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

**Alīna Neščerecka**
Doktora studiju programmas „Siltuma, gāzes un ūdens tehnoloģija" doktorante

# BIOLOĢISKĀ STABILITĀTE HLORĒTOS DZERAMĀ ŪDENS SADALES TĪKLOS

**Promocijas darba kopsavilkums**

Zinātniskie vadītāji
Profesors *Dr. sc. ing.*
TĀLIS JUHNA
*Dr.* FREDERIKS HAMMESS

**RTU Izdevniecība**
**Rīga 2017**

Neščerecka A. Bioloģiskā stabilitāte
hlorētos dzeramā ūdens sadales tīklos.
Promocijas darba kopsavilkums. –
Rīga: RTU Izdevniecība, 2017. – 23 lpp.

Iespiests saskaņā ar Valsts zinātniskās
kvalifikācijas komisijas 2017. gada
18. maija lēmumu, protokols Nr. 168.2.

Promocijas darbs izstrādāts ar NMS-CH projekta "*BioWater: Assessment of biological stability in drinking water distribution networks with chlorine residuals*" (*Sciex-N-7 12.265*); Latvijas valsts pētījumu programmas *SOPHIS*, līgums Nr. 10-4/VPP-4/11, un Rīgas Tehniskās universitātes doktorantūras pētniecības granta, līgums Nr. 04000-1.1/17, atbalstu.

**ISBN 978-9934-10-957-7**

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

Promocijas darbs inženierzinātņu doktora grāda iegūšanai tiek publiski aizstāvēts 2017. gada 16. jūnijā Rīgas Tehniskās universitātes Arhitektūras fakultātē, Ķīpsalas ielā 6, 433. auditorijā.

OFICIĀLIE RECENZENTI

Profesors *Dr. habil. sc. ing.* Namejs Zeltiņš
Rīgas Tehniskā universitāte, Latvija

Profesors *Dr. Ilkka Miettinen*
*National Institute for Health and Welfare*, Somija

Profesors *Dr. Jean-Claude Block*
*University of Lorraine*, Francija

APSTIPRINĀJUMS

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

Alīna Neščerecka ……. (paraksts)

Datums: ……

Promocijas darbs ir uzrakstīts latviešu/angļu valodā, tajā ir ievads, 5 nodaļas, secinājumi, literatūras saraksts, 55 attēli, 7 tabulas, kopā 116 lappuses. Literatūras sarakstā ir 182 nosaukumi.

# SATURS

Pētījuma aktualitāte ..... 5

Darba mērķis ..... 6

Metodoloģijas un galveno sadaļu apraksts ..... 7

Zinātniskā novitāte un darba galvenie rezultāti ..... 18

Praktiskais lietojums ..... 19

Secinājumi ..... 20

Publikācijas ..... 21

Konferenču tēzes ..... 22

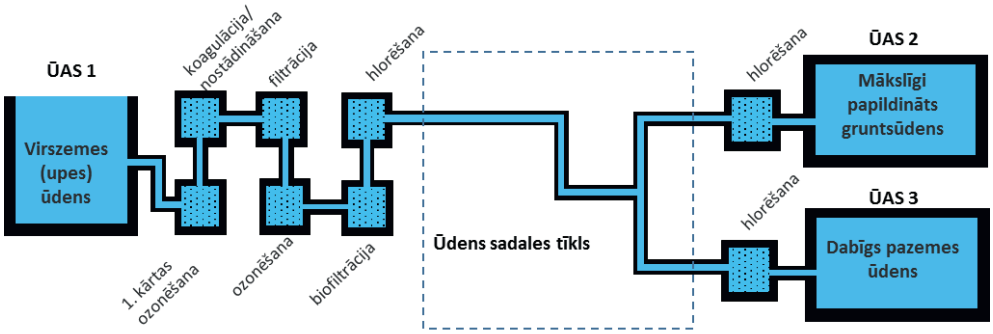
Literatūra ..... 22

# PĒTĪJUMA AKTUALITĀTE

Bioloģiskās stabilitātes koncepcija paredz, ka ūdens bioloģiskajai kvalitātei patērētājam jābūt tādai kāda tā ir tieši pēc attīrīšanas [1], un tas ir viens no ūdensapgādes sistēmas galvenajiem mērķiem. Dzeramā ūdens bioloģiskās kvalitātes pasliktināšanās var radīt vairākas problēmas, ieskaitot ūdens patērētāju neapmierinātību ar ūdens organoleptiskajām īpašībām un, sliktākajā gadījumā, infekcijas slimības, kas var izraisīt nopietnas veselības problēmas un pat cilvēku nāvi. Tāpēc ūdenī, kas nonāk ūdens sadales tīklā, nedrīkst būt patogēnas baktērijas, un tīklā baktēriju vairošanās jābūt novērstai. Baktēriju augšana īpaši nav vēlama iespējamas oportūnistisko baktēriju (piemēram, *Legionella* sugu) vairošanās dēļ. Šīs baktērijas ir daļa no dabas ūdens biocenozes, un zemā koncentrācijā veselā organismā slimības neizraisa. Tomēr noteikti veselības riski ir personām ar novājinātu imūno sistēmu, īpaši – ja ir augsta šādu baktēriju koncentrācija.

Izšķir divas galvenās pieejas, ar kurām var sasniegt ūdens bioloģisko stabilitāti: dzeramā ūdens dezinfekcija, paredzot paliekošu dezinfekcijas efektu un/vai baktēriju augšanu veicinošo (limitējošo) vielu izdalīšanu no ūdens. Dzeramā ūdens bioloģiskās stabilitātes panākšana ar barības vielu izdalīšanu, neizmantojot dezinfekciju, ir izplatīta Šveicē un Nīderlandē [2, 3]. Tomēr jautājums par bioloģisko stabilitāti ūdensapgādes sistēmās ar paliekošu dezinfekcijas efektu ir pētīts daudz mazāk. Dezinfekcijas mērķis ir iznīcināt mikroorganismus, un augstā dezinfekcijas līdzekļa koncentrācijā baktērijām vairoties nevajadzētu. Ūdens sadales tīklā hlora koncentrācija parasti samazinās, un tāpēc mazinās arī hlora spējas novērst baktēriju vairošanos. Vairāki pētījumi apstiprina, ka biomasas daudzums tīklā palielinās, neskatoties uz to, ka pirms ūdens padošanas tīklā bija veikta dezinfekcija [4, 5]. Turklāt vairāki literatūras avoti liecina par to, ka hlorēšanas rezultātā palielinās asimilējamā organiskā oglekļa (*assimilable organic carbon*, *AOC*) koncentrācija [6–8], kas ir heterotrofu baktēriju galvenais barības avots. Tas rada jautājumu par hlorēšanas lomu dzeramā ūdens bioloģiskā stabilitātē.

Latvija ir Ziemeļeiropas valsts, kur saldūdens resursi ir pieejami pietiekamā daudzumā, lai pilnībā nodrošinātu valsts iedzīvotāju vajadzības. Taču, lai ūdens atbilstu dzeramā ūdens kvalitātes likumdošanas noteikumiem, ir nepieciešama tā attīrīšana. Dabīgā ūdens kvalitāte ir paaugstinājusies, jo samazinājusies lauksaimniecības un rūpniecības notekūdens novadīšana un uzlabojusies attīrīšanas kvalitāte. Tomēr, ūdens patēriņam samazinoties, palielinās tā uzturēšanas laiks lielos ūdens sadales tīklos, un, piemēram, Latvijas galvaspilsētā Rīgā tas ir veicinājis baktēriju augšanai labvēlīgo vidi tīklā [9]. Rīgas ūdensapgādes tīkla kopgarums pārsniedz 1400 km, un tas padara šo tīklu īpaši piemērotu un interesantu ūdens bioloģiskās stabilitātes pētījumiem. Ūdens šajā tīklā atrodas pietiekami ilgu laiku, lai būtu iespējama baktēriju vairošanās, pieņemot, ka ūdenim piemīt augšanu veicinošas īpašības. Viss ūdens, kas nonāk tīklā, tiek hlorēts, un tas dod iespēju pētīt hlorēta ūdens bioloģisko stabilitāti reālos apstākļos. Svarīgi, ka ūdens nāk no dažādiem avotiem un tam ir dažāds attīrīšanas process (1. attēls): Rīgas ūdens sadales tīkls tiek apgādāts ar hlorētu dabīgu gruntsūdeni, mākslīgi papildināmu pazemes ūdeni un attīrītu virszemes ūdeni, un pēdējiem diviem ir augsts humīnvielu un *AOC* saturs. Dzeramajā ūdenī no dažādiem avotiem gaidāms arī dažāds baktēriju augšanas potenciāls. Īpašu interesi rada tās sadales tīkla zonas, kur ūdeņi var sajaukties.




1. attēls. Pētāmās ūdensapgādes sistēmas principiālā shēma.
Pilsēta tiek apgādāta ar ūdeni no trīs ūdens apgādes sistēmām (ŪAS), kas ietver pilna mēroga virszemes ūdens attīrīšanu (ŪAS 1), mākslīgi papildinātā un dabīgā gruntsūdens hlorēšanu (ŪAS 2 un 3). Promocijas darbā dažādos pētījuma posmos paraugi tika ņemti no visām ŪAS un vairāk nekā 50 paraugu no sadales tīkla.

Esošām dzeramā ūdens bioloģiskās kvalitātes un bioloģiskās stabilitātes novērtēšanas metodēm ir vairākas nepilnības. Piemēram, organiskā oglekļa noteikšana nedod pilnīgu priekštatu par baktēriju augšanas riskiem un pat var izraisīt kļūdainus secinājumus, ja baktēriju augšana ir limitēta ar neorganiskām vielām. Tādā veidā bija nepieciešams izstrādāt jaunu augšanas potenciāla novērtēšanas pieeju, ņemot vērā vairākas barības vielas. Tas, ka Rīgas ūdens sadales tīklā nav bioloģiski stabils, bija aprakstīts agrākā pētījumā, bet korelācijas starp baktēriju koncentrācijām un ūdens uzturēšanas laiku tika aprēķinātas, baktēriju daudzuma noteikšanai izmantojot koloniju veidojošo vienību (*heterotrophic plate count, HPC*) metodi, ar ko dzeramajā ūdenī ir iespējams kultivēt tikai ap 1 % baktēriju [10], turklāt rezultātu iegūšanai ar šo metodi nepieciešamas vismaz 24 h [11]. Dzeramā ūdensapgādes sistēmās, kur izmanto dezinfekciju, bioloģiskās stabilitātes novērtēšanai *in situ* precīzas un uzticamas dzīvotspējīgu baktēriju noteikšanas metodes ir ārkārtīgi svarīgas. Tādēļ nepieciešamas jaunas metodes un pieejas: jāpārbauda un jāstandartizē alternatīvas un no kultivēšanas neatkarīgas baktēriju daudzuma noteikšanas metodes, jāuzlabo augšanas potenciāla novērtēšanas pieeja, balstoties uz vairākām barības vielām, un jāizmanto tās bioloģiskās stabilitātes pētījumos.

## DARBA MĒRĶIS

Darba mērķis bija noskaidrot, vai hlorēšana (kā pēdējais ūdens sagatavošanas posms) var veicināt baktēriju vairošanos hlorētā dzeramā ūdens sadales tīklā. Pētījumam tika definēti vairāki uzdevumi:

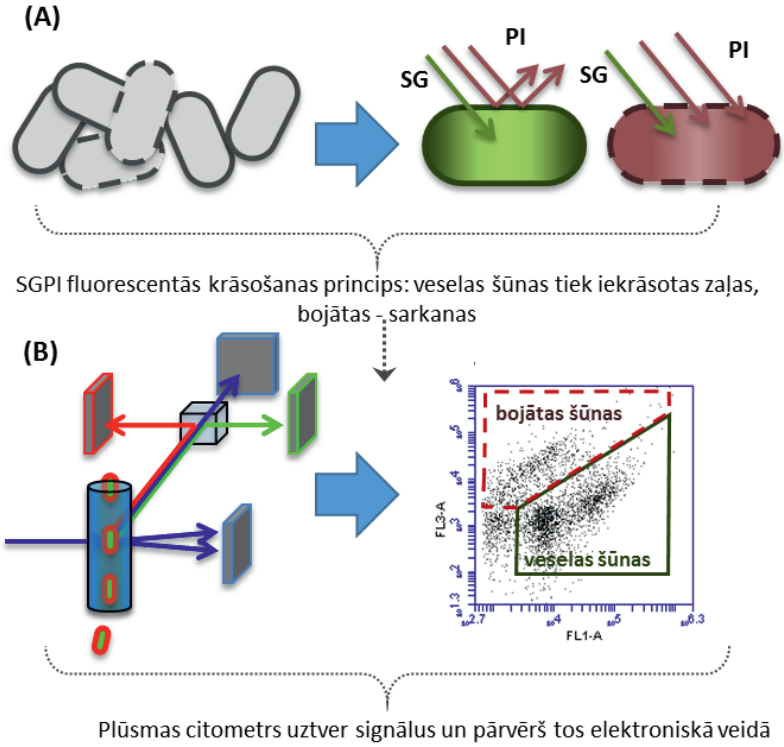
- optimizēt un standartizēt dzīvotspējīgo baktēriju noteikšanas metodi, kas balstās uz *SYBR Green I* un propīdija jodīda (*SGPI*) fluorescento krāsošanu un plūsmas citometrijas mērījumiem, un pārbaudīt šo metodi uz hlorētiem paraugiem;
- izpētīt adenozīntrifosforskābes (*ATP*) metodes iespējas raksturot hlorēšanas efektivitāti;
- izmantot iepriekš minētas metodes pilna mēroga dzeramā ūdens sadales tīklā ar mērķi novērtēt bioloģisko stabilitāti laikā un telpā;
- uzlabot, pielāgot un lietot augšanas potenciāla metodi baktēriju augšanas limitējošu faktoru raksturošanai Rīgas ūdensapgādes sistēmā.

# METODOLOĢIJAS UN GALVENO SADAĻU APRAKSTS

## Metožu pārbaude un optimizācija

Šajā pētījumā ar *SGPI* krāsotu paraugu plūsmas citometrijas mērījumi un *ATP* noteikšana tika izmantota dzīvotspējīgu baktēriju noteikšanai kā alternatīva standarta *HPC* metodei dzeramā ūdens kvalitātes raksturošanai un bioloģiskās stabilitātes novērtēšanai. Ūdens pētniecības jomā šīs metodes ir labi pazīstamas, bet dažādos pētījumos metožu protokoli bieži atšķiras. Turklāt, lai gan vairums tirgū pieejamo krāsu un reaģentu ir gatavi lietošanai, ne vienmēr tie ir optimizēti dzeramā ūdens analīzēm. Tāpēc radās nepieciešamība optimizēt un standartizēt protokolus. Arvien pieaugoša metožu izmantošana prasa precīzus protokolus, lai nodrošinātu ticamus un salīdzināmus eksperimentu datus.

## Norādījumi paraugu krāsošanas protokolu izstrādāšanai plūsmas citometrijai, demonstrēti ar *SGPI* krāsošanas piemēru

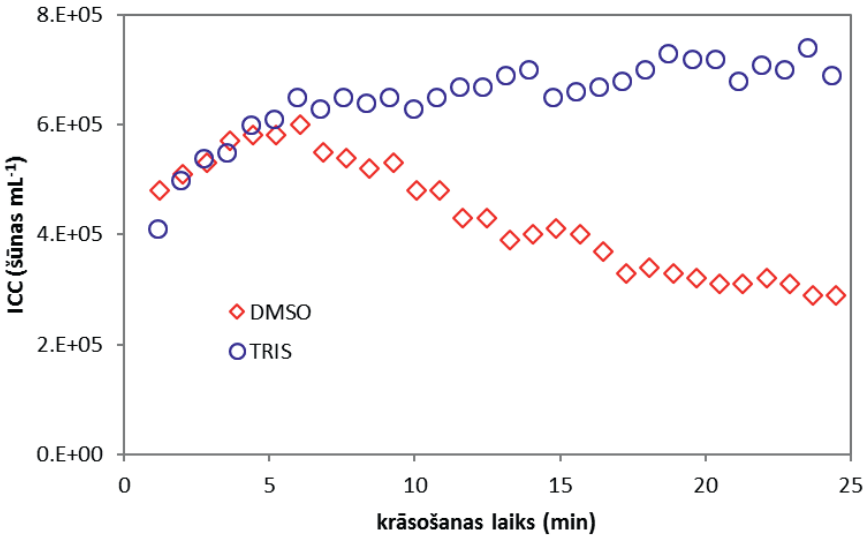



2. attēls. Dzīvotspējīgo baktēriju skaita noteikšana ar *SGPI* krāsošanu un citometriskiem mērījumiem.

Kad *SGPI* pievieno ūdens paraugam, šūnas ar veselām membrānām iekrāsosies zaļi, jo tikai SG var iekļūt šūnā. *PI* iekļūstot šūnās ar bojātām membrānām, dzēš SG emitētu fluorescenci un iekrāso baktērijas sarkanas (A). Dabiski fluorescents vai iekrāsots ūdens paraugs plūst plūsmas kamerā, kur šūnas pa vienai šķērso lāzera staru. Priekšējā un sāna gaismas izkliede (zilā bultiņa) un fluorescence (sarkanā un zaļā bultiņa) tiek pierakstītas elektroniski (B).

Paraugu iekrāsošana ar fluorescentām krāsām un plūsmas citometrijas mērījumi ūdens pētniecībā tiek bieži izmantotas kopējā baktēriju skaita un baktēriju dzīvotspējas noteikšanai. Ir pieņemts, ka baktērijas zaudē dzīvībai svarīgas funkcijas, kad šūnas membrāna ir bojāta, jo tad nevar veidoties elektroķīmiskais gradients. *SGPI* krāsošanas princips ir balstīts *SYBR Green I* (*SG*) spējā iekļūt visās baktērijās – propīdija jodīds (*propidium iodide*, *PI*) var iekļūt baktērijās tikai tad, ja membrāna ir bojāta, un tādā veidā ir iespējams atšķirt šūnas ar veselu (*intact cell count*, *ICC*) un bojātu membrānu (2. A attēls). Plūsmas citometriskās analīzes ir balstītas uz gaismas izkliedi un fluorescenci, ko emitē fluorescentās proves (krāsas), kad krāsotas šūnas lineāra plūsmā šķērso lāzera staru noteiktā leņķī (2. B attēls).

Promocijas darbā tika izstrādāti vispārējie *SGPI* krāsošanas metodes norādījumi. Neapstrādāti upes ūdens paraugi un ar augstu temperatūru vai hloru apstrādāti paraugi tika krāsoti ar *SGPI*, noturēti dažādos apstākļos ar atšķirīgiem parametriem, mērījumu veikšanas intervāli 40–60 s. Norādījumi ietver vairāku parametru testēšanu: krāsu darba šķīdums, krāsas koncentrācijas, krāsošanas temperatūra un laiks, kas var būtiski ietekmēt krāsošanas rezultātu, ja nav pareizi piemeklēts. Piemēram, redzams, ka *DMSO* (plūsmas citometrijā bieži izmantots krāsu atšķaidīšanai) palielināja šūnu membrānu caurlaidību un radīja nepareizu datu interpretāciju (3. attēls); *TRIS* buferis tika ieteikts kā alternatīva.



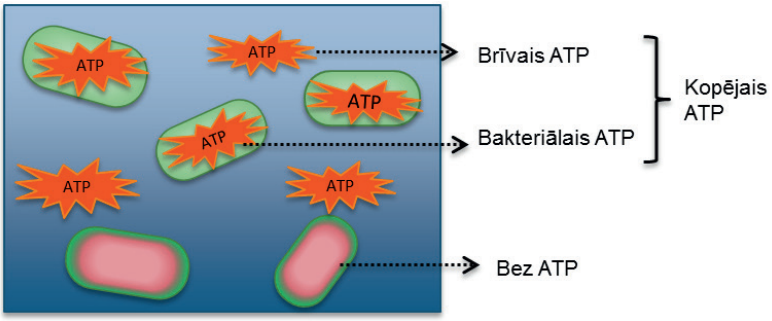

3. attēls. *TRIS* bufera (pH = 8,1) un *DMSO* ietekme uz *SGPI* krāsošanu.
*TRIS* un *DMSO* tika izmantoti *SGPI* darba šķīduma pagatavošanai. Upes ūdens paraugi tika krāsoti 25 min 37 °C temperatūrā ar 3 µM *PI* 10,000 reizes atšķaidītā *SG* (*n* = 30) [12].

Līdzīgie eksperimenti parādīja, ka *PI* koncentrācijā, kas ir zemāka par 3 µM, bojātu šūnu krāsošana ir nepilnīga, bet augstākā par 12 µM *PI* koncentrācijā radīja pseido *PI*-pozitīvas šūnas. 6 µM *PI* koncentrācija tika izvēlēta par optimālo. Zemā temperatūrā (25 °C) reakcija bija lēna, un ne visas baktērijas tika iekrāsotas, bet 44 °C temperatūra izraisīja šūnu bojāšanos, kas deva kļūdainu rezultātu. Par optimālo krāsošanas temperatūru tika izvēlēta 35 °C. Lai iekrāsotos visas šūnas un varētu iegūt stabilus rezultātus, ņemot vērā iepriekš minētos parametrus, bija nepieciešamas aptuveni 12–15 min. *EDTA* pievienošanas rezultātā

radās 1–39 % lielāks *PI*-pozitīvu šūnu daudzums, salīdzinot ar paraugiem bez *EDTA*. Lai noskaidrotu, vai krāsošana procesā ir nepieciešams izmantot *EDTA*, nepieciešami papildu pētījumi. Šajā pētījumā ir izstrādāts standartizēts protokols, kas balstīts uz eksperimentāliem datiem [12].

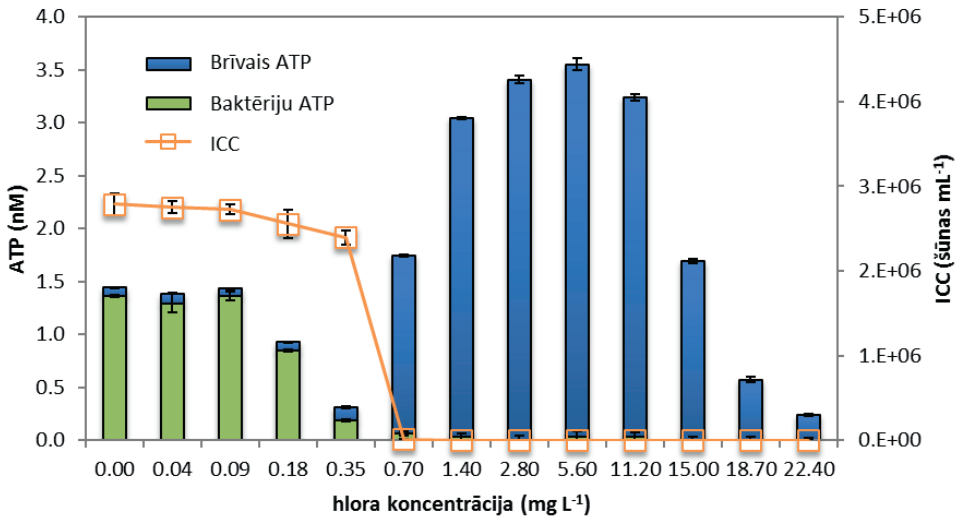
## *ATP* noteikšanas metodes testēšana uz hlorētiem paraugiem

*ATP* ir molekulas, kam ir būtiska loma metaboliskos procesos un dzīvībai svarīgās funkcijās, tās ir galvenās enerģijas pārnesējas šūnās [13]. Tādēļ bakteriālais *ATP* (*intracellular ATP*), visticamāk, norāda uz dzīvu mikroorganismu klātbūtni paraugā. Tomēr *ATP* analīzēm ir potenciālās nepilnības, īpaši tās izraisa brīvais *ATP* (*extracellular ATP*). Ūdens paraugos *ATP* var atrasties šūnā – tā sauktais bakteriālais *ATP*, kas ir tieši saistīts ar dzīvām baktērijām, un ārpus šūnas *ATP* jeb brīvais *ATP* (4. attēls). Kaut gan brīvā *ATP* eksistence jau bija zināma, tā izcelsme nav pilnīgi izskaidrota, un dažreiz brīvais *ATP* tika uzskatīts par metodes/mērījumu kļūdu vai blakusproduktu. Turklāt šī metode parasti tika lietota nehlorēta ūdens pētījumos un hlorētā ūdenī nekad nav bijusi pārbaudīta. Tādēļ bija nepieciešams pētījums par *ATP* uzvedību un stabilitāti hlorētos paraugos.




4. attēls. Shematisks attēls: *ATP* atrašanās ūdens paraugos.
Kopējais *ATP* sastāv no bakteriālā *ATP*, kas ir šūnu vielmaiņai svarīga molekula, un brīvā *ATP*. Baktērijas, kas nesatur *ATP*, nav dzīvas. Pareizus baktēriju dzīvotspējas rezultātus var iegūt, mērot bakterialo *ATP* atsevišķi no brīvā *ATP*.

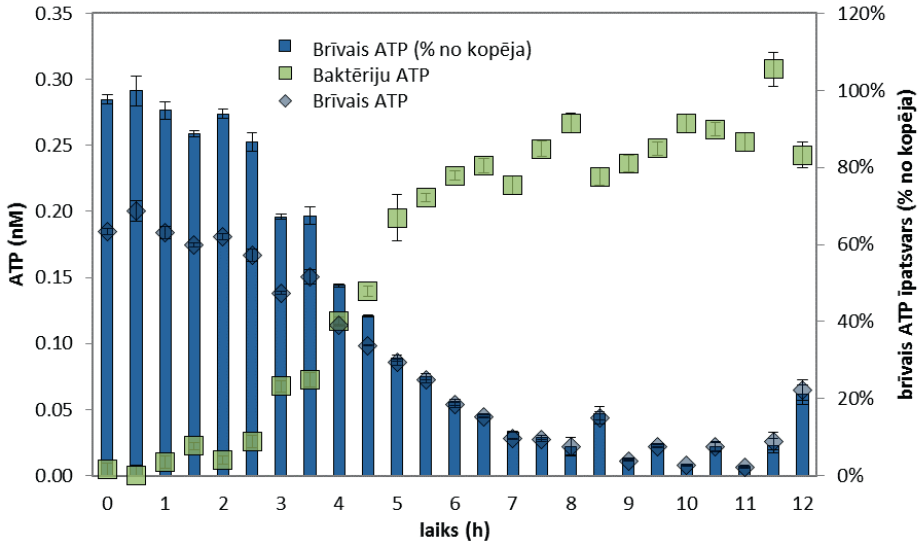
Lai izpētītu hlorēšanas ietekmi uz *ATP*, *Escherichia coli* suspensija tika atšķaidīta filtrētā upes ūdenī ar gala koncentrāciju $3\times10^6$ šūnas $mL^{-1}$, tad nātrija hipohlorīds tika dozēts *E.coli* saturošos paraugos ar sākotnējo brīva hlora koncentrāciju paraugos 0,04–22,4 mg $L^{-1}$. Tika mērīts kopējais un brīvais *ATP*, kā arī paraugi tika krāsoti ar *SGPI*, un *ICC* mērīts ar plūsmas citometru. *ATP* un *ICC* izmaiņas parādītas 5. attēlā.




5. attēls. *ATP* izmaiņas hlora dezinfekcijas rezultātā.
*E.coli* suspensijai tika pievienotas dažādas hlora devas. Stabiņi parāda kopējo *ATP* kā bakteriālā *ATP* (zaļš) un brīvā *ATP* (zils) summu. *ICC* mērīti ar plūsmas citometru pēc *SGPI* krāsošanas. Standartnovirzes iegūtas trīs atkārtojumos [14].

Hlorēšanas procesā tika konstatēta *ATP* izdalīšanās no bojātām baktēriju šūnām, bet tās mehānisms un apjoms bija atkarīgs no hipohlorīda devas. Augstā hlora koncentrācijā (> 0,35 mg-$Cl_2$ $L^{-1}$), kontaktlaikā 5 min tika novērots ievērojams brīvā *ATP* koncentrācijas pieaugums, bet zemākā koncentrācijā bakteriālā *ATP* samazinājums noritēja bez brīvā *ATP* izmaiņām. Brīvā *ATP* pieaugums sakrita ar acīmredzamu *ICC* samazinājumu līdz pat < 0,4 % no sākotnējas koncentrācijas, kas norāda uz bakteriālo šūnu membrānas bojājumiem, kam sekoja gandrīz 100 % brīvā *ATP* īpatsvars paraugā. Šie novērojumi parāda, ka *ATP* ātri izplūst no šūnām, kad to membrānas ir sagrautas līdz tādai pakāpei, kad to var noteikt ar *SGPI* un plūsmas citometrijas analīzēm. Līdzīgie rezultāti tika novēroti analoģiskā eksperimentā ar neattīrītu upes ūdeni, kas nozīmē ka šī ir universālā parādība paraugiem pēc oksidējošās dezinfekcijas.

Lai izpētītu brīvā *ATP* stabilitāti ūdenī, tika veikti vairāki testi. Rezultāti parādīja, ka sterilā vidē brīvā *ATP* molekulas ir stabilas vismaz 20 h, bet tās lēnām samazinājās filtrētā upes ūdenī ($k$ = 0,051 $h^{-1}$ pie 5 °C ($R^2$ = 0,996) un $k$ = 0,145 $h^{-1}$ pie 30 °C ($R^2$ = 0,999)) enzīmu vai arī baktēriju frakciju, kas nebija aizturētā filtrā (0,1 µm), iedarbības rezultātā. Savukārt brīvā *ATP* samazinājums bija daudz straujāks ($k$ = 0,368 $h^{-1}$; $R^2$ = 0,96) dabisko baktēriju populāciju klātbūtnē. Interesanti, ka 12 stundu garā eksperimentā brīvā *ATP* samazinājums sakrita ar bakteriālā *ATP* pieaugumu (6. attēls), kas norāda uz baktēriju augšanu. Tādā veidā mēs secinājām, ka augošas baktērijas sašķēla un/vai uzņēma lielu brīvā *ATP* daudzumu. Atsevišķi tika pārbaudīts, vai dzeramā ūdens baktērijas izmanto brīvo *ATP* vai tā struktūras elementus kā fosfora un oglekļa avotu. Konstatēts, ka brīvais *ATP* tika izmantots kā fosfora avots, no kā izriet, ka brīvais *ATP* var ietekmēt dzeramā ūdens bioloģisko stabilitāti.



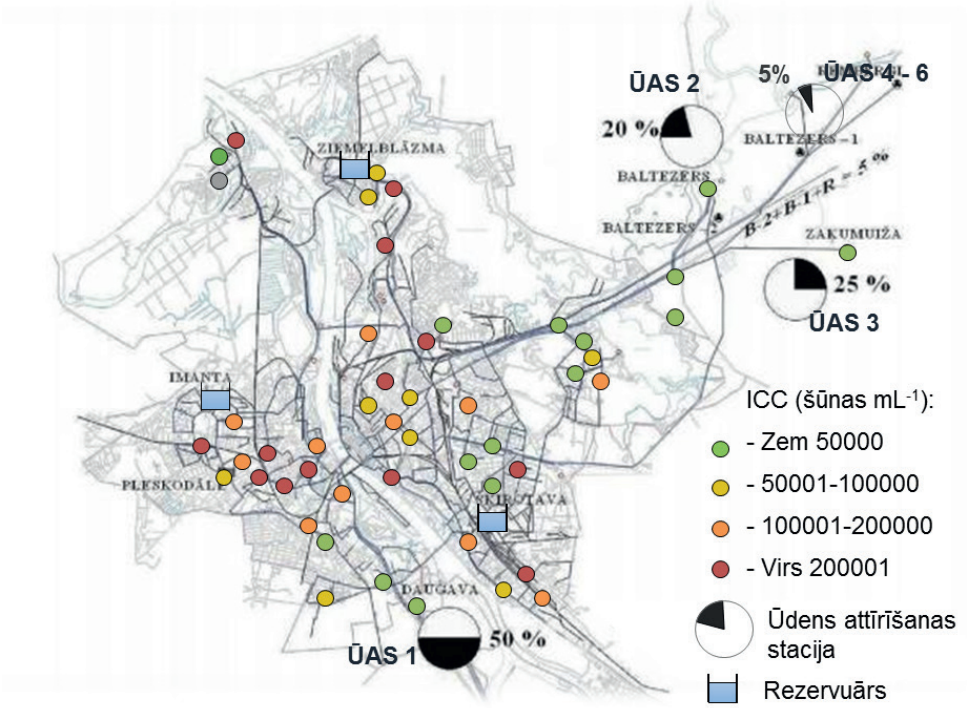

6. attēls. *ATP* izmaiņas ūdens baktēriju augšanas eksperimentā filtrētā upes ūdenī ar dabisko brīvo *ATP* (12 h, 30 °C).

Brīvā *ATP* (rombi) samazinājums sakrīt ar bakteriālā *ATP* (kvadrāti) palielinājumu, tādā veidā pilnīgi izmainot brīvā un bakteriālā *ATP* īpatsvaru (stabiņi) [14].

Ņemot vērā brīvā *ATP* izdalīšanos hlorēšanas procesā, ir skaidrs, ka *ATP*, kas izdalīts no baktērijām noteiktā hlora koncentrācijā (augstākā par c. a. 0,2 g-$Cl_2$ g-$DOC^{-1}$), var kalpot par fosfora avotu. Kaut gan tā koncentrācija ir samērā zema, brīvais *ATP* var veicināt baktēriju augšanu (dzeramajā) ūdenī. Acīmredzot, tā daudzums un ietekme uz bioloģisko stabilitāti ūdensapgādes sistēmās ir atkarīga no sākotnējā suspendēto un bioplēves baktēriju daudzuma pirms hlorēšanas, ka arī no hlora devas. Iegūtie rezultāti akcentē nepieciešamību hlorētos ūdens paraugos noteikt tieši bakteriālo (nevis tikai kopējo) *ATP* [14].

## Tīkla izpēte: laika un telpas bioloģiskās stabilitātes novērtēšana Rīgas ūdens sadales tīklā

Iepriekšminētās metodes tika lietotas bioloģiskās stabilitātes pētīšanai hlorētā dzeramā ūdens sadales tīklā Rīgā. Kopumā tika izvēlētas 49 paraugu ņemšanas vietas ar mērķi aptvert pēc iespējas plašāku teritoriju un ietvert gan tuvākus, gan tālākus rajonus, ņemot vērā attālumu līdz ūdens attīrīšanas stacijām (ŪAS). Šajā pētījumā tika iekļautas trīs ŪAS (1. un 7. attēls), kur virszemes ūdeni (ŪAS 1), mākslīgi papildināto gruntsūdeni (ŪAS 2) un dabisko pazemes ūdeni (ŪAS 3) sagatavo līdz dzeramā ūdens kvalitātei.



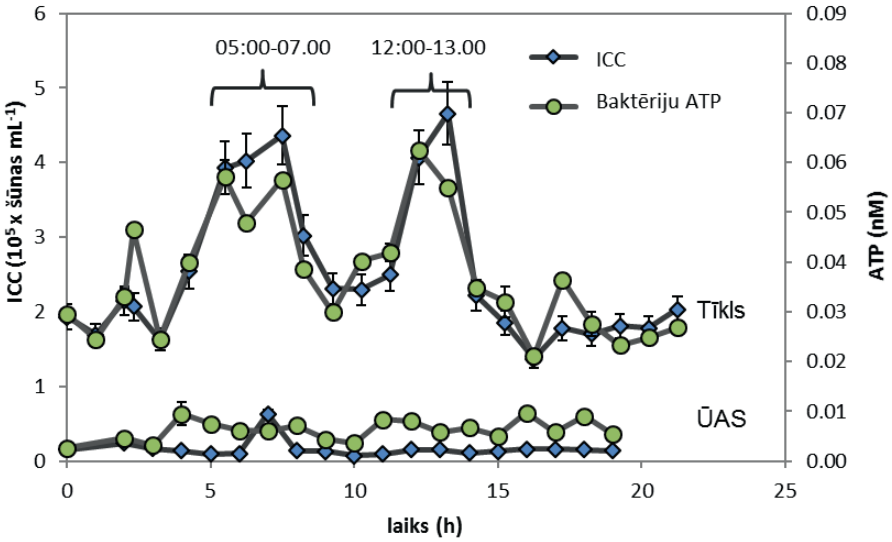

7. attēls. Paraugu ņemšanas vietas ūdensapgādes tīklā, klasificētas pēc *ICC* skaita.
ŪAS 1, ŪAS 2 un ŪAS 3 ir galvenās ūdens attīrīšanas stacijas pilsētā. ŪAS 1 veic virszemes ūdens attīrīšanu, ŪAS 2 un 3 – attiecīgi mākslīgi papildinātā un dabīgā gruntsūdens hlorēšanu. ŪAS 4–6 – parējās sūkņu stacijas ar mazāku nozīmi pilsētas ūdensapgādes sistēmā [15].

Lai labāk atspoguļotu baktēriju augšanas tendences pilsētas mērogā, paraugi tika sadalīti četrās kategorijās, vadoties pēc *ICC*, un attēloti kartē (7. attēls). Paraugu ņemšanas vietas ar viszemākajam *ICC* vērtībām (mazāk nekā $5\times10^4$ šūnas $mL^{-1}$) ir atzīmēti ar zaļu apli. Dzeltenie un oranžie apļi atbilst augstākām *ICC* koncentrācijām, vietas ar visaugstākajām *ICC* (virs $2\times10^5$ šūnas $mL^{-1}$) iezīmētas ar sarkanu krāsu. Atkarībā no ŪAS ūdenī pēc attīrīšanas bija $1{,}84\times10^5$–$5{,}63\times10^5$ šūnas $mL^{-1}$ kā kopējais baktēriju skaits (*total cell count*, *TCC*) un $9{,}7\times10^3$–$2{,}13\times10^4$ šūnas $mL^{-1}$ *ICC*, kas bija 2–5 % no *TCC*. Šie dati liecina par efektīvu dezinfekciju visās ŪAS. *TCC* paraugos no dzeramā ūdens sadales tīkla ($n$ = 49) svārstījās no $1{,}62\times10^5$ šūnas $mL^{-1}$ līdz $1{,}07\times10^6$ šūnas $mL^{-1}$, *ICC* bija no $5{,}28\times10^3$ šūnas $mL^{-1}$ līdz $4{,}66\times10^5$ šūnas $mL^{-1}$ jeb 3–59 % no *TCC*. Svarīgi, ka 50 % no visiem paraugiem bija vairāk nekā $1{,}06\times10^5$ *ICC* $mL^{-1}$, kas ir veselu pakāpi vairāk nekā uzreiz pēc attīrīšanas, kas liecina, ka baktēriju augšana šajā ūdens sadales tīklā nav nejaušs gadījums.

Kā jau bija sagaidāms, vietas, marķētas kartē ar zaļo, pārsvarā atradās rajonos tuvu pie ŪAS. Savukārt visvairāk *ICC* tika konstatēts tālākos no ŪAS rajonos un tā sauktajās „sajaukšanās" zonās, kas var tikt apgādātas ar ūdeni no dažādiem avotiem (ŪAS). Šie novērojumi liecina, ka dzeramais ūdens sadales tīklā nav bioloģiski stabils un ir iespējama baktēriju vairošanās. Samērā zemas *ICC* vērtības pie ŪAS var izskaidrot ar īsu ūdens uzturēšanas laiku, baktēriju augšanas aizkavēšanos paliekošā hlora iedarbībā, mazvarbūtīgu ūdens stagnāciju lielas ūdens plūsmas dēļ. Tas, ka paraugi ar augstāku baktēriju koncentrāciju

pārsvarā atradās tālu no ŪAS, var būt saistīts ar to, ka arvien pieaugoša distance no ŪAS un ūdens uzturēšanas laiks rada paliekošā hlora samazināšanos un, iespējams, barības vielu izplūdi oksidācijas procesā; abi gadījumi var veicināt baktēriju vairošanos. Turklāt "sajaukšanās" zonas ir potenciālie baktēriju vairošanās karstie punkti, jo dažāda tipa ūdenī var būt barības vielas, kas ir limitējošas citam. Savukārt neviendabīgs baktēriju skaits, t. i., samērā augstas un zemas *ICC* koncentrācijas paraugi, tika konstatēts nelielas platības robežās, var būt saistīts ar baktēriju skaita izmaiņām laikā. Šāda parādība tika demonstrēta eksperimentā, kad bakteriālais *ATP* un *ICC* tika mērīti ŪAS 1 izplūdē un sadales tīklā 21 stundu laikā, un tika novērotas ievērojamas bioloģiskā dzeramā ūdens kvalitātes izmaiņas (8. attēls). Visticamāk, tas ir saistīts ar ūdens patēriņa izmaiņām dienas laikā, kas savukārt ietekmē ūdens rezervuāru darbību, ūdens uzturēšanas laiku un baktēriju atdalīšanos no bioplēves.

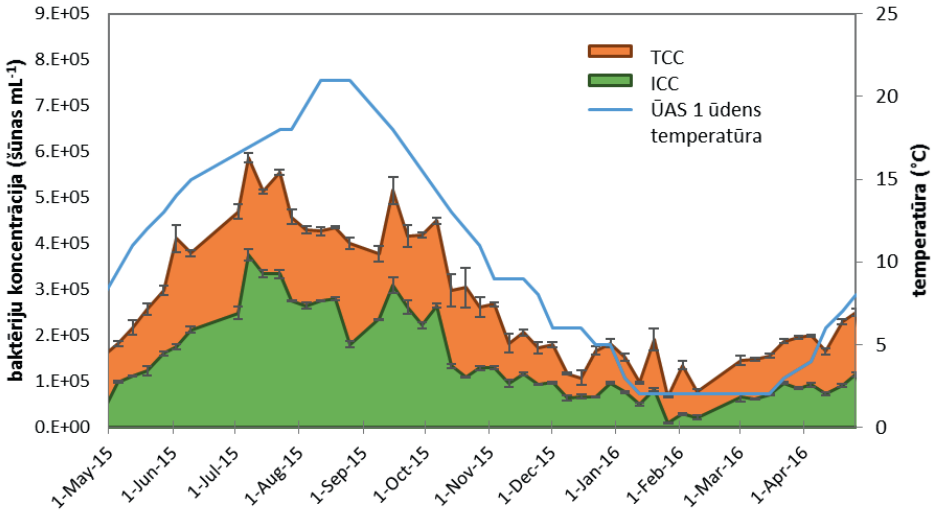
Tādā veidā šis pētījums parādīja bioloģisko nestabilitāti ūdens sadales tīklā, ko izraisīja baktēriju vairošanās. Kaut gan šā pētījuma posma rezultāti neliecina par to, ka hlorēšana veicina baktēriju vairošanos, ir skaidrs, ka ar hlorēšanu mikroorganismu vairošanos apturēt nebija iespējams [15].




8. attēls. Bioloģisko parametru izmaiņas ŪAS un sadales tīkla paraugos diennakts laikā. 21 stundu ŪAS 1 ($n$ = 19) un sadales tīkla ($n$ = 23) monitorings parāda gandrīz nemainīgas *ATP* un *ICC* vērtības ŪAS un ievērojamas svārstības tīkla paraugā [15].

## Tīkla izpēte: ilgtermiņa bioloģiskās stabilitātes pētīšana

Iepriekšējais pētījums ūdens sadales tīklā bija ierobežots laikā: paraugi tika ņemti divu nedēļu garumā, tāpēc bija nolemts veikt atsevišķu pētījumu, lai noskaidrotu, vai bioloģiskā nestabilitāte izpaužas arī ilgtermiņā. Paraugiem no divām vietām ūdens sadales tīklā *TCC* un *ICC* tika mērīti katru nedēļu viena gada garumā. Pie tam, viena vieta tika apgādāta pārsvarā ar ūdeni no virszemes ūdens avota (ŪAS 1), otra, visticamāk, – arī no gruntsūdens (ŪAS 2 un 3).



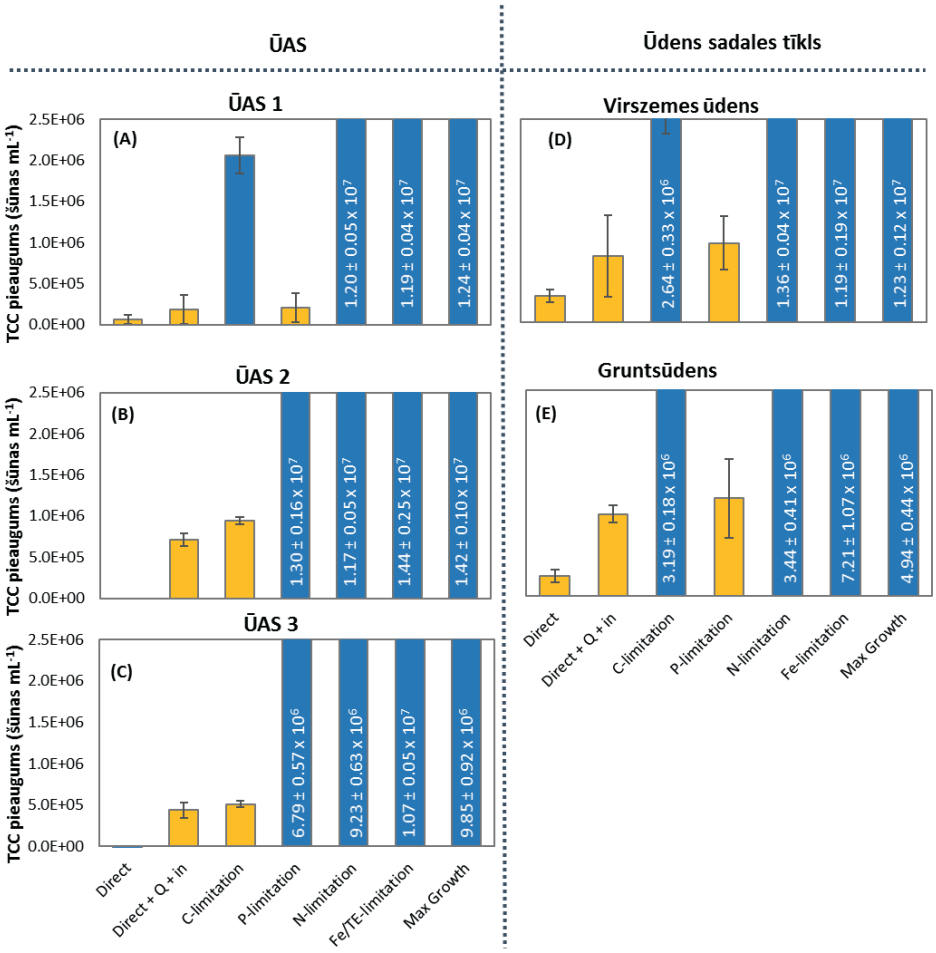

9. attēls. Baktēriju skaita izmaiņas ūdens sadales tīkla paraugā un ūdens temperatūra ŪAS 1 izplūdē viena gada novērošanas laikā ($n$ = 48).

12 mēnešu laikā tika konstatētas sezonālas *TCC* un *ICC* izmaiņas dzeramā ūdens sadales tīkla paraugos ($n$ = 48) (9. attēls). Sadales tīkla paraugā no ŪAS 1 *TCC* svārstījās no 0,67 līdz $5{,}87\times10^5$ šūnas $mL^{-1}$, un *ICC* vērtības bija $0{,}1–3{,}75\times10^5$ šūnas $mL^{-1}$, kas nozīmē, ka dažādā laikā baktēriju koncentrācija var atšķirties par vienu pakāpi. Viena gada monitorings parādīja, ka augstāka baktēriju koncentrācija paradījās siltā laikā: visas *TCC* un *ICC* vērtības, kas bija lielākas par vidējo, bija novērotas no maija līdz oktobrim, un pārējā novērošanas periodā tās bija zemākas. Pie tam, *TCC* un *ICC* svārstību tendence bija līdzīga ūdens temperatūras izmaiņām ŪAS 1 izplūdē. Korelācijas starp baktēriju koncentrāciju ūdenī un tā temperatūru bija: $R^2$ = 0,82 starp temperatūru un *TCC*, un $R^2$ = 0,8 – ar *ICC* ($n$ = 37). Rezultāti parādīja, ka ūdens temperatūra ietekmē vairākus procesus, kas savukārt nosaka dzeramā ūdens kvalitāti sadales tīklā. Pirmkārt, neattīrītā virszemes ūdenī mazāk baktēriju bija ziemas laikā, kad ūdens temperatūra bija zema. Otrkārt, arī pēc biofiltriem ziemā, kad ūdens temperatūra bija 1 °C, salīdzinot ar vasaras mēnešiem ar ūdens temperatūru 21 °C, tika konstatēta daudz mazāka baktēriju koncentrācija. Beidzot, ŪAS 1 izplūdes un attiecīgā ūdens sadales tīkla paraugu mikroorganismu skaita salīdzinājums parādīja, ka ziemā to starpība (= vairošanās) ir mazāka. Savukārt gruntsūdenī netika konstatētas būtiskas sezonālas izmaiņas – gan ūdens temperatūra, gan baktēriju daudzums bija līdzīgs visa gada garumā.

Kopumā rezultāti liecina par to, ka dzeramā ūdens kvalitātes nodrošināšanai un vērtēšanai ir jāņem vērā dažādi gadalaiki, klimats un ūdens veids. Tas nozīmē, ka noteicošo parametru robežvērtības/bāzes līnija ir jādefinē atkarībā no sezonālām svārstībām, kā arī ŪAS darbību (dezinfekciju) var pielāgot arī sezonālām izmaiņām.

## Augšanu limitējošo barības vielu noteikšana Rīgas ūdens sadales tīklā

Iepriekšējās daļās tika parādīta dzeramā ūdens nestabilitāte tīklā. Tika noskaidrots, ka paliekoša hlora koncentrācija nav pietiekama, lai novērstu baktēriju vairošanos. No otras puses, baktēriju vairošanās ir iespējama tikai ar nosacījumu, ka ūdenī ir visas augšanai (vielmaiņai) nepieciešamas barības vielas. Kaut gan *AOC* formēšanās hlorēšanas rezultātā bija zināma no iepriekšējiem pētījumiem, šajā promocijas darba tika noskaidrots, ka hlora iedarbība uz baktērijām var radīt arī *ATP* izdalīšanos, ko baktērijas var izmantot kā fosfora avotu. Tāpēc promocijas darba mērķis bija izpētīt, vai hlora iedarbībā saražotās vielas veicina baktēriju vairošanos pētāmajā ūdensapgādes tīklā, vai šīm vielām ir cita izcelsme.




10. attēls. Baktēriju pieaugums ŪAS un sadales tīkla paraugos, aprēķināts kā *TCC* izmaiņas pēc 72 h ar dažādām barības vielu kombinācijām.

Augšanas potenciāls tika mērīts ŪAS 1 (A), ŪAS 2 (B) un ŪAS 3 (C) izplūdē un virszemes (D) un pazemes ūdenim (E) atbilstošos sadales tīkla paraugos. Negatīvas kontroles paraugi (*direct and direct + Q +in*) un augšanu limitējošās kombinācijas parādītas ar dzeltenu krāsu.

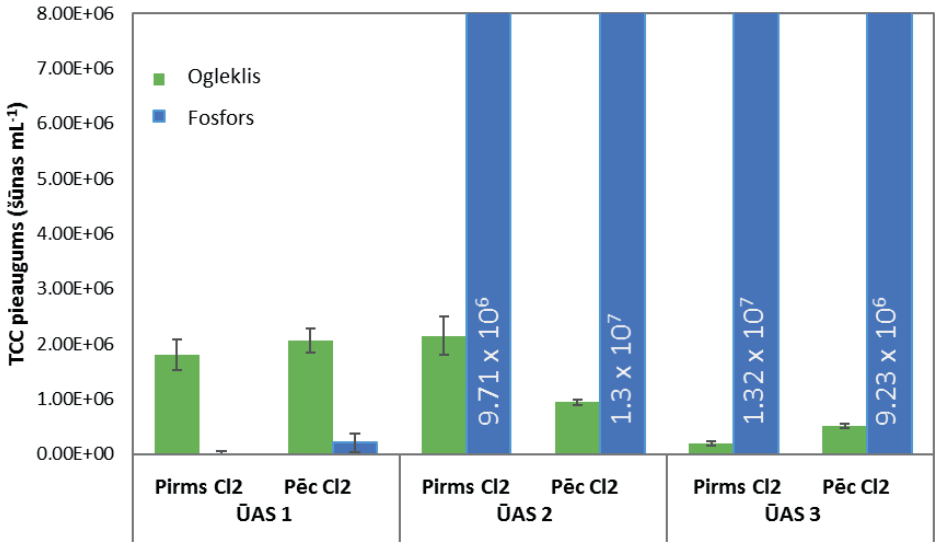
Bija nepieciešama esošo baktēriju limitējošo barības vielu noteikšanas metožu uzlabošana, jo parasti tās tika balstītas tikai uz vienu parametru, kas varēja radīt nepareizus secinājumus, ja augšana ir limitēta ar citām vielām. Atsevišķu metožu rezultātus nebija iespējams salīdzināt, jo tajās bija ņemta vērā dažāda baktēriju augšanai nepieciešamo barības vielu koncentrācija. Šajā darbā izmantotā metode balstīta uz augšanas potenciāla metodes, ko savā pētījumā aprakstījuši *Prest* un kolēģi [16], un mikrobioloģiski pieejama fosfora noteikšanas metodes [17] kombināciju. Paraugi ar un bez hlora neitralizācijas tika inkubēti bez papildu barības vielu pievienošanas (*Direct+Q+in* un *Direct*, 10. attēls) un kalpoja kā negatīvās kontroles. Pozitīvās kontroles paraugiem (*Max Growth*, 10. attēls) tika pievienotas barības vielas, kas bija pārākumā attiecībā uz baktēriju augšanai nepieciešamo daudzumu pie pievienota oglekļa koncentrācijas 1 mg $L^{-1}$ *AOC*. Limitējošo barības vielu noteikšanai interesējošais elements netika pievienots kopā ar pārējām vielām. Salīdzinot baktēriju pieaugumu ar kontroles paraugiem, tas ļāva novērtēt, vai paraugs satur šo elementu un cik lielā mērā tas veicina vairošanos. Baktēriju pieaugumu nosaka ar *TCC* mērījumiem pēc paraugu 72 h inkubācijas (30 °C).

Paraugi limitējošo barības vielu noteikšanai tika ņemti pirms un pēc hlorēšanas trijās ŪAS un divās vietās ūdens sadales tīklā, kurās attiecīgi pārsvarā ir virszemes ūdens vai gruntsūdens. Paraugi tika analizēti uz baktēriju augšanas limitēšanu ar oglekli, fosforu, slāpekli un dzelzi (C-, P-, N-, Fe-*limitation*, 10. attēls).

Rezultāti parādīja, ka bez papildu vielu pievienošanas un bez hlora neitralizācijas ūdens uzreiz pēc attīrīšanas neveicina baktēriju vairošanos. Interesanti, ka attīrītam virszemes ūdenim un gruntsūdenim baktēriju vairošanās limitējošās/veicinošās vielas bija dažādas. Primārais vairošanos limitējošais elements attīrītā virszemes ūdenī no ŪAS 1 bija fosfors (10. A attēls). Ja pārējās vielas bija pārākumā, fosfors pašā paraugā varēja radīt 2,07 ± 1,75×$10^5$ šūnas $mL^{-1}$ baktēriju pieaugumu, kas nebija statistiski nozīmīgi atšķirīgs no negatīvas kontroles ar hlora neitralizāciju (1,83 ± 1,78×$10^5$ šūnas $mL^{-1}$, $P > 0,05$).

Savukārt baktēriju vairošanos gruntsūdenī limitēja organiskais ogleklis (10. B C attēls). Oglekļa daudzums ŪAS 2 izplūdē varēja sekmēt 9,42 ± 0,474 × $10^5$ šūnas $mL^{-1}$ pieaugumu (94 µg *AOC* $L^{-1}$), ŪAS 3 – 7,12 ± 0,371×$10^5$ šūnas $mL^{-1}$ (71 µg *AOC* $L^{-1}$), kas tāpat kā ŪAS 1 gadījumā arī nebija statistiski nozīmīgi atšķirīgs no negatīvas kontroles ar hlora neitralizāciju (6,4 ± 0,908 ×$10^5$ šūnas $mL^{-1}$, $P > 0,05$). Baktēriju pieaugums paraugā bez papildu fosfora bija līdzīgs kā pozitīvās kontroles paraugā, kas liecina par to, ka fosfors ir pārākumā un nelimitē baktēriju vairošanos uzreiz pēc attīrīšanas nevienā no gruntsūdens paraugiem.

Baktēriju vairošanās limitējošo vielu sadalījums ūdens sadales tīklā izmainījās. Fosfors kļuva par primāro vairošanos limitējošo elementu abos sadales tīkla paraugos (10. D un E attēls). Gruntsūdens tīkla paraugā fosfors veicināja 1,19 ± 0,474×$10^6$ šūnas $mL^{-1}$ pieaugumu, vai 10 reizes mazāk nekā ŪAS 2&3 izplūdē. Kaut gan virszemes ūdens tīkla paraugā fosfors palika limitējošais, tas sekmēja piecas reizes lielāku baktēriju pieaugumu nekā tieši pēc ŪAS 1 jeb 9,76 ± 3,29×$10^5$ šūnas $mL^{-1}$. Gruntsūdens tīkla paraugā izmaiņas bija arī attiecībā uz *AOC* saturu, kur bija trīs reizes vairāk organiskā oglekļa nekā pēc attīrīšanas (3,19 ± 0,18×$10^6$ šūnas $mL^{-1}$). Savukārt izmaiņas *AOC* daudzumā virszemes ūdens tīklā parauga nebija statistiski nozīmīgi atšķirīgas ($P > 0,05$).




11. attēls. Baktēriju vairošanos limitējošo barības vielas izmaiņas hlorēšanas rezultātā.

Augšanu limitējošo barības vielu izdalīšanās bija atkarīga no ūdens avota veida un iepriekšējās attīrīšanas. Augšanas potenciāla mērījumi pirms un pēc hlorēšanas parādīja statistiski nozīmīgu ($P < 0{,}05$) baktēriju augšanu fosfora pieauguma dēļ ŪAS 2 un oglekļa izmaiņām (31 µg *AOC* $L^{-1}$ pieaugums) ŪAS 3 (11. attēls). Limitējošo vielu izmaiņas ŪAS 1 bija negatīvas (samazinājās) vai nebija statistiski nozīmīgi atšķirīgas ($P > 0{,}05$). No bioloģiskās stabilitātes viedokļa tikai izdalītais *AOC* ŪAS 3 varēja palielināt baktēriju augšanas riskus. Kaut gan fosfora daudzums ŪAS 2 bija lielāks pēc hlorēšanas, ūdens tajā nebija limitēts ar fosforu, tāpēc šajā gadījumā mēs neuzskatām to par nestabilitāti veicinošu faktoru.

Dati rāda, ka ūdenim, kas nonāk vienā ūdens sadales tīklā, ir dažādas, bet savstarpēji papildinošas, barības vielas. Kaut gan limitējošo barības vielu palielinājums tika novērots ŪAS 3, ir maz ticams, ka tas bija galvenais bioloģiskās stabilitātes iemesls šajā ūdensapgādes sistēmā. Izmaiņas bioloģiskās stabilitātes īpašībās nozīmē, ka sistēmā ar dažādiem sākotnējiem augšanu veicinošiem parametriem, iespējams, notiek barības vielu pārnešana. Tāpēc šāda veida ūdens sadales tīklos ir jāņem vērā paaugstinātais baktēriju augšanas risks.

# ZINĀTNISKĀ NOVITĀTE UN DARBA GALVENIE REZULTĀTI

- *SGPI* krāsošanas procesa optimizācijai tika pārbaudīti dažādi parametri, dažos testos tika izmantots unikāls pilnībā automatizēts plūsmas citometrs. Promocijas darbā tika izstrādāti vispārējie *SGPI* krāsošanas metodes norādījumi. Pārbaudes laikā tika noteikti vispiemērotākie parametri attīrītā un neattīrītā ūdens paraugiem: *SGPI* darba šķīduma pagatavošanai tika izvēlēts *TRIS* buferis, optimālā *PI* koncentrācija – 6 μM, vispiemērotākā krāsošanas temperatūra – 35 °C. Lai iegūtu stabilus rezultātus, bija nepieciešamas 12–15 minūtes. Īpaši izcelta tika metožu un protokolu standartizēšanas nepieciešamība.
- *ATP* metode tika testēta tieši hlorētiem paraugiem, un dezinfekcijas mehānisms tika papildināts ar iepriekš nezināmiem procesiem. Augstā hlora koncentrācijā (> 0,35 mg-$Cl_2$ $L^{-1}$) kontaktlaikā 5 min tika konstatēts ievērojams brīvā *ATP* koncentrācijas pieaugums, bet zemākā koncentrācijā bakteriālā *ATP* samazinājums noritēja bez brīvā *ATP* izmaiņām. Tādā veidā membrānas sagraušana hlorēšanas rezultātā rada *ATP* izplūdi no baktērijām, un *ATP* hidrolīze šūnā nenotiek vai nenotiek pilnībā.
- Baktērijas var patērēt brīvo *ATP* kā fosfora avotu, bet *ATP*-oglekli baktērijas neizmanto. Zināmā mērā brīvais *ATP* var ietekmēt ūdens bioloģisko stabilitāti.
- Ar jaunām baktēriju dzīvotspējas noteikšanas metodēm detalizēti tika izpētīta bioloģiskā stabilitāte hlorētā dzeramā ūdens sadales tīklā:
  - telpiskās bioloģiskās stabilitātes pētījums ietvēra 49 paraugu ņemšanas vietas sadales tīklā un ŪAS paraugus;
  - katru nedēļu viena gada garumā tika analizētas divas vietas;
  - 21 h laikā ik pēc stundas tika analizēti ŪAS 1 izplūdes un atbilstošā tīkla paraugs (pēc ūdens uzturēšanas laika).
- Tīklā tika konstatēta telpiskā bioloģiskā nestabilitāte, un lielāka baktēriju koncentrācija tika novērota no ŪAS tālākos rajonos. 50 % no visiem paraugiem bija vairāk nekā $1{,}06\times10^5$ *ICC* $mL^{-1}$, kas ir par veselu pakāpi vairāk nekā uzreiz pēc attīrīšanas, un tas liecina, ka baktēriju vairošanās šajā ūdens sadales tīklā nav nejaušs gadījums.
- Ūdens sadales tīklā tika novērotas sezonālās izmaiņas: baktēriju koncentrācijas starpība ziemā un vasarā varēja sasniegt vienu pakāpi. Tas ir saistīts ar vispārēji mazāku baktēriju daudzumu virszemes ūdenī ziemas laikā, kad ūdens temperatūra ir zema, un zemāku baktēriju aktivitāti biofiltros, kas nosaka sākotnējo bioloģisko ūdens sastāvu šāda tipa ŪAS. Tika konstatēts, ka arī baktēriju vairošanās līmenis tīklā ir atkarīgs no sezonas. Savukārt gruntsūdenī būtiskas sezonālas izmaiņas netika konstatētas.
- Baktēriju vairošanās potenciāla metode tika uzlabota un lietota tīkla bioloģiskās nestabilitātes pētīšanā. Uzreiz pēc attīrīšanas ūdens neveicināja baktēriju vairošanos. Tomēr ūdenī no dažādiem avotiem tika konstatētas dažādas, bet savstarpēji papildinošas barības vielas, kas var palielināt baktēriju vairošanās riskus dzeramā ūdens sadales tīklos. Turklāt ūdens bioloģiskā stabilitāte un barības vielu daudzums sadales tīklā mainījās: virszemes ūdens tīkla paraugā fosfors sekmēja piecas reizes lielāku baktēriju pieaugumu nekā tieši pēc ŪAS 1, gruntsūdenī bija trīs reizes vairāk organiskā oglekļa un 10 reizēs mazāk fosfora nekā ŪAS 2&3 izplūdē.
- Atkarībā no ŪAS augšanas veicinošu vielu pieaugums bija dažāds. Vairāku attīrīšanas posmu ŪAS 1 hlorēšanas rezultātā barības vielas neveidojās, bet fosfors tika izdalīts

ŪAS 2 un ogleklis (31 µg *AOC* $L^{-1}$) ŪAS 3, un tikai pēdējais varēja ietekmēt bioloģisko stabilitāti. Mēs uzskatām, ka baktēriju augšanas riski vairāk saistīti ar zemu paliekošā hlora koncentrāciju un dažādām augšanu veicinošām barības vielām dažādos ūdens avotos, kas, nonākot vienā sadales tīklā, var radīt augšanai labvēlīgus apstākļus.

## PRAKTISKAIS LIETOJUMS

*ATP* un *SGPI* plūsmas citometrija pierādīja, ka tās ir ātras, uzticamas kvantitatīvās baktēriju dzīvotspējas noteikšanas metodes un var tikt veiksmīgi izmantotas bioloģiskās stabilitātes novērtēšanai un augšanas potenciāla mērījumos. Šīs metodes var ieteikt regulāram dzeramā ūdens kvalitātes monitoringam papildus standarta kultivēšanas metodēm vai pat to vietā. Bioloģiskā piesārņojuma gadījumā *ATP* un citometriskās metodes reaģētu daudz ātrāk, līdz ar to dotu iespēju ātri novērst piesārņojuma izplatīšanos. Pie tam, izmantojot šīs metodes, īsā laikā var iegūt lielu datu apjomu, kas veicinātu labāku izpratni par ūdensapgādes sistēmas darbību un procesiem tīklā. Šobrīd arvien lielāku interesi izraisa tā sauktās "agrās brīdināšanas sistēmas", ko var izmantot baktēriju izplatīšanās prognozēšanai sadales tīklā, automātiskai piesārņojuma atpazīšanai un ziņošanai atbildīgajām institūcijām. Šādu sistēmu izveidei ir nepieciešams liels datu daudzums, un bieži tas ir nopietns šķērslis modeļiem, kas balstīti uz bioloģiskiem mērījumiem. Šo uzdevumu risināšanā būtu noderīgas ātras un detalizētas *ATP* un citometriskās metodes, nodrošinot nepieciešamos datus, ko var integrēt modeļos sistēmas izveidei, uzlabošanai un validācijai. Fluorescento krāsošanu un plūsmas citometrijas mērījumus ir iespējams automatizēt un izmantot tiešsaistes dzeramā ūdens kvalitātes monitoringā reālā laikā.

Dzeramā ūdens piegādātājam ir jāņem vērā tas, ka *ATP* un citometriskās metodes nav standartizētas un likumdošana tās neregulē. Šobrīd tās var lietot kā papildu metodes, lai individuālie piegādātāji varētu nodrošināt dzeramā ūdens kvalitāti. Baktēriju skaita noteikšanai dzeramā ūdenī ir standartizētas tikai kultivēšanas metodes, un ūdens kvalitātes kontrolei sadales tīklā obligātas ir tikai fekālo indikatororganismu analīzes [18, 19]. Interesants ir fakts, ka, neskatoties un zināmu kultivēšanas metožu trūkumu, padomes Direktīvā 98/83/EC, kas ir Latvijas likumdošanas akta pamatā, ir teikts, ka ūdens kvalitātes metodēm, kas paredzētas uzturā lietojamā ūdens analīzei, jānodrošina uzticami un salīdzināmi rezultāti ("*The methods used to analyse the quality of water intended for human consumption should be such as to ensure that the results obtained are reliable and comparable*") [18], tajā pašā laikā iesakot laikietilpīgas un nepilnīgas kultivēšanas metodes ikdienas ūdens bioloģiskās kvalitātes analīzēm. Ideālā gadījumā ir jāizvērtē iespēja likumdošanā iekļaut konkrētu, no kultivēšanas neatkarīgu metožu izmatošanu.

Bioloģiskās nestabilitātes pierādījums un, salīdzinot ar ŪAS novērojumiem, vispārīgi augstāks baktēriju augšanas potenciāls pētāmā ūdens sadales tīklā liecina par to, ka ar bioloģiskās stabilitātes novērtējumu ŪAS ne vienmēr var prognozēt baktēriju augšanu tīklā. Lai labāk izprastu situāciju ūdensapgādes tīklā un identificētu problemātiskās vietas, kurās baktēriju daudzums vai augšanas potenciāls ir visaugstākais, augšanas potenciāls ir jāanalizē vairākās vietās sistēmā. Ūdens kvalitātes pasliktināšanās, kas saistīta ar baktēriju vairošanos, visbiežāk rodas attālinātās vietās, kurām ir raksturīgs liels ūdens uzturēšanas laiks; „sajaukšanās" zonās, ja ir vairāki ūdens avoti; vietās, ko ietekmē ūdenstorņi, un rajonos ar zemu ūdens patēriņu un augstu ūdens uzturēšanas laiku, piemēram, bijušās industriālās zonas. Turklāt monitorings viena gada garumā parādīja sezonālas tendences,

kas savukārt ir atkarīgas no vietas un ūdens avota. Analizējot dzeramā ūdens kvalitāti, ir jāņem vērā sezonālas atšķirības – siltam gadalaikam normāla baktēriju koncentrācija, visticamāk, liecinās par ūdens piesārņojumu ziemā. Atkarībā no gadalaika var tikt optimizēta ŪAS darbība, un tas var palielināt sistēmas drošumu un, iespējams, samazināt izmaksas. Piemēram, ziemas laikā, kad ūdens temperatūra ir zema, ir maz baktēriju un to aktivitāte un vairošanās biofiltros un tīklā ir zema, hlora devas var tikt samazinātas vai hlorēšana vispār atcelta. Kad neattīrītā ūdenī nav tik daudz mikroorganismu un to ļauj ķīmiskās ūdens kvalitātes prasības, līdzīgi var tikt samazināta arī ozonēšanas intensitāte. Protams, pirms samazināt dezinfekciju, ir jāveic dezinfekcijas efektivitātes riska analīzes. Savukārt vasarā, karstā laikā, kad baktēriju daudzums ir ievērojami lielāks, var palielināt hlora devu, lai novērstu baktēriju vairošanos tīklā.

Interesants novērojums ir tas, ka vienā un tajā pašā ūdens sadales tīklā nonāk dažādi ūdeņi ar atšķirīgām barības vielu limitācijām. Tas rada nepieciešamību analizēt vairākas vielas, kas potenciāli var ietekmēt bioloģisko stabilitāti. Šis novērojums liecina arī par iespējamām ar baktēriju augšanu saistītām problēmām „sajaukšanas zonās", t. i., kur var tikt dažāda veida ūdens atkarībā no ūdens patēriņa un hidrauliskiem apstākļiem. Ir jāparedz arī iespējamus risinājumus, kā samazināt barības vielu koncentrācijas ūdenī. Konkrētajā ūdensapgādes sistēmā to var sasniegt ar papildu ūdens attīrīšanas posmiem gruntsūdens ŪAS, piemēram, ar biofiltrāciju. Ja organiskā oglekļa un fosfora izdalīšanas norit pietiekami efektīvi, tad var izvērtēt hlorēšanas pārtraukšanas iespēju. Mūsu rezultāti, piemēram, parādīja, ka hlorēšanas procesā tiek iznīcināta liela mikroorganismu daļa, bet paliekošā hlora daudzums nav pietiekams, lai novērstu baktēriju vairošanos tīklā. Atsevišķos gadījumos pēc hlorēšanas var veidoties barības vielas, un tas tika konstatēts arī divās no trijām Rīgas ŪAS. Kaut gan mēs uzsveram, ka hlorēšanas rezultātā izdalītās barības vielas nav galvenais bioloģiskās nestabilitātes iemesls Rīgas ūdens sadales tīklā, vajadzība pēc hlorēšanas nav viennozīmīga. Bez tam, ir zināms, ka dzeramā ūdens sistēmas Amsterdamā un Cīrihē ir bioloģiski stabilas arī bez hlorēšanas [2, 3]. Pirms pieņemt lēmumu, ir jāpārbauda, vai no ŪAS izejošā ūdenī nav patogēnu mikroorganismu, jo to iznīcināšana ir primārais hlorēšanas uzdevums. Lai pārliecinātos, ka hlorēšanas atcelšana neizraisīs baktēriju un patogēnu mikroorganismu vairošanās problēmas tīklā, hlora devu var samazināt pakāpeniski, pastiprinot ūdens kvalitātes kontroli sadales tīklā. No otrās puses, lai novērstu baktēriju vairošanos, hlora koncentrāciju var palielināt. Tomēr abos gadījumos ir vēlams identificēt mikroorganismu sugas, kas vairojas tīklā, un saprast, kādus riskus tās rada. Šie apsvērumi ir jāņem vērā arī Rīgas pilsētas ūdens drošības plānu izveidē.

Barības vielu pieaugums ūdensapgādes tīklā, visticamāk, ir vairāku faktoru kombinācija, un ir arī skaidrs, ka nozīmīga loma ķīmiskā sastāva izmaiņā ir arī ūdens un cauruļu virsmas/bioplēves mijiedarbībai. Tādēļ sistēmās var veikt cauruļvada skalošanu , lai uzlabotu ūdens kvalitāti ar augstu baktēriju vairošanās risku.

## SECINĀJUMI

Promocijas darba mērķis bija novērtēt dzeramā ūdens bioloģisko stabilitāti hlorētos dzeramā ūdens sadales tīklos, īpaši Rīgas ūdensapgādes tīklā. Tīklā tika konstatēta nestabilitāte laikā un telpā, un tas bija saistīts ar baktēriju vairošanos tīklā.

Atsevišķos apstākļos hlorēšana var palielināt vairošanās veicinošu barības vielu koncentrāciju ūdenī. To daudzums ir atkarīgs no konkrēta ūdens avota un attīrīšanas. Šajā ūdensapgādes sistēmā limitējošu barības vielu palielinājums tika konstatēts tikai vienā ŪAS. Lai arī mēs secinājām, ka hlorēšana nav galvenais ūdens nestabilitātes iemesls, tā rada labvēlīgus apstākļus baktēriju vairošanās procesam: hlorēšana neveicināja ievērojamu barības vielu pieaugumu pētāmajā tīklā, bet arī neaizkavēja baktēriju vairošanos. Bioloģiskā nestabilitāte, visticamāk, bija izraisīta ar atšķirīgām barības vielām dažādos ūdens veidos.

Hlorēšanas rezultātā no baktērijām izdalās *ATP*, un ūdens baktērijas spēj patērēt brīvo *ATP* kā fosfors avotu. Tas nozīmē, ka noteiktos apstākļos tas var radīt bioloģiskās nestabilitātes risku. Tika pierādīts, ka baktērijas izmanto brīvo *ATP*, lai notiktu vairošanās. Lai noskaidrotu, vai hlorēšanas apstākļos izdalītais *ATP* var faktiski ietekmēt baktēriju vairošanos un salīdzinātu to ar nehlorētu ūdeni, ir nepieciešami nākamie pētījumi. Šis pētījums bija fokusēts uz suspendētām baktērijām. Iespējamā ietekme no bioplēves baktērijām izdalītā *ATP* vēl jāpēta.

Metožu optimizācijas un pareizas rezultātu interpretēšanas svarīgums tika parādīts ar konkrētiem piemēriem. Darbs pie krāsošanas metodes norādījumu izstrādes un *ATP* metodes testēšanas sekmēja dziļāku izpratni par šūnu nāves mehānismu un pašu metožu darbības mehānismiem.

Atšķirīgas baktēriju vairošanās limitējošas īpašības dažāda veida ūdeņos un to izmaiņas ūdens sadales tīklā akcentē risku, kas saistīti ar bioloģisko stabilitāti "jauktās" ūdensapgādes sistēmās, novērtēšanas svarīgumu. Lai saprastu procesus, kas ietekmē barības vielu pārnesi sadales tīklos, ir nepieciešami tālāki pētījumi.

Apkopojot šā darba rezultātus un novērojumus, mēs secinājām, ka ir jāizvērtē hlorēšanas nepieciešamība gan no dezinfekcijas efektivitātes, gan no bioloģiskās stabilitātes viedokļa katrai ūdensapgādes sistēmai. Lai optimizētu ūdens attīrīšanu, līdz minimumam samazinātu baktēriju augšanu un nodrošinātu drošu dzeramo ūdeni katram patērētājam, ir jābūt izpratnei par baktēriju vairošanās riskiem attiecībā uz ūdens avotu, sadales tīkla konstrukcijas, limitējošām barības vielām un sezonālām izmaiņām.

## PUBLIKĀCIJAS


1. Nescerecka, A., Hammes, F., Juhna, T.: A pipeline for developing and testing staining protocols for flow cytometry, demonstrated with SYBR Green I and propidium iodide viability staining. J. Microbiol. Methods. 131, 172–180 (2016).
2. Nescerecka, A., Juhna, T., Hammes, F.: Behavior and stability of adenosine triphosphate (ATP) during chlorine disinfection. Water Res. 101, 490–497 (2016).
3. Nescerecka, A., Rubulis, J., Vital, M., Juhna, T., Hammes, F.: Biological Instability in a Chlorinated Drinking Water Distribution Network. PLoS ONE. 9, e96354 (2014).
4. Grube, M., Gavare, M., Nescerecka, A., Tihomirova, K., Mezule, L., Juhna, T.: FTIR spectroscopic analysis for studying Clostridium cell response to conversion of enzymatically hydrolyzed hay. Journal of Molecular Structure 1044, 201–205 (2013).
5. Mežule, L., Tihomirova, K., Neščerecka, A., Juhna, T.: Biobutanol Production from Agricultural Waste: A Simple Approach for Pre-Treatment and Hydrolysis. Latvian Journal of Chemistry, 51, pp. 407–414 (2012).

## KONFERENČU TĒZES


1. Nescerecka, A., Juhna, T., Hammes, F., 2016. „A new approach for biological stability assessment in a full-scale drinking water supply system", IWA Specialist Conference Microbial Ecology and Water Engineering 2016, Copenhagen, Denmark 4–7 September 2016. pp. 354–355.
2. Nescerecka, A., Juhna, T., Hammes, F., 2015. „Automated Flow Cytometry Approaches for Assessment of Chlorination Efficacy on Aquatic Bacterial Communities", How Dead is Dead? IV conference, Eawag, Swiss Federal Institute of Aquatic Science and Technology Duebendorf/Zurich, Switzerland, 21–22 May 2015. p. 30.
3. Nescerecka, A., Juhna, T., Hammes, F., 2015. „The Application of Adenosine-Triphosphate Measurements for Determination of Bacterial Viability in Chlorinated Drinking Water", How Dead is Dead? IV conference, Eawag, Swiss Federal Institute of Aquatic Science and Technology, Duebendorf/Zurich, Switzerland, 21–22 May 2015. p. 24.
4. Nescerecka, A., Rubulis, J., Juhna, T., Hammes, F., 2014, „Microbial Drinking Water Quality Monitoring in Biologically Unstable Chlorinated Water". 55th International Scientific Conference Subsection Water Engineering 2nd Baltic Water Research Platform 15th October 2014, RIGA, p. 15.
5. Nescerecka, A., Tihomirova, K., Rubulis, J.,2012 "Determination of Microorganism Growth Potential in Water SupplySystems by Flow Cytometry". Riga Technical University 53rd InternationalScientific Conference dedicated to the 150th anniversary and The 1st Congressof World Engineers and Riga Polytechnical Institute / RTU Alumni. Digest, Riga, October 11–12, p. 421


## LITERATŪRA


1. Lautenschlager, K., Hwang, C., Liu, W.-T., Boon, N., Köster, O., Vrouwenvelder, H., Egli, T., Hammes, F.: A microbiology-based multi-parametric approach towards assessing biological stability in drinking water distribution networks. Water Res. 47, 3015–3025 (2013).
2. Hammes, F., Berger, C., Köster, O., Egli, T.: Assessing biological stability of drinking water without disinfectant residuals in a full-scale water supply system. J. Water Supply Res. Technol. 59, 31 (2010).
3. Vital, M., Dignum, M., Magic-Knezev, A., Ross, P., Rietveld, L., Hammes, F.: Flow cytometry and adenosine tri-phosphate analysis: Alternative possibilities to evaluate major bacteriological changes in drinking water treatment and distribution systems. Water Res. 46, 4665–4676 (2012).
4. Francisque, A., Rodriguez, M.J., Miranda-Moreno, L.F., Sadiq, R., Proulx, F.: Modeling of heterotrophic bacteria counts in a water distribution system. Water Res. 43, 1075–1087 (2009).
5. Niquette, P., Servais, P., Savoir, R.: Bacterial dynamics in the drinking water distribution system of Brussels. Water Res. 35, 675–682 (2001).
6. LeChevallier, M. W., Welch, N. J., Smith, D.B.: Full-scale studies of factors related to coliform regrowth in drinking water. Appl. Environ. Microbiol. 62, 2201–2211 (1996).

7. Polanska, M., Huysman, K., van Keer, C.: Investigation of assimilable organic carbon (AOC) in flemish drinking water. Water Res. 39, 2259–2266 (2005).
8. van der Kooij, D.: Assimilable organic carbon (AOC) in drinking water. In: McFeters, G. A. (ed.) Drinking Water Microbiology. pp. 57–87. Springer New York, New York, NY (1990).
9. Juhna, T., Klavinš, M.: Water-Quality Changes in Latvia and Riga 1980–2000: Possibilities and Problems. AMBIO J. Hum. Environ. 30, 306–314 (2001).
10. Hoefel, D., Grooby, W. L., Monis, P. T., Andrews, S., Saint, C. P.: Enumeration of water-borne bacteria using viability assays and flow cytometry: a comparison to culture-based techniques. J. Microbiol. Methods. 55, 585–597 (2003).
11. Bartram, J., Cotruvo, J., Exner, M., Fricker, C., Glasmacher, A.: Heterotrophic plate count and drinking-water safety: The significance of HPCs for water quality and human health. World Health Organization (2003).
12. Nescerecka, A., Hammes, F., Juhna, T.: A pipeline for developing and testing staining protocols for flow cytometry, demonstrated with SYBR Green I and propidium iodide viability staining. J. Microbiol. Methods. 131, 172–180 (2016).
13. Karl, D. M.: Cellular nucleotide measurements and applications in microbial ecology. Microbiol. Rev. 44, 739–796 (1980).
14. Nescerecka, A., Juhna, T., Hammes, F.: Behavior and stability of adenosine triphosphate (ATP) during chlorine disinfection. Water Res. 101, 490–497 (2016).
15. Nescerecka, A., Rubulis, J., Vital, M., Juhna, T., Hammes, F.: Biological Instability in a Chlorinated Drinking Water Distribution Network. PLoS ONE. 9, e96354 (2014).
16. Prest, E. I., Hammes, F., Kötzsch, S., Loosdrecht, M. C. M. van, Vrouwenvelder, J. S.: A systematic approach for the assessment of bacterial growth-controlling factors linked to biological stability of drinking water in distribution systems. Water Sci. Technol. Water Supply. ws2016001 (2016).
17. Lehtola, M. J., Miettinen, I. T., Vartiainen, T., Martikainen, P. J.: A New Sensitive Bioassay for Determination of Microbially Available Phosphorus in Water. Appl. Environ. Microbiol. 65, 2032–2034 (1999).
18. Council Directive 98/83/EC, http://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/?uri=CELEX%3A31998L0083.
19. MK noteikumi Nr. 235: Dzeramā ūdens obligātās nekaitīguma un kvalitātes prasības, monitoringa un kontroles kārtība. (2012).