effective P removal by conventional technologies can not serve as an instrument for bacterial growth, *i.e.* biofilm development control in the drinking water distribution network because even at MAP concentration of $< 1 \mu\text{g P L}^{-1}$ there were $5 \cdot 100'000 \text{ cells/cm}^2$ accounted in the biofilm. As the P recycling continues the cell number will not decrease until carbon or any other factor important for bacterial growth becomes limiting.

Conclusions

- Microbially available phosphorus (MAP) concentration was efficiently decreased both in water treatment plant using surface water and in pilot-scale equipment fed with spiked groundwater (data not shown in this Summary) by using conventional chemical coagulation-precipitation method. MAP in the river water was $33 \mu\text{g P L}^{-1}$ and it decreased down to $< 1 \mu\text{g P L}^{-1}$ (below the detection limit).
- Despite that the concentrations of total organic carbon (TOC) and assimilable organic carbon (AOC) decreased as a result of surface water purification there was no decrease in carbon concentration in the biofilters. The addition of phosphorus did not yield the expected result in decrease of carbon concentration – it decreased only for 7% which was not statistically significant ($T \leq 0$, $p < 0.1$). In addition AOC analysis by inorganic salt addition (including P) showed no decrease during purification. This analysis indicates the part of C which could be used for bacterial growth provided that all the other necessary elements are supplied (such as P in this case) which means that P limits bacterial growth in the surface water. It is important to continue the research

regarding the inefficient performance of biofilters. It must be noted that the concentration of carbon in the water used in these experiments and in the groundwater significantly exceeds that commonly observed elsewhere in Europe. Thus this experiment shows that biological filtration using activated carbon filters is not an efficient method of extensive carbon removal from humic-rich waters.

- There is a positive correlation between MAP concentration and (i) the number of heterotrophic bacteria in the biofilm (correlation coefficient 0.95) and (ii) total number of bacteria in the biofilm (correlation coefficient 0.71) in the drinking water rich in humic substances. Thus both the number of total and heterotrophic bacteria in the biofilm increases with the MAP concentration. This was shown in field-scale experiments using specific equipment (Propella® reactor).
- It is not possible to control bacterial growth and biofilm formation in humic-rich waters in the distribution network using conventional technologies. When the P concentration expressed as MAP was $< 1 \mu\text{g P L}^{-1}$ (below the detection limit) the number of bacteria in the biofilm reached $5'100'000 \text{ cells/cm}^2$. Thus even if the conventional chemical coagulation/precipitation method can decrease the concentration of MAP it cannot be used to control the biofilm formation.
- The concentration of MAP of $1 \mu\text{g P L}^{-1}$ in flow-trough reactor (retention time 22 sec) yielded less than 1000 CFU/cm^2 as opposed to over $1'000'000 \text{ CFU/cm}^2$ in a completely mixed reactor (retention time 15 h). This could be explained as luxury phosphorus uptake when P accumulated in the cytoplasmic membrane and inside the cell as polyphosphate inclusion bodies is being used to produce new cells

Publikāciju saraksts/List of Publications

- I. Rubulis J., Juhna T., (2006). Potential of biofilm control in water supply systems by removal of phosphorus from drinking water // *Water Science and Technology: Water Supply*, (accepted), Impact Factor 0.875.
- II. Rubulis J., Juhna T., (2006). Effect of phosphorus on biofilm growth in a completely mixed biofilm reactor // *Biofilms 2*, 14-15.
- III. Juhna T., Rubulis J., (2004). Problems of DOC removal during biological treatment of surface water with a high amount of humic substances // *Water Science and Technology: Water Supply*, 4 (4), 183-187, Impact Factor 0.875.
- IV. Rubulis J., Juhna T., (2005). The full-scale study on phosphorus addition to biologically activated carbon filters // In: Proceedings, Annual 46th RTU Scientific Conference – Riga, 203-210.
- V. Rubulis J., Birzniece D., Juhna T., (2004). Influence of hydraulic retention time to the biofilm growth in drinking water supply system // In: Proceedings, Annual 45th RTU Scientific Conference – Riga, 212-220.
- VI. Rubulis J., (2003). Current research about biological stability of drinking water in the Riga water supply system, Latvia // In: Proceedings, Annual LLU Scientific Conference “Research for rural development 2003” – Jelgava, 110 – 113.