

Abstract

Biofilms are a major problem in drinking water systems. They contain a very high percentage of microorganisms which are protected against disinfectants attack and their life conditions are improved. A good knowledge of biofilm growth and detachment under conditions similar to those occurring in real systems may help on water systems design and on preventing risky events for public health.

In this work bacteria accumulation, both in suspension and attached to surfaces, was followed under steady (turbulent, laminar and no-flow) and unsteady conditions (intermittent flow) in laboratory reactors fed with drinking water. This water was practically neutral with low contents of dissolved solids, carbon, phosphorous, nitrogen and chlorine. Around $2 - 5 \times 10^5$ total cells were present per milliliter of water in which 22 - 45 % were metabolically active and 0.05 - 1.5 % cultivable. Drinking water contained *Proteobacteria*, *Bacteroidetes* and *Actinobacteria* with predominance to the *Betaproteobacteria* (32 - 58 %). A low number of nitrifying bacteria was also found in the drinking water. A high fraction of cultivable bacteria (90.3 %) was composed of negative rods, from which 67.6 % were identified to genera *Pseudomonas*, *Xanthomonas*, *Flavobacterium*, *Stenotrophomonas* and *Sphingomonas*. The opportunistic pathogen *Pseudomonas aeruginosa* was not detected in any of the analyzed water samples.

Hydrodynamic conditions are of great importance on the behavior of the bacteria in the biofilm as they affect their accumulation and detachment. Under steady flow conditions, biofilms were composed of $0.1 - 5 \times 10^7$ total cells/cm², 17 - 34 % of them being metabolically active and 6 - 18 % cultivable. The growth rate of bacteria attached to PVC was 0.15 day^{-1} while the growth rate for bacteria in suspension, was similar to the inverse of the residence time, *i. e.* 1.8 day^{-1} . Under steady state conditions, a higher water velocity caused a decrease in the biofilm growth rate, as well as a decrease in the cells wall accumulation due to a higher detachment rate. The residence time, the stagnancy and temperature enhanced cell accumulation in biofilms and in the water phase, as well as their metabolic activity and cultivability.

Unsteady flow conditions contributed to the formation of stable biofilms with decreasing fractions of metabolic activity and cultivability with biofilm depth and life length. Flushing

systems subjected to stagnant periods promoted a release of a very high amount of biofilm cells, thus degrading the water quality.

Several materials were tested for their biofilm growth potential. The roughness and the hydrophobic character of the polymeric materials (PVC, PEX, HDPE and PP) contributed to an increasing biofilm accumulation in flow systems. These effects were negligible under stagnant conditions. The effect of hydrophobicity was not clear for stainless steel pipes with and without surface modifications (SiO_x, Excalibur, DLC and Ni-P-PTFE coatings).

Microbial populations in biofilms were affected by the hydrodynamic conditions and the surface materials, although *Betaproteobacteria* was always the dominant group. For instance, biofilms formed in turbulent flows were much more cohesive and less prone to detach than those formed under laminar flow or stagnant conditions and, thus their composition had a slower variation over time.

Keywords: drinking water, biofilm, microbial population, kinetics, adhesion material, roughness, hydrophobicity.

Resumo

Os biofilmes representam um dos maiores problemas em sistemas de água potável, contendo uma elevada fracção de microrganismos que se encontram protegidos dos desinfectantes e as suas condições de vida são melhoradas. Um bom conhecimento do comportamento dos biofilmes em condições semelhantes às reais pode ajudar na construção destes sistemas e na prevenção de eventos com risco para a saúde pública. Neste trabalho, a acumulação de bactérias, suspensas ou aderidas às superfícies, foi seguida em condições estacionárias (turbulento, laminar e estático) e não estacionárias (escoamento intermitente) em reactores laboratoriais alimentados com água da torneira. A água potável é praticamente neutra com baixos conteúdos em sólidos dissolvidos, carbono, fósforo, azoto e cloro. Cerca de $2 - 5 \times 10^5$ células totais estão presentes em

cada mililitro de água das quais 22 - 45 % são metabolicamente activas e 0,05 - 1,5 % cultiváveis. A população microbiana da água potável é composta por *Proteobacteria*, *Bacteroidetes* e *Actinobacteria* com predominância da subclasse *Beta* das *Proteobacteria* (32 - 58 %). Baixos teores de bactérias nitrificantes também foram encontrados. Uma fracção elevada das bactérias cultiváveis (90.3 %) era composta bastonetes Gram-negativos dos quais 67.6 % foram identificados como *Pseudomonas*, *Xanthomonas*, *Flavobacterium*, *Stenotrophomonas* e *Sphingomonas*. A bactéria patogénica oportunista *Pseudomonas aeruginosa* não foi detectada em nenhuma amostra.

A hidrodinâmica afecta muito a acumulação e o desprendimento das bactérias nos biofilmes. Em condições estacionárias de fluxo, os biofilmes são compostos por $0,1 - 5 \times 10^7$ células/cm², sendo 17 - 34 % metabolicamente activas e 6 - 18 % cultiváveis. A taxa de crescimento das bactérias aderidas ao PVC foi $0,15 \text{ dia}^{-1}$ e, em suspensão, a taxa foi semelhante ao inverso do tempo de residência ($1,8 \text{ dia}^{-1}$). Em condições de fluxo estacionárias, a velocidade da água diminui a taxa de crescimento do biofilme assim como a sua acumulação devido ao aumento do desprendimento. O tempo de residência, a estagnação e a temperatura aumentam a acumulação de células aderidas e plantónicas, assim como a sua actividade metabólica e a cultivabilidade.

As condições não estacionárias de escoamento contribuíram para a formação de biofilmes estáveis com decrescentes fracções de actividade metabólica e de cultivabilidade com a espessura e a idade do biofilme. A imposição de elevados caudais de escoamento, após períodos de estagnação, promoveu a libertação de quantidades muito significativas do biofilme, degradando a qualidade da água.

O potencial de crescimento do biofilme foi testado para vários materiais. O aumento da rugosidade e do carácter hidrofóbico aumentaram a acumulação de biofilmes em sistemas de fluxo para os materiais poliméricos (PVC, PEX, HDPE e PP). Estes efeitos foram reduzidos em condições estacionárias. O efeito da hidrofobicidade não foi claro para o aço inoxidável com ou sem modificações de superfície (revestimentos de SiO_x, Excalibur, DLC e Ni-P-PTFE).

As populações microbianas dos biofilmes foram afectadas pelas condições hidrodinâmicas e pelo material de adesão, embora *Betaproteobacteria* seja sempre o

grupo dominante. Por exemplo, os biofilmes formados em escoamento turbulento eram muito mais coesos e com maior resistência ao desprendimento e, por isso verificou-se uma menor variabilidade da composição microbiana.

Palavras-chave: água potável, biofilme, população microbiana, cinética, materiais de adesão, rugosidade, hidrofobicidade.