

RĪGAS TEHNISKĀ UNIVERSITĀTE

Linda MEŽULE

**NEKULTIVĒJAMO *ESCHERICHIA COLI* NOZĪME
DZERAMĀ ŪDENS APGĀDES SISTĒMĀS**

Promocijas darba kopsavilkums

**SIGNIFICANCE OF NONCULTURABLE *ESCHERICHIA COLI*
IN DRINKING WATER SYSTEMS**

Summary of PhD thesis

Rīga 2011

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

Linda MEŽULE

Doktora studiju programmas „Siltuma, gāzes un ūdens inženiersistēmas” doktorante

**NEKULTIVĒJAMO *ESCHERICHIA COLI* NOZĪME DZERAMĀ ŪDENS
APGĀDES SISTĒMĀS**

Promocijas darba kopsavilkums

**SIGNIFICANCE OF NONCULTURABLE *ESCHERICHIA COLI* IN
DRINKING WATER SYSTEMS**

Summary of PhD thesis

Zinātniskais vadītājs/ Supervisor
Prof., Dr.sc.ing.
Tālis Juhna

Rīga 2011

Mežule L. Nekultivējamo *Escherichia coli*
nozīme dzeramā ūdens apgādes sistēmās.
Promocijas darba kopsavilkums.



Šis darbs izstrādāts ar Eiropas Sociālā fonda projekta «Atbalsts RTU doktora studiju īstenošanai» un ES 6. Ietvarprogrammas projekta „Technology enabled universal access to safe water – TECHNEAU” (Nr. 018320) atbalstu.

This work has been supported by the European Social Fund within the project «Support for the implementation of doctoral studies at Riga Technical University» and undertaken as a part of the research project “Technology enabled universal access to safe water – TECHNEAU” (Nr. 018320) which is supported by the European Union within the 6th Framework Programme.

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

Promocijas darbs inženierzinātņu doktora grāda iegūšanai tiek publiski aizstāvēts 2011.g. 16. decembrī 16:00 Rīgas Tehniskās universitātes Būvniecības fakultātē, Āzenes ielā 16, 250. auditorijā.

OFICIĀLIE RECENZENTI

Prof., Dr.habil.sc.ing. Daniels Turlajs
Rīgas Tehniskā universitāte

Prof., Dr.biol. Uldis Kalnenieks
Latvijas Universitāte

Prof., Dr.biol., Bill Keevil
University of Southampton, School of Biological Sciences

APSTIPRINĀJUMS

Apstiprinu, ka esmu izstrādājis doto promocijas darbu, kas iesniegts izskatīšanai Rīgas Tehniskajā universitātē inženierzinātņu doktora grāda iegūšanai. Promocijas darbs nav iesniegts nevienā citā universitātē zinātniskā grāda iegūšanai.

Linda Mežule(Paraksts)

Datums: 2011. gada 16. decembrī

Promocijas darbs ir uzrakstīts angļu valodā, satur ievadu, 5 nodaļas, vispārēju diskusiju un secinājumus, literatūras sarakstu, saīsinājumu sarakstu, 61 attēlu, 9 tabulas, kopā 152 lappuses. Literatūras sarakstā ir 276 nosaukumi.

SATURA RĀDĪTĀJS / TABLE OF CONTENTS

DARBA VISPĀRĒJS RAKSTUROJUMS.....	6
Tēmas aktualitāte.....	6
Darba mērķis un uzdevumi	7
Darba zinātniskā novitāte un praktiskais pielietojums.....	7
Darba struktūra un apjoms	9
LITERATŪRAS APSKATS.....	10
DARBĀ IZMANTOTĀS METODES	12
REZULTĀTI UN DISKUSIJA.....	14
<i>Escherichia coli</i> fizioloģisko stāvokļu novērtēšana	14
<i>Escherichia coli</i> neitralizācijas efektivitāte ar ķīmisko un mehānisko dezinfekciju	14
<i>Escherichia coli</i> dzeramā ūdens apgādes sistēmās un tās ietekme uz veselību	16
Labilo organisko savienojumu ietekme uz <i>Escherichia coli</i> spēju vairoties dzeramā ūdens apgādes sistēmās	18
SECINĀJUMI.....	20
GENERAL DESCRIPTION	21
Introduction - topicality.....	21
The objective and tasks	22
Scientific novelty and application	22
Scope of the work.....	24
BACKGROUND AND LITERATURE REVIEW	25
MATERIALS AND METHODS	27
RESULTS AND DISCUSSION	29
Assessment of <i>Escherichia coli</i> in different physiological states	29
Effectivity of chemical and mechanical disinfection on ability to neutralize <i>Escherichia coli</i>	29
Fate of <i>Escherichia coli</i> in water distribution networks and health risks associated with it	31
The effect of addition of labile organic carbon on <i>Escherichia coli</i> ability to divide in drinking water biofilms	33
CONCLUSIONS.....	35
PUBLIKĀCIJU SARAKSTS / LIST OF PUBLICATIONS	36
SAĪSINĀJUMI / ABBREVIATIONS	37
LITERATŪRAS SARAKSTS / REFERENCES	38

DARBA VISPĀRĒJS RAKSTUROJUMS

Tēmas aktualitāte

Vispārīgi pieņemts, ka fekālā piesārņojuma indikatororganisma - *Escherichia coli* klātbūtne ūdensapgādes sistēmās norāda uz nesenu piesārņojumu vai neefektīvu ūdens attīrīšanas procesu. Tomēr, ne vienmēr ir izdevies izskaidrot visus *E. coli* izraisītus uzliesmojumus [18] vai atsevišķus inficēšanās gadījumus [15]. Kā iespējamie iemesli tiek minēti:

1) Dažādo transporta mehānismu un atšķirīgās dezinfekcijas izturības dēļ, *E. coli* klātbūtne dzeramajā ūdenī ne vienmēr sakrīt ar patogēnu koncentrāciju [1];

2) Iespēja identificēt mikrobioloģisko piesārņojumu, izmantojot esošo rutīnas paraugu ievākšanas metodiku (atsevišķi ūdens paraugi no dažādām vietām apgādes sistēmā), ir zema [40];

3) Bojājumu vai ārēja stresa rezultātā daļu no *E. coli* nevar kultivēt standarta mikrobioloģiskajās barotnēs [34]. Promocijas darbā plašāk tiek aplūkota tieši šī faktora nozīme.

Zināms, ka ūdenī stresa apstākļos (zemas barības vielu koncentrācijas, oksidētāju, piem., hlors, klātbūtne) *E. coli* var nonākt nekultivējamā bet dzīvotspējīgā stāvoklī (*viable but non-culturable state*, VBNC) [26, 31], ko uzskata par šūnu izdzīvošanas stratēģiju [29]. Ūdens apgādes sistēmās esošā bioplēve, kas darbojas kā aizsargbarjera pret nelabvēlīgu apkārtējo vidi (aktīvais dezinfektants vai strauja apstākļu maiņa sistēmā), var kalpot kā izdzīvošanu veicinošs faktors. Atrodoties bioplēvē, šūnas var atgūt spēju vairoties [4, 42], kas var izraisīt to pastiprinātu atdalīšanos no bioplēves un tādējādi ietekmēt dzeramā ūdens patērētāju [8].

Darba mērķis un uzdevumi

Promocijas darba mērķis bija novērtēt nekultivējamās *Escherichia coli* nozīmi dzeramā ūdens apgādes sistēmās. Mērķa sasniegšanai tika izvirzīti sekojoši jautājumi:

- 1) Vai ķīmiskā un mehāniskā dezinfekcija var neitralizēt VBNC *E. coli*, ja tiek lietota tādā koncentrācijā, kas pieļaujama dzeramajam ūdenim?
- 2) Vai *E. coli* uzkrājas un izraisa ūdens piesārņojumu ūdensapgādes sistēmu bioplēvē?
- 3) Vai *E. coli* var vairoties ūdensapgādes sistēmu bioplēvē?

Lai atbildētu uz izvirzītajiem jautājumiem tika definēti sekojoši uzdevumi:

1. Atlasīt un pārbaudīt dažādas molekulārās metodes neliela skaita kopējo un nekultivējamo *E. coli* šūnu identificēšanai dzeramajā ūdenī un bioplēvē.
2. Eksperimentāli pārbaudīt mehāniskās (hidrodinamiskā kavitācija) un ķīmiskās (hlorēšana) dezinfekcijas efektivitāti *E. coli* dažādu fizioloģisko stāvokļu neitralizēšanai.
3. Lauka pētījumos analizēt *E. coli* koncentrācijas izmaiņas koncentrēta dzeramā ūdens un bioplēves paraugos.
4. Lauka pētījumos noteikt barības vielu ietekmi uz *E. coli* skaita izmaiņām dzeramā ūdens apgādes sistēmu bioplēvē.

Darba zinātniskā novitāte un praktiskais pielietojums

Escherichia coli piemērotība ūdens mikrobioloģiskās kvalitātes novērtēšanai tiek apšaubīta jau vairākus gadus [1]. Zināms, ka *E. coli* var ne tikai būt patogēna (O157:H7) [15], bet arī izdzīvot dzeramajā ūdenī un augt oligotrofā vidē laboratorijas apstākļos [42].

Promocijas darbs parāda, ka zemās koncentrācijas VBNC *E. coli* var būt sastopama arī visiem standartiem atbilstošā dzeramā ūdens apgādes sistēmā, un to koncentrācija ūdenī un bioplēvē palielinās atkarībā no ūdens uzturēšanās laika tīklā. Bez tam, mazinoties stresa apstākļiem, šīs baktērijas ir spējīgas augt. Kvantitatīvā mikrobioloģiskā riska novērtējuma (*quantitative microbial risk assesement*, QMRA), kas iekļauts arī Pasaules Veselības organizācijas (WHO) rekomendācijās par Ūdens drošības plānu ieviešanu [45], aprēķini parādīja, ka dzeramajā ūdenī sastopamās VBNC *E. coli* koncentrācijas uzrāda paaugstinātu risku, salīdzinot ar līdz šim analizētajām kultivējamām baktērijām.

Šobrīd visi inženierekonomiskie aprēķini par ūdens dezinfekcijas efektivitāti ir balstīti uz mikroorganismu spēju vairoties mikrobioloģiskajās barotnēs, kur, piemēram, *E. coli*, tiek uzskatīts par salīdzinoši jutīgu. Promocijas darbā iegūtie rezultāti parāda, ka, lai pilnībā neitralizētu *E. coli*, nepieciešamas daudz augstākas aktīvā dezinfektanta koncentrācijas un to iedarbība uz dažādiem šūnas dzīvotspējas parametriem ir atšķirīga.

Promocijas darba laikā iegūtie rezultāti tika ziņoti un apspriesti 10 starptautiskās konferencēs:

- 2007. g. no 10.-14. septembrim Tokijā, Japānā „14th International Symposium on Health-Related Water Microbiology”.
- 2007. g. no 10.-11. decembrim Rīgā, Latvijā „Advances and applications of FISH technology: drinking water, environmental and foodstuff analyses”.
- 2008. g. no 28.-30. maijam Edinburgā, Lielbritānijā „Water and Sanitation in International Development and Disaster Relief”.
- 2008. g. no 6.-8. oktobrim Minhenē, Vācijā „Biofilms III: 3rd International Conference”.
- 2009. g. 12. martā Bohumā, Vācijā „How dead is dead? Survival and final inactivation of microorganisms”.
- 2009. g. no 5.-7. oktobrim Singapūrā „Global Conference on Microbial Contaminants in Drinking Water”.
- 2010. g. no 2.-4. jūnijam Maskavā, Krievijā „Water and wastewater treatment plants in towns and communities of the XXI century: technologies, design & operation”.
- 2010. g. no 1.-3. septembrim Vinčesterā, Lielbritānijā „Biofilms IV”.
- 2011. g. no 6.-8. jūnijam Edinburgā, Lielbritānijā „Fecal Indicators: Problem or solution?”.
- 2011. G. no 16.-17. Jūnijam Tubingenā, Vācijā „How dead is dead II: The ins and outs of bacterial dormancy”.

Darba struktūra un apjoms

Promocijas darbs sastāv no ievada, 5 nodaļām, kopējās diskusijas un secinājumiem. 2. – 5. nodaļa sastāv no atsevišķa ievada, materiālu un metožu, rezultātu un diskusijas, kā arī secinājumu daļas. Promocijas darbs uzrakstīts uz 152 lapām ar 276 literatūras avotiem, 60 attēliem un 10 tabulām.

Pirmā nodaļa sastāv no vispārīga literatūras apskata par dzeramā ūdens sagatavošanu, nekultivējamiem mikroorganismiem, *E. coli* un tās īpašībām.

Otrajā nodaļā „*Escherichia coli* fizioloģisko stāvokļu novērtēšana” aprakstītas populārākās molekulārās metodes specifiskai *E. coli* identificēšanai vides paraugos, kā arī vairākas metodes šūnu aktivitātes novērtēšanai. Darba gaitā tika veikti pētījumi par šo metožu praktisko pielietojumu un rezultātu kvalitāti, kur labāko kombināciju izmantoja tālākajos pētījumos.

Trešajā nodaļā „*Escherichia coli* neitralizācijas efektivitāte ar ķīmisko un mehānisko dezinfekciju” laboratorijas pētījumu rezultātā tika noskaidrota trīs dezinfekcijas metožu efektivitāte un nepieciešamās devas, lai neitralizētu kultivējamās, dalīties spējīgās un metaboliski aktīvās *E. coli* šūnas.

Ceturtajā nodaļā „*Escherichia coli* dzeramā ūdens apgādes sistēmās un tās ietekme uz veselību” aprakstīti lauka pētījumi, kur gada laikā ievāca dzeramā ūdens un bioplēves paraugus no Rīgas dzeramā ūdens apgādes sistēmas. Paraugos tika noteikta kultivējamo un dalīties spējīgo šūnu koncentrācija. Lai identificētu draudus cilvēka veselībai, izmantojot lauka pētījumos noteikto šūnu koncentrāciju, tika veikti QMRA aprēķini.

Piektajā nodaļā „Labilo organisko savienojumu ietekme uz *Escherichia coli* spēju vairoties dzeramā ūdens apgādes sistēmās” lauka pētījumos tika veikts *E. coli* koncentrācijas izmaiņu monitorings Rīgas dzeramā ūdens apgādes tīkla vienā vietā. Pēc tam tika analizēta šo baktēriju spēja vairoties bioplēvē, ja sistēmai pievieno viegli noārdāmus organiskos savienojumus tādā koncentrācijā, kas raksturīga bioloģiski nestabilam ūdenim.

LITERATŪRAS APSKATS

Pasaulē ik gadu 1.8 miljoni cilvēku mirst no diarejas izraisītām saslimšanām [3, 44]. Neskatoties uz plašajām informācijas kampaņām un detalizētiem kvalitātes novērtēšanas standartiem, arī attīstītajās valstīs, joprojām ik gadu tiek reģistrēti daudzi dzeramā ūdens izraisīti saslimšanu gadījumi [6, 24, 35].

Eiropas Savienībā dzeramā ūdens kvalitāti kontrolē atbilstoši 98/83/EC direktīvai "Par dzeramā ūdens kvalitāti" [5, 27], kur galvenie nosakāmie mikrobioloģiskie rādītāji ir fekālā piesārņojuma indikatororganismi – visbiežāk *Escherichia coli*. Atbilstoši prasībām, 100 ml dzeramā ūdens parauga nedrīkst saturēt vairāk par 0 kvv *E. coli* [27]. Tiek uzskatīts, ka šo organismu klātbūtne dzeramajā ūdenī netieši norāda arī uz citu patogēnu klātbūtni, kurus lielās dažādības un sarežģītās identificēšanas dēļ atsevišķi nenosaka [5]. Testējamos paraugus (100 – 500 ml ūdens) ievāc dzeramā ūdens apgādes sistēmas atsevišķās vietās, ko nosaka ūdens piegādātājs atbilstoši saražotā ūdens daudzumam.

Parasti uzskata, ka *Shigella* spp., *Salmonella* spp., un citi patogēni nonāk dzeramā ūdens sistēmā fekālā piesārņojuma rezultātā, tomēr reizēm novēroti inficēšanās gadījumi arī kvalitatīvās ūdensapgādes sistēmās [11]. Noskaidrots, ka bieži vidē sastopamo patogēno mikroorganismu, un īpaši rezistentu viensūņu, skaits nesakrīt ar indikatororganismu koncentrācijām [1, 3] un bioplēves kā patogēnu aizsargbarjeras nozīme netiek pietiekoši novērtēta. Kā arī pierādīts, ka daļa no patogēniem vai fakultatīvi patogēniem mikroorganismiem, piemēram, *Pseudomonas* spp., *Mycobacter* spp., *Campylobacter* spp., *Legionella* spp., *Helicobacter* vai *Salmonella* spp., ir spējīgi vairoties ūdensapgādes sistēmās [25]. Vēl biežāk, nonākot oligotrofā vidē, šie mikroorganismi var pāriet dzīvotspējīgā, bet nekultivējamā stāvoklī (VBNC) [29]. Pierādīts, ka pat fekālā piesārņojuma indikatororganisms *E. coli* kļūst nekultivējams, ja ūdenī nonāk 4°C temperatūrā [26].

Pieņemts, ka atrodoties VBNC stāvoklī mikroorganismi nav kultivējami mikrobioloģiskajās barotnēs, tomēr saglabā savu metabolisko aktivitāti. Plašie pētījumi par VBNC šūnu fizioloģiju, bioķīmiju un izmaiņām gēnu līmenī, lielā mērā apstiprinājuši to nozīmi medicīnā, bioattīrīšanā un indikatororganismu pielietojumā [28]. Neskatoties uz to, ka zināms, ka kultivējami mikroorganismi var pāriet VBNC stāvoklī [2, 19, 30], to nozīme uz cilvēka veselību vēl joprojām nav pilnīgi izpētīta. Gadījumā, ja šādas šūnas būtu spējīgas atgūt savu kultivējamību, to nozīme būtu nepārprotama [22, 28]. Vēl pavisam neseno tika uzskatīts, ka *E. coli* nav spējīgas izdzīvot un vairoties apkārtējā vidē, piem., ūdenī, tomēr

pētījumi pierādījuši, ka tās ne tikai spējīgas izdzīvot (arī VBNC stāvoklī) [12, 39], bet var arī augt [42].

Droša dzeramā ūdens sagatavošanai, piegādei un uzraudzībai WHO iesaka ieviest Ūdens drošības plānus, kas paredz: 1) Dabas ūdeņu aizsardzību; 2) Ūdens attīrīšanu, lai maksimāli samazinātu piesārņojumu un 3) Ūdens atkārtotas piesārņošanās novēršanu uzglabāšanas, apgādes un uzturēšanas laikā [7]. Tieši pēdējā faktora nozīme tiek īpaši uzsvērta, kopš noskaidrots, ka piesārņojums ūdens apgādes sistēmās var nonākt ne tikai neefektīvas attīrīšanas rezultātā, bet arī caur tīklu, cauruļu savienojumu vietās, negatīva spiediena rezultātā, nepareizas sistēmas labošanas un uzturēšanas dēļ. Piesārņojums uzkrājas bioplēvē, un vēlāk atkārtoti nonāk sistēmā. Noskaidrots, ka, palielinoties ūdens apgādes sistēmu vecumam, un samazinoties ūdens bioloģiskajai stabilitātei, palielinās risks patogēnu nonākšanai sistēmā caur ūdensapgādes tīklu [9]. Vispārējai mikrobioloģiskā piesārņojuma risku novērtēšanai un infekcijas varbūtības noteikšanai izmanto QMRA metodiku, kas iekļauj riska identificēšanu, efektīvas devas noteikšanu, riska raksturošanu un riska vadību [23].

Tā kā patiesā *E. coli* nozīme dzeramā ūdens apgādes sistēmās vēl joprojām nav noteikta, pasākumi ūdens aizsardzībai (Ūdens drošības plāni) var būt nepietiekami, un tādējādi nevēlami ietekmēt cilvēka veselību. Vēl jo vairāk, tā kā visi inženierekonomiskie aprēķini par ūdens attīrīšanu (daudzpakāpju attīrīšanas sistēmai) un dezinfekcijas efektivitāti (CT vērtības) ir balstīti uz datiem, kas iegūti mikroorganismu kultivēšanas rezultātā, tie var nebūt precīzi.

DARBĀ IZMANTOTĀS METODES

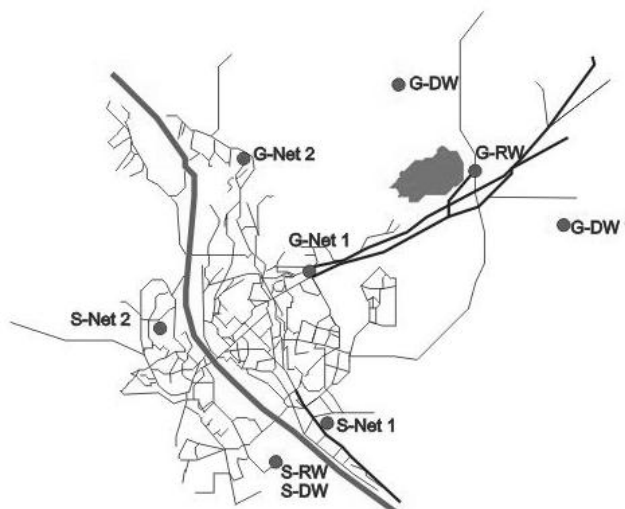
Kopējā un VBNC *E. coli* identificēšanai dzeramajā ūdenī un bioplēvē tika pārbaudīta vairāku dzīvotspējas noteikšanas metožu piemērotība lietošanai kopā ar fluorescento *in situ* hibridizāciju (FISH). Tika analizēta šūnu membrānas integritāte (Live/Dead® BacLight krāsošanas metode), enzimatiskā aktivitāte (esterāzes aktivitāte), elpošanas aktivitāte (CTC metode) un dalīšanās potenciāls (tiešās dzīvotspējas uzskaitīšanas metode - *direct viable count*, DVC). FISH metodei izmantoja iepriekš aprakstītu PNA zondi [17, 33].

Laboratorijas pētījumos tika veikti trauku eksperimenti dezinfekcijas efektivitātes noskaidrošanai un pielietoti reaktori *E. coli* dzīvotspējas izmaiņu novērtēšanai. Reaktorus uzpildīja ar sterilu, *E. coli* nesaturošu mākslīgi pagatavotu ūdeni, inokulēja ar *E. coli* un uzturēja vairākas dienas (ūdens uzturēšanās laiks – 16.7 stundas, samaisīšanās ātrums – 0.1 m/s, 20°C). Regulāros laika intervālos tika ievākti bioplēves un ūdens paraugi un noteikts kopējais *E. coli* skaits (ar FISH un PCR), dalīties spējīgās (DVC-FISH) un kultivējamās šūnas (membrānu filtrācijas metode atbilstoši ISO [16, 27]). Kopējā mikroorganismu skaita noteikšanai un populācijas monitoringam tika veiktas ATP, AOC un DAPI krāsošanas analīzes.

Elektroķīmiskās dezinfekcijas efektivitātes novērtēšana, lai neitralizētu *E. coli* (tūrkultūra, ~ 10⁶ šūnas/ml), tika veikta īpaši pagatavotā elektrolīzes šūnā, kas sastāvēja no TiO_{2n-1} keramiskā anoda (virsmas laukums 12.1 cm²) un nerūsējošā tērauda katoda (virsmas laukums 18 cm²). Apstrādi veica 23 ± 2 ° C temperatūrā, pH 7. Strāvas stiprums, apstrādes laiks un hlorīda jonu koncentrācija (0 – 250 mg/l) mainījās atkarībā no eksperimenta. Līdzīgi tika veikti pētījumi par hidrodinamiskās kavitācijas ietekmi uz *E. coli* (tūrkultūra, ~ 10⁶ šūnas/ml) dzīvotspēju. Paraugus apstrādāja kavitācijas iekārtā, kas sastāvēja no rezervuāra (2 litri) un kavatora (plāksne ar savstarpēji rotējošiem diskiem). 3 līdz 9 minūšu ilga apstrāde (līdz ūdens temperatūra sistēmā sasniedza 38°C) tika veikta pie 0.14 W/cm³ (8.7 A, 220 V) līdz 0.49 W/cm³ (8.7 – 9.3 A, 220 V) jaudas blīvuma. Apstrādātos un kontroles paraugus no abām sistēmām tālāk analizēja ar CTC, DVC-FISH un kultivēšanas metodēm.

Lauka pētījumos sezonāli ievāca bioplēves paraugus no neattīrīta un attīrīta dzeramā ūdens sistēmām (1. att.). Tajās pašās vietās ievāca koncentrētus ūdens paraugus [41]. Divas nedēļas vecos bioplēves paraugos un aptuveni 400 reizes koncentrētos ūdens paraugos tika noteikts kopējais mikroorganismu skaits, heterotrofo baktēriju koncentrācija, kopējā, dalīties spējīgo un kultivējamo *E. coli* koncentrācija. Dzīvotspējīgo *E. coli* koncentrācijas ietekmes novērtēšanu uz cilvēka veselību veica izmantojot QMRA aprēķinus (Monte Carlo simulācija

ar Oracle©Crystal Ball datorprogrammu), kur tika noteikta iespējamā dienas un gada inficēšanās varbūtība.



1. attēls. Rīgas dzeramā ūdens apgādes sistēma ar 12 bioplēves un ūdens paraugu ievākšanas vietām, ieskaitot ūdeni pirms attīrīšanas (G-RW – neattīrīts ezera ūdens; S-RW - neattīrīts virszemes ūdens), attīrīšanas procesa laikā (S-OZ – virszemes ūdens pēc otrās ozonēšanas; S-RF – virszemes ūdens pēc pirmajiem ātrfiltriem, S-BF – virszemes ūdens pēc biofiltriem) un pēc attīrīšanas (S-DW – virszemes ūdens pēc pēdējās hlorēšanas; G-DW – infiltrēts pazemes ūdens pēc pēdējās hlorēšanas), kā arī ūdeni no tīkla – S-NET1, S-NET2, G-NET1 un G-NET2. Cipari 1 un 2 norāda uz ūdens uzturēšanās laiku tīklā, kur “1” reprezentē īsāko uzturēšanās laiku.

Lai noteiktu *E. coli* koncentrācijas izmaiņas dzeramajā ūdenī, lauka pētījumos ūdensapgādes tīkla vienā vietā (pazemes ūdens avots, ~ 28 h ūdens uzturēšanās laiks, AOC ~ 100 $\mu\text{gC/l}$) kopumā trīs atsevišķas reizes tika pieslēgts pilnīgas sajaukšanās tipa reaktors un darbināts 5 nedēļas. Iknedēļas analīzēs bioplēvē un ieplūstošajā un izplūstošajā ūdenī noteica kopējās populācijas izmaiņas (kopējais mikroorganismu skaits, ATP) un *E. coli* koncentrāciju (FISH, DVC-FISH un kultivējamās šūnas). Pēc tam sistēmai pieslēdza un vienādos apstākļos darbināja divus reaktorus, līdz maksimālai *E. coli* koncentrācijai bioplēvē (dati no iepriekšējiem eksperimentiem). Vienam no reaktoriem pievienoja ultra-filtrētu notekūdeni (<100 šūnas/l, < 5 *E. coli* šūnas/l) vai sterilu glikozes-sāļu šķīdumu un dozēja tā, lai galējā AOC koncentrācija ūdenī nepārsniegtu 500 $\mu\text{gC/l}$. Notekūdens vai glikozes dozēšana notika attiecīgi 14 vai 8 dienas. Kopējās populācijas un *E. coli* koncentrācijas izmaiņu dinamika tika analizēta kā iepriekš.

REZULTĀTI UN DISKUSIJA

***Escherichia coli* fizioloģisko stāvokļu novērtēšana**

Šobrīd noteikumi dzeramā ūdens kvalitātes kontrolei (98/83/EC) paredz tikai kultivējamo *E. coli* uzskaitīšanu, tāpēc, lai noteiktu kopējo *E. coli* koncentrāciju dzeramajā ūdenī, nepieciešams lietot citas, piemēram, molekulārās, metodes.

Promocijas darba otrajā nodaļā aprakstīta fluorescentās *in situ* hibridizācijas, kas pamatojas uz specifisku fluorescentas zondes piesaistīšanos šūnas rRNS, piemērotība dzeramā ūdens un bioplēves paraugu analizēšanai. Darba gaitā tika veiktas izmaiņas esošajā protokolā, kas paredzēts PNA zondēm [20, 33], lai samazinātu paraugu apstrādei nepieciešamo laiku, samazinātu šūnu skaita zudumus un autofluorescenci, kā arī samazinātu mikroskopijas metožu noteikšanas robežu. Rezultāti parādīja, ka pat 1.5 stundu laikā ir iespējams iegūt paraugus ar intensīvi fluorescējošu *E. coli* un zemu fona fluorescenci. Neskatoties uz to, ka FISH metode ir augsti specifiska un jutīga, tā tieši neraksturo identificētās šūnas dzīvotspēju, jo rRNS zināmu laiku var būt sastopamas arī mirušās šūnās [38]. Lai varētu diferencēt dzīvotspējīgās – metaboliski aktīvās šūnas, tika aplūkotas vairākas dzīvotspējas noteikšanas metodes un to potenciālais pielietojums kopā ar FISH metodi. Eksperimentālie pētījumi parādīja, ka visticamākie un vieglāk interpretējamie rezultāti iegūstami, ja tiek lietota tiešās dzīvotspējas uzskaites (DVC) metode. Darba gaitā fluorescentās mikroskopijas tehnika tika attīstīta līdz tādām līmenim, ka, izmantojot DVC-FISH metodi, parauga noteikšanas robeža bija tikai 5 šūnas.

***Escherichia coli* neitralizācijas efektivitāte ar ķīmisko un mehānisko dezinfekciju**

Attīrot dzeramo ūdeni, kā pēdējo drošības barjeru pirms ūdens nonākšanas sistēmā izmanto dezinfekciju. Ūdensapgādes tīklā aktīvais dezinfektants pasargā ūdeni no neliela piesārņojuma un mikroorganismu savairošanās [11, 45]. Šobrīd visi dzeramā ūdens dezinfekcijas efektivitātes inženierekonomiskie aprēķini ir balstīti uz mikroorganismu spēju vairoties barības vielām bagātās barotnēs, un fekālā piesārņojuma indikatororganisms *E. coli* tiek uzskatīts par viegli neitralizējamu [43]. Tomēr plašas informācijas par dezinfekcijas devām dažādu *E. coli* metabolisko stāvokļu neitralizācijai nav.

Otrajā nodaļā tika izvērtēta ķīmiskās un fizikālās dezinfekcijas efektivitāte, lai efektīvi neitralizētu *E. coli*. Hlorēšanas eksperimentu rezultāti parādīja, ka apstrādājot *E. coli* ar 0.54 mg/l hlora (kopējais) jau pēc 1 minūtes netika konstatētas kultivējamas *E. coli* šūnas, tomēr 15% vēl joprojām saglabāja savu metabolisko aktivitāti (elpošanas spēju).

Pirmās kārtas kinētiskās konstantes k (hlorā patēriņš) aprēķini parādīja, ka k vērtības metaboliskai aktivitātei, dalīšanās potenciālam un kultivējamībai ir attiecīgi 2.2, 2.3 un 13.6 min^{-1} . Līdzīgas k vērtības kultivējamām *E. coli* novērotas arī iepriekš [13, 36].

Pieņemot, ka kopējā hlorā koncentrācija laikā nemainās, tika aprēķinātas CT vērtības 99% *E. coli* šūnu neitralizēšanai (1. tabula).

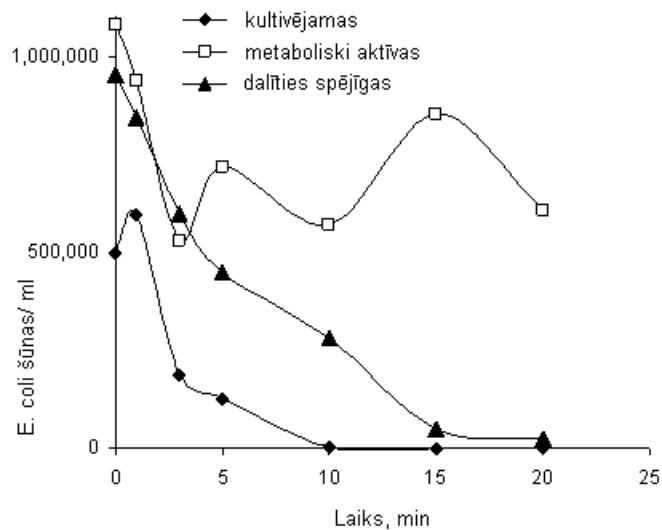
1. tabula

CT vērtības, lai neitralizētu *E. coli* dzīvotspēju par 2-log (99%).

Dzīvotspējas stāvoklis	CT vērtība (mg/l min^{-1})
Kultivējamība	0.27
Dalīšanās potenciāls	1.08
Metaboliskā aktivitāte	1.10

CT vērtību salīdzinājums dažādiem metaboliskajiem stāvokļiem parādīja, ka, lai pilnībā neitralizētu *E. coli* metabolisko aktivitāti un potenciālu dalīties, nepieciešamas vairāk kā četras reizes augstākas hlorā devas nekā tiek rekomendēts.

Tālākajos pētījumos *E. coli* neitralizēšanai tika analizēta elektroķīmiskās dezinfekcijas efektivitāte, kur aktīvais dezinfektants (hlor), elektrolīzes procesa laikā veidojas no pašā ūdenī esošajiem hlorā joniem. Rezultāti parādīja, ka aktīvo hloru iespējams iegūt arī no tādiem ūdens paraugiem, kur hlorā jonu koncentrācija nepārsniedz ļoti tīros ūdeņos sastopamās koncentrācijas. Ievietojot paraugus sterilā buferētā ūdenī ar 6.8 mg/l hlorā jonu koncentrāciju un apstrādājot ar 0.002 A strāvu, kultivējamo un dalīties spējīgo *E. coli* šūnu koncentrācija eksponenciāli samazinājās (pirmās kārtas ātruma konstante). Vienlaikus paraugi saturēja 0.5 mg/l aktīvā hlorā. Līdzīgs samazināšanās ātrums tika novērots gan kultivējamām, gan dalīties spējīgām šūnām (2. att.). Pēc 15 vai 20 minūšu apstrādes attiecīgi netika identificētas nevienas kultivējamas vai dalīties spējīgas šūnas. Cita koncentrācijas samazināšanās tika novērota šūnu metaboliskajai aktivitātei – straujš samazinājums pirmajās trīs apstrādes minūtēs un praktiski nemainīgs visu atlikušo apstrādes laiku.



2. attēls. Apstrādes laika ietekme uz dezinfekcijas efektivitāti (6.8 mg/l hlora joni, 0.002 A strāvas stiprums, pH 7 ± 0.2 , $t^\circ = 23 \pm 2^\circ\text{C}$).

No visām testētajām dezinfekcijas metodēm viszemāko efektivitāti uzrādīja fizikālā dezinfekcija (hidrodinamiskā kavitācija), jo neatkarīgi no apstrādes režīma neaktīvo – mirušo šūnu koncentrācija palielinājās tikai par 10%. Tomēr, lai apturētu *E. coli* šūnu dalīšanos, apstrāde ar hidrodinamisko kavitāciju bija efektīva. 3 minūšu apstrāde 490 W/l režīmā samazināja dalīties spējīgo *E. coli* koncentrāciju par 75%, izveidojot lielu metaboliski aktīvu bet dalīties nespējīgu *E. coli* populāciju. Šādi novērojumi aprakstīti jau iepriekš un daļēji tiek izskaidroti ar strauju stresa stāvokļa iestāšanos šūnām [14]. Kaut arī *E. coli* pēc apstrādes ar hidrodinamisko kavitāciju nebija spējīgas dalīties, tās saglabāja savu metabolisko aktivitāti, norādot uz atšķirīgo dzīvotspējas stāvokļu dažādiem neitralizēšanas mehānismiem.

***Escherichia coli* dzeramā ūdens apgādes sistēmās un tās ietekme uz veselību**

Laboratorijas pētījumi par *E. coli* uzvedību nonākot oligotrofā vidē parādīja, ka, inokulējot sistēmu ar lielu *E. coli* koncentrāciju, vairāk nekā 90 % šūnu pirmajās 24 stundās bija sastopamas ūdens fāzē, tomēr eksperimenta laikā *E. coli* koncentrācija ūdenī samazinājās par 1 kārtu un vienlaikus uzkrājās bioplēvē. Sākotnēji DVC un kultivējamo *E. coli* koncentrācija bija vienāda, tomēr pēc 24 stundām tikai 10 % no dalīties spējīgām *E. coli* bija kultivējamas. Pēc četrām dienām reaktorā netika konstatētas kultivējamas *E. coli*, kamēr dalīties spējīgo šūnu koncentrācija samazinājās tikai nedaudz un pat tika novērots neliels augšanas ātrums bioplēvē ($\sim 0.03 \text{ h}^{-1}$), norādot uz bioplēves analīžu nozīmīgumu un tiešo identificēšanas metožu praktisko pielietojumu dzeramā ūdens kvalitātes kontrolē.

Lauka pētījumi par VBNC *E. coli* sastopamību neattīrītā un attīrītā ūdenī parādīja, ka attīrīšanas process ir pietiekoši efektīvs, lai samazinātu *E. coli* koncentrāciju par 3 kārtām. Tikko attīrītā ūdenī dalīties spējīgo *E. coli* koncentrācija nepārsniedza 0/1000 ml (2. tabula), kas sakrita ar kultivēšanas metožu rezultātiem. FISH analīžu rezultāti tīklā un, tūlīt pēc attīrīšanas parādīja, ka katrs divas nedēļas vecas bioplēves cm² satur vismaz 5 *E. coli* šūnas (2. tabula) un, ka visi bioplēves un 25 ūdens paraugi bija *E. coli* pozitīvi. No visām bioplēvē esošajām FISH pozitīvajām *E. coli* šūnām 53 % bija dalīties spējīgas. Tajā pašā laikā ūdenī identificēja tikai ļoti nelielu kultivējamo *E. coli* skaitu, un no bioplēves neizdalīja nevienu kultivējamu *E. coli*.

2. tabula

Kopējā kultivējamo, FISH pozitīvo un dalīties spējīgo (DVC pozitīvo) *Escherichia coli* koncentrācija bioplēves un ūdens paraugos.

Parauga ņemšanas vieta	Parauga veids*	Kultivējamās <i>E. coli</i> , kvv/cm ² vai kvv/l**	FISH pozitīvās <i>E. coli</i> , šūnas/cm ² vai šūnas/l	DVC pozitīvās <i>E. coli</i> , šūnas/cm ² vai šūnas/l
S-RW	Ū	26.74	n/d	(2.52 ± 0.17)*10 ³
	B	0	44.21 ± 34.72	1.99 ± 2.54
S-DW	Ū	0	n/d	0
	B	0	8.40 ± 3.92	2.95 ± 5.14
S-NET1	Ū	0	n/d	0.93 ± 1.61
	B	0	111.58 ± 57.87	45.20 ± 30.25
S-NET2	Ū	0.13	n/d	9.30 ± 4.13
G-RW	Ū	30.24	n/d	(2.99 ± 0.94)*10 ³
	B	0	9.39 ± 1.67	0.66 ± 0.85
G-DW	Ū	0	n/d	1.01 ± 1.75
G-DW [^]	Ū	0	n/d	0
	B	0	14.44 ± 4.94	3.54 ± 4.79
G-NET1	Ū	0.06	n/d	0.94 ± 1.62
	B	0	70.62 ± 19.97	84.75 ± 57.37
G-NET2	Ū	0.006 ± 0.01	103.97 ± 20.05	52.41 ± 58.72

Norādītās vērtības ir vidējais no skaitu no četriem paraugu ievākšanas periodiem a standartnovirzi, kas reprezentē minimālo un maksimālo vērtību.

* Ū – ūdens, B- bioplēve

** Bioplēves paraugiem rezultāts tiek izteikts kā kvv vai šūnas uz cm² virsmas; ūdens paraugiem kā kvv vai šūnas uz L ūdens.

N/D – netika noteikts

Pētījumi par *E. coli* koncentrācijas izmaiņām virszemes un pazemes ūdenī parādīja, ka dzīvotspējīgo šūnu skaits pieaug palielinoties ūdens uzturēšanās laikam neatkarīgi no sezonas (2. tabula). Abiem ūdens veidiem, daudz izteiktāka skaita palielināšanās tika novērota bioplēvē nevis ūdens fāzē. Dzīvotspējīgo un kultivējamo *E. coli* skaita korelācija ūdenī netika novērota, kā tas iepriekš aprakstīts dabas ūdeņiem [12]. Augošās *E. coli* koncentrācijas daļēji izskaidrojamas ar to rezistenci pret dezinfekciju, nepietiekamām aktīvā

dezinfektanta devām tīklā un zemu plēsēju daudzumu [37, 46]. Tālāka šo šūnu atdalīšanās no bioplēves [32] varētu radīt nevēlamu ietekmi uz cilvēka veselību, īpaši gadījumos, ja VBNC stāvoklī atrodas arī patogēnās *E. coli* [19].

Lai novērtētu VBNC *E. coli* ietekmi uz cilvēku veselību, QMRA analīzes tika veiktas ūdens paraugiem, kas ievākti tīklā no G-NET2. Uzņemto devu aprēķināja kā dalīties spējīgo vai kultivējamo *E. coli* daudzumu, kas uzņemts iedzerot. Tika veiktas simulācijas diviem variantiem, pirmkārt, ja visas uzskaitītās šūnas ir augsti patogēnas (infekciozā deva < 100 šūnas), un otrkārt, ja infekciozā deva ir augsta (> 10⁶ šūnas). Iegūtie aprēķini parādīja, ka pirmajā gadījumā risks ir ļoti augsts, un pat aprēķinos izmantotā kultivējamo šūnu koncentrācija pārsniedz pieļaujamo risku par divām kārtām. Otrajā gadījumā, ja uzskaitītās *E. coli* nav izteikti patogēnas, inficēšanās risks no kultivējamo šūnu koncentrācijas ir zems, bet nedaudz pārsniedz pieļaujamo normu dalīties spējīgo šūnu gadījumā. Ietekmes faktoru analīzes parādīja, ka neatkarīgi no izvēlētās simulācijas, 95 % gadījumu iegūto rezultātu ietekmē šūnu vai kvv koncentrācija, nevis uzņemtais ūdens daudzums.

Labilo organisko savienojumu ietekme uz *Escherichia coli* spēju vairoties dzeramā ūdens apgādes sistēmās

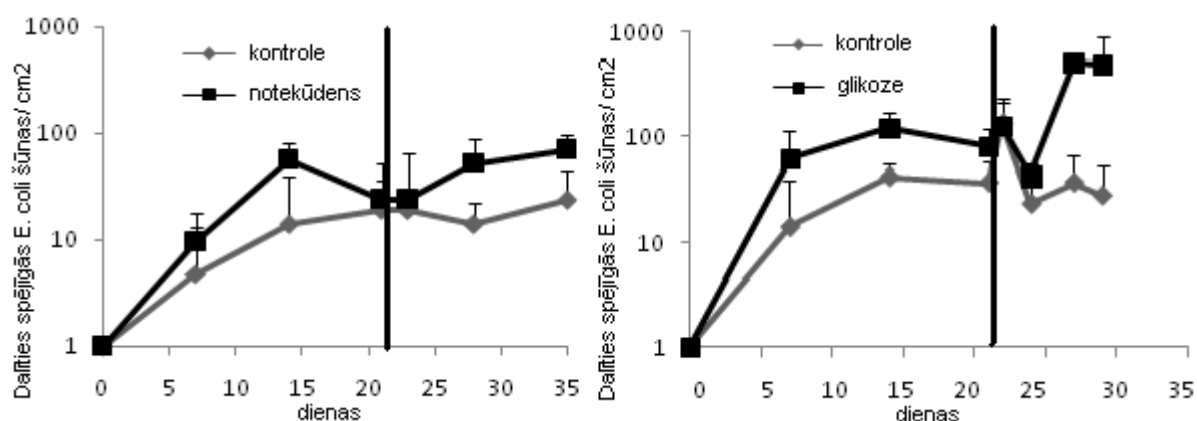
Promocijas darba 5. nodaļā tika analizēta viegli noārdāmo organisko savienojumu ietekme uz dzeramā ūdens apgādes tīklā esošām dzīvotspējīgām un kultivējamām *E. coli*. Koncentrācijas izmaiņu novērtēšanai izvēlējās vietu Rīgas ūdensapgādes tīklā (G-NET2) ar ūdens uzturēšanās laiku vismaz 28 stundas, un augstāko *E. coli* koncentrāciju atbilstoši 4. nodaļā iegūtajiem rezultātiem. Atšķirībā no iepriekšējiem pētījumiem [2, 10, 37], netika izmantotas iepriekš mikrobioloģiskajās barotnēs izolētas *E. coli* kultūras un veikta sistēmas papildināšana ar *E. coli* šūnām.

Piecu nedēļu koncentrācijas izmaiņu novērošana parādīja, ka viens dzeramā ūdens ml satur vidēji vienu *E. coli* šūnu, un var sastādīt līdz pat 1 % no kopējā šūnu skaita. Neskatoties uz nedaudz palielināto *E. coli* koncentrāciju reaktora izplūdē, aprēķinātā atšķirība nebija būtiska ($P \geq 0.05$).

E. coli koncentrācijas izmaiņu novērtēšana bioplēvē parādīja, ka visaugstākā *E. coli* koncentrācija ir sastopama pēc 3 nedēļām, kam seko tālāka skaita samazināšanās. Vidēji 58 ± 23 % no visām bioplēvē uzskaitītajām *E. coli* bija dalīties spējīgas. Vienlaikus *E. coli* koncentrācija bioplēvē nepārsniedza 0.0047% no kopējā baktēriju skaita. Vidējā DVC pozitīvo *E. coli* skaita salīdzinājums trīs atsevišķos pētījumos (atšķirīgos laikos) parādīja, ka

iegūtais DVC pozitīvo *E. coli* skaits būtiski neatšķiras ($P \geq 0.05$), kas norāda uz novērojuma sistemātiskumu un DVC-FISH metodes piemērotību šādu pētījumu veikšanā.

Tā kā maksimālā *E. coli* koncentrācija tika novērota pēc 3 nedēļām, šis atskaites punkts tika izmantots tālākajos pētījumos par labilo organisko savienojumu ietekmi. Tīklam pievienoja divus reaktorus, kuros pirmajās trīs nedēļās netika novērotas būtiskas atšķirības DVC pozitīvo *E. coli* koncentrācijā ($P = 0.16$). Tad vienam no reaktoriem 14 dienas tika dozēts ultra-filtrēts notekūdens (beigu AOC $\sim 500 \mu\text{gC/l}$). Dozēšanas rezultātā kopējo mikroorganismu skaits izplūdē un bioplēvē palielinājās tikai divas reizes un pavisam nedaudz palielinājās dzīvotspējīgo *E. coli* koncentrācija bioplēvē (3.att. pa kreisi) ($P \geq 0.05$). Kontroles reaktorā (bez dozēšanas) nenovēroja kopējā *E. coli* skaita palielināšanos, kā arī ieplūdes un izplūdes ūdens analīzes neuzrādīja *E. coli* augšanu.



3. attēls. Dalīties spējīgo (DVC pozitīvo) *E. coli* koncentrācija bioplēvē divos identiskos Propella™ reaktorus. Kontroles – nedozēts reaktors (pelēka līnija) un reaktors, kam dozēts vai nu notekūdens (pa kreisi) vai glikozes-sāļu šķīdums (pa labi). Vertikālā melnā līnija reprezentē dozēšanas uzsākšanas brīdi vienā no reaktoriem. Standartnovirze reprezentē datu izkliedi starp trīs paraugiem.

Tālākai viegli noārdāmo savienojumu ietekmes novērtēšanai tika uzstādīta vēl viena reaktoru sistēma un vienādos apstākļos darbināta 3 nedēļas. Tad vienam no reaktoriem tika dozēts sterils glikozes-sāļu šķīdums (beigu AOC $\sim 500 \mu\text{gC/l}$). Rezultāti parādīja, ka astoņu dienu laikā kopējais mikroorganismu skaits dozētā reaktora bioplēvē un izplūdes ūdenī palielinājās par 1 kārtu. Tajā pašā laikā dzīvotspējīgo *E. coli* koncentrācija bioplēvē palielinājās 6 reizes un pieauga dalīšanās potenciāls (3. att. pa labi) ($P \leq 0.05$). Vienlaikus koncentrācijas pieaugums kontroles reaktorā netika novērots.

Dzīvotspējīgo *E. coli* koncentrācija ar glikozi dozētā reaktora izplūdes ūdenī palielinājās par nepilnu vienu kārtu (3. att. pa labi), tomēr visā sistēmas darbības laikā no reaktora bioplēves ar standarta kultivēšanas metodēm netika izolēta neviena *E. coli*.

SECINĀJUMI

1. Ķīmiskās (hlorēšana) un mehāniskās (kavitācija) dezinfekcijas metodes bija pietiekoši efektīvas, lai neitralizētu kultivējamās *E. coli* šūnas. Lai pilnībā neitralizētu šūnu metabolisko aktivitāti un dalīšanās potenciālu bija nepieciešamas daudz augstākas aktīvā dezinfektanta devas. Noteiktās CT vērtības pilnīgai *E. coli* neitralizēšanai ar hlorēšanu bija lielākas par $1.0 \text{ mgCl/l min}^{-1}$, kas vismaz divas reizes pārsniedz pieļaujamās aktīvā dezinfektanta devas ūdensapgādes tīklā.

2. Neatkarīgi no dažādajiem neitralizēšanas ātrumiem un devām hlorēšanai, elektroķīmiskajai dezinfekcijai un hidrodinamiskajai kavitācijai, tika novērota vienāda neitralizēšanas tendence. Vispirms samazinājās šūnu kultivējamība, pēc tam dalīšanās potenciāls un tikai tad šūnu metaboliskā aktivitāte, tāpēc kultivēšanas pielietojums dezinfekcijas efektivitātes novērtēšanā nevar būt uzskatāms par pietiekoši reprezentatīvu.

3. Kaut arī tikai neliels daudzums kultivējamo *E. coli* (0.13 kvv/l) ir sastopams visiem standartiem atbilstošas dzeramā ūdens apgādes sistēmas ūdenī un neviena bioplēvē, tika noskaidrots, ka bioplēve satur 1 – 50 dalīties spējīgas *E. coli* šūnas/cm² (~ 53% no kopējā *E. coli* šūnu skaita bioplēvē) ar tendenci koncentrācijai palielināties pieaugot ūdens uzturēšanās laikam sistēmā neatkarīgi no sezonas.

4. Lai gan aprēķinātais inficēšanās risks no kultivējamām un dalīties spējīgām *E. coli* dzeramajā ūdenī nav liels, vidējais ikgadējais risks patērējot dzīvotspējīgas *E. coli* šūnas divas reizes pārsniedza pieļaujamo normu, norādot uz iespējamu inficēšanās risku lietojot *E. coli* saturošu dzeramo ūdeni.

5. Labilo organisko savienojumu koncentrācijas palielināšana dzeramajam ūdenim līdz koncentrācijai, kas sastopama bioloģiski nestabilā ūdenī, palielināja dalīties spējīgo *E. coli* koncentrāciju bioplēvē sešas reizes, norādot uz *E. coli* spēju augt, mainoties barības vielu koncentrācijai ūdenī.

GENERAL DESCRIPTION

Introduction - topicality

Traditionally the occurrence of fecal indicator organism *E. coli* in the network is linked to the recent pollution of source or ineffective treatment, thus, it is regarded as a conservative tracer. However, occasionally this approach has not been able to explain sporadic contamination cases of drinking water [15] and avoid waterborne outbreaks, including several major ones [18]. The possible reasons for these failures are:

1) The presence of *E. coli* does not always correlate with other pathogens due to their different rates of transport in aquatic environment and resistance to disinfection [1],

2) The probability of detecting microbial pollution by routine sampling (grab water samples in several locations of water distribution networks) is estimated to be low [40] and

3) Some of *E. coli* could be injured or stressed and unable to reproduce on routine growth media used for their detection [34]. The importance of this factor is the focus of this Thesis.

Under the stress, such as low nutrient concentration and presence of oxidants (e.g. chlorine) in the water, *E. coli* can attain a state of non-cultivability often referred as viable but not culturable (VBNC) [26, 31] which is believed to be a survival strategy [29]. Additional factor supporting their survival in drinking water systems is provided by the biofilm, where these bacteria can be entrapped and protected from unfavorable conditions (disinfectant residual or rapid changes in the system itself) and again show growth [4, 42]. Further their discharge in the water, can then pose a health risk for the consumer [8].

The objective and tasks

The overall objective of this thesis was to assess the significance of non-culturable *Escherichia coli* in drinking water systems. The assessment was limited to answering to the following questions:

- (1) Is chemical and mechanical disinfection able to neutralize VBNC *E. coli* at the doses permissible for drinking water treatment?
- (2) Is *E. coli* accumulating the biofilm and can it act as a source of secondary contamination of drinking water?
- (3) Is *E. coli* able to multiply in biofilms of the drinking water distribution networks?

To answer the questions following **tasks** were defined:

1. To select and evaluate a molecular based method for enumeration of low number of total and non-culturable *E. coli* in water and biofilm samples.
2. To test the effect of mechanical (hydrodynamic cavitation) and chemical (chlorination) disinfection on the viability of *E. coli* in batch scale studies.
3. To monitor of *E. coli* concentration dynamics in full scale studies by analyzing water concentrates and biofilm samples.
4. To determine the effect of addition of nutrients on the amount of *E. coli* in the reactor which is connected to a water distribution network of a large city.

Scientific novelty and application

The true applicability of *E. coli* as an indicator of fecal pollution is under doubt for many years [1]. Apart from existence of pathogenic strains (O157:H7) [15], it has been shown that *E. coli* is able to survive in drinking water and can show growth in laboratory based oligotrophic conditions [42].

This Thesis shows that low concentration of VBNC *E. coli* can be found in drinking water distribution system meeting all standards and their concentration in the biofilm and the water increase with water residence time in the network. Moreover, these bacteria found in the network can show growth when opposed to more favorable conditions. Quantitative microbial risk assessment (QMRA as a part of Water Safety Plans) [45] on the amount of water based *E. coli* showed that VBNC forms contribute to much higher risk than traditionally analyzed culturable cells.

At the moment all engineering calculations on disinfection effectivity are based on *E. coli* ability to grow on nutrient rich media, however, the data obtained in this Thesis show that much higher disinfectant concentrations are needed to fully inactivate *E. coli* (no signs of

metabolic activity) and the inactivation mechanisms of multiple viability states (cultivability, ability to divide and respire) are different.

The results of the thesis have been reported and discussed in 10 international conferences:

- “14th International Symposium on Health-Related Water Microbiology” in Tokyo, Japan, 10-14 September, 2007.
- “Advances and applications of FISH technology: drinking water, environmental and foodstuff analyses” in Latvia, Riga, 10-11 December 2007.
- “Water and Sanitation in International Development and Disaster Relief” in UK, Edinburgh, 28-30 May, 2008.
- “Biofilms III: 3rd International Conference” in Germany, Munich, 6 -8 October, 2008.
- “How dead is dead? Survival and final inactivation of microorganisms” in Germany, Bochum, 12 March 2009.
- “Global Conference on Microbial Contaminants in Drinking Water” in Singapore, 5-7 October, 2009.
- “Water and wastewater treatment plants in towns and communities of the XXI century: technologies, design & operation” in Russia, Moscow, 2-4 June, 2010.
- “Biofilms IV” in United Kingdom, Winchester, 1.-3. September, 2010.
- “Fecal Indicators: Problem or solution?” in United Kingdom, Edinburgh, 6-8 June, 2011.
- “How dead is dead II: The ins and outs of bacterial dormancy” in Germany, Tübingen 16-17 June, 2011.

Scope of the work

The thesis consists of: General introduction, Background, General discussion, General conclusions and 4 chapters with individual introduction, materials and methods, results and discussion and conclusion parts. There are 152 pages with 276 references, 60 figure and 10 tables in the thesis.

Chapter 1 involves general literature review on issues regarding drinking water quality, VBNC bacteria and vulnerability of engineering systems with respect to growth of microbial pollution.

Chapter 2 “Assessment of *Escherichia coli* in different physiological states” involved selection and evaluation of current molecular methods to rapidly and sensitively identify low concentration of VBNC *E. coli* in water and biofilm samples.

Chapter 3 “Effectivity of chemical and mechanical disinfection on ability to neutralize *Escherichia coli*” involved laboratory scale studies on the effectivity of three disinfection methods (chlorination, electrochemical disinfection and hydrodynamic cavitation) to neutralize *E. coli* in different viability states (metabolically active, able to divide and culturable).

Chapter 4 “Fate of *Escherichia coli* in water distribution networks and health risks associated with it” involved full scale environmental sample analyses from Riga drinking water distribution system over a period of year to determine the occurrence of able to divide and culturable *E. coli* in drinking water and biofilm. After quantitative microbial risk assessment (QMRA) was performed to analyze the health risks from the concentrations of *E. coli* found in the study.

Chapter 5 “The effect of addition of labile organic carbon on *Escherichia coli* ability to divide in drinking water biofilms” involved full scale monitoring of *E. coli* concentration changes in one place of the distribution system, followed by studies on the effect of supply of labile organic carbon on *E. coli* ability to grow in biologically unstable water.

BACKGROUND AND LITERATURE REVIEW

Despite of wide campaigns and regulations for drinking water quality improvement and maintenance, many waterborne outbreaks are still registered annually [6, 24, 35] and are the major cause of morbidity and mortality worldwide. It is estimated that around 1.8 million people die each year from diarrheal diseases [3, 44].

The quality of drinking water in European Union is monitored according to The Drinking Water Directive 98/83/EC [5, 27]. The regulations for monitoring and control of microbiological parameters include regular control for presence of fecal indicator bacteria – mainly *E. coli*. The amount of bacteria per 100 ml of drinking water should not exceed 0 colony forming units [27]. These bacteria are considered to indicate the potential presence of pathogens in the environment, since detection and enumeration of all possible pathogens is impossible [5, 21]. Traditionally the sampling of water is performed by grab sample technique – 100 – 500 ml of water is taken from sites chosen by water supplier. It is accepted that bacteria like *Shigella* spp., *Salmonella* spp., pathogenic *E. coli* enter the distribution system through fecal contamination. However, occasionally the disease has been reported in well-maintained systems too [11]. Environmental pathogenic bacteria or highly resistant protozoa mostly do not correlate with the presence of commonly used drinking water indicators [1, 3], the role of the biofilm as pathogen harbor is not taken into account, there is evidence that some pathogenic or opportunistic pathogens like *Pseudomonas* spp., *Mycobacter* spp., *Campylobacter* spp., *Legionella* spp., *Helicobacter pylori* or *Salmonella typhimurium* can multiply in the distribution network [25] and more often it is reported that these bacteria can attain a state of non-cultivability or often referred as viable but not culturable state [29]. Moreover, it has been shown that fecal indicator - *Escherichia coli* can enter VBNC state in natural water held at 4°C [26].

It is assumed that bacteria in VBNC state fail to grow on the routine bacteriological media on which they would normally grow and develop into colonies, but are alive and capable of renewed metabolic activity [28]. The VBNC state has been studied extensively and there is abundant information about the physiology, biochemistry and genetics of such cells. The significance in medicine, bioremediation and the use as fecal indicators is becoming increasingly evident [28]. Despite the existence of VBNC state [2, 19, 30], there still is a lack of evidence on the importance of those organisms on human health. However, if the VBNC cells were able to become culturable again, i.e. underwent a process of resuscitation, their role would be obvious [22, 28]. Until recently it was believed that *E. coli* does not survive in the environment and do not grow in secondary habitats, such as water [12, 39]. However, studies

have shown that *E. coli* is not only able to survive in oligotrophic conditions in a non-culturable state [19], but also show growth [42].

To ensure safe drinking-water through good water supply practice World Health Organization employs the introduction of Water Safety Plans which aim: 1) To prevent contamination of source waters; 2) To treat the water to reduce or remove contamination that could be present to the extent necessary to meet the water quality targets; and 3) To prevent re-contamination during storage, distribution and handling of drinking-water [7]. The later factor is regarded as especially important since it is estimated that, apart from ineffective treatment pathogens can enter the distribution system via a variety of pathways (leaking pipes, cross-connections, backflow improper treatment and maintenance works etc) and become entrained in the biofilm for later release. It is estimated that the risk for pathogen intrusion increase with the age of the distribution system, hydraulic fluctuations, pipe material and decline in biological stability of water [9]. To assess the risks from microbial agents and define the statistical probability of an infection QMRA with hazard identification, exposure assessment and dose-response, risk characterization and risk management [23] is used.

However, if the actual behavior of *E. coli* is still not clearly understood, the measures for safeguarding drinking water (e.g. in Water Safety Plan) may be inadequate, thus putting a large number of water consumers under the risk. Moreover, since all engineering calculations on water treatment (e.g. risk assessment for multibarrier treatment) and disinfection efficiency (e.g. CT values in treatment or after repair works or installation of new pipes) are based on results obtained by culture methods, the underestimation of disinfection efficiency is probable.

MATERIALS AND METHODS

To identify total and VBNC *E. coli* in drinking water and biofilm multiple viability assays, e.g. cell membrane integrity (Live/Dead® BacLight staining), enzymatic activity (esterase activity), respiratory activity (CTC staining), ability to divide (direct viable count), were tested for their applicability and possibility to be combined with Fluorescent *in situ* hybridization. The PNA probe used for specific identification of *E. coli* was chosen according to Perry-O'Keefe *et al* [17, 33].

Laboratory scale studies involved batch experiments for disinfection experiments and fully mixed reactor installation which was supplied with sterile, synthetic *E. coli* free water and spiked with *E. coli* culture and run for several days (water retention time 16.7 hours, velocity 0.1 m/s, temperature approx. 20°C). On a regular basis biofilm and water samples were collected and analyzed for total *E. coli* concentration (FISH and PCR methods), viable (DVC-FISH) and culturable cells (Membrane Filtration according to ISO) [16, 27]. For total population (TBN) monitoring ATP, AOC and DAPI staining was applied.

The effect of electrochemical disinfection on *E. coli* pure culture ($\sim 10^6$ cells/ml) was tested in a specially made electrolytic cell consisting of Ti_nO_{2n-1} containing ceramic anode with an area 12.1 cm² and a cathode made of stainless steel, with a total surface area of 18 cm². The electrolysis process was carried out at, temperature 23 ± 2 ° C, pH 7 and with variable current intensity and treatment time. The concentration of chloride ions varied from 0 to 250 mg/l. Similarly, all pure culture *E. coli* samples ($\sim 10^6$ cells/ml) were processed with hydrodynamic cavitation in a laboratory scale system, consisting of a reservoir (2 liters) and cavitation device made from a plate in which a rotating disk was located. The disk was driven by the motor. Treatment regimes differed for each experiment ranging from 0.14 W/cm³ (8.7 A, 220 V) to 0.49 W/cm³ (8.7 – 9.3 A, 220 V) and lasted from 3 till 9 minutes (depending on the moment when temperature in sample holder exceeded or reached 38°C. Samples from both systems were further analyzed with CTC staining, DVC-FISH and culture based assays.

Full scale studies involved seasonal environmental sample analyses with installation of stainless steel coupon collectors into the raw water sources and drinking water supply system (Fig. 1). Subsequently concentrated water samples [41] were collected from the same places. The two week old biofilm and approximately 400 times concentrated water samples were analyzed for TBN, heterorophic plate counts (HPC), total, viable and cultivable *E. coli*. To assess the impact of viable *E. coli* concentration on human health QMRA was performed and Monte Carlo simulations (Oracle© Crystal Ball) were used to determine the probable daily and yearly risk.

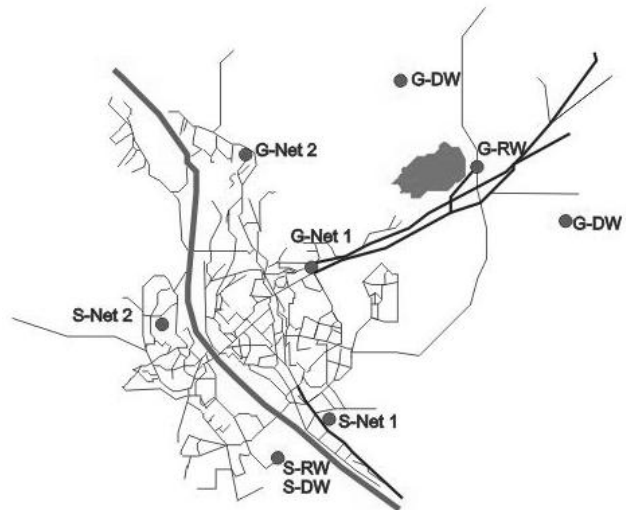


Figure 1. Riga drinking water distribution network with 12 biofilm and water sampling sites including water before (G-RW – raw lake water; S-RW – raw surface water), during (S-OZ – surface water after second ozonation, S-RF – surface water after first rapid filters, S-BF – surface water after biofilters) and after treatment (S-DW - surface water after final chlorination; G-DW - infiltrated groundwater after final chlorination) and in the network S-NET1, S-NET2, G-NET1 and G-NET2. Numbers 1 and 2 indicate the residence time after treatment – “1” having shorter residence time.

To monitor the concentration dynamics of *E. coli* a completely mixed reactor was installed in a drinking water supply system (groundwater water source, residence time ~ 28h, AOC ~100 $\mu\text{gC/l}$) in total 3 times and run for 5 weeks each. Overall population dynamics (TBN, ATP) and *E. coli* concentration (FISH, DVC-FISH, cultivable cells) was monitored on a weekly basis in the inlet and outlet waters and in the biofilm of the reactor. After, two reactors were installed in parallel run for biofilm harbored *E. coli* concentration to reach the maximum (as estimated previously) and then either ultrafiltrated wastewater (<100 cells/l; *E. coli* free) or sterile glucose-salt solution was supplied to one of the reactors (final AOC ~ 500 $\mu\text{gC/l}$) for 14 or 8 days respectively. The monitoring of concentration dynamics in the inlet and outlet water and in the biofilm was performed as previously for total bacteria and *E. coli*.

RESULTS AND DISCUSSION

Assessment of *Escherichia coli* in different physiological states

When working according to The Drinking Water Directive 98/83/EC only culturable *E. coli* are detected, however, to analyze total *E. coli* concentration and differentiate between total, VBNC and culturable cells molecular methods must be employed.

In chapter 2 of the Thesis the applicability of Fluorescence *in situ* hybridization for drinking water and biofilm samples was tested. The work included modification of the current protocol for PNA probes [20, 33] to decrease the time necessary for analyses, minimize cell loss and increase cell-to-noise ratio. The results showed that within 1.5 hours it is possible to obtain samples with highly fluorescent *E. coli*. Despite high specificity and sensitivity, FISH itself is not a cell viability marker, since nucleic acids can be present in dead cells for a long period of time [38]. Thus, the applicability of FISH with currently available viability assays was analyzed. The results indicated that the most reliable, robust and sensitive data were obtained when Direct viable count method was used in combination with Fluorescence *in situ* hybridization (DVC-FISH). The fluorescent technique and microscopy analyses were developed to the level that as few as 5 cells per sample could be detected.

Effectivity of chemical and mechanical disinfection on ability to neutralize *Escherichia coli*

The final security barrier applied to treated water is disinfection. Maintenance of residual disinfectant in the system is used to provide a safeguard against low-level contamination and growth within the distribution system [11, 45]. At the moment all engineering calculations on disinfection effectivity of drinking water are based on cell ability to form colonies on nutrient rich media. Traditionally the fecal indicator *E. coli* is regarded as relatively susceptible to disinfection and easily inactivated [43], however, the data on disinfection effectivity of different viability states of this bacterium is limited.

In chapter 3 the effectivity of chemical and physical disinfection on different viability states of *E. coli* were evaluated. The results showed that that no cultivable *E. coli* were observed after 1 minute of exposure to 0.54 mg/l total chlorine, whereas about 15% of metabolically active (CTC positive) cells were still detected at this exposure time.

The calculation of disinfection first order kinetic constant k (equal to chlorine demand), showed that k values were 2.2, 2.3. and 13.6 min^{-1} respectively for CTC, DVC, and

cultivable bacteria which corresponds to previously reported results for cultivable *E. coli* [13, 36].

Assuming that total chlorine concentration did not change over time CT values for 99% kill of *E. coli* were calculated (exponent $n = 1$). Results are shown in table 1.

Table 1

CT values for various viability states of *E. coli* to obtain 2-log (99%) kill.

Viability state	CT value (mg/l min ⁻¹)
Cultivability	0.27
Ability to divide (DVC positive)	1.08
Metabolic activity (respiration)	1.10

The comparison of the CT values for different viability states showed that to reduce cell metabolic activity or ability to divide by the same log as cultivability 4 times higher CT value is necessary.

To further investigate the disinfection mechanisms electrochemical disinfection was applied to batch *E. coli* culture where during the process of electrolysis active disinfectant is generated from ions naturally occurring in the water. The results showed that active disinfectant can be generated even from low concentration of chlorine ions (concentrations found in pristine waters). After the sample was exposed to 6.8 mg/l chlorine ion concentration and treated with 0.002 A current intensity, cultivable and able to divide *E. coli* concentration decreased rapidly following exponential decay rate (*viz.* first-order rate constant) and estimated active chlorine concentration at the same time was around 0.5 mg/l. The rate of decrease was similar for both cultivable and able-to-divide (DVC) *E. coli* (Fig. 2). After about 15 minutes of exposure no cultivable or able-to-divide *E. coli* were detected in the samples. At the same time the respiratory ability of *E. coli* decreased with different trend: more rapidly at the beginning and nearly stopped after 3 minutes of test – the phenomenon which would require further investigation.

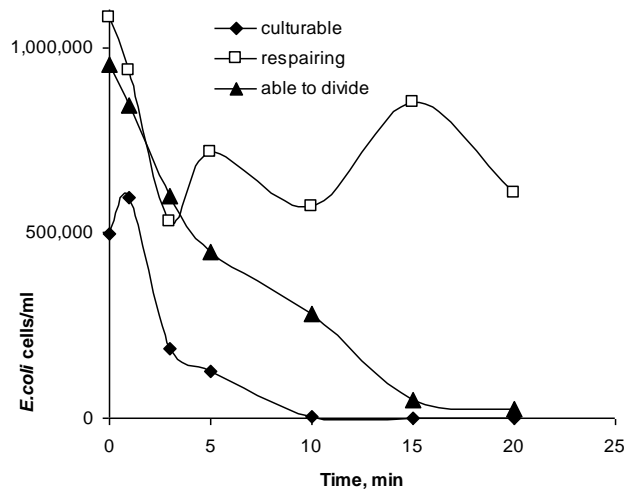


Figure 2. Effect of treatment time on disinfection efficiency (concentrations of chlorine ions 6.8mg/l, current intensity 0.002 A, pH 7 ± 0.2 , $t^{\circ} = 23 \pm 2^{\circ}\text{C}$).

From all disinfection techniques applied physical disinfection with hydrodynamic cavitation showed to be the least efficient one, since the proportion of inactive – dead cells increased for only 10% irrespective of the treatment regime applied. However, hydrodynamic cavitation was very effective in stopping multiplication of *E. coli*. A treatment as short as 3 minutes with energy input of 490 W per liter was sufficient to reduce *E. coli* ability to divide by 75%, resulting in a large metabolically active, but non-dividing population of the cells. This condition already discussed in different studies [14], might be caused by rapid setting of stress on the bacterial cells. Even though bacteria were not dividing they still possessed the ability to continue to carry out respiratory process, thus, indicating on different inactivation mechanisms for cultivability and metabolic activity.

Fate of *Escherichia coli* in water distribution networks and health risks associated with it

Laboratory scale studies on behavior of *E. coli* when subjected to oligotrophic conditions showed that when inoculated with high concentration of the cells during the first day more than 90% of *Escherichia coli* remained suspended in water, however, throughout the experiments the *E. coli* cell number in water decreased for 1 log and increased in the biofilm. For the inoculated *E. coli*, DVC and CFU correlation was close to 100%. However, after one day only 10% of DVC positive *E. coli* cells were cultivable. After 4 days no cultivable *E. coli* were detected in the reactor, at the same time the cells retained their ability to divide and even show a low growth rate ($\sim 0.03 \text{ h}^{-1}$) at the expense of the biofilm,

indicating the importance of biofilm analyses and application of direct methods in drinking water quality control.

The analyses on the occurrence of VBNC *E. coli* in raw water and freshly treated drinking water showed that the treatment process itself is effective enough to reduce the concentration of *E. coli* for more than 3 log and no able to divide *E. coli* were found in water samples just after the treatment (Table 2) which corresponded to the data obtained with culture based assays. However, the results of FISH analyses in the supply system and just after the treatment showed that each cm² of two week old biofilm contained a minimum of 5 *E. coli* cells (Table 2) and all biofilm and 25 of water samples were positive for *E. coli*. From all FISH positive *E. coli* in the biofilm 53% of cells showed the ability to divide. At the same time no culturable *E. coli* were detected in the biofilm and only trace amounts in the water.

Table 2.

Total cultivable, FISH positive and DVC positive (viable) *Escherichia coli* in the biofilm and water samples.

Sampling site	Sample type*	Cultivable <i>E. coli</i> , cfu/cm ² or cfu/l**	FISH positive <i>E. coli</i> , cells/cm ² or cells/l	DVC positive <i>E. coli</i> , cells/cm ² or cells/l
S-RW	W	26.74	n/d	(2.52 ± 0.17)*10 ³
	B	0	44.21 ± 34.72	1.99 ± 2.54
S-DW	W	0	n/d	0
	B	0	8.40 ± 3.92	2.95 ± 5.14
S-NET1	W	0	n/d	0.93 ± 1.61
	B	0	111.58 ± 57.87	45.20 ± 30.25
S-NET2	W	0.13	n/d	9.30 ± 4.13
G-RW	W	30.24	n/d	(2.99 ± 0.94)*10 ³
	B	0	9.39 ± 1.67	0.66 ± 0.85
G-DW	W	0	n/d	1.01 ± 1.75
G-DW [^]	W	0	n/d	0
	B	0	14.44 ± 4.94	3.54 ± 4.79
G-NET1	W	0.06	n/d	0.94 ± 1.62
	B	0	70.62 ± 19.97	84.75 ± 57.37
G-NET2	W	0.006 ± 0.01	103.97 ± 20.05	52.41 ± 58.72

Values are the average for four seasons with standard deviation specified as a maximum and minimum interval.

* W – water, B- biofilm

** For biofilm samples the results are represented as cfu or cells per cm², for water samples – cfu or cells per Liter of water.

N/D – not determined

The analyses on *E. coli* concentration changes showed that for both surface and groundwater the amount of viable *E. coli* increased with increasing water residence time and it happened irrespective of the season (Table 2). For both water types a more intense increase in cell concentration was observed for biofilm samples. The concentration increase in water

samples was less significant. There was no correlation between culturable and viable *E. coli* numbers in drinking water, unlike previously observed for raw water samples [12]. The high and increasing numbers of *E. coli* could be connected with their resistance to chlorine, low chlorine levels at all in the network or low protozoan grazing [37, 46]. Subsequently their release from biofilm by detachment [32] could have a serious effect on human health, especially if VBNC forms of bacteria, including *E. coli* O157:H7 are present [19].

To assess the importance of VBNC *E. coli* on human health QMRA analyses were performed for water samples in G-NET2 location. The estimated dose was determined as the amount of able to divide or cultivable *E. coli* detected per volume of water consumed. Two scenarios were simulated by assuming the case when all cells counted represent highly pathogenic *E. coli* (infectious dose < 100 cells) and less pathogenic *E. coli* (infectious dose > 10⁶ cells). The results showed that for the first case the risk is very high and even in the case of cultivable cell concentration it is 2 log above the allowed threshold. The second assumption involving less pathogenic *E. coli* showed the risk for cultivable counts to be very low and slightly above the threshold for able to divide cells. Nevertheless, the sensitivity analyses showed that more than 95% of the risk contributed to the amount of cells consumed and the risk from able to divide cells exceeded the culturable proportion for 4 log.

The effect of addition of labile organic carbon on *Escherichia coli* ability to divide in drinking water biofilms

In Chapter 5 it was investigated if addition of labile organic carbon at the levels found in drinking water may change the concentration of both culturable and VBNC *E. coli* in the biofilm. The site chosen for the concentration monitoring was in Riga drinking water distribution network (G-NET2) with a water residence time of at least 28 hours and the highest concentration of total and viable *E. coli* according to results obtained in Chapter 4. In contrast to previous studies [2, 10, 37] *E. coli* used in these studies were not previously isolated on culture media and no spiking of drinking water was performed.

The 5 week monitoring on *E. coli* concentration dynamics showed that on average there is one *E. coli* cell for each milliliter of drinking water, representing up to 1% of total population. Despite slight increase in the amount of *E. coli* leaving the reactor, the estimated difference was not significant ($P \geq 0.05$).

The monitoring of biofilm showed that the highest total and able to divide *E. coli* concentration in the biofilm is obtained after 3 weeks, then followed by a decrease. On average $58 \pm 23\%$ of the *E. coli* had the potential for dividing. At the same time the amount of

E. coli in the biofilm never increased 0.0047 % from total bacterial numbers. The comparison of mean DVC positive *E. coli* data obtained throughout 3 separate reactor installation periods (5 week each) showed that no significant difference ($P \geq 0.05$) is observed in DVC positive counts between each installation, showing that the observed trend is regular to the system and the results obtained with DVC-FISH method are representative enough.

Since the observed maximum concentration of *E. coli* in the biofilm was after 3 weeks, this time was chosen as a time when supply of labile organic carbon to one of the reactors was initiated. Prior monitoring showed that there is no significant difference between the reactors ($P = 0.16$) with respect to *E. coli*. When ultrafiltrated wastewater was supplied (final AOC $\sim 500 \mu\text{gC/l}$) the observed increase in total bacterial counts in the biofilm and outlet water was only two times and only slight increase in viable *E. coli* in the biofilm was observed (Fig. 3. right) ($P \geq 0.05$). In the control unsupplied reactor no increase in total *E. coli* counts was observed with a 20% increase in DVC positive cells. In the mean time the inlet and outlet water analyses showed no growth of *E. coli* in the reactor.

Another setup with the supply of glucose (final AOC $\sim 500 \mu\text{gC/l}$) increased the amount of total bacterial counts in the biofilm and outlet water for more than 1 log after 8 days. During this time the amount of viable *E. coli* in the biofilm increased 6 times and showed a distinct trend of increasing potential for dividing (Fig. 3 left) ($P \leq 0.05$). At the same time no increase in the amount of viable *E. coli* was observed for control – not supplied reactor.

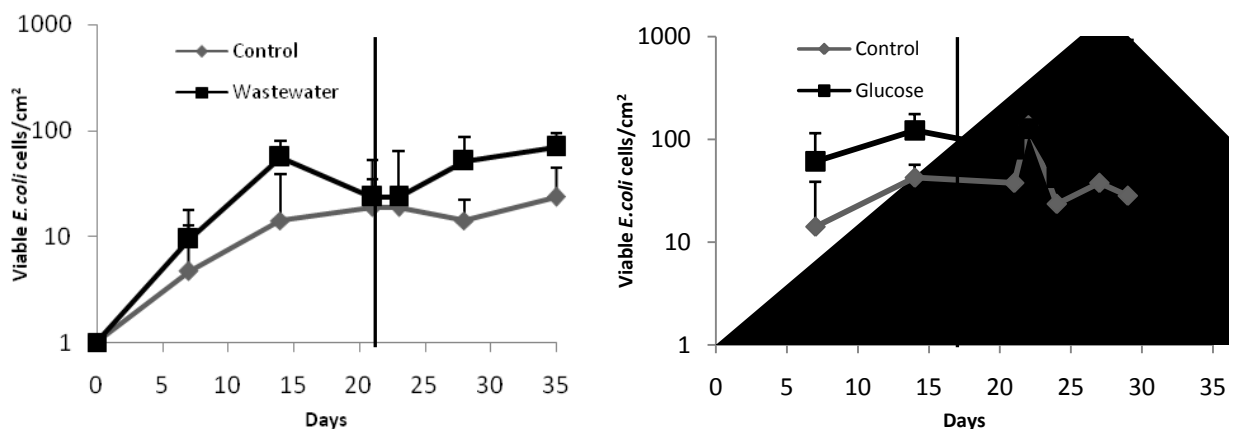


Figure 3. Concentration of able to divide (DVC positive) *E. coli* in the biofilm of two identical Propella™ reactors. Control reactor represents the unsupplied (grey) and the supplied reactor is represented as either wastewater (left) or glucose-salt solution (right). Vertical black line represents the moment of the initiation of supply to one of the reactors.

The standard deviation represents the dispersion of the results of three repetitions.

The amount of viable *E. coli* in the outlet water of supplied reactor increased for almost 1 log, indicating the growth of *E. coli* (Fig. 3. right), however, at the same time when using standard culture based assays no culturable *E. coli* from the biofilm during 8 days of glucose-salt solution dosage was collected.

CONCLUSIONS

1. Chemical (chlorination) and mechanical (cavitation) disinfection techniques showed to be effective to neutralize cultivable, *E. coli*. To fully inactivate cell metabolic activity or ability to divide much higher concentrations of disinfection agent are necessary. The estimated CT value for full inactivation of *E. coli* was more than $1.0 \text{ mg/l min}^{-1}$ which at least 2 times exceeds the permissible concentration of residual disinfectant in the distribution system.

2. Apart from the different inactivation rates for chlorination, electrochemical disinfection and hydrodynamic cavitation the overall neutralization trend was observed in the following order: cultivability > ability to divide > metabolic activity (respiration). Thus, the application of cultivation methods showed to be not representative enough for disinfection effectivity.

3. Even if only traces of culturable (max 0.13 CFU/l) cells were detected in drinking water meeting current microbiological quality standards and none in the biofilm in the distribution system, biofilm contained able to divide *E. coli* ($1 - 50 \text{ cells/cm}^2$, representing 53% from total *E. coli*) with the increasing concentration further in the network irrespective of the sampling period.

4. Even if the estimated health risk from concentrations of culturable *E. coli* in the water of the distribution system is low, the average yearly risk from viable *E. coli* exceeded the accepted threshold for more than 2 times indicating a possible human health risk with respect to *E. coli* from consumption of drinking water.

5. The supply of labile organic carbon to *E. coli* found in biofilm of drinking water distribution system increased the concentration of viable *E. coli* for more than 6 times indicating on the growth of *E. coli* in biologically unstable water.

PUBLIKĀCIJU SARAKSTS / LIST OF PUBLICATIONS

Full papers in Scientific Journals:

- Mezule L., Juhna T. Effect on addition of labile organic carbon on growth of *Escherichia coli* in drinking water biofilm// – submitted.
- Mezule L., Tsyfansky S., Yakushevich V., Juhna T. A Simple Technique for Water Disinfection with Hydrodynamic Cavitation: Effect on Survival of *Escherichia Coli* // Desalination. – 2009. – 248(1-3). – pp. 152.-159. (Journal Impact Factor: 1.851).
- Mezule L., Reimanis M., Malers J., Ozolins J., Juhna T. Application of Electrolysis with TinO₂n-1 Ceramic Electrodes for Disinfection of Drinking Water // Scientific Journal of RTU. 1. series., Materiālzinātne un lietišķā ķīmija. - 20. vol. – 2009. - pp. 123-131.
- Ziemeļnieks R., Birzniece D., Juhna T., Mežule L. Occurrence of Legionellae in Hot Water supply Systems of Riga City // Scientific Journal of RTU. 2. series., Būvzinātne. - 6. vol. – 2005. – pp. 231-237.

Full papers in Books:

- Mezule L., Larsson S. Juhna T. Application of DVC-FISH method in tracking *Escherichia coli* in drinking water distribution networks. – Chapter in “Faecal Indicators: problem or solution?” by The Royal Society of Chemistry – Accepted.
- С. Цыфанский. Кавитационные и высоковольтно-плазменные технологии. Теория, эксперимент, инновационные предложения. – Рига: издательство РТУ, 2008. – 500 с. (Подпараграф 4.4.3. Л. Межуле, Т. Юхна Возможности использования кавитации для дезинфекции питьевой воды [314]. 156 -159 с.)

Full papers in Conference Proceedings:

- Tihomirova K., Gavare M., Mezule L., Grube M., Juhna T. Application of FT-IR for characterization of biomass isolated from drinking water // 8th International Conference on “Environmental Engineering”, 2011. – Vilnius, VGTU Press “Technika”. – pp. 672. – 678.
- Reimanis M., Mežule L., Mālers J., Bērziņa-Cimdiņa L., Juhna T., Ozoliņš J. Preparation of Water with Electrolysis Method Using Ceramic Electrodes // Water and Wastewater Treatment Plants in Towns and Communities of the XXI Century: Technologies, Design and Operation, 2010. - Moscow: IWA Publishing. – CD
- Mezule L., Larsson S., Juhna T. Surveillance of Microbial Quality in a Drinking Water Distribution Network by Using Molecular Methods // Global Conference on Microbial Contaminants in Drinking Water, 2009. – Singapore: AWWA. – CD.
- Mezule L., Tsyfansky S., Yakushevich V., Juhna T. A Simple Technique for Water Disinfection with Hydrodynamic Cavitation: Effect on Survival of *Escherichia Coli* // International Workshop on Water and Sanitation in International Disaster Relief, 2008. – Edinburgh: University of Edinburgh. – pp. 63. – 70.

SAĪSINĀJUMI / ABBREVIATIONS

AOOC	assimilable organic carbon	asimilējamais organiskais ogleklis
ATP	adenosine-5'-triphosphate	adenozīna trifosfāts
CFU (kvv)	colony forming units	koloniju veidojošās vienības
CTC	5 cyano-2,3-ditolyl tetrazolium chloride	5 ciano-2,3-ditolil tetrazolija hlorīds
CT	disinfectant in m/l per contact time	dezinfektants m/l kontakta laika vienībā
DVC	direct viable count	tiešās dzīvotspējas uzskaitīšanas metode
DVC-FISH	direct viable count combined with Fluorescence <i>in situ</i> hybridization	Fluorescentā <i>in situ</i> hibridizācija apvienota ar tiešās dzīvotspējas uzskaitīšanas metodi
FISH	Fluorescence <i>in situ</i> hybridization	Fluorescentā <i>in situ</i> hibridizācija
G-DW	infiltrated groundwater after final chlorination	infiltrēts pazemes ūdens pēc hlorēšanas
G-NET	network drinking water supplied from groundwater water source	attīrīts pazemes ūdens no dzeramā ūdens apgādes sistēmas
G-RW	raw lake water	neattīrīts ezera ūdens
HPC	heterotrophic plate counts	heterotrofo baktēriju skaits
PCR	polymerase chain reaction	polimerāzes ķēdes reakcija
PNA	peptide nucleic acid	peptīdnukleīnskābe
QMRA	quantitative microbial risk assessment	kvantitatīvā mikrobioloģiskā riska novērtēšana
rRNS	ribosomal ribonucleic acid	Ribosomālā ribonukleīnskābe
S-BF	surface water after biofilters	virszemes ūdens pēc biofiltriem
S-DW	surface water after final chlorination	attīrīts virszemes ūdens pēc pēdējās hlorēšanas
S-NET	network drinking water supplied from surface water source	attīrīts virszemes ūdens no dzeramā ūdens apgādes sistēmas
S-OZ	surface water after second ozonation	virszemes ūdens pēc otrās ozonēšanas
S-RF	surface water after first rapid filters	virszemes ūdens pēc pirmajiem ātrfiltriem
S-RW	raw surface water	neattīrīts virszemes ūdens
TBN	total bacterial numbers	kopējais mikroorganismu skaits
VBNC	viable but not culturable	dzīvotspējīgs bet nekultivējams

LITERATŪRAS SARAKSTS / REFERENCES

1. Ashbolt N.J., Grabow W.O.K., Snozzi M. Indicators of microbial water quality, Chapter 13. - London: IWA Publishing, 2001. – pp. 289-316.
2. Bjergbaek L.A., Roslev P. Formation of nonculturable *Escherichia coli* in drinking water // Journal of Applied Microbiology. - 2005. – 99. - pp. 1090-1098.
3. Cabral J.P.S. Water Microbiology. Bacterial Pathogens and Water // International journal of environmental research and public health. - 2010. – 7. - pp. 3657-3703.
4. Camper A., McFeters G., Characklis W., Jones W. Growth kinetics of coliform bacteria under conditions relevant to drinking water distribution systems // Applied and Environmental Microbiology. - 1991. - 57(8). - pp. 2233-2239.
5. Council Directive 98/83/EC of November 3, 1998. The quality of water intended for human consumption. European Commission.
6. Craun M.F., Craun G.F., Calderon R.L., Beach M.J. Waterborne outbreaks reported in the United States // Journal of Water and Health. - 2006. - 4(2). - pp. 19-30.
7. Davison A., Howard G., Stevens M., Callan P., Fewtrell L., Deere D., Bartram J. Water Safety Plans: Managing drinking-water quality from catchment to consumer. Geneva: World Health Organization, 2005. - 244 p.
8. Donlan R. Biofilms: Microbial Life on Surfaces // Emerging Infectious Diseases. - 2002. - 8(9). - pp. 881-890.
9. Environmental Protection Agency. Health Risks from Microbial Growth and Biofilms in Drinking Water Distribution Systems. – Washington: EPA, 2002. – 52 p.
10. Fass S., Dincher M.L., Rasoner D.J., Gatel D., Block J.-C. Fate of *Escherichia coli* experimentally injected in a drinking water distribution pilot system // Water Research. - 1996. - 30(9). - pp. 2215-2221.
11. Ford T.E. Microbiological safety of drinking water: United States and global perspectives // Environmental Health Perspectives. - 1999. - 107(1). - pp. 191-206.
12. Garcia-Armisen T., Servais P. Enumeration of viable *E. coli* in rivers and wastewaters by fluorescent in situ hybridization // Journal of Microbiological Methods. - 2004. – 58. - pp. 269-279.
13. Helbling D.E., VanBriesen J.M. Free chlorine demand and cell survival of microbial suspensions // Water Research. - 2007. - 41(19). - pp. 4424-4434.
14. Hoefel D., Grooby W.L., Monis P.T., Andrews S., Saint C.P. Enumeration of waterborne bacteria using viability assays and flow cytometry: a comparison to culture-based techniques // Journal of Microbiological Methods. - 2003. – 55. - pp. 585-597.
15. Hunter P.R. Waterborne disease: epidemiology and ecology. - West Sussex: John Wiley and Sons, 1997. – 372 p.
16. ISO 9308-1:2000. Water quality - Detection and enumeration of *Escherichia coli* and coliform bacteria - Part 1: Membrane filtration method. - International Organization for Standardization, 2001.

17. Juhna T., Birzniece D., Larsson S., Zulenkovs D., Sharipo A., Azevedo N.F., Me'nard-Szczebara F., Castagnet S., Fe'liers C., Keevil C.W. Detection of *Escherichia coli* in biofilms from pipe samples and coupons in drinking water distribution networks // Applied and Environmental Microbiology. - 2007. - 73(22). - pp. 7456–7464.
18. Lee S.H., Levy D.A., Craun G.F., Beach M.J., Calderon R.L. Surveillance for waterborne-disease outbreaks--United States, 1999-2000 // MMWR Surveillance Summaries. - 2002. - 51(8). - pp. 1-47.
19. Liu Y., Wang C., Tyrrell G., Hrudehy S.E., Li X.F. Induction of *Escherichia coli* O157:H7 into the viable but non-culturable state by chloraminated water and river water, and subsequent resuscitation // Environmental Microbiology Reports - 2009. - 2(1). - pp. 155 - 161.
20. Manz W., Wendt-Potthoff K., Neu T., Szewzyk U., Lawrence J. Phylogenetic composition, spatial structure, and dynamics of lotic bacterial biofilms investigated by fluorescent *in situ* hybridization and confocal laser scanning microscopy // Microbial Ecology. - 1999. - 37(4). - pp. 225-237.
21. Mara D., Horan N. (eds) The handbook of water and wastewater microbiology. -London: Academic Press, 2003. – 819 p.
22. McDougald D., Rice S.A., Kjelleberg S. New perspectives on the viable but nonculturable response // Biologia Bratislava. - 1999. – 54. - pp. 617-623.
23. Medema G., Ashbolt N.J. QMRA: its value for risk management. - MicroRisk project (EVK1-CT-2002-00123): EC 5th Framework Programme, 2006. – 36 p.
24. Miettinen I. A waterborne outbreak caused by a severe contamination of distribution network: Nokia case. // Faecal Indicators: problem or solution? - Edinburgh, UK, 2011. – presentation.
25. Momba M.N.B., Kfir R., Venter S.N., Cloete T.E. An overview of biofilm formation in distribution systems and its impact on the deterioration of water quality // Water SA. - 2000. - 26(1). - pp. 59-66.
26. Na S.H., Miyanaga K., Unno H., Tanji Y. The survival response of *Escherichia coli* K12 in a natural environment // Applied microbiology and biotechnology. - 2006. – 72. - pp. 386-392.
27. Nr.235. Dzeramā ūdens obligātās nekaitīguma un kvalitātes prasības, monitoringa un kontroles kārtība. - 2003.gada 29.aprīļa MK noteikumi, 2003.
28. Oliver J.D. The viable but nonculturable state in bacteria // Journal of Microbiology. - 2005. - 43(S). - pp. 93-100.
29. Oliver J.D. Recent findings on the viable but nonculturable state in pathogenic bacteria // FEMS Microbiology Reviews. - 2010. – 43. - pp. 415–425.
30. Oliver J.D., Nilsson L., Kjelleberg S. Formation of nonculturable *Vibrio vulnificus* cells and its relationship to the starvation state // Applied and Environmental Microbiology. - 1991. - 57(9). - pp. 2640-2644.
31. Oliver J.D., Dagher M., Linden K. Induction of *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium* into the viable but nonculturable state following chlorination of wastewater // Journal of Water and Health. - 2005. – 03. - pp. 249-257.
32. Parsek M., Singh P. Bacterial biofilms: An emerging link to disease pathogenesis // Annual Reviews of Microbiology. - 2003. – 57. - pp. 677-701.

33. Perry-O'Keefe H., Rigby S., Oliveira K., Sorensen D., Stender H., Coull J., Hyldig-Nielsen J. Identification of indicator microorganisms using a standardized PNA FISH method. // *Journal Microbiological Methods*. - 2001. - 47(3). - pp. 281-292.
34. Scheusner D.L., Busta F.F., Speck M.L. Inhibition of injured *Escherichia coli* by several selective agents // *Applied Microbiology*. - 1971. - 21(1). - pp. 46-49.
35. Semenza J.C. *Cryptosporidium* surveillance and water-borne outbreaks in Europe // *Eurosurveillance* - 2007. - 12(3-6). - pp. 120-123.
36. Shang C., Blatchley III E.R. Chlorination of pure bacterial cultures in aqueous solution // *Water Research*. - 2001. - 35(1). - pp. 244-254.
37. Sibille I., Sime-Ngando T., Mathieu L., Block J.C. Protozoan bacterivory and *Escherichia coli* survival in drinking water distribution systems // *Applied and Environmental Microbiology*. - 1998. - 64(1). - pp. 197-202.
38. Stender H., Fiandaca M., Hyldig-Nielsen J.J., Coull J. PNA for rapid microbiology // *Journal of Microbiological Methods*. - 2002. - 48(1). - pp. 1-17.
39. van Elsas J.D., Semenov A.V., Costa C., Trevors J.T. Survival of *Escherichia coli* in the environment: fundamental and public health aspects // *The ISME journal*. - 2011. - 5. - pp. 173-183.
40. van Lieverloo J.H., Mesman G.A., Bakker G.L., Baggelaar P.K., Hamed A., Medema G. Probability of detecting and quantifying faecal contaminations of drinking water by periodically sampling for *E. coli*: a simulation model study // *Water Research*. - 2007. - 41(19). - pp. 4299-4308.
41. Veenendaal H.R., Brouwer-Hanzens A.J. A Method for the concentration of microbes in large volumes of water. – *TECHNEAU*, 2007. - 30 p.
42. Vital M., Hammes F., Egli T. *Escherichia coli* O157 can grow in natural freshwater at low carbon concentrations // *Environmental Microbiology*. - 2008. - 10(9). - pp. 2387-2396.
43. White G.C. *Handbook of Chlorination and Alternative Disinfectants*. 4th Edition. - New York,: John Wiley & Sons, Inc, 1999. – 1569 p.
44. WHO. *Water, sanitation and hygiene links to health: facts and figures*. - Geneva, Switzerland: World Health Organization, 2004. – 2 p.
45. WHO. *Guidelines for drinking-water quality*. 4th Edition. - Geneva, Switzerland: World Health Organization, 2011. – 564 p.
46. Williams M.M., Braun-Howland E.B. Growth of *Escherichia coli* in model distribution system biofilms exposed to hypochlorous acid or monochloramine // *Applied and Environmental Microbiology*. - 2003. - 69(9). - pp. 5463-5471.