



# De invloed van ijzer op de biomassa-accumulatie in de continue biofoulingmonitor (CBM)

**BTO 2015.216(s)**  
**Oktober 2015**

**KWR**

*Watercycle Research Institute*



# De invloed van ijzer op de biomassa-accumulatie in de continue biofoulingmonitor (CBM)

**BTO 2015.216(s)**  
**Oktober 2015**

© 2015 KWR

Alle rechten voorbehouden.

Niets uit deze uitgave mag worden verveelvoudigd, opgeslagen in een geautomatiseerd gegevensbestand, of openbaar gemaakt, in enige vorm of op enige wijze, hetzij elektronisch, mechanisch, door fotokopieën, opnamen, of enig andere manier, zonder voorafgaande schriftelijke toestemming van de uitgever.





# Colofon

**Titel**

De invloed van ijzer op de biomassa-accumulatie in de continue biofoulingmonitor (CBM)

**Opdrachtnummer**

C222030/C222013

**Onderzoeksprogramma**

BTO

**Projectmanager**

Ir. Luc Hornstra

**Opdrachtgevers**

BTO SPO van PWN en Evides.

**Kwaliteitsborger**

Dr. Paul W.J.J. van der Wielen

**Auteurs**

Dr. ir. Dick van der Kooij & Dr. Ludmila Bereschenko.

**Verzonden aan**

Evides & PWN



# Verantwoording

Het onderzoek met de CBM met ijzerdosering beschreven in dit rapport is uitgevoerd binnen het BTO-Speerpuntonderzoek van Evides en PWN en werd begeleid door Jan Bahlman en Bram Martijn.

Bij KWR werden ondersteunende werkzaamheden verricht door medewerkers van het Laboratorium voor Microbiologie (LMB) o.l.v. Ronald Italiaander, nl. Meindert de Graaf (plaatsing en bemonstering van de CBM), Lonneke Hensen en Carola Blokker (microbiologische analyses), Anke Brouwer (registratie analyseresultaten) en door medewerkers van het Laboratorium voor Materialenonderzoek en Chemische Analyse (LMC) o.l.v. Ton van Leerdam nl. Pascal Kooij, Eline van den Berg en Alex Zoontjes (analyses van ijzer, DOC en koolhydraten).



# Afkortingen

<b>AOC</b>	Assimileerbare organische koolstof
<b>ADK</b>	Andijk (pompstation PWN)
<b>AK</b>	Actieve kool
<b>ATP</b>	Adenosinetriposfaat
<b>B<sub>A</sub></b>	Actieve biomassa, op basis van ATP
<b>BAS</b>	Biomassa-accumulatiesnelheid (in monitors met glasparels)
<b>B<sub>C</sub></b>	Actieve biomassa, op basis van koolstof
<b>BPL</b>	Berenplaat (pompstation Evides)
<b>BRH</b>	Breehei (pompstation, Waterleiding Maatschappij Limburg)
<b>CBM</b>	Continue biofoulingmonitor
<b>CH</b>	Koolhydraten (carbohydrates)
<b>DOC</b>	Opgeloste organische koolstof (dissolved organic carbon)
<b>Fe</b>	IJzer
<b>FeAS</b>	IJzeraccumulatiesnelheid
<b>FeCl<sub>3</sub></b>	IJzerchloride
<b>NOM</b>	Natuurlijk organisch materiaal
<b>OHP</b>	Oldeholtgade (Pompstation Vitens NV)
<b>PHMOC</b>	Particulair en hoog moleculair organic carbon
<b>STJ</b>	SintJansklooster (pompstation Vitens NV)
<b>TOC</b>	Total organic carbon
<b>TWL</b>	Tull en 't Waal (Pompstation Vitens NV)



# Samenvatting

Ijzer (Fe), in de vorm van Fe-hydroxide, is in veel drinkwatertypen aanwezig in een aantoonbare concentratie ( $> 0,01$  mg Fe per liter). Er zijn aanwijzingen dat Fe-hydroxide de accumulatie van biomassa in het distributiesysteem kan versterken, waardoor de nagroei toeneemt. In het kader van het BTO-Speerpuntonderzoek van Evides en PWN is daarom onderzocht of dosering van  $\text{FeCl}_3$  aan het influent van een continue biofoulingmonitor (CBM) van invloed is op de accumulatie van actieve biomassa in de betreffende CBM. Deze CBM werd gevoed met het filtraat van de actieve koolfilters bij pompstation Berenplaat. Lage concentraties van gedoseerd  $\text{FeCl}_3$  (0,01 - 0,04 mg Fe/liter) veroorzaakten een sterke toename van de ijzerafzettingssnelheid (FeAS) (tot ca.  $26 \text{ mg Fe m}^{-2} \text{ d}^{-1}$ ), met een specifieke FeAS van ca.  $750 \text{ mg Fe m}^{-2} \text{ d}^{-1}$  per mg gedoseerd Fe per liter. Ook de biomassa-accumulatie snelheid (BAS) in de CBM nam sterk toe (van ca.  $20 \text{ ng ATP m}^{-2} \text{ d}^{-1}$  zonder gedoseerd  $\text{FeCl}_3$  tot ca.  $440 \text{ ng ATP m}^{-2} \text{ d}^{-1}$ ). Tussen de BAS-toename en de FeAS toename werd een significant en sterk verband waargenomen.

Vergelijking van de waarnemingen met resultaten van eerder uitgevoerd onderzoek met CBMs bij een aantal drinkwatertypen liet zien dat de specifieke FeAS in deze watertypen meestal veel lager was dan na de gevonden waarde na het actieve koolfiltraat op pompstation Berenplaat na dosering van  $\text{FeCl}_3$ . Tevens bleek dat een toename van de FeAS ook in deze CBMs gepaard ging met een BAS-toename. Deze BAS-toename verschilde per watertype en was per mg geaccumuleerd Fe meestal hoger dan bij de  $\text{FeCl}_3$ -dosering. De verschillen tussen de watertypen zijn waarschijnlijk een gevolg van onderlinge verschillen in de concentratie van actieve biomassa. De hoge FeAS en de relatief sterke BAS-toename bij  $\text{FeCl}_3$ -dosering duiden erop dat het na de  $\text{FeCl}_3$ -dosering gevormde Fe-hydroxide verschilt van het Fe-hydroxide aanwezig in het reinwater na diverse behandelingsprocessen en een verblijf in het distributiesysteem. Duidelijk is echter dat de aanwezigheid van Fe-hydroxide de accumulatie van biomassa in de CBM versterkt. Aannemelijk is daarom dat verlaging van de Fe-concentratie in het drinkwater zal bijdragen aan een beperking van de biomassa-accumulatie in het distributiesysteem. Bepaling van de biomassa-accumulatiepotentie van drinkwater, door metingen van het effect van  $\text{FeCl}_3$ -dosering op de BAS, kan leiden tot identificatie van watertypen waarbij Fe het meeste effect heeft op de biomassa-accumulatie in het distributiesysteem en van de waterkwaliteitsparameters die daarbij een rol spelen.





# Inhoud

<b>Verantwoording</b>	<b>7</b>
<b>Afkortingen</b>	<b>9</b>
<b>Samenvatting</b>	<b>11</b>
<b>Inhoud</b>	<b>13</b>
<b>1 Inleiding</b>	<b>15</b>
1.1 Beïnvloedt ijzer de biomassa-accumulatie in het distributiesysteem ?	15
1.2 Doelen CBM onderzoek	15
<b>2 Opzet onderzoek</b>	<b>17</b>
2.1 Onderzoeklocatie en watersamenstelling	17
2.2 CBM	17
2.2.1 Beschrijving	17
2.2.2 Fe-dosering en monsterprogramma	17
2.3 Analysemethoden	19
2.3.1 Adenosinetrifosfaat (ATP)	19
2.3.2 IJzer	19
2.3.3 DOC en CH	19
<b>3 Resultaten</b>	<b>21</b>
3.1 Samenstelling AK-filtraat	21
3.2 Accumulatie van Fe en actieve biomassa in de CBMs	21
3.2.1 Fe-accumulatie	22
3.2.2 Biomassa-accumulatie	22
3.3 Accumulatie van DOC en koolhydraten	24
<b>4 Discussie</b>	<b>25</b>
4.1 Opzet bespreking resultaten	25
4.2 Eigenschappen van Fe-hydroxide	25
4.2.1 Oplosbaarheid/colloïden	25
4.3 Fe-accumulatie in CBM	26
4.3.1 Fe-hydroxide in het water	26
4.3.2 Specifieke FeAS	26
4.3.3 Relatie tussen Fe-accumulatie en B <sub>A</sub> -accumulatie	28
4.4 Biomassa-accumulatieprocessen	30
4.4.1 Biofilmvorming	30
4.4.2 Biomassa-accumulatie in de CBM door adsorptie	30
4.4.2.1 Adsorptie in de aanvoerleiding, resp. de zuivering	31
4.4.2.2 Adsorptie van bacteriën op Fe-hydroxide aanwezig in de CBM	32
4.4.2.3 Adsorptie/accumulatie van Fe-hydroxide met geadsorbeerde bacteriën	32
4.4.3 Variaties in de B <sub>A</sub> /Fe-verhouding in de CBM	33

4.4.4	Adsorptie van dode biomassa en NOM op Fe-hydroxide	34
4.5	Betekenis Fe voor nagroei	34
<b>5</b>	<b>Conclusies en aanbevelingen</b>	<b>37</b>
5.1	Conclusies	37
5.2	Aanbevelingen	37
5.2.1	Praktijk	37
5.2.2	Onderzoek	37
<b>6</b>	<b>Referenties</b>	<b>39</b>
<b>Bijlage I</b>		<b>41</b>
	Presentatie resultaten batchtesten en CBM met ijzerdosering	41
<b>Bijlage II</b>		<b>51</b>
	Zuiveringsschema pompstation Berenplaat	51
<b>Bijlage III</b>		<b>53</b>
	Overzicht meetresultaten	53

# 1 Inleiding

## 1.1 Beïnvloedt ijzer de biomassa-accumulatie in het distributiesysteem ?

De aanwezigheid van biomassa en afbreekbare verbindingen in het geproduceerde reinwater kan leiden tot kwaliteitsvermindering van het drinkwater, b.v. aanwezigheid van *Aeromonas* en dierlijke organismen. Bij onderzoek van het reinwater van pompstation Andijk en het water in het distributiesysteem met de continue biofoulingmonitor (CBM) werden aanwijzingen verkregen dat niet-opgelost ijzer (Fe), aanwezig als Fe-hydroxide, in het drinkwater de accumulatie van biomassa in biofilms en sediment kan versterken (KWR 2010.107). Uit onderzoek met de hemoflow kwam naar voren dat de concentraties van partikelgebonden en hoogmoleculair organische koolstof (PHMOC) en niet-opgelost Fe in het reinwater van een aantal pompstations sterk uiteenlopen (BTO 2013.044). Deze uiteenlopende concentraties hangen samen met verschillen in de Fe-concentratie in het reinwater ( $<0,01 - 0,2 \text{ mg L}^{-1}$ ). Fe-hydroxide is aanwezig als colloïdaal opgeloste en gesuspenderde positief geladen deeltjes. Opgeloste organische stof (natuurlijk organisch materiaal, NOM) kan adsorberen op Fe-hydroxide (Gu et al. 1995) en Fe-hydroxide adsorbeert op bacteriën (MacRae and Edwards, 1972). Deze processen kunnen de accumulatie van biomassa in het distributiesysteem versterken. Kwantitatieve informatie over de invloed van Fe-hydroxide op de biomassa-accumulatie is nodig om na te gaan of beperking van de Fe-concentratie kan bijdragen aan een verdere beperking van nagroei. Binnen het BTO-Speerpuntonderzoek van Evides en PWN is daarom een onderzoekproject gedefinieerd, met als doelstelling het effect van Fe op de biomassa-accumulatie experimenteel aan te tonen. De experimenten omvatten (i) batchtesten waarbij het effect van Fe-dosering op geselecteerde biopolymeren is onderzocht en (ii) metingen van het effect van Fe-dosering aan drinkwater op de biomassa-accumulatie in de CBM. De resultaten van de batchtesten zijn in eerder gepresenteerd en deze presentatie is weergegeven in Bijlage I. Deze resultaten zijn verder niet in deze rapportage opgenomen in verband met onduidelijkheden over de experimentele condities en de verkregen resultaten. In deze rapportage zijn de resultaten van het onderzoek met de CBM beschreven. Deze resultaten zijn vervolgens vergeleken met de waarneming van accumulatie van Fe en biomassa in de CBMs bij eerder gerapporteerd onderzoek (BTO 2011.050).

## 1.2 Doelen CBM onderzoek

- Nagaan of dosering van Fe, in de vorm van  $\text{FeCl}_3$ , aan het influent van invloed is op de accumulatie van biomassa in de CBM gevoed met een representatief watertype;
- Vergelijking van de resultaten met resultaten verkregen in eerdere onderzoeken met de CBM;
- Beoordeling van de resultaten i.v.m. de betekenis voor de praktijk.



## 2 Opzet onderzoek

### 2.1 Onderzoeklocatie en watersamenstelling

Twee CBMs zijn geplaatst op pompstation Berenplaat (ps BPL, Evides) en werden gevoed met het water na de actieve koolfiltratie (AK-filtraat). De PHMOC-concentratie van dit AK-filtraat is relatief hoog (BTO 2013.044), maar de lage biofilmvormingssnelheid in de biofilmmonitor (BFM) (KWR 09.069) duidt erop dat deze verbindingen vrijwel niet bijdragen aan de biofilmvorming. Het zuiveringsschema van ps Berenplaat is opgenomen in Bijlage II. Voor het coagulatieproces wordt  $\text{FeCl}_3$  gedoseerd ( $5 \text{ mg Fe L}^{-1}$ ).

### 2.2 CBM

#### 2.2.1 Beschrijving

De CBM bestaat uit 4 parallelle geplaatste kolommen met in iedere kolom een cuvet (cilinder met een inwendige diameter 1 cm) gevuld met glaspereels ( $\text{Ø } 2 \text{ mm}$ ), met een totaal oppervlak van  $19,84 \text{ cm}^2$ . Het te onderzoeken water wordt aangevoerd via een Teflon slang met een debiet van 10 L per kolom per uur en 40 L per uur (by-pass) om de verblijftijd in de aanvoerleiding te bekorten. Periodiek, bv. iedere 14 dagen, worden twee cuvetten uit de CBM genomen en vervangen door nieuwe cuvetten met glaspereels. De glaspereels worden verzameld in 10 ml geautoclaveerd drinkwater en vervolgens 4 x gedurende 2 min ultrasoon behandeld in een waterbad. In de verkregen suspensie (40 ml) werden de concentraties bepaald van actieve biomassa ( $B_A$ ), Fe, DOC en koolhydraten (CH). De accumulatiesnelheid van de actieve biomassa (BAS) en van ijzer (FeAS) is berekend als het quotiënt van de concentratie actieve biomassa ( $B_A$ , gemeten als ATP) en Fe per  $\text{m}^2$  en de periode dat de betreffende cuvet is doorstroomd met het te onderzoeken water.

#### 2.2.2 Fe-dosering en monsterprogramma

Op 4 oktober 2013 zijn twee CBMs aangesloten op het verzamelde AK-filtraat. De CBM met Fe-dosering werd aangesloten via een flexibele (geribbelde) zwarte Teflon leiding (i.d. 1,25 cm, lengte 10 m). De CBM zonder Fe-dosering was aangesloten via een teflon leiding van ca. 2 meter. De voeding van de CBMs werd ingeregeld op 10 L per kolom per uur met 40 L per uur voor additionele verversing per CBM. Het debiet is dagelijks/wekelijks gecontroleerd. Vanaf 16-10-2013 (dag 12) is Fe aan het voedingswater van één van de CBMs gedoseerd vanuit een oplossing (5 liter) van  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  ( $40 \text{ mg Fe L}^{-1}$ ;  $\text{pH} < 2$ ) in demiwater. Met behulp van een slangenpomp is de oplossing gedoseerd aan het voedingswater. De dosering is periodiek gecontroleerd door bepalen van de gewichtsafname van de oplossing en het debiet van de CBM. In de Teflon leiding vindt menging plaats van de  $\text{FeCl}_3$ -oplossing met het AK-filtraat. Op 28-10-2013 (dag 24) bleek dat de ijzerdosering  $0,16 \text{ mg Fe L}^{-1}$  was i.p.v. de beoogde  $0,1 \text{ mg Fe L}^{-1}$ . Op 4-11-2013 (dag 31) is de Fe-dosering bijgesteld. Op 11-11-2013 bleek dat in de periode van 4-11-2013 (dag 31) tot 11-11-2013 (dag 38) de concentratie van gedoseerd  $\text{FeCl}_3$  gemiddeld  $0,3 \text{ mg Fe L}^{-1}$  bedroeg als gevolg van het afgenomen debiet van de CBM. Op 15-11-2013 (dag 42) is een  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ -oplossing met een lagere concentratie ( $40 \text{ mg Fe L}^{-1}$ ) aangesloten en is de dosering ingesteld op  $0,01 \text{ mg Fe L}^{-1}$ . Voor de periode 15-11-2013 - 25-11-2013 was de Fe-concentratie op basis van gedoseerd volume gemiddeld  $0,013 \text{ mg Fe L}^{-1}$ . Op 11-12-2013 bleek dat de concentratie van gedoseerd Fe vanaf 25-11-2013 gemiddeld  $0,02 \text{ mg Fe L}^{-1}$  bedroeg. Vanaf 11-12-2013 tot 24-12-2013 was de gemiddelde concentratie  $0,036 \text{ mg Fe L}^{-1}$  als gevolg van debietafname.

Cuvetten (1 en 2) zijn uitgenomen na een looptijd van 12 dagen (16-10-2013) (geen Fe-dosering), na 24 dagen (28-10-2013) en 27 dagen (11-11-2013). In de monsters van 11-11-2013 is nagegaan of de Fe-concentratie in de suspensie de ATP-bepaling verstoort. Vastgesteld werd dat verdunning (minimaal 5 x) nodig was voor een betrouwbare ATP-bepaling. Vervolgens is steeds 10 x verdund met demiwater. Op 15-11-2013 (dag 42) zijn 4 cuvetten van de CBM met Fe-dosering uitgenomen; 2 met een doorstroomtijd van 4 dagen en 2 met een doorstroomtijd van 18 dagen. Op 26-11-2013 (dag 53) zijn 4 cuvetten van de CBM met Fe-dosering uitgenomen (doorstroomtijd 11 dagen). Ook op 11-12-2013 en op 24-12-2013 zijn 4 cuvetten uitgenomen, met doorstroomtijden van 15, resp. 13 dagen. Op deze dagen zijn ook cuvetten van de CBM zonder Fe-dosering bemonsterd. Tabel 1 geeft een overzicht van de Fe-dosering en de analyses in de CBM met Fe-dosering.

Tabel 1.  $FeCl_3$ -dosering en analyses CBM

Periode (dagnummer)	$FeCl_3$ -dosering* (mg Fe L <sup>-1</sup> )	Bemonstering (dagnummer)	Analyses
4-10 (0) - 16-10 (12)	geen	12	B <sub>A</sub> (ATP)
16-10 (12) - 28-10 (24)	0,1 - 0,16	24	B <sub>A</sub> (ATP), Fe, DOC, CH
28-10 (24) - 15-11 (42)	0,3	39	B <sub>A</sub> (ATP), Fe, DOC, CH
15-11(42) - 26-11 (53)	0,013	53	B <sub>A</sub> (ATP), Fe, DOC, CH
26-11(53) - 11-12 (68)	0,02	68	B <sub>A</sub> (ATP), Fe, DOC, CH
11-12 (68) - 24-12 (81)	0,03	81	B <sub>A</sub> (ATP), Fe, DOC, CH

\*berekend op basis van het CBM debiet en de concentratie en volume-afname  $FeCl_3$ -oplossing



Fig. 1. CBM, teflon aanvoerleiding,  $FeCl_3$ -oplossing en doseerpomp.

## **2.3 Analysemethoden**

### **2.3.1 Adenosinetrifosfaat (ATP)**

De concentratie van actieve biomassa in water en op oppervlakken in contact met water ('biofilm') is bepaald met behulp van de analyse van adenosinetrifosfaat (ATP). De ATP-bepaling berust op de luciferine-luciferase reactie, waarbij ATP onder vorming van licht (een foton per molecuul ATP) overgaat in adenosinedifosfaat (ADP). Met behulp van lichtgevoelige apparatuur kan de lichtproductie nauwkeurig worden gemeten. De werkwijze levert binnen enkele minuten een resultaat op. De detectiegrens van de analyse bij direct onderzoek van (drink)water bedraagt ca. 0,5 ng ATP L<sup>-1</sup>. Details van de werkwijze zijn beschreven in KWR-huisvoorschrift LMB-002 en door Magic and Van der Kooij (1984).

### **2.3.2 IJzer**

Na aanzuren van het monster met salpeterzuur (tot pH 1 á 2) voor het oplossen van de Fe-(hydr)oxiden wordt de concentratie van Fe gemeten m.b.v. een ICP-MS (X-Series II; Thermo Scientific). De aantoonbaarheidsgrens van deze methode in (drink)water is 10 µg Fe L<sup>-1</sup> (KWR-Huisvoorschrift LAM-074).

### **2.3.3 DOC en CH**

DOC, de totale concentratie van opgelost organische koolstof is gemeten met behulp van de Shimadzu TOC-V Analyser conform KWR-huisvoorschrift LAM-068. De onderste analysegrens van de DOC-analyse is 1 mg C L<sup>-1</sup>.

De concentratie van koolhydraten in de suspensie is gemeten conform de methode beschreven door Dubois (Dubois et al. 1956). Deze colorimetrische methode is gebaseerd op de reactie van suikers met fenol in aanwezigheid van geconcentreerd zwavelzuur. Het koolhydraatgehalte wordt uitgedrukt in glucose-equivalenten. De onderste analysegrens van deze methode is 2 mg glucose-eenheden L<sup>-1</sup> direct in het water.





# 3 Resultaten

## 3.1 Samenstelling AK-filtraat

De kwaliteitskenmerken van het AK-filtraat voor de onderzoekperiode (onderzoekperiode (4 - 10 - 2013 tot 24 -12 - 2013) zijn weergegeven in Tabel 2. In deze periode nam de watertemperatuur relatief sterk af. Fig. 2 laat zien dat het ATP-gehalte in het AK-filtraat, na doorstroming van de Teflon aanvoerleiding, sterk varieerde en bovendien sterk verschilde per CBM.

Tabel 2 Samenstelling van het verzamelde AK-filtraat bij ps Berenplaat in de onderzoekperiode

Parameter	Concentratie
Temperatuur (°C)	13,6 - 6,1 (dalend)
Troebeling (FTE)	<0,10*
Zuurgraad (pH)	7,75*
Ijzer (mg L <sup>-1</sup> )	<0,01*
Mangaan (mg L <sup>-1</sup> )	pm
DOC (mg L <sup>-1</sup> )	1,72*
UV extinctie (254 nm) (m <sup>-1</sup> )	2,97*
AOC-gehalte (µg ac-C eq L <sup>-1</sup> )	6,7*
ATP-gehalte (ng L <sup>-1</sup> ; gem. ± sd) (P50)	15,7±5,9 (11)**

\* analyse Evides; \*\*analyse (KWR) bij CBM zonder en met dosering

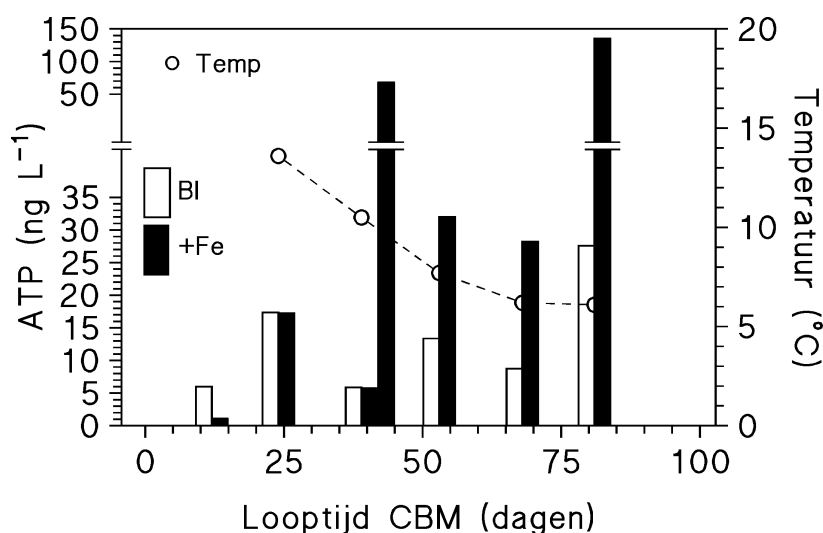


Fig. 2. ATP-gehalte en temperatuur van het water gedurende de looptijd van de CBMs.

## 3.2 Accumulatie van Fe en actieve biomassa in de CBMs

De resultaten van de metingen in de CBMs zijn weergegeven in Bijlage III, Tabel III-1 (CBM zonder ijzerdosering) en Tabel III-2 (CBM met ijzerdosering).

### 3.2.1 Fe-accumulatie

In de periode tot dag 12 werd geen Fe gedoseerd en vanaf dag 12 tot en met dag 42 was de Fe-dosering relatief hoog ( $> 0,1 \text{ mg Fe L}^{-1}$ ) en variabel. Vanaf dag 42 was de Fe-dosering lager, maar nam toe als gevolg van een afnemende debiet door de CBM. In de CBM werden gemiddelde Fe-concentraties op de glaspereels waargenomen die varieerden van  $266 - 1048 \text{ mg Fe m}^{-2}$  bij de hoge dosering en van  $96-350 \text{ mg Fe m}^{-2}$  bij de lagere doseringen (Tabel III-2). De verschillen tussen deze concentraties zijn het gevolg van het verschil in dosering en de looptijd van de diverse cuvetten, die varieerde van 4 tot 27 dagen. De FeAS-waarden geven de gemiddelde accumulatie per dag op basis van de doorstroomtijd die in de figuur is vermeld (Fig. 3A). In de CBM zonder Fe-dosering was de Fe-accumulatie erg laag ( $< 2 \text{ mg Fe m}^{-2}$ ), d.w.z.  $\text{FeAS} < 0,2 \text{ mg Fe m}^{-2} \text{ d}^{-1}$ . De FeAS-waarden in de CBM met Fe-dosering ( $10 - 125 \text{ mg Fe m}^{-2} \text{ d}^{-1}$ ) zijn veel hoger dan in de CBM zonder dosering. Uit Fig. 3A blijkt dat de (gemiddelde) FeAS op dag 42 na 4 dagen doorstromen veel hoger was dan na 18 dagen doorstromen bij een gemiddelde dosering van  $0,3 \text{ mg Fe L}^{-1}$ . De operationele condities (Fe-dosering; stabiliteit doorstroming cuvet) bij 18 dagen zijn onduidelijk waardoor de waarneming na 18 dagen mogelijk niet representatief is. Niet uitgesloten is dat ook de dosering gedurende 4 dagen ( $0,3 \text{ mg Fe L}^{-1}$ ) niet juist en/of variabel was. In de periode met lagere Fe-dosering nam de FeAS toe bij toename van de Fe-dosering. Uit deze drie waarnemingen kan worden afgeleid dat tussen de FeAS en de lage Fe-dosering een significante en sterke lineaire relatie bestaat, nl.  $\text{FeAS} (\text{mg m}^{-2} \text{ d}^{-1}) = 757 (\pm 100) \text{ Fe} (\text{mg L}^{-1}) + 0,88 (\pm 2,2)$  ( $r^2=0,965$ ;  $p= 0,017$ ) (Fig.3B). De FeAS bij de dosering van  $0,3 \text{ mg Fe L}^{-1}$  is lager dan verwacht op basis van deze relatie.

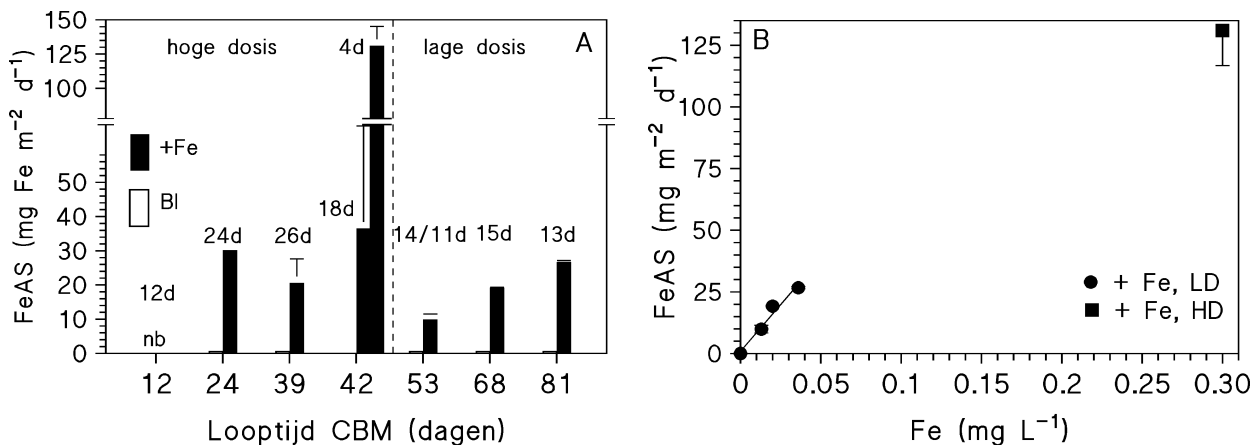


Fig. 3. A: FeAS in de CBMs zonder en met Fe-dosering. Nb, niet bepaald, geen Fe-dosering; B: relatie tussen FeAS en de concentratie van gedoseerd Fe.

### 3.2.2 Biomassa-accumulatie

De concentratie van actieve biomassa ( $B_A$ ) in de CBM zonder Fe-dosering lag van dag 24 t/m dag 81 tussen  $180 - 6735 \text{ ng ATP m}^{-2}$  (Tabel III-1) en tussen  $343 - 6081 \text{ ng ATP m}^{-2}$  in de CBM met Fe-dosering. Als gevolg van een sterk verhoogde  $B_A$ -concentratie in 2 van de 4 cuvetten was de  $B_A$  in de blanco CBM op dag 53 hoger dan in de CBM met Fe-dosering (Fig. 4A). Op dag 81 werd in 2 van de 4 cuvetten eveneens een verhoogde  $B_A$ -concentratie waargenomen in de blanco CBM, maar lager dan in de cuvetten met Fe-dosering. Fig. 3A laat zien dat in de periode met hoge Fe-dosis de  $B_A$  op dag 24 en dag 39 significant hoger was dan zonder Fe-dosering. Op dag 42 was de  $B_A$  na 4 dagen duidelijk hoger dan de gemiddelde  $B_A$  na 18 dagen; gegevens van de CBM zonder Fe-dosering ontbreken voor deze datum. In de periode van 26-11-2013 (dag 53) tot 24-12-2013 (dag 81) vertoonde de  $B_A$ -concentratie in de cuvetten met Fe-dosering weinig variatie op dezelfde dagen en was duidelijk hoger dan in de CBM zonder Fe-dosering in dezelfde periode, behalve op dag 53.

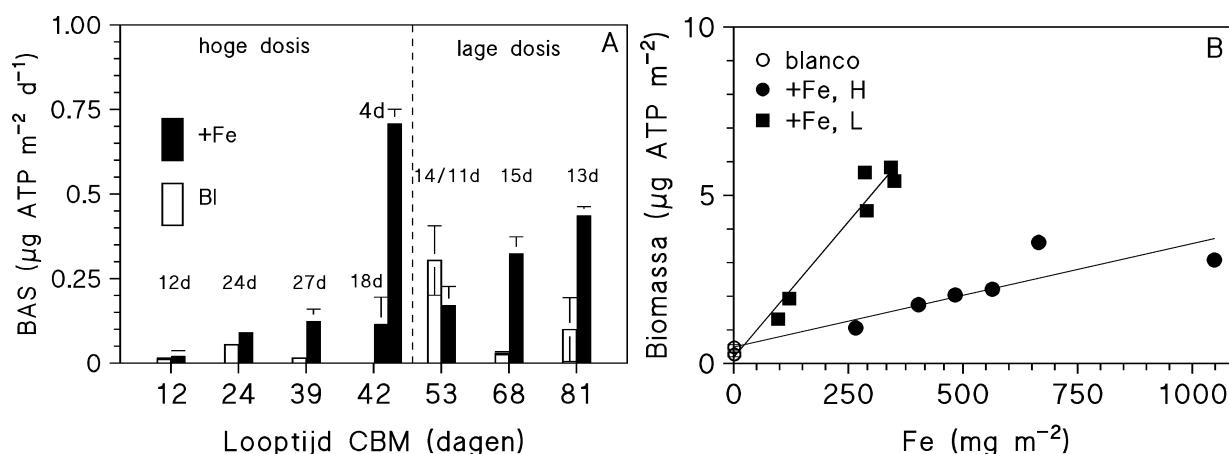


Fig. 4A. BAS in de CBMs zonder en met Fe-dosering ( $1 \mu\text{g ATP m}^{-2} = 100 \text{ pg ATP cm}^{-2}$ ); B: Relatie tussen de concentratie van actieve biomassa en de Fe-concentratie in de CBM. +Fe, H, hoge  $\text{FeCl}_3$ -dosering; +Fe, L, lage  $\text{FeCl}_3$ -dosering.

Uit Fig. 4B blijkt dat tussen de  $B_A$ -concentratie en de Fe-concentratie in de CMB met Fe-dosering lineaire verbanden bestaan. De  $B_A$ -concentratie bij de lage Fe-dosering is bij een gelijke Fe-concentratie in de CBM echter hoger dan bij de hoge dosering. Deze verbanden worden weergegeven door:

Hoge Fe-dosering:  $B_A (\mu\text{g ATP m}^{-2}) = 0,0030 (\pm 0,00056) \text{ Fe (mg m}^{-2}) + 0,490 (\pm 0,306)$  ( $r^2=0,83$ ;  $p = 0,0016$ )

Lage Fe-dosering:  $B_A (\mu\text{g ATP m}^{-2}) = 0,017 (\pm 0,002) \text{ Fe (mg m}^{-2}) - 0,195 (\pm 0,58)$  ( $r^2=0,94$ ;  $p = 0,0013$ ).

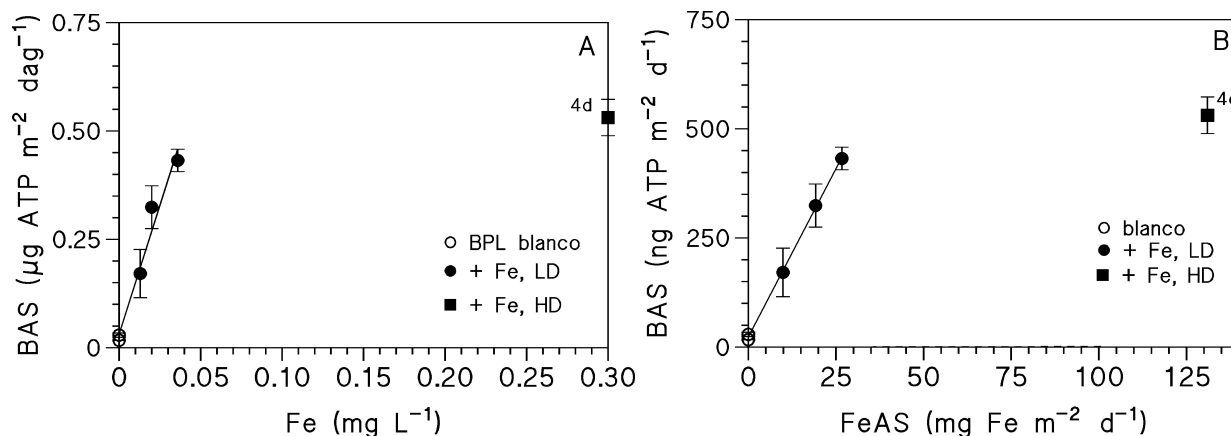


Fig. 5A. Relatie tussen BAS en de concentratie van gedoseerd Fe; B: Relatie tussen BAS en FeAS. De verhoogde biomassaconcentraties in de blanco zijn apart weergegeven ( $\square$ ) en niet meegenomen in berekeningen van de relaties. +Fe, LD, HD: lage resp. hoge  $\text{FeCl}_3$ -dosering.

Fig. 5A en 5B laten zien dat er voor de lagere Fe-doseringen ( $n=3$ ) een duidelijk verband is tussen de BAS en de concentratie van gedoseerd Fe, resp. de FeAS. Deze verbanden zijn hieronder weergegeven:

- $BAS (\mu\text{g ATP m}^{-2} \cdot \text{d}^{-1}) = 11,85 (\pm 1,24) \text{ Fe (mg L}^{-1}) + 0,031 (\pm 0,02)$ ;  $r^2=0,97$ ;  $p = 0,002$
- $BAS (\mu\text{g ATP m}^{-2} \cdot \text{d}^{-1}) = 0,0154 (\pm 2,7 \times 10^{-4}) \text{ FeAS (mg m}^{-2} \cdot \text{d}^{-1}) + 0,022 (\pm 0,004)$ ;  $r^2 = 0,999$ ;  $p = 1,2 \times 10^{-5}$ .

Uit het verband tussen BAS en Fe kan worden afgeleid dat een verhoging van de Fe-concentratie met  $0,01 \text{ mg L}^{-1}$  een BAS-toename van bijna een factor 5 veroorzaakte, namelijk van  $0,0025 \pm 0,0007 \text{ } \mu\text{g ATP m}^{-2}\cdot\text{d}^{-1}$  ( $2,5 \pm 0,7 \text{ pg ATP cm}^{-2} \text{ d}^{-1}$ ) in de blanco tot ca.  $0,12 \text{ } \mu\text{g ATP m}^{-2} \text{ d}^{-1}$  ( $12 \text{ pg ATP cm}^{-2} \text{ d}^{-1}$ ). Bij een sterk verhoogde FeAS ( $>100 \text{ mg m}^{-2} \text{ d}^{-1}$ ) was de BAS lager dan berekend op basis van de relatie tussen BAS en FeAS bij de lagere Fe-doseringen. Mogelijk wordt een maximum BAS (ca.  $0,5 \text{ } \mu\text{g ATP m}^{-2}\cdot\text{d}^{-1}$ ) bereikt bij FeAS-waarden  $> 100 \text{ mg Fe m}^{-2} \text{ d}^{-1}$ .

### 3.3 Accumulatie van DOC en koolhydraten

De accumulatie van DOC in de cuvetten, berekend uit het DOC-gehalte van de suspensie verkregen na ultrasonische behandeling van de glaspereels, lag tussen  $137$  en  $342 \text{ mg C m}^{-2}$  in de cuvetten zonder Fe-dosering (Tabel III.1) en tussen  $145$  en  $343 \text{ mg C m}^{-2}$  in de cuvetten bij Fe-dosering (Tabel III.2). De accumulatie van koolhydraten in de cuvetten is berekend uit het koolhydraatgehalte van de suspensies. Bij de CBM zonder Fe-dosering was de CH-concentratie in de suspensie steeds lager dan de detectiegrens ( $< 2 \text{ mg L}^{-1}$ ). In de CBM met hoge Fe dosering was de CH-concentratie hoger dan de detectiegrens en lag tussen  $56$  en  $131 \text{ mg m}^{-2}$  op de glaspereels (Fig. 6). Bij de lagere Fe-doseringen was de CH-concentratie in de suspensie meestal lager dan de detectiegrens van de bepaling. Bij de hogere waarde dag 68) was het CH-gehalte van water na ultrasonische behandeling van de glaspereels iets hoger dan de detectiegrens, nl.  $2,2 \text{ mg CH L}^{-1}$ .

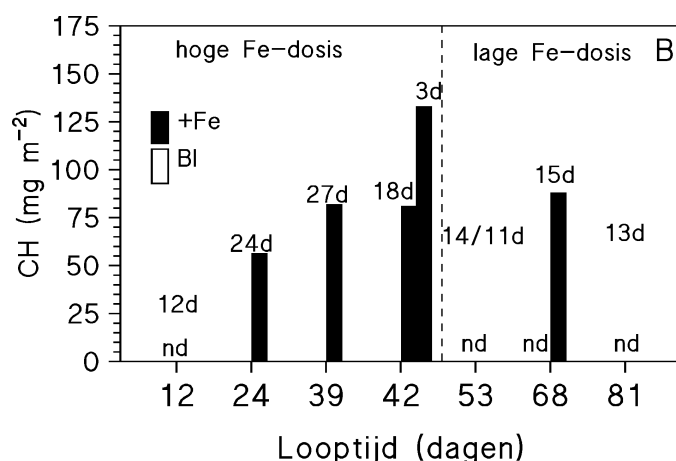


Fig. 6. Accumulatie van koolhydraten (CH) in de CBMs zonder en met Fe-dosering; nb, niet bepaald; nd, niet detecteerbaar.

# 4 Discussie

## 4.1 Opzet bespreking resultaten

De operationele condities van de CBM met FeCl<sub>3</sub>-dosering varieerden bij de uitvoering van de experimenten. Dit betreft in het bijzonder de hoge Fe-dosering, de looptijd van de cuvetten en ook de volumestroom (debiet). Daarnaast was de watersamenstelling (temperatuur en ATP-gehalte) variabel en werd ook in de CBM zonder Fe-dosering incidenteel een relatief hoge biomassa-accumulatie waargenomen. Bij de lage FeCl<sub>3</sub>-dosering werden bruikbare resultaten verkregen, maar het aantal waarnemingen (n=3 in een periode van 39 dagen) is relatief gering. Door het beperkte aantal metingen en de uitvoering van de metingen in één watertype bij een relatief lage temperatuur hebben de resultaten een indicatief karakter. De resultaten verkregen met het doseren van FeCl<sub>3</sub> aan een CBM worden hieronder nader geanalyseerd, vergeleken met waarnemingen in CBMs bij eerder onderzoek (BTO 2011.050) en er wordt aandacht besteed aan de betekenis van deze experimentele waarnemingen voor de praktijk. Dit wordt onder andere gedaan door een analyse te maken van de processen die een rol kunnen spelen bij de accumulatie van Fe-hydroxide en biomassa in de CBM en de invloed van Fe-hydroxide op de accumulatie van biomassa. Tevens wordt ingegaan op de betekenis van Fe voor nagroei.

## 4.2 Eigenschappen van Fe-hydroxide

### 4.2.1 Oplosbaarheid/colloïden

Fe(III)-hydroxide wordt gevormd bij de oxidatie van opgelost Fe<sup>2+</sup> bij de drinkwaterbereiding uit zuurstofloos grondwater (beluchting) en bij het coagulatieproces door dosering van het bij lage pH opgeloste FeCl<sub>3</sub> (5-7 mg L<sup>-1</sup>, ps Berenplaat) of FeClSO<sub>4</sub> (16-20 mg L<sup>-1</sup>; ps Andijk). In het distributiesysteem wordt Fe-hydroxide gevormd bij de corrosie van gietijzeren leidingen. Bij pH 8 is de oplosbaarheid van Fe-hydroxide ca. 2x10<sup>-10</sup> M, d.w.z. 0,01 µg Fe L<sup>-1</sup>. Ter vergelijking: de oplosbaarheid van Al-hydroxide is bij pH 8 ca. 3x10<sup>-5</sup> M, d.w.z. 800 µg Al L<sup>-1</sup>. Bij pH 7 zijn de verschillen minder groot, nl. ca. 0,1 µg Fe L<sup>-1</sup> en ca. 80 µg Al L<sup>-1</sup> (Stumm and Morgan, 1996). In drinkwater direct na de zuivering is Fe-hydroxide over het algemeen aanwezig in concentraties tussen <0,005 mg Fe L<sup>-1</sup> en 0,5 mg Fe L<sup>-1</sup>. In het distributiesysteem kunnen hogere concentraties worden waargenomen dan in het reinwater, bv. pompstation Andijk (Tabel 3). In het Drinkwaterbesluit (2011) is voor ijzer een maximum concentratie van 0,2 mg Fe L<sup>-1</sup> opgenomen.

Fe-hydroxide is in (drink)water aanwezig in de vorm van zeer kleine positief geladen deeltjes (colloïden) en grotere gesuspendeerde deeltjes die bezinken. De stabiliteit van colloïdaal opgelost Fe-hydroxide is afhankelijk van de elektrostatische repulsie en de Van der Waals aantrekkingskracht, zoals beschreven met de Derjaguin-Landau-Verwey-Overbeek (DLVO)-theorie. De amorfe deeltjes van Fe-hydroxide veranderen door polymerisatie en kristallisatie ('aging'), waarbij o.a. goethiet [Fe<sup>3+</sup> O(OH)] en hematiet (Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>) kunnen ontstaan (Lahann, 1976). Dit betekent dat in verschillende situaties (bv. direct na dosering van FeCl<sub>3</sub>, direct na oxidatie bij beluchting en in water, biofilm en sediment in het distributiesysteem) verschillende typen Fe-hydroxiden, ook wel Fe-oxyhydroxiden genoemd, aanwezig zijn. Gemakshalve is hier steeds de aanduiding Fe-hydroxide gehanteerd. Fe-hydroxide adsorbeert aan negatief geladen oppervlakken, zoals zand bij de snelle zandfiltratie, aan glas (b.v. in de CBM en de biofilmmonitor) en aan bacteriën en biomassa. De negatief geladen bacteriën adsorberen beter aan het positief geladen Fe-hydroxide dan aan negatief geladen silicaat, bv. glas. Bij de adsorptie aan Fe-hydroxide spelen de negatief geladen segmenten van EPS, zoals glucuronzuur

en fosfaatgroepen (Sutherland, 2001), een rol (Parikh and Chorover, 2006). Ook opgeloste hoogmoleculaire organische verbindingen, waaronder natuurlijk organisch materiaal (NOM), adsorberen (nagenoeg irreversibel) aan Fe-hydroxide (Gu et al. 1995). De irreversibele binding is het gevolg van de adsorptie van meerdere segmenten van een polymeer aan het oppervlak (Fleer, 1971). De aard en lading van het oppervlak van de Fe-hydroxide deeltjes veranderen door NOM-adsorptie en aanhechting van biomassa/bacteriën. NOM adsorptie op het colloïdaal opgeloste Fe-hydroxide kan de stabiliteit van de colloïdale oplossing vergroten door de aanwezigheid van organische polymeren op het oppervlak.

### 4.3 Fe-accumulatie in CBM

#### 4.3.1 Fe-hydroxide in het water

Dosering van  $\text{FeCl}_3$  (pH <2) aan het AK-filtraat (pH = 7,7) leidde tot de vorming van colloïdaal opgelost  $\text{Fe}(\text{OH})_3$  als gevolg van uitwisseling van  $\text{Cl}^-$ -ionen door  $\text{OH}^-$ -ionen. Dit proces begint direct maar volledige uitwisseling van  $\text{Cl}^-$  door  $\text{OH}^-$  vergt meerdere dagen (Lahann, 1976). De verblijftijd van het water in de aanvoerleiding van geribbeld Teflon (inhoud  $1226 \text{ cm}^3$ ) is 55 sec bij een debiet van  $80 \text{ L h}^{-1}$ . Onbekend is in welke mate omzetting van  $\text{FeCl}_3$  naar Fe-hydroxide in de aanvoerleiding optrad. Het Fe-hydroxide (colloïdaal opgelost en vlokjes) en het nog niet omgezette  $\text{FeCl}_3$  komen vervolgens in aanraking met de glasparsels in de CBM.

Bij de bereiding van drinkwater uit ijzerhoudend grondwater en bij de toepassing van  $\text{Fe}^{3+}$  bij het coagulatieproces wordt eveneens Fe-hydroxide gevormd. Door toepassing van een of meer filtratieprocessen wordt dit Fe-hydroxide vervolgens grotendeels verwijderd waardoor de concentratie in het reinwater laag is. Het Fe-hydroxide aanwezig in het reinwater is veel langer in contact geweest met de in het water en het filterbed aanwezige bacteriën en NOM dan het geval is bij de  $\text{FeCl}_3$ -dosering. Een deel van dit Fe-hydroxide is mogelijk door NOM-adsorptie gestabiliseerd.

#### 4.3.2 Specifieke FeAS

Bij de lagere  $\text{FeCl}_3$ -doseringen, waarbij de gemiddelde concentratie is bepaald en redelijk overeenkomende looptijden (11-15 dagen) zijn gehanteerd, nam de FeAS toe met toenemende Fe-concentratie (Fig. 3B). Per dag accumuleerde hierbij gemiddeld  $757 (\pm 100) \text{ mg m}^{-2} \text{ Fe}$  per  $\text{mg Fe L}^{-1}$ , d.w.z. ca.  $7,6 \text{ mg Fe m}^{-2} \text{ d}^{-1}$  bij een concentratie van  $0,01 \text{ mg Fe L}^{-1}$ . Ter vergelijking, bij eerder onderzoek met de CBM was de FeAS van de onderzochte drinkwatertypen meestal lager dan  $5 \text{ mg Fe m}^{-2} \text{ d}^{-1}$  (Tabel 3). De hoge FeAS bij de hoogste Fe-dosering (ca.  $0,3 \text{ mg Fe L}^{-1}$ ) en een looptijd (van de cuvet) van 4 dagen is ca. 50% van de FeAS afgeleid van de relatie tussen FeAS en de lagere Fe-concentraties. De FeAS bij een dosering van  $0,16 \text{ mg Fe L}^{-1}$  toonde ook een afwijkend beeld, mogelijk als gevolg van variabele procescondities. Duidelijk is dat Fe-hydroxide, zoals aanwezig onder de testcondities, snel adsorbeert, maar onduidelijk is of de FeAS (i) lineair toeneemt bij Fe-concentraties boven  $0,04 \text{ mg Fe L}^{-1}$  en/of (ii) constant blijft bij toenemende looptijd, d.w.z. bij een toenemende Fe-concentratie in de CBM. Het effect van een Fe-concentratie bij FeAS-waarden  $> 25 \text{ mg Fe m}^{-2} \text{ d}^{-1}$  is overigens van minder belang omdat dergelijke hoge FeAS-waarden in drinkwater niet worden waargenomen. Hoge FeAS-waarden treden waarschijnlijk wel op in de snelfilters na de beluchting van ijzerhoudend grondwater en na coagulatie m.b.v. Fe-dosering.

Ter vergelijking met de FeAS-waarden in de CBM met  $\text{FeCl}_3$ -dosering zijn in Tabel 3 de FeAS-waarden van een aantal watertypen weergegeven die zijn verkregen met eerder CBM-onderzoek. In deze tabel zijn ook de Fe-concentraties weergegeven. De Fe-concentraties in de onderzochte watertypen varieerden relatief sterk, evenals de FeAS-waarden. Bij ps Andijk

varieerde de FeAS sterk met het seizoen (watertemperatuur) (KWR 2010.107). De gemiddelde Fe-concentratie in het distributiesysteem is waarschijnlijk niet representatief voor de Fe-concentratie op een specifieke locatie in het distributiesysteem, als gevolg van sedimentatie en sedimenttransport (Vreeburg, 2007). Gedetailleerde informatie over de variaties in de Fe-concentratie tijdens het onderzoek met de CBMs is niet verzameld. Het quotiënt van de gemiddelde FeAS en de gemiddelde Fe-concentratie (de specifieke FeAS, d.w.z. mg Fe m<sup>-2</sup> d<sup>-1</sup> per mg Fe L<sup>-1</sup>) varieert van 5,6 (pompstation SintJansklooster, rein) tot 428 (pompstation Andijk, distributie). Deze en andere specifieke FeAS-waarden zijn alleen indicatief omdat de Fe-concentraties in het water sterk varieerden en mogelijk niet juist zijn. Duidelijk is wel dat de specifieke FeAS bij de in Tabel 3 genoemde watertypen (veel) lager is dan de specifieke FeAS van 757 (± 100) mg Fe m<sup>-2</sup> d<sup>-1</sup> per mg Fe L<sup>-1</sup> bij de lage FeCl<sub>3</sub>-dosering.

Tabel 3. FeAS-waarden en ijzerconcentratie in (drinkwater) bij eerder uitgevoerd onderzoek\*

Pompstation/watertype	Jaar	Concentratie**	FeAS	FeAS/Fe#
		(mg Fe L <sup>-1</sup> )	(mg Fe m <sup>-2</sup> d <sup>-1</sup> )	(m <sup>-2</sup> d <sup>-1</sup> L)
		Min-max/gem ± sd		
Oldeholtpade, rein (OHP-R)	2009	<0,01-0,015; <0,01	0,15 ± 0,05	30
Oldeholtpade, distributie (OHP-D)	2009	niet beschikbaar	1,96 ± 0,27	nb
Breehei, rein (BRH-R)	2009-2010	0,028 ± 0,009	1,38 ± 0,87	49
SintJansklooster, rein (STJ-R)	2010	0,016-0,165; 0,061	0,34 ± 0,15	5,6
Andijk, AK-filtraat (ADK-AKF)	2010	0,0013 ± 0,0006##	0,14 ± 0,06	107
Andijk, kelder Hoorn	2010	0,0013 ± 0,0006##	0,5 ± 0,4	384
Andijk, distributie 1 (ADK-D1)	2010	0,0042 ± 0,00059##	0,5 ± 0,4	119
Andijk, distributie 2 (ADK-D2)	2010	0,0042 ± 0,00059##	1,8 ± 0,9	428
Tull en 't Waal, rein (TWL-R)	2011	0,028-0,093; 0,053	3,2 ± 2,6	60
Tull en 't Waal, distributie (TWL-D)	2010-2011	pm	4,6 ± 3,8	nb

\* BTO 2011.050; \*\*gemiddelde concentraties voor het jaar cq. periode waarin onderzoek met de CBM is uitgevoerd (gegevens beschikbaar gesteld door het betrokken waterleidingbedrijf); #specifieke FeAS; ##gegevens 2011; gegevens 2010 niet beschikbaar.

In Fig. 7 zijn de gemiddelde FeAS-waarden weergegeven als functie van de gemiddelde Fe-concentratie in het water. Ook hieruit blijkt dat er geen eenduidig verband is tussen de FeAS en de Fe-concentratie en dat de gemiddelde FeAS-waarden bij de diverse watertypen beneden het niveau liggen dat is waargenomen bij FeCl<sub>3</sub>-dosering. Bij dit eerdere onderzoek werd een cuvetlooptijd van 28 dagen gehanteerd. Een afnemende adsorptiesnelheid bij een langere looptijd (28 dagen t.o.v. 11 á 15 dagen) kan de lagere FeAS-waarden niet verklaren; dit zou hoogstens een verschil van een factor twee veroorzaken in vergelijking met de waarnemingen bij de CBM met gedoseerd FeCl<sub>3</sub>. Blijkbaar accumuleert Fe-hydroxide aanwezig in de diverse drinkwatertypen veel minder goed dan Fe-hydroxide aanwezig na de FeCl<sub>3</sub>-dosering. De lagere accumulatiesnelheid hangt waarschijnlijk samen met verandering van de aard van het Fe-hydroxide (o.a. afname positieve lading) door veroudering en adsorptie van NOM en (dode) biomassa biomassa(bestanddelen). Procescondities in de zuivering (Fe-concentratie in het ruwe water, aard beluchting, een of meer biologische filtratiestappen), verblijf in een reinwaterkelder en de condities in het distributiesysteem (verblijftijd, stroomsnelheid) spelen hierbij een rol. Verzamelen van informatie over de aard van Fe-hydroxide in verschillende situaties vergt nader (literatuur)onderzoek. Dosering van een stabiele goed gedefinieerde colloïdale Fe-hydroxide oplossing (sol) kan, indien uitvoerbaar, nadere informatie opleveren over de invloed van de aard van het Fe-hydroxide op de FeAS.

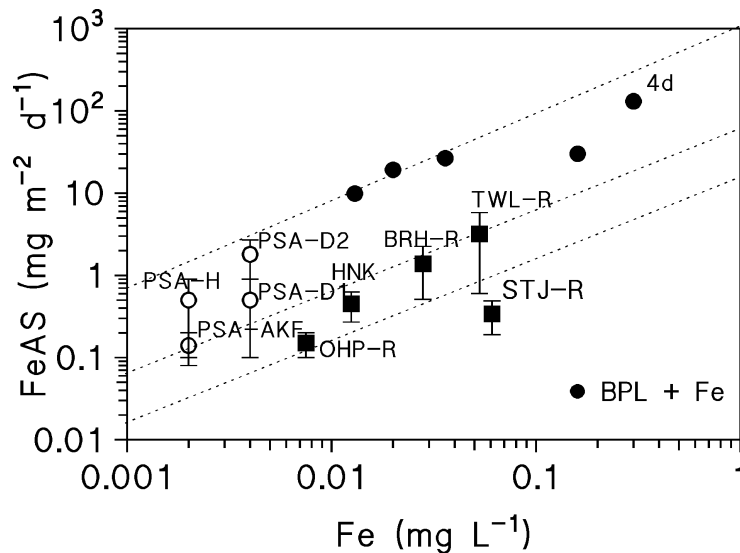


Fig. 7. FeAS-waarden in de CBM op diverse locaties als functie van de Fe-concentratie. Stippellijnen geven proportionele relaties tussen FeAS en Fe weer. BPL + Fe: CBM met lage en hoge FeCl<sub>3</sub>-dosering. Voor afkortingen, zie Tabel 3. Voor de testlocaties PSA-H, PSA-D1 en PSA-D2 zijn de FeAS-waarden weergegeven in relatie tot de gemiddelde Fe-concentratie in het distributiesysteem (van ps Andijk). De Fe-concentraties op de testlocaties zijn niet bekend.

#### 4.3.3 Relatie tussen Fe-accumulatie en B<sub>A</sub>-accumulatie

FeCl<sub>3</sub>-dosering verhoogde de BAS (Fig. 5). Bij de hoge Fe-doseringen (> 0,1 mg L<sup>-1</sup>) was de B<sub>A</sub>-concentratie bij een bepaalde concentratie van geaccumuleerd Fe-hydroxide echter lager dan bij een lage Fe-dosering (Fig. 4B). De verklaring hiervoor is dat de FeAS toenam met verhoogde Fe-dosering, maar de BAS bij een gelijkblijvende biomassaconcentratie in het water deze toename niet kon 'bijhouden'. Opmerkelijk is dat FeCl<sub>3</sub>-dosering een 20-voudige BAS-toename veroorzaakte bij een FeAS van 125 mg Fe m<sup>-2</sup> d<sup>-1</sup>. De biomassa-accumulatiepotentie van het AK-filtraat is bij FeCl<sub>3</sub>-dosering dus veel hoger dan blijkt uit de BAS van het water zonder Fe-dosering.

Voor de interpretatie van de resultaten van de CBM met FeCl<sub>3</sub>-dosering bij ps Berenplaat is de accumulatie van actieve biomassa (B<sub>A</sub>, μg ATP m<sup>-2</sup>) en Fe (mg m<sup>-2</sup>) in deze CBM weergegeven naast de accumulatie in CBMs die bij eerder onderzoek (BTO 2011.050) op diverse locaties waren geplaatst (Fig. 8). Bij de meeste locaties is sprake van een significant en sterk (hoge R<sup>2</sup>) lineair verband tussen de B<sub>A</sub>-concentratie en de Fe-concentratie (Tabel 4), d.w.z. de BAS is gerelateerd aan de FeAS. Deze relatie verschilt per watertype. De verhouding van de B<sub>A</sub> en Fe-concentraties in de CBM met gedoseerd Fe is laag in vergelijking met de verhoudingen bij de andere locaties, met uitzondering van het drinkwater van ps Tull en 't Waal (TWL). De hoogste B<sub>A</sub>/Fe-verhoudingen werden waargenomen bij ps Andijk na kelder Hoorn (PSA-H), ps Sintjansklooster reinwater en ps Andijk AK-filtraat,



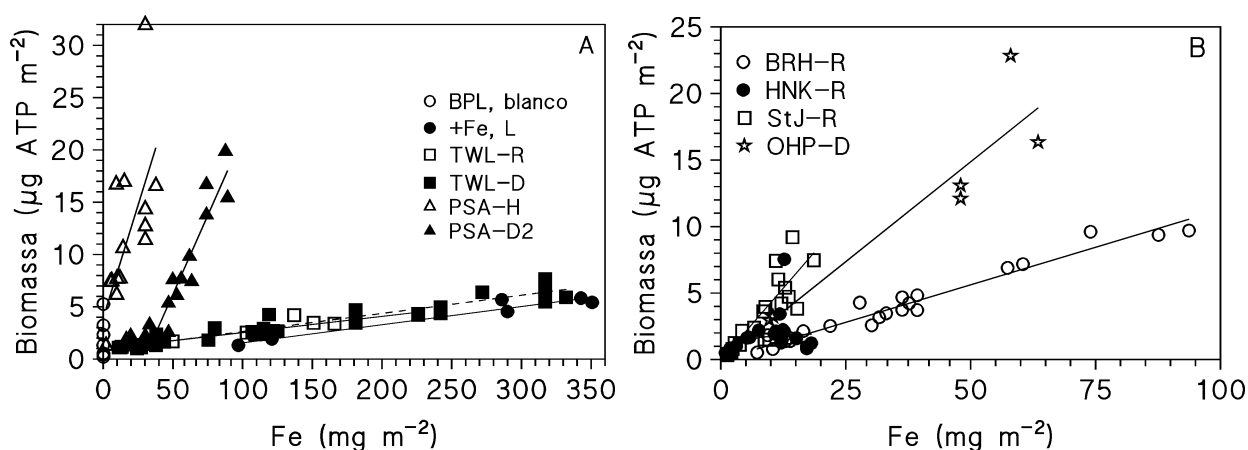


Fig. 8. Actieve biomassa en Fe in de CBM bij ps Berenplaat (lage Fe-dosis) en enkele andere locaties. PSA-H, pompstation Andijk, kelder Hoorn; PSA-D, pompstation Andijk, distributie (Purmerend); TWL-D, pompstation Tull en 't Waal, distributie (locatie KWR Nieuwegein); OHP-D, pompstation Oldeholtspade, distributie; BRH-R, pompstation Breehei, reinwater; HNK-R, pompstation Hanik, rein; StJ-R, pompstation Sintjansklooster, rein.

De concentraties van geaccumuleerd Fe en  $B_A$  zijn ook op logaritmische schaal weergegeven (Fig. 9), zodat de lage en hoge concentraties goed in beeld komen. Fig. 9 laat zien dat:

- de Fe-concentratie in de CBMs meestal ligt tussen 1 en 300 mg m<sup>-2</sup>;
- de  $B_A$ -concentratie meestal ligt tussen 0,3 en 30 µg ATP m<sup>-2</sup> (30 - 3000 pg ATP cm<sup>-2</sup>);
- de  $B_A$ -concentratie in de meeste watertypen proportioneel toeneemt met de Fe-concentratie;
- de  $B_A$ /Fe-verhouding varieert van minder dan 10 ng ATP mg<sup>-1</sup> Fe (AK-filtraat BPL, hoge FeCl<sub>3</sub>-dosis) tot meer dan 1000 ng ATP mg<sup>-1</sup> Fe (ADK-AKF).

Tabel 4. Verband tussen concentratie actieve biomassa ( $B_A$ , ng ATP m<sup>-2</sup>) en ijzerconcentratie (mg Fe m<sup>-2</sup>) in de CBM ( $B_A = a \text{ Fe} + b$ ) bij een aantal (drink)watertypen

Locatie/watertype	n*	a ± se ( $B_A$ /Fe) (ng ATP mg <sup>-1</sup> Fe)	b (ng ATP m <sup>-2</sup> )	R <sup>2</sup>	p	$B_A$ /Fe** (ng ATP/mg Fe) (gem. ± sd)
Berenplaat, hoge Fe-dosis	6	3,0 ± 0,57	570 ± 290	0,80	0,001	4,4 ± 1,0
Berenplaat, lage Fe-dosis#	3	15,4 ± 0,3	220 ± 4	0,99	1,2x10 <sup>-5</sup>	16,3 ± 2,1
TWL-rein	10	15,5 ± 2,6	983 ± 273	0,87	0,009	45 ± 37
TWL-distributie	30	17,4 ± 0,98	885 ± 174	0,92	0,0013	33 ± 17
Hanik, rein (HNR-R)	18	49 ± 30	1102 ± 337	0,14	>0,05	204 ± 137
Breehei, rein	24	113 ± 5	- 18 ± 220	0,95	5,3x10 <sup>-16</sup>	117 ± 27
Oldeholtspade, rein	11	223 ± 30	147 ± 115	0,88	1,6x10 <sup>-4</sup>	243 ± 59
Oldeholtspade, distributie	8	300 ± 62	-145 ± 2800	0,85	0,009	291 ± 65
Andijk-D2 (Purmerend)##	12	301 ± 37	-860 ± 240	0,87	1,1x 10 <sup>-5</sup>	132 ± 52
Andijk-H	13	429 ± 137	3962 ± 2920	0,47	0,009	755 ± 449
STJ-Rein	18	433 ± 59	-32 ± 58	0,77	6x10 <sup>-6</sup>	402 ± 146
Andijk-AKF	14	497 ± 265	1200 ± 830	0,21	>0,05	1100 ± 770

\* aantal waarnemingen; \*\* gemiddelde ± sd van de concentraties in de cuvetten; # relatie tussen  $B_A$  en FeAS; ## voor Fe-concentraties ≥ 50 mg m<sup>-2</sup>.

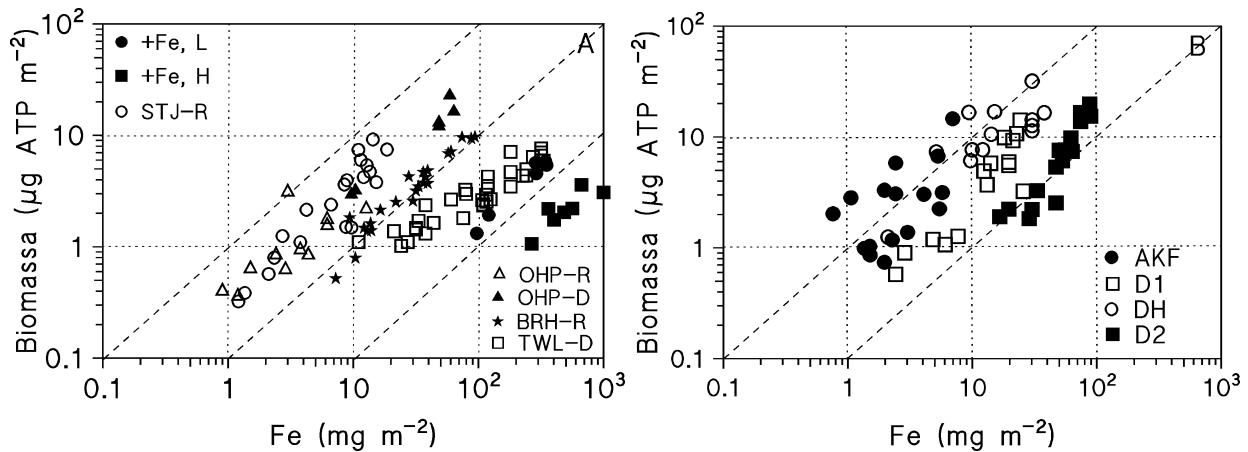


Fig. 9. A: Relatie tussen  $B_A$  en Fe-concentraties in de CBM op logaritmische schaal bij diverse drinkwatertypen. B: relatie tussen de  $B_A$  en Fe-concentratie in de CBMs bij ps Andijk (2010). De onderbroken hulplijnen geven proportionele verbanden tussen  $B_A$  en Fe.

#### 4.4 Biomassa-accumulatieprocessen

##### 4.4.1 Biofilmvorming

Bij de biofilmvorming op een oppervlak in contact met stromend water kan onderscheid worden gemaakt in de volgende processen: (i) transport van bacteriën naar het oppervlak; (ii) adsorptie van de bacteriën op dit oppervlak; (iii) irreversibele hechting door uitscheiding van EPS (extracellular polymeric substances); (iv) handhaving en groei door opname van afbreekbare stoffen en (v) afgifte van bacteriën aan het water.

Het transport van de cellen naar een oppervlak wordt onder meer beïnvloed door de hydraulische condities en de eigenschappen van de micro-organismen, b.v. beweeglijkheid (Camper et al. 1993; Mueller et al. 1996). De adsorptie van cellen op een oppervlak hangt af van de eigenschappen van het oppervlak (lading, hydrofiel/hydrofoob, ruwheid), de eigenschappen van de bacteriën (lading, hydrofiel/hydrofoob) (Bos et al. 1999), de watersamenstelling (o.a. pH) en milieucondities (b.v. temperatuur). Onder condities waarbij geen groei optrad adsorbeerden bacteriën van een reïncultuur (*Pseudomonas* sp.) op glas (hydrofiel, negatieve lading) veel minder sterk dan op hydrofobe materialen (b.v. teflon, polyethyleen), een hydrofiel positief geladen oppervlak (platina) en een hydrofiel neutraal oppervlak (germanium) (Fletcher and Loeb, 1979). De aanwezigheid van positief geladen ionen, pH en NOM in het water beïnvloeden de oppervlakte-eigenschappen en daardoor de adsorptie van bacteriën. Adsorptie van bacteriën bevordert de uitscheiding van EPS (VandeViere and Kirchman, 1993). Door uitscheiding van diverse typen EPS kunnen bacteriën zich op allerlei soorten oppervlakken vasthechten. De hechting wordt door de adsorptie van delen van de EPS-moleculen aan het oppervlak nagenoeg onomkeerbaar. Door opname van afbreekbare stoffen kunnen de bacteriën in de biofilm zich handhaven en vermeerderen. Deze processen treden onder andere op in filters bij de drinkwaterbereiding (biologische filtratie), in distributiesystemen en ook in de biofilmmonitor en de CBM.

##### 4.4.2 Biomassa-accumulatie in de CBM door adsorptie

Een hoge  $\text{FeCl}_3$ -dosering veroorzaakte in enkele dagen een sterke  $B_A$ -toename ( $BAS = \text{ca. } 520 \text{ ng m}^{-2} \text{ d}^{-1}$ ) in de CBM. Deze hoge BAS is vrijwel geheel het gevolg van adsorptie van de

bacteriën omdat groei geen rol van betekenis kan hebben gespeeld door de lage watertemperatuur (ca. 10 °C), de korte tijdsduur en de lage groeipotentie van het AK-filtraat. Deze lage groeipotentie ligt voor de hand gezien de intensiteit van de omzettingsprocessen bij AK-filtratie. De BAS van het AK-filtraat was ca. 25 ng ATP m<sup>-2</sup> d<sup>-1</sup> zonder FeCl<sub>3</sub>-dosering en ook de eerder gemeten BVS was laag (< 50 ng ATP m<sup>-2</sup> d<sup>-1</sup>; KWR 2009.069). Ter vergelijking: uit metingen van het effect van acetaat-dosering aan drinkwater bleek dat een concentratieverhoging van 1 µg acetaat-C L<sup>-1</sup> een BAS-toename van 790 ± 50 ng ATP m<sup>-2</sup> d<sup>-1</sup> veroorzaakte (BTO 2011.050). Uit de sterke lineaire relatie tussen de BAS en de FeAS blijkt dat de BAS ook bij de lage FeCl<sub>3</sub>-dosering werd bepaald door B<sub>A</sub>-adsorptie. De B<sub>A</sub>/Fe-verhouding in de CBM met FeCl<sub>3</sub>-dosering is echter laag in vergelijking met andere watertypen (Tabel 4). Bij een hoge FeCl<sub>3</sub>-dosering was deze verhouding lager dan bij de lage doseringen. De lage B<sub>A</sub>/Fe-verhouding bij de FeCl<sub>3</sub>-dosering is dus het gevolg van een hoge FeAS in combinatie met een relatief geringe biomassa-adsorptie.

De lage BAS in de CBM zonder FeCl<sub>3</sub>-dosering (25 ng ATP m<sup>-2</sup> d<sup>-1</sup>) betekent dat adsorptie van bacteriën op glas zeer beperkt was. Mogelijk speelde Fe (< 0,01 mg L<sup>-1</sup>) bij deze lage BAS nog een rol. Ook uit de relaties tussen geaccumuleerd B<sub>A</sub> en Fe in de CBMs bij een aantal andere watertypen (Fig. 9) blijkt dat de B<sub>A</sub>-accumulatie (BAS) zeer gering is bij een lage Fe-accumulatie (FeAS).

In de CBM met de lage FeCl<sub>3</sub>-dosering is de B<sub>A</sub>/Fe-verhouding 15 ng ATP/mg Fe (Tabel 4). In exponentieel groeiende bacteriën is het ATP-gehalte gemiddeld 0,4% van de biomassa-koolstof (Karl, 1980). Deze verhouding en de B<sub>A</sub>/Fe-verhouding van 15 ng ATP mg<sup>-1</sup> Fe geeft een verhouding tussen actieve biomassakoolstof (B<sub>C</sub>) en Fe van 3,75 µg B<sub>C</sub> mg<sup>-1</sup> Fe. Onder de testcondities trad geen exponentiële groei op (zie hierboven) en de ATP/B<sub>C</sub>-verhouding was dus lager dan 0,4%. Dit betekent dat de B<sub>C</sub>/Fe-verhouding hoger was dan 3,75 µg B<sub>C</sub> mg<sup>-1</sup> Fe. De werkelijke B<sub>C</sub>-concentratie per mg geaccumuleerd Fe is onbekend, maar was waarschijnlijk (veel) lager dan de adsorptiecapaciteit van Fe-hydroxide. In de CBM die bij ps Andijk werd gevoed met AK-filtraat, werden B<sub>A</sub>/Fe-verhoudingen, waargenomen van ca. 2500 ng ATP mg<sup>-1</sup> Fe. Met ATP = 0,4% B<sub>C</sub> geeft dit 1000 µg B<sub>C</sub> mg<sup>-1</sup> Fe. Onduidelijk is hoeveel biomassa kan worden gebonden door Fe-hydroxide. In enkele cuvetten in de CBM zonder Fe-dosering (blanco) zijn incidenteel opvallend hoge B<sub>A</sub>-concentraties waargenomen (Tabel III-1). Bij deze hoge concentraties, die mogelijk het gevolg van de aanwezigheid (en/of vorming) van biomassa-conglomeraten in de teflon aanvoerleiding was de B<sub>A</sub>/Fe-verhouding hoger dan 4000 ng ATP mg<sup>-1</sup> Fe. Mogelijk was hierbij sprake van binding van Fe-hydroxide door de biomassa.

Bij de biomassa-accumulatie in de CBM als gevolg van adsorptie kan onderscheid worden gemaakt tussen de volgende processen:

- (i) adsorptie van de in het water aanwezige bacteriën op Fe-hydroxide in de aanvoerleiding van de CBM bij FeCl<sub>3</sub>-dosering, resp. op Fe-hydroxide gevormd in het zuiveringsproces (CBMs op diverse watertypen);
- (ii) de adsorptie/accumulatie van Fe-hydroxide met geadsorbeerde bacteriën in de CBM;
- (iii) adsorptie van bacteriën op Fe-hydroxide geaccumuleerd in de CBM.

#### 4.4.2.1 *Adsorptie in de aanvoerleiding, resp. de zuivering*

Direct na de FeCl<sub>3</sub>-dosering bevat het water (pH = 7,7) een groot aantal Fe<sup>3+</sup>-ionen (ca. 10<sup>14</sup> per ml bij dosering van 0,01 mg Fe L<sup>-1</sup>). Dit aantal is veel hoger dan het aantal bacteriën in het water (ca. 10<sup>5</sup> mL<sup>-1</sup>) en komt overeen met 0,01 pg Fe<sup>3+</sup> µm<sup>-3</sup>. Dit betekent dat Fe<sup>3+</sup> aanwezig is in de directe nabijheid van de bacteriën. Tijdens het verblijf van het water in de aanvoerleiding (ca. 55 sec.) zullen dus een deel van het positief geladen colloïdaal opgeloste Fe-hydroxide en van de resterende Fe<sup>3+</sup>-ionen adsorberen op de negatief geladen bacteriën (levend en dood).

Daarnaast zullen bacteriën adsorberen op de Fe-hydroxide vlokjes die worden gevormd in de leiding. Onduidelijk is of deze adsorptieprocessen zijn voltooid als het water de CBM bereikt. De fractie bacteriën zonder geadsorbeerd Fe is na een contacttijd van ca. 1 minuut in de aanvoerleiding echter waarschijnlijk verwaarloosbaar.

Bij de bereiding van drinkwater uit ijzerhoudend grondwater en bij de toepassing van  $\text{Fe}^{3+}$  bij het coagulatieproces zijn Fe-hydroxide en bacteriën ook naast elkaar aanwezig in het water en accumuleren Fe-hydroxide en bacteriën in de zand-/antraciet-filters voor Fe-verwijdering. Als gevolg van deze processen zijn bacteriën aanwezig op het Fe-hydroxide in het filtraat van deze processen en is ook de fractie bacteriën zonder geadsorbeerd Fe waarschijnlijk verwaarloosbaar. Mogelijk is de adsorptiecapaciteit van het Fe-hydroxide in evenwicht met ('verzadigd') de betreffende biomassaconcentratie in het water. Deze adsorptiecapaciteit is mogelijk beïnvloed (verminderd) door NOM-adsorptie op het Fe-hydroxide.

#### 4.4.2.2 *Adsorptie van bacteriën op Fe-hydroxide aanwezig in de CBM*

Bacteriën adsorberen sterk en irreversibel op zand gecoat met Fe-oxyhydroxide, terwijl op zand zonder coating een veel minder sterke adsorptie en ook desorptie optrad (Mills et al. 1994). Op Fe-hydroxide in de CBM zal dus adsorptie optreden van bacteriën die nog vrij in het water aanwezig zijn. Dit proces kan pas optreden nadat Fe-hydroxide is geaccumuleerd. Wanneer Fe-hydroxide al veel geadsorbeerde bacteriën bevat, is het aandeel van deze adsorptie waarschijnlijk meestal gering. In corroderende gietijzeren leidingen is wel Fe-hydroxide zonder bacteriën aanwezig, afhankelijk van de intensiteit van het corrosieproces.

#### 4.4.2.3 *Adsorptie/accumulatie van Fe-hydroxide met geadsorbeerde bacteriën*

Typische gemiddelde concentraties van het aantal bacteriën in de CBM gevoed met drinkwater (na 28 dagen) zijn:  $1,8 \times 10^6$  cellen  $\text{cm}^{-2}$  (in de CBM gevoed het AK-filtraat bij ps Andijk; KWR 2010.107) en  $1,9 \times 10^6$  cellen  $\text{cm}^{-2}$  (in de CBM gevoed met het reinwater van ps TWL ; BTO 2011.055). Bij een lengte en diameter van  $1 \mu\text{m}$  zijn minimaal  $10^8$  bacteriën  $\text{cm}^{-2}$  nodig voor een volledige bezetting van het glasoppervlak. In de genoemde CBMs was na een cuvetlooptijd van 28 dagen dus minder dan 2% van het glasoppervlak bedekt met bacteriën. Fe-accumulatie werd dus bepaald door de adsorptie van Fe-hydroxide op het glasoppervlak.

De zeer significante en meestal sterke lineaire relaties tussen  $B_A$  en Fe in de CBMs bij de diverse watertypen (Tabel 4) kunnen worden verklaard door de accumulatie van Fe-hydroxide met daarop geadsorbeerde biomassa/bacteriën. De verschillende Fe-hydroxide concentraties en  $B_A$ -concentraties in de CBMs zijn waarschijnlijk het gevolg van de verschillende concentraties van  $B_A$  en Fe-hydroxide in de diverse watertypen. De hoge Fe concentratie ( $> 100 \text{ mg Fe m}^{-2}$ ) in de CBM gevoed met het drinkwater van ps TWL (Tabel 4, Fig. 8) wijst op een relatief hoge Fe-concentratie in het water. De BAS in deze CBM was echter laag, evenals de  $B_A/\text{Fe}$ -verhouding (Tabel 3) en dat wijst op een relatief lage  $B_A$  concentratie in het water. Ook de groeipotentie van dit water is laag ( $\text{BVS} < 5 \text{ pg ATP cm}^{-2} \text{ dag}^{-1}$ ; Sack et al. 2014).

Wanneer het optreden van de hierboven beschreven adsorptieprocessen verder kan worden bevestigd met experimenteel onderzoek, dan kan worden geconcludeerd dat de biomassa-accumulatie (BAS) in de CBM in veel watertypen vooral afhankelijk is van de hoeveelheid biomassa die is geadsorbeerd op Fe-hydroxide dat vervolgens accumuleert (FeAS) in de CBM. Na een contacttijd van 28 dagen in de CBM zijn de maximum concentraties van geaccumuleerd  $B_A$  en Fe niet bereikt. Uit onderzoek met de biofilmmonitor is gebleken dat de maximum concentratie van geaccumuleerd  $B_A$  meestal wordt bereikt na een looptijd van ca. 100 dagen.

#### 4.4.3 Variaties in de $B_A/Fe$ -verhouding in de CBM

Verhoging van de  $FeCl_3$ -dosering aan het aangevoerde water van 0,01 naar 0,04 mg Fe L<sup>-1</sup> ging gepaard met toename van de FeAS, waarbij de BAS proportioneel toenam en de  $B_A/Fe$ -verhouding in de CBM gelijk bleef. Bij de hoge  $FeCl_3$ -dosering nam de  $B_A$ -concentratie (d.w.z. de BAS) wel toe maar de  $B_A/Fe$ -verhouding in de CBM werd lager (Fig. 4B). In het drinkwater van ps TWL ging een Fe-concentratie > 100 mg Fe m<sup>-2</sup> in de CBM eveneens gepaard met een minder dan proportionele toename van de  $B_A$ -concentratie (Fig. 9A). De BAS-toename in deze CBMs werd blijkbaar beperkt door de adsorptie van  $B_A$  op Fe-hydroxide, vermoedelijk door de lage  $B_A$  concentratie in het water. In de CBMs in het distributiesysteem van ps Andijk (locaties DH, D1 en D2) werden de hoogste FeAS-waarden en BAS-waarden waargenomen bij een watertemperatuur > 10 á 15 °C (Fig. 10). De gemiddelde Fe-concentratie in het gedistribueerde water was laag (Tabel 3). De Fe-concentratie op de locaties waar de CBMs waren opgesteld is niet bepaald, maar was mogelijk hoger. De toename van FeAS in de CBMs bij locaties D1 en D2 bij een temperatuur > 10 á 15 °C betekent dat de Fe-concentratie in het water toenam. De toename van de  $B_A/Fe$ -verhouding hierbij wijst op een sterkere toename van de  $B_A$ -concentratie. Mogelijke verklaringen hiervoor zijn: (i) bij verhoogde watertemperatuur trad aanvoer op van Fe beladen met relatief veel bacteriën uit biofilm en sediment aanwezig in de leidingen (40 km) tussen pompstation en de CBM en/of (ii) een toename van de activiteit van de geaccumuleerde biomassa door meer omzetting van afbreekbare stoffen.

De hoogste  $B_A/Fe$ -verhoudingen werden waargenomen in de CBM bij ps ADK (AK-filtraat) en ps ADK, kelder Hoorn (Fig. 10; Tabel 4). Tussen de concentraties van  $B_A$  en Fe (alle waarnemingen) in de CBM gevoed met AK-filtraat bestaat geen significant verband. In de CBM gevoed met water uit kelder Hoorn is het verband wel significant maar de relatie is zwak (lage  $R^2$ ; Tabel 4). De oorzaak van deze zwakke relaties zijn waarschijnlijk de sterke variaties van de BAS en de FeAS gedurende de looptijd van deze CBMs (Fig. 10). Deze variaties hangen samen met seizoeninvloeden op de watersamenstelling en de operationele condities in de zuivering. De FeAS van het AK-filtraat bleef laag maar in de eerste twee maanden van de looptijd werden hierbij hoge  $B_A/Fe$ -verhoudingen tot ca. 2500 ng ATP mg<sup>-1</sup> Fe) waargenomen. In de periode met lagere watertemperatuur was  $B_A/Fe$ -verhouding lager (560 ± 135 ng ATP mg<sup>-1</sup> Fe). Ook hier was in de 'warme' periode waarschijnlijk sprake van de aanvoer van meer biomassa (door verhoogde biologische activiteit in de AK-filters), en/of meer omzetting van afbreekbare stoffen.

Als gevolg van de  $ClO_2$ -dosering aan het AK-filtraat van pompstation Andijk (KWR 2010.107) bevat het water bij ps ADK-H bevat gemakkelijk afbreekbare stoffen. De relatief sterk verhoogde BAS in de 'warme' periode (Fig. 10) kan worden toegeschreven aan de versterkte vorming en omzetting van deze gemakkelijk afbreekbare stoffen. De mediaan van het aantal bacteriën op het glasoppervlak was  $6,2 \times 10^6$  cm<sup>-2</sup>, met waarden boven  $1,5 \times 10^7$  cm<sup>-2</sup> in de zomerperiode, waardoor  $P_{90} = 1,7 \times 10^7$  bacteriën cm<sup>-2</sup>. Met de hierboven gegeven bacterieafmetingen kan het oppervlak dat is bezet met bacteriën worden geschat op maximaal 20%. Bij vorming van microkolonies en kleinere bacteriën was dit oppervlak kleiner. Ook hier was het overgrote deel van het glas dus beschikbaar voor Fe-adsorptie. Verschillende factoren kunnen hebben bijgedragen aan de verhoogde FeAS in de 'warme periode', nl. (i) een verhoogde Fe-concentraties door het verblijf van het water in de transportleiding (ca. 17 km) en in de kelder te Hoorn; (ii) een verhoogde Fe-concentratie als gevolg van de hogere  $ClO_2$ -dosering in de warme periode en (iii) adsorptie van Fe-hydroxide op de EPS-producerende biomassa,

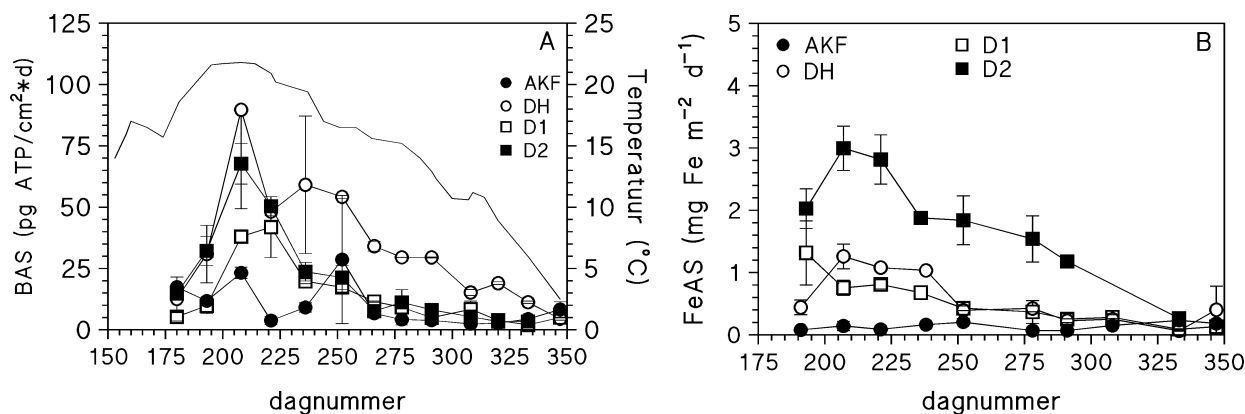


Fig. 10. BAS en FeAS in drinkwater van ps Andijk (PWN). AKF, filtraat actieve koolfilters, DH, water uit kelder Hoorn; D1, Locatie Bovenkarspel; D2, Locatie Purmerend. Herkomst gegevens: KWR 2010.107.

#### 4.4.4 Adsorptie van dode biomassa en NOM op Fe-hydroxide

Dode biomassa (bestanddelen) en NOM adsorberen op Fe-hydroxide. Mede als gevolg hiervan verandert de aard (lading, samenstelling, grootte) van de Fe-hydroxide colloïden. Deze verandering van samenstelling en de invloed van de fysisch-chemische veroudering van Fe-hydroxide spelen waarschijnlijk een rol bij verminderde specifieke FeAS en kunnen ook de adsorptie van  $B_A$  op Fe-hydroxide verminderen. Hierover zijn in de onderzoeken met de CBMs op diverse locaties echter geen gegevens verzameld. In de CBM met  $FeCl_3$ -dosering zijn wel enkele metingen van de DOC-accumulatie en de koolhydraat (CH)-accumulatie uitgevoerd. Bij de DOC-metingen is niet gecorrigeerd voor de DOC-concentratie in het water waarin de glaspereels ultrasoon werden behandeld en waaraan aanvankelijk bovendien NTA was toegevoegd. Tussen de blanco CBM en de  $FeCl_3$ -dosering werden hierdoor geen verschillen waargenomen. De CH-concentratie in de suspensie verkregen na ultrasone behandeling van de glaspereels was vrijwel steeds beneden of bij de detectiegrens, ook in de cuvetten van de blanco CBM waarbij een verhoogde biomassa-concentratie werd waargenomen. Uitzonderingen vormden enkele metingen bij de hoge  $FeCl_3$ -doseringen en bij een lage  $FeCl_3$ -dosering, waarbij CH-concentraties van 50 á 130 mg CH  $m^{-2}$  werden berekend. Bij een gemiddeld koolstofgehalte van 40% komen deze concentraties overeen met 20 á 50 mg CH-C  $m^{-2}$ . Vaststelling van de precieze relatie tussen Fe-accumulatie en accumulatie van organische stof vergt nader onderzoek.

#### 4.5 Betekenis Fe voor nagroei

Bij de bereiding van drinkwater uit zuurstofloos grondwater wordt gereduceerd ijzer ( $Fe^{2+}$ ) door beluchting omgezet in Fe-hydroxide.  $Fe^{3+}$ -zouten worden onder vorming van Fe-hydroxide gebruikt voor het coagulatieproces bij de bereiding van drinkwater uit oppervlaktewater. In het distributiesysteem kan Fe-hydroxide worden gevormd bij de corrosie van gietijzeren leidingen. Fe-hydroxide is dus aanwezig in alle drinkwatertypen, maar in uiteenlopende concentraties. De oplosbaarheid van Fe-hydroxide in water met een pH van ca. 8 is echter zeer gering ( $\ll 1 \mu g Fe L^{-1}$ ). Het colloïdaal opgeloste positief geladen Fe-hydroxide adsorbeert op de buiswand, associeert met negatief geladen NOM en biomassa, en vormt vlokjes die bezinken. Door deze eigenschappen speelt Fe-hydroxide in het drinkwater bij distributie een geheel andere rol dan Ca-, Mg- en Al-verbindingen, die beter oplosbaar zijn.

Uit het bovenbeschreven onderzoek kwam naar voren dat  $FeCl_3$ -dosering de  $B_A$ -accumulatie in de CBM versterkte. Uit resultaten van eerder uitgevoerd kon worden afgeleid dat een hogere FeAS in de CBM gepaard ging met een hogere BAS. Een verhoogde Fe-hydroxide concentratie

in het reinwater zal dus ook de  $B_A$ -accumulatie in het distributiesysteem versterken door vorming van meer biofilm en sediment. Corroderende gietijzeren leidingen hebben een overeenkomstig, maar lokaal, effect. De mate waarin de  $B_A$ -accumulatie wordt verhoogd is afhankelijk van de concentraties van Fe-hydroxide en  $B_A$  in het water. In reinwatertypen in Nederland ligt de  $B_A$ -concentratie in het water meestal tussen ca. 0,5 en 10 ng ATP L<sup>-1</sup> (van der Kooij and Veenendaal, 2014). Verschillen in concentraties van Fe-hydroxide en  $B_A$  in het water leiden tot verschillen in de verhouding tussen biomassa en Fe. Dit blijkt ook uit de metingen in In het spuiwater van ps Spannenburg (ca. 100 ng ATP mg<sup>-1</sup> Fe) en in het spuiwater van ps Amersfoortseweg (ca. 10 ng ATP mg<sup>-1</sup> Fe) (van der Wielen en van der Kooij, 2010). Vorming van meer biofilm en sediment in het leidingnet versterkt de vervuiling van het distributiesysteem met biomassa die kan dienen als voedsel voor protozoa en dierlijke organismen. Bepaalde protozoa worden door *Legionella*-bacteriën benut als gastheer. Waterpissebedden, die biofilm en sediment consumeren en daarbij de karakteristieke ijzerhoudende fecale pellets uitscheiden (van Lieverloo et al. 1996), kunnen problemen veroorzaken, o.a. verstopping van watermeters. Biomassa-turnover processen gaan gepaard met het vrijkomen van gemakkelijk afbreekbare verbindingen (Pernthaler, 2005). Onder deze omstandigheden kan o.a. groei van *Aeromonas* optreden, waarbij de wettelijke kwaliteitseis t.a.v. dit organisme (<1000 kolonievormende eenheden per 100 mL) kan worden overschreden. Ook langzaam afbreekbare stoffen zoals biomassa-componenten (bv. eiwitten en koolhydraten), en NOM, die zijn geadsorbeerd op Fe-hydroxide kunnen waarschijnlijk de groei van (micro-)organismen in biofilm en sediment versterken. Kwantitatieve informatie hierover ontbreekt.

Het effect van Fe-hydroxide verschilt per watertype. De invloed bij een drinkwatertype op de biomassa-accumulatie als gevolg van adsorptie kan worden beoordeeld door het bepalen van de  $B_A$ -accumulatiepotentie van het water in de CBM d.m.v. doseringen van FeCl<sub>3</sub>. De beoordeling van de invloed van Fe-hydroxide op de bevordering van groei van micro-organismen door omzetting van geadsorbeerde biomassa-componenten en NOM vergt nadere informatie over de mate van adsorptie van deze verbindingen op Fe-hydroxide.





# 5 Conclusies en aanbevelingen

## 5.1 Conclusies

- Dosering van een lage  $\text{FeCl}_3$ -concentratie veroorzaakte een sterke toename van de FeAS in de CBM, maar de specifieke FeAS (FeAS per mg Fe  $\text{L}^{-1}$ ) in CBMs gevoed met diverse drinkwatertypen is veel lager dan de specifieke FeAS na  $\text{FeCl}_3$ -dosering. Fe-hydroxide aanwezig in het drinkwater accumuleert blijkbaar veel minder snel in de CBM dan Fe-hydroxide aanwezig na  $\text{FeCl}_3$ -dosering;
- De relatief sterke BAS-toename bij de  $\text{FeCl}_3$ -dosering geeft aan dat de  $B_A$ -accumulatiepotentie van het AK-filtraat beduidend hoger is dan wordt waargenomen in het water zonder Fe-dosering. Dit kan ook in andere drinkwatertypen het geval zijn;
- Fe-hydroxide versterkte ook de accumulatie van de actieve biomassa in de CBMs gevoed met verschillende drinkwatertypen in eerder onderzoek. In het distributiesysteem zal dus meer biomassa accumuleren bij een toename van de Fe-concentratie;
- Tussen de concentratie van actieve biomassa ( $B_A$ , ng ATP  $\text{m}^{-2}$ ) en de Fe-concentratie in de CBM bestaat meestal een duidelijk lineair verband, dat verschilt per watertype;
- De mate van toename van de  $B_A$ -accumulatie bij toename van de Fe-concentratie is afhankelijk van de aard van het aanwezige Fe-hydroxide en de concentratie van de actieve biomassa in het water;
- De  $B_A$ -accumulatie in de CBM is waarschijnlijk grotendeels het gevolg van de accumulatie van Fe-hydroxide met daarop geadsorbeerde actieve biomassa. Verschillen in BAS-waarden zijn het gevolg van verschillen in  $B_A$  concentratie en Fe-concentratie in het water.
- Onduidelijk is in welke mate in diverse drinkwatertypen sprake is van adsorptie van biomassa- componenten en NOM op Fe-hydroxide en in welke mate deze geadsorbeerde stoffen een rol spelen bij nagroei.
- In verband met onduidelijkheden over de experimentele condities en de verkregen resultaten van de batchtesten waarbij  $\text{FeCl}_3$  aan flessen is gedoseerd, zijn er geen duidelijke conclusies over die fase van het onderzoek te trekken.

## 5.2 Aanbevelingen

### 5.2.1 Praktijk

- Zoveel mogelijk verlagen van de Fe-concentratie in het reinwater en in het drinkwater in het distributiesysteem in drinkwatertypen met een hoge  $B_A$ -accumulatiepotentie.

### 5.2.2 Onderzoek

- Ontwikkelen van een gestandaardiseerde werkwijze voor het bepalen van de invloed van Fe-hydroxide op de  $B_A$ -accumulatie door middel van metingen van het effect van verschillende  $\text{FeCl}_3$ -doseringen op de BAS;
- Nagaan of het meten van de BAS op glaspapels gecoat met Fe-oxide informatie geeft over de  $B_A$ -accumulatiepotentie van drinkwater;
- Bepalen van de  $B_A$ -accumulatiepotentie van verschillende drinkwatertypen, w.o. filtraat langzame zandfilters, AK-filtraten bij div. locaties, drinkwater bereid uit aerob en anaerob grondwater. Hierbij tevens waterkwaliteitsparameters (o.a. pH, TOC, Mn,

biomassaconcentratie, groeipotentie) meten om de invloed hiervan op de  $B_A$ -accumulatiepotentie te bepalen;

- Bepalen van de verhouding tussen de concentratie van Fe-hydroxide, de concentratie van actieve biomassa en het totale aantal bacteriën in diverse drinkwatertypen;
- Bepalen van de verhouding tussen de concentratie van Mn-hydroxide, de concentratie van actieve biomassa en het totale aantal bacteriën in diverse drinkwatertypen;
- Bepalen van de aanwezigheid van biomassa en NOM geadsorbeerd op Fe in diverse drinkwatertypen en in biofilms en sediment;
- Bepalen van de specifieke FeAS van drinkwatertypen door meten van het Fe-gehalte in het water bij onderzoek met CBMs. Verklaring van verschillen vergt nader onderzoek naar de fysisch-chemische eigenschappen (lading, electroforetische snelheid) en de samenstelling van Fe-hydroxide in drinkwater in vergelijking met  $Fe(OH)_3$  na  $FeCl_3$ -dosering.
- Door middel van literatuuronderzoek nagaan of mangaan een rol kan spelen bij de biomassa-accumulatie.

## 6 Referenties

Bos R, H.C. van der Mei, H.J. Busscher. 1999. Physico-chemistry of initial microbial adhesive interactions- its mechanisms and methods for study. FEMS Microbiol. Rev. 23:179-230.

Drinkwaterbesluit 2011. Besluit van 23 mei 2011, houdende bepalingen inzake de productie en distributie van drinkwater en de organisatie van de openbare drinkwatervoorziening (Drinkwaterbesluit). Staatsblad 293:1-48.

Dubois M, Gilles KA, Hamilton JK, Rebers PA and Smith f. 1956. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. Anal. Chem. 28: 350-356..

Fleer GJ. 1971. Polymer adsorption and its effect on colloidal stability. Mededelingen Landbouwhogeschool Wageningen 71-20.

Fletcher M and Loeb GI. 1979. Influence of substratum characteristics on the attachment of a marine pseudomonad to solid surfaces. Appl. Environ. Microbiol. 37:67-72.

Fletcher, M. 1988. Attachment of *Pseudomonas fluorescens* to glass and influence of electrolytes on bacterium-substratum separation distance. J. Bacteriol. 170(5):2027-2030.

Gu B, Schmitt J, Chen Z, Liang L and McCarthy JF. 1995. Adsorption and desorption of different organic matter fractions on iron oxide. Geochim Cosmochim Acta 59:219-229..

Lahann RW. 1976. Surface-charge variation in aging ferric hydroxide. Clays and Clay Minerals 24:320-326

Magic-Knezev A, van der Kooij D. 2004. Optimization and significance of ATP analysis for measuring active biomass in granular activated carbon filters in water treatment. Water Res. 38:3971-3979.

Mills AJ, Herman JS, Hornberger GM and DeJesus TD. 1994. Effect of solution ionic strength and iron coatings on mineral grains on the sorption of bacterial cells to quartz sand. Appl. Environ. Microbiol. 60:3300-3306.

Parikh SJ and Chorover J. 2006. ATR-FITR spectroscopy reveals bond formation during bacterial adhesion to iron oxide. Langmuir 22: 8492-8500.

Pernthaler J. 2005. Predation on prokaryotes in the water column and its ecological implications. Nature Rev. 3:537-548.

Sack ELW, van der Wielen PWJJ and van der Kooij D. 2014. Polysaccharides and proteins added to flowing drinking water at microgram-per-liter levels promote the formation of biofilms predominated by Bacterioidetes and Proteobacteria. Appl. Environ. Microbiol. 80: 2360-2371.

Sutherland I. 2001. Biofilm exopolysaccharides: a strong and sticky framework. Microbiology 147:3-9.

Stumm W and Morgan JJ, 1996. Aquatic chemistry. Chemical equilibria and rates in natural waters. Third Edition. John Wiley & Sons Inc. New York.

VandeVivere, P. and D.L. Kirchman. 1993. Attachment stimulates exopolysaccharide synthesis by a bacterium. App. Environ. Microbiol. 59(10):3280-3286.

Van der Kooij D and Veenendaal HR. 2014. Regrowth problems and biological stability assessment in the Netherlands. Chapter 11, pp 291-337 in Microbial growth in drinking-water supplies. Eds. van der Kooij D and van der Wielen PWJJ. IWA Publishing London-New York.

Van der Kooij D. en Veenendaal HR. 2013. Bepaling van de concentratie van biomassa in drinkwater met behulp van de hemoflow (BTO 2013.044).

Van der Kooij D en Veenendaal HR. 2012. Bepaling van de biofilmvormende eigenschappen van drinkwater met een continue biofilmmonitor. BTO 2011.050,

Van der Wielen, P.W.J.J. en D. van der Kooij. 2011. Inventarisatie van *Aeromonas* en koloniegetal 22°C in drinkwater en relaties met fysisch/chemische parameters. BTO 2011.001.

Van der Wielen, P.W.J.J. en D. van der Kooij. 2010. ATP-metingen geven informatie over kans op nagroeiproblemen bij drinkwaterdistributie. H<sub>2</sub>O 38-40.

Van Lieverloo JHM, Veenendaal G, van der Kooij D. 1996. Dierlijke organismen in systemen voor de distributie van drinkwater. Resultaten van een inventarisatie. SWE 96.013.

Vreeburg, J. 2007. Discoloration in drinking water distribution systems: a particular approach. Proefschrift Technische Universiteit Delft.

# Bijlage I

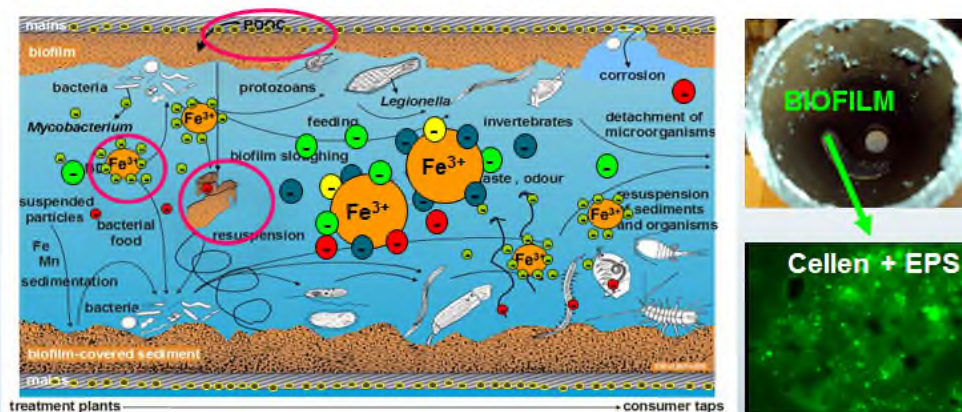
## Presentatie resultaten batchtesten en CBM met ijzerdosering

### Rol ijzer in nagroei/biologische stabiliteit in het drinkwaterdistributiesysteem

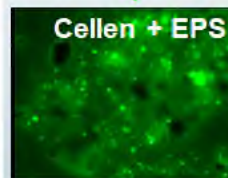
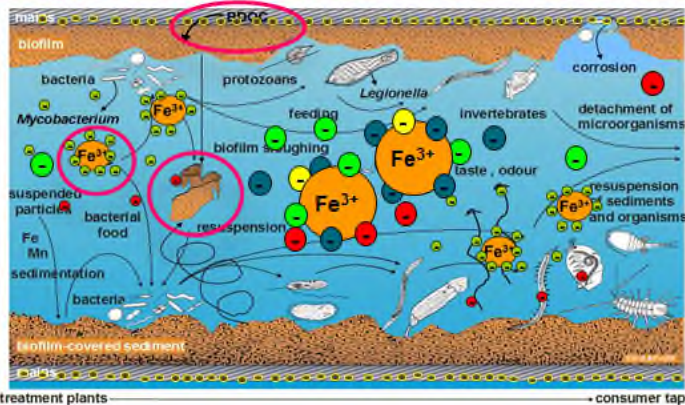
7 Februari 2014, Nieuwegein

Ludmila Bereschenko

### Rol ijzer bij hechting en sedimentatie van (moeilijk-afbreekbaar) organisch materiaal



**Doelstelling:** In welke mate ijzer-gebonden organisch materiaal resulteert in verhoogde accumulatie van actieve biomassa in een biofilmmonitor?



## Vraagstellingen (Fase I)

- Hoe snel ontstaan (ijzer)vlokken?
- Hoe groot zijn (ijzer)vlokken?
- Hecht (actieve) biomassa aan (ijzer)vlokken?
- Hecht DOC aan (ijzer)vlokken?
- Bij welke concentraties ijzer?


### Fase I: Experimenten onder statische condities (Batch-testen)

<p><b>FeCl<sub>3</sub>·6H<sub>2</sub>O</b></p> <p><b>pH = 8,0</b></p> <p><b>Reine water</b> BAS: 20 - 60 (pg ATP/cm<sup>2</sup>.d)</p>	<p><b>0, 1 en 1 mg Fe/ L</b></p> <p><b>0, 1 mg Fe/ L</b> <b>Na 1 uur op ijs</b></p> <p>20 sec 300 rpm 16 h 75 rpm</p>	<p><b>16 uur</b></p>
<p>- Lekkanaal water - ps Berenplaat (na AKF, ClO<sub>2</sub>, opslagkelder, HD)</p>		



Fase I: Onder statische condities (Batch-testen)

**FeCl<sub>3</sub>·6H<sub>2</sub>O**

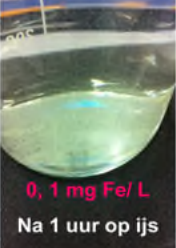


**pH = 8,0**

**Reine water**  
BAS: 20 - 60  
(pg ATP/cm<sup>2</sup>.d)

→

**0, 1 en 1 mg Fe/ L**



**0, 1 mg Fe/ L**  
**Na 1 uur op ijs**

20 sec 300 rpm  
16 h 75 rpm

→

**1 uur**

**3 uur**

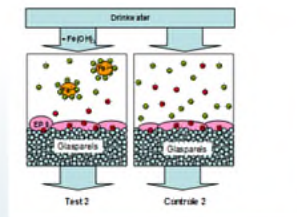
**5 uur**

Tijd: 5 min  
Grootte: 1.2 µm  
Cellen in/op vlokken  
Dosering: 0,1 mg Fe/L

- Lekkanaal water

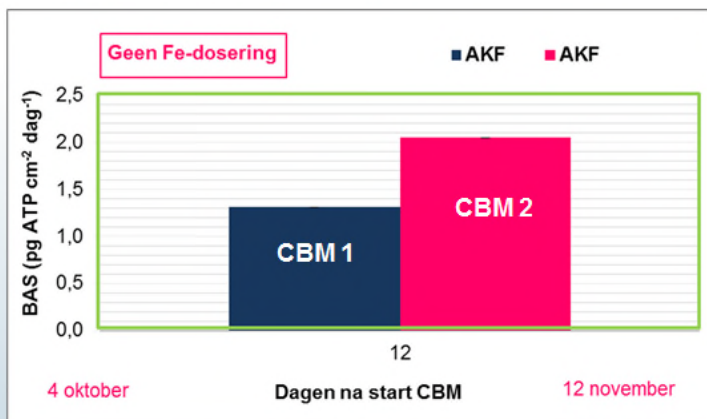
- ps Berenplaat (na AKF, ClO<sub>2</sub>, opslagkelder, HD)

Fase II: Onder dynamische condities (Biofilmmonitor)

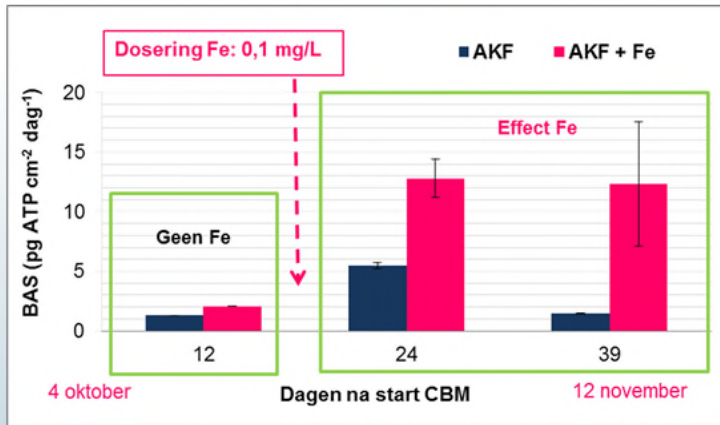


- ATP
- BAS
- Fe
- DOC
- CH

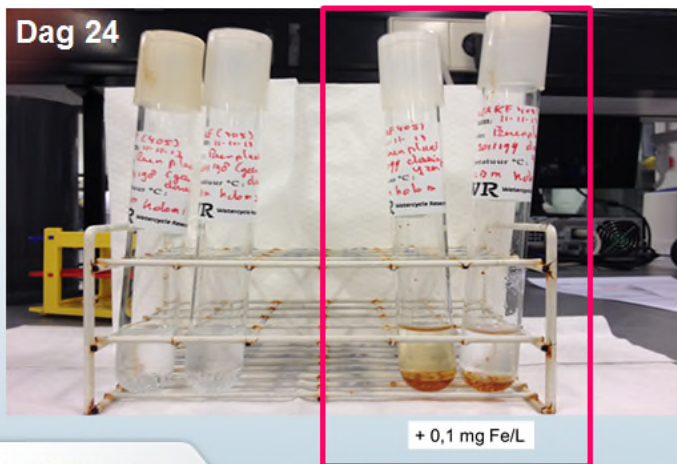
BAS: geen verschil tussen de kolommen



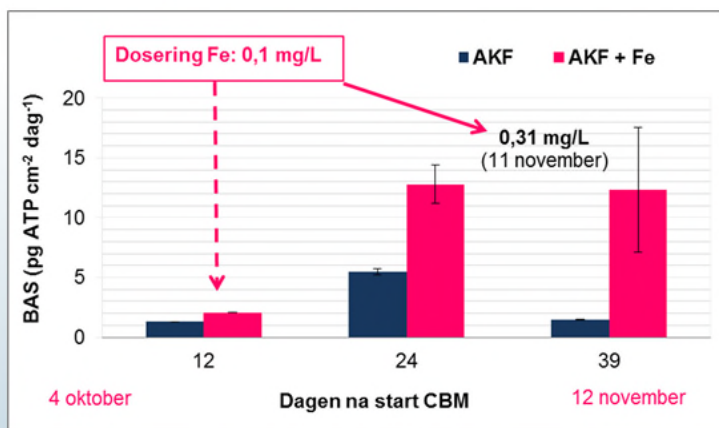
## Fe-dosering: verschil tussen de kolommen



Dit verschil is ook visueel waarneembaar

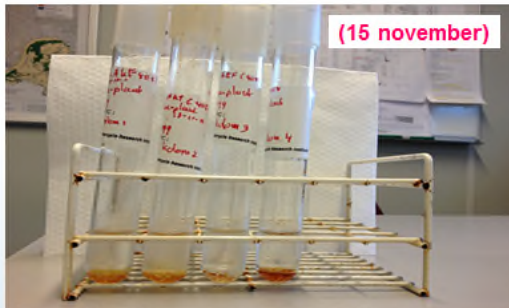
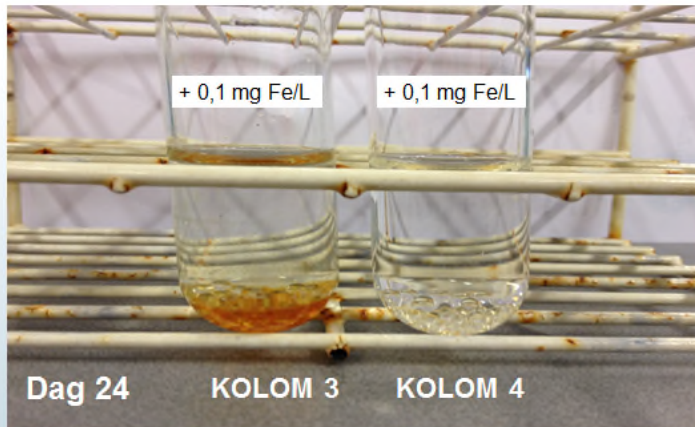


Controle dosering

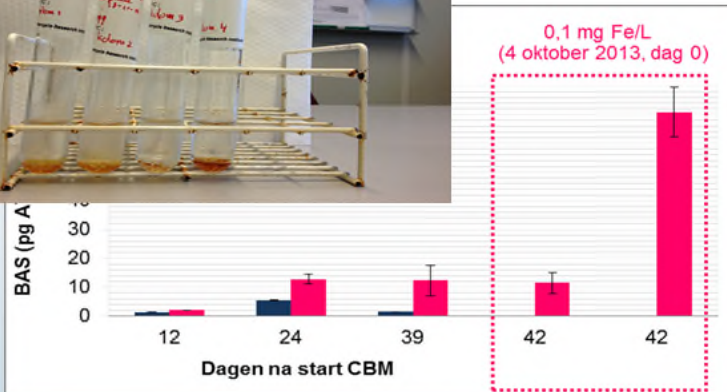




### Verschil tussen Fe-kolommen

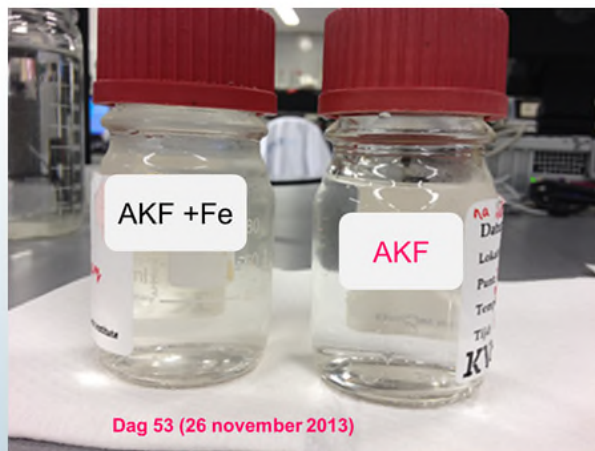


### Oplossing: nieuwe CBM



Resultaat: concentratie ijzer is verlaagd  
(naar 0,01 mg Fe/L)

Met het blote oog (nog) geen verschil



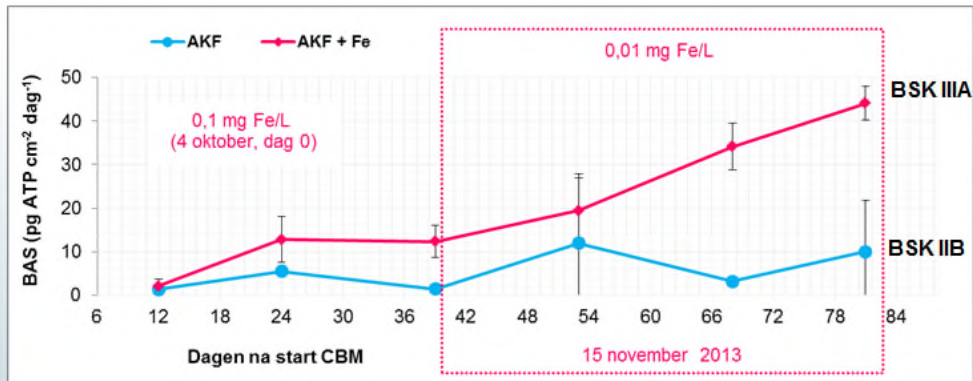
Bij lagere dosering (0,01 mg Fe/L):  
na 2 weken **zichtbare vervuiling van CBM-kolommen**

Slide 13



Bij lagere dosering (0,01 mg Fe/L):  
duidelijk **verschil tussen CBM's in BAS**

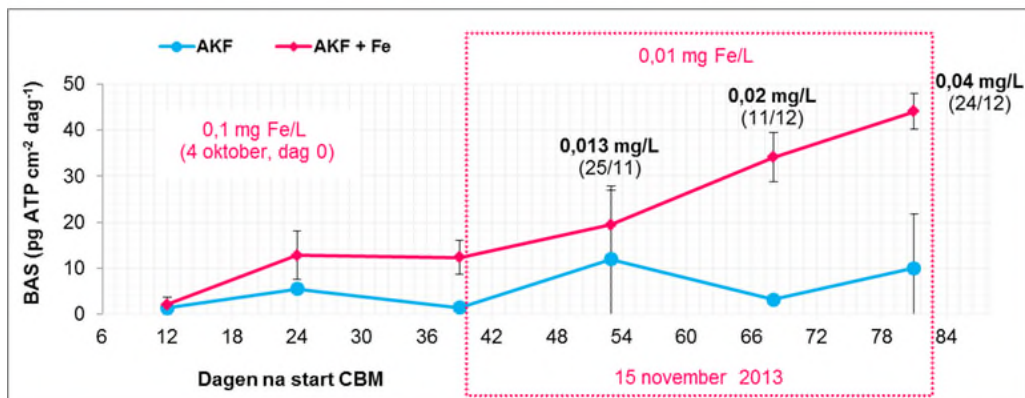
Slide 14



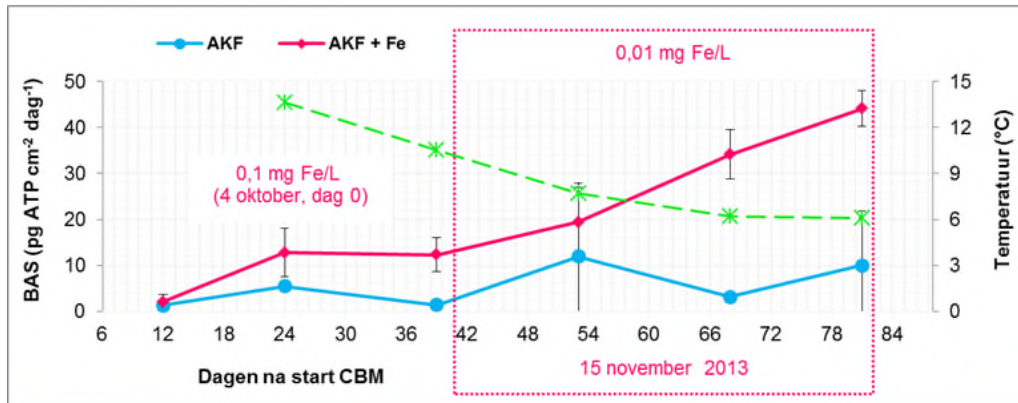
+ Fe-flokken → verhoogde BAS

Slide 15

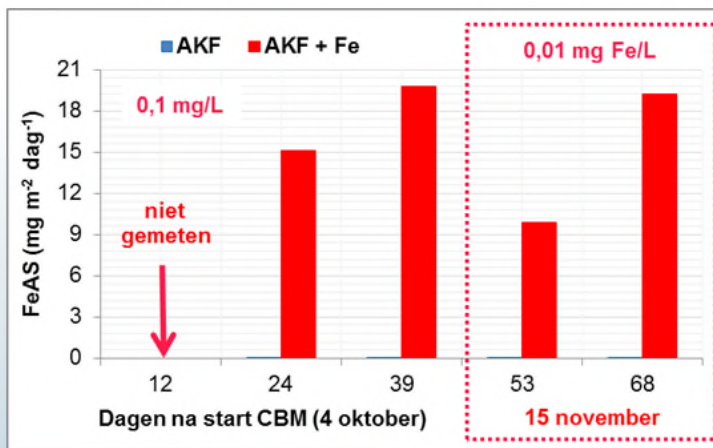
Fluctuaties in Fe-concentraties bij dosering: acceptabel



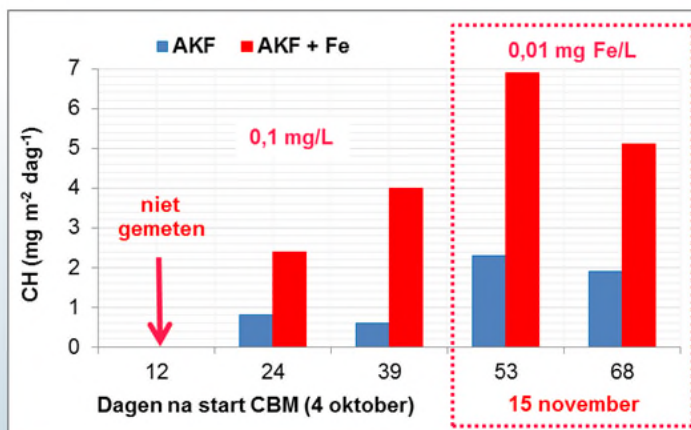
### Verlaging temperatuur: geen effect op BAS



### Vershil in FeAS tussen de CBM's

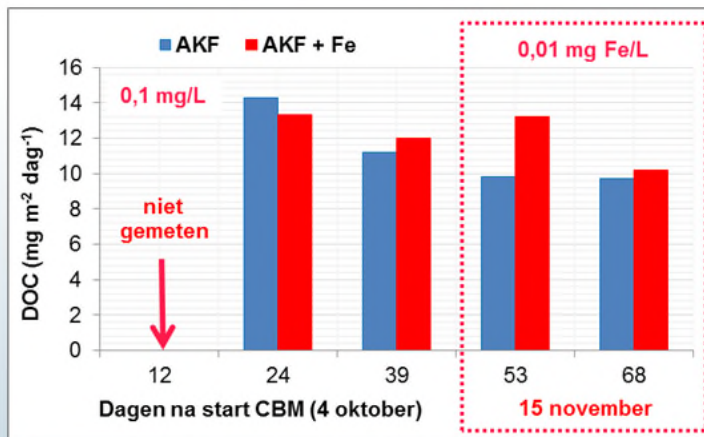


### Vershil in CH-concentratie van biofilms

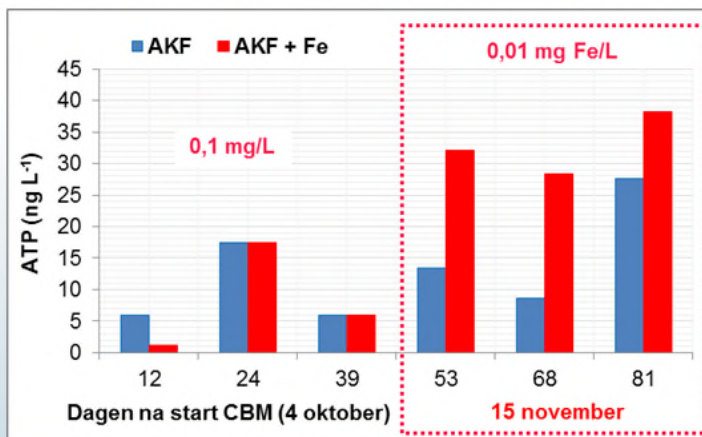




## DOC-concentraties: verschillen waargenomen



## ATP (water): verschillen waarneembaar



## Conclusies

- *IJzervlokken accumuleren (hechten) in CBM*
- *De accumulatie (hechting) van ijzervlokken resulteert in hogere BAS*
- *Aanhechting en groei van microbiële cellen is hoger door ijzer*
- *Hechting van DOC aan ijzer(vlokken) is minder duidelijk*
- *Concentratie van koolhydraten in CBM met ijzer is hoger*
- *Lage ijzerconcentratie in het water kan de biologische stabiliteit van het water negatief beïnvloeden*

**Verder onderzoek:**

**Onduidelijk blijft wat precies is waargenomen:**

- **EPS-productie op geaccumuleerde (Fe)vlokken?**
- **Of EPS-productie op CBM-glasparels?**
- **Hechting van gesuspendeerde CH aan ijzer(vlokken)?**

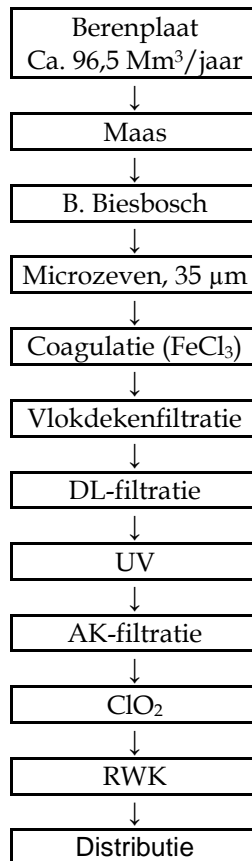
**Aanbeveling:**

**ijzerconcentratie in het reinwater zo laag mogelijk houden**



# Bijlage II

## Zuiveringsschema pompstation Berenplaat







# Bijlage III

## Overzicht meetresultaten

Tabel III-1. Meetresultaten CBM zonder ijzerdosering

Monster- datum	CBM looptijd dagen	Cuvet nr	Cuvet looptijd dagen	Monster code	Biomassa ng/m <sup>2</sup>	BAS ng/(m <sup>2</sup> .d)	BAS Gem ± sd	Fe mg/m <sup>2</sup>	FeAS mg/(m <sup>2</sup> .d)	DOC mg/m <sup>2</sup>	DOCAS mg/(m <sup>2</sup> .d)	CH mg/m <sup>2</sup>
16-10-2013	12	1	12	M133345	178	14,9	13,2 ± 2,5					
		2	12	M133346	137	11,4						
28-10-2013	24	3	24	cuvet*								
		4	24	M-133439	<b>1309</b>	54,6				342	14,3	< dg**
28-10-2013	24	3+4	24	3439	<b>1328</b>	55,4		0,2	0,008			
11-11-2013	39	1	27	M-133640	384	14,2	14,4 ± 0,4			302	11,2	< dg
		2	27	M-133641	397	14,7						
11-11-2013	39	1+2	26	3640+3641	339,5	13,1						
26-11-2013	53	3	29	M-133796	180	6,2	nb					
		4	29	M-133797	<b>6735</b>	232						
26-11-2013	53	1	15	M-133796	324	21,6	nb	1,6	0,107	137	9,1	< dg
		2	15	M-133797	5266	351,1		1,2	0,08	137	9,1	< dg
11-12-2013	68	3	15	M-133982	371	24,8	24,7 ± 3,2					
		4	15	M-133983	418	27,9						
11-12-2013	68	1	15	M-133982	420	28,0		1,2	0,08	145	9,7	< dg
		2	15	M-133983	543	36,2		1,2	0,08	145	9,7	< dg
24-12-2013	81	3	13	M-134079	220	17	17,2 ± 0,2					
		4	13	M-134080	2381	183						
24-12-2013	81	3	13	M-134079	225	17,3		1,6	0,123	145	11,2	< dg
		4	13	M-134080	2321	179		1,6	0,123	149	11,5	< dg

\* cuvet niet beschikbaar, \*\* < dg; CH-concentratie in de suspensie kleiner dan de detectiegrens (2 mg L<sup>-1</sup>)

Tabel III-2. Meetresultaten CBM met ijzerdosering

Datum	CBM looptijd dagen	Cuvel nr	Monster code	Cuvel looptijd dagen	ATP ng/m <sup>2</sup>	BAS ng/(m <sup>2</sup> .d)	BAS gem ± sd	Fe g/m <sup>2</sup>	FeAS mg/(m <sup>2</sup> .d)	FeAS gem ± sd	DOC mg/m <sup>2</sup>	CH mg/m <sup>2</sup>
16-10-13	12	1	M133348	12	385	32	20,6 ± 16,1					
		2	M133349	12	110	9,2						
28-10-13	24	3	M-133440	24	3968	165	nb					
		4	M-133441	24	344	14,3						
28-10-13	24	3+4	3440+41	24	2194	91,4		363	30,2		342,7	56,4
11-11-13	39	1	M-133643	26	4027	154,9	129 ± 37					
		2	M-133644	26	2659	102,3						
11-11-13	39	1+2	3643	26	3603	138,5		665	25,6		322,2	82,4
11-11-13	39	1+2	3644	26	1751	67,3		403	15,5		322,2	131,2
15-11-13	42	1	M-133718	4	2107	526,7	530 ± 4					
		2	M-133719	4	2130	532,6						
15-11-13	42	3	M-133720	18	976	54,2	115 ± 86					
		4	M-133721	18	3172	176,2						
15-11-13	42	1	M-133718	4	2037	509,2	531 ± 31	484	121	131 ± 14	157,3	80,3
		2	M-133719	4	2215	553,8		564	141		161,6	<#
15-11-13	42	3	M-133720	18	1057	58,7		266	14,8	36 ± 30	153,9	<
		4	M-133721	18	3090	171,6		1048	58,2		161,6	133,4
26-11-13	53	1	M-133793	11	2716	246,9	171 ± 55					
		2	M-133794	11	1549	140,8						
26-11-13	53	3	M-133793	11	1939,3	176,3		121	11,0	9,9 ± 1,6	145,3	<
		4	M-133794	11	1324,0	120,4		97	8,8		145,3	<
11-12-13	68	1	M-133985	15	3995,4	266,4	323 ± 49					
		2	M-133986	15	5223,9	348,3						
11-12-13	68	3	M-133985	15	4549,2	303,3		290	19,4	19,3 ± 0,2	153,9	<
		4	M-133986	15	5682,2	378,8		286	19,1		153,9	88,9
24-12-13	81	1	M-134082	13	5380,9	413,9						
		2	M-134083	13	6081,1	467,8	444 ± 25					
24-12-13	81	1	M-134082	13	5423,4	417,2		351	27	26,7 ± 0,4	157,3	<
		2	M-134083	13	5830,7	448,5		343	26,4		161,6	<



