

# MAXIMAAL HERGEBRUIK VAN HET MEDIUM EN MINIMALISATIE VAN DE SPUI VAN SPIRULINA-TEELT

Coudron Carl  
INAGRO  
E [carl.coudron@inagro.be](mailto:carl.coudron@inagro.be)

Devlamynck Reindert  
Ugent  
E [reindert.devlamynck@ugent.be](mailto:reindert.devlamynck@ugent.be)

Van Havermaet Robin  
PCG  
E [robin.van.havermaet@pcgroenteteelt.be](mailto:robin.van.havermaet@pcgroenteteelt.be)

Devaere Jolien  
KU Leuven  
E [jolien.devaere@kuleuven.be](mailto:jolien.devaere@kuleuven.be)



## Inhoud

|       |   |    |
|-------|---|----|
| 1     | Inleiding .....   | 1  |
| 2     | Samenstelling van de spui .....   | 2  |
| 3     | Hergebruik van Spirulina-medium voor de kweek van Spirulina .....                   | 3  |
| 3.1   | Groei van Spirulina in vers versus oud medium .....                                 | 3  |
| 3.2   | Behandelen van het gerecycleerde medium voor de kweek van spirulina .....           | 3  |
| 3.2.1 | Actieve kool (korrels).....   | 4  |
| 3.2.2 | Actieve kool (poeder) .....   | 4  |
| 3.2.3 | Membraanfiltratie .....   | 5  |
| 3.2.4 | Ozon.....   | 6  |
| 3.2.5 | H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> .....   | 6  |
| 3.2.6 | H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> en UV.....  | 7  |
| 3.3   | Spirulina-kweek op behandeld medium .....   | 7  |
| 3.4   | Conclusie .....   | 8  |
| 4     | Eendenkroos voor de verwerking van Spirulina-spui.....                              | 9  |
| 4.1   | Meerwaarde van eendenkroos .....  | 9  |
| 4.2   | Waterkwaliteit en nutritionele behoeften van eendenkroos .....                      | 9  |
| 4.3   | Bakkenproeven.....  | 11 |
| 4.3.1 | Proefopzet .....  | 11 |
| 4.3.2 | Resultaten en discussie .....   | 11 |
| 4.3.3 | Conclusie .....   | 14 |
| 5     | Spirulina-spui verwerken met zwarte soldatenvlieg ( <i>Hermetia illucens</i> )..... | 15 |
| 5.1   | Vervanging van regenwater door Spirulina-spui.....                                  | 15 |
| 5.2   | Alkaliseren van gefermenteerd substraat met spui .....                              | 15 |
| 6     | Conclusie .....   | 17 |
| 7     | Referenties .....   | 18 |
|       | Colofon .....   | 19 |

# 1 INLEIDING

---

Spirulina is een microalg die commercieel geteeld wordt op een waterige voedingsoplossing van minerale meststoffen. Na verloop van tijd kan deze voedingsoplossing gecontamineerd raken, verzouten of op andere manieren ongeschikt worden voor verdere teelt. Dergelijk restwater, dat door de teler wordt bestempeld als afvalwater en niet kan hergebruikt worden, wordt ook spui genoemd.

De spui die werd geproduceerd in dit project, bevat nog steeds N- en P-gehalten boven de losbare grenzen en deze nutriënten moeten dus verwijderd worden. Daarnaast bevat de spui ook hoge gehalten aan bicarbonaat die een probleem vormen om de spui te lozen. Om de duurzaamheid van spirulina-teelt te vergroten, is het belangrijk dat er zo weinig mogelijk spui wordt geproduceerd en dat de nutriënten ervan zoveel mogelijk worden gerecupereerd.

In dit rapport, dat tot stand kwam binnen het Interreg project 'de blauwe keten', zal worden bekeken hoe het medium zo lang mogelijk kan worden hergebruikt via recirculatie en hoe de nutriënten van deze stroom zoveel mogelijk kunnen worden gerecupereerd door het groeien van eendenkroos op de afvalstroom. Daarnaast werd ook onderzocht of de bufferende werking van het medium van nut kan zijn voor het alkalisch maken van insectenvoeder.

## 2 SAMENSTELLING VAN DE SPUI

Verschillende media van verschillende oorsprong en op verschillende tijdstippen werden geanalyseerd op hun nutritionele samenstelling (Tabel 1). Anko Projects is producent van Spirulina en leverde medium van twee raceway ponds. Het water werd enkele cycli gerecirculeerd gedurende het groeiseizoen waardoor de nutritionele samenstelling lager is dan het restwater van PCG. Daarnaast leverde Anko Projects ook water dat gebruikt werd om de filters en leidingen van de reactor en de oogstinstallatie te reinigen. PCG leverde twee maal restwater van één van hun raceway ponds. Het medium wordt met grotere regelmaat ververst dan het restwater afkomstig van Anko Projects.

Tabel 1: Samenstelling van verschillende restwaters uit de spirulina-teelt.

| Oorsprong   |       | Anko Projects |            |            | PCG        |            |
|-------------|-------|---------------|------------|------------|------------|------------|
| Eenheid     |       | Medium (1)    | Medium (2) | Spoelwater | Medium (1) | Medium (2) |
| pH          |       | 9,6           | 9,8        | 8,8        | 9,5        | 9,9        |
| EC (T=25°C) | µS/cm | 11 200        | 12 500     | 6 200      | 19 800     | 27 800     |
| Nitraat     | mg/l  | 340           | 70         | 390        | 1 400      | 1 700      |
| Nitriet     | mg/l  | 74            | 50         | 2,6        |            | 110        |
| Ammonium    | mg/l  | 0,06          | 0,06       | 3,1        | 3,6        | 7,2        |
| Fosfor      | mg/l  | 46            | 59         | 14         | 86         | 100        |
| Chloriden   | mg/l  | 150           | 420        | 390        | 670        |            |
| Sulfaten    | mg/l  | 560           | 630        | 370        | 210        |            |
| Calcium     | mg/l  | 25            | 20         | 60         | 24         |            |
| Magnesium   | mg/l  | 18            | 20         | 20         | 15         |            |
| Natrium     | mg/l  | 2 500         | 2 800      | 1 200      | 7 500      |            |
| Kalium      | mg/l  | 400           | 790        | 210        | 500        |            |
| Boor        | mg/l  | 0,07          | 0,18       | 0,07       | 0,05       |            |
| Ijzer       | mg/l  | 1,4           | 1,1        | 0,20       | 1,1        |            |
| Mangaan     | mg/l  | 0,23          | 0,12       | 0,06       | 0,11       |            |
| Koper       | mg/l  | 0,03          | 0,03       | 0,04       | 0,05       |            |
| Zink        | mg/l  | 0,35          | 0,15       | 0,24       | 0,09       |            |

Het groeimedium van Spirulina bevat een hoge concentratie aan carbonaten wat resulteert in een hoge pH van het medium. Deze hoge pH vermindert het risico op contaminatie door andere micro-organismen waardoor Spirulina eenvoudig kan geproduceerd worden in lage-kost open raceway ponds (Craggs et al., 2013).

Het is ook door de hoge concentratie aan carbonaten en natrium dat de elektrische geleidbaarheid van het medium eveneens hoog ligt. Gezien de natuurlijke oorsprong van Spirulina zich in alkalische zoutmeren bevindt, is dit automatisch één van de behoeften voor de kweek van deze microalg. Het verbruik van de aanwezige nutriënten is echter beperkt waardoor uiteindelijk een relatief grote hoeveelheid van deze nutriënten nog in de spui achterblijft.

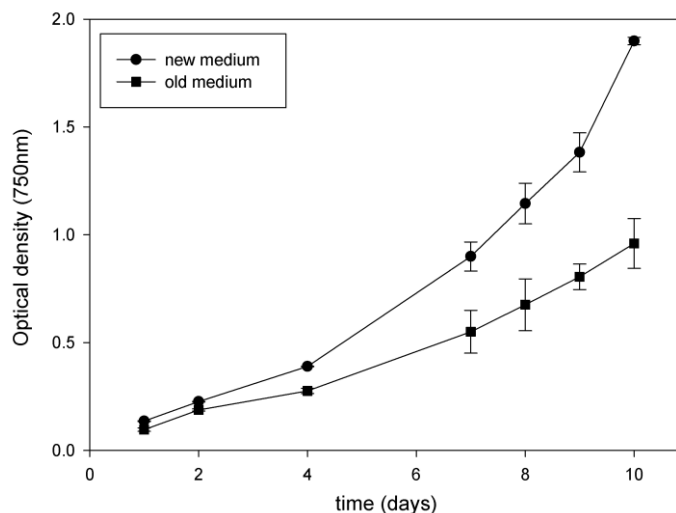
### 3 HERGEBRUIK VAN SPIRULINA-MEDIUM VOOR DE KWEEK VAN SPIRULINA

#### 3.1 GROEI VAN SPIRULINA IN VERS VERSUS OUD MEDIUM

Om de watervoetafdruk van de microalgen-productie te reduceren is het belangrijk om water te recyclen.

Om het effect van oud medium (medium dat een aantal keer gerecicleerd werd) op de groei van Spirulina na te gaan, werd in het labo van de KU Leuven Spirulina gekweekt in vers medium en in oud medium, dit telkens in 3 replica's. Zoals weergegeven in Figuur 1 is de groei van Spirulina na 10 dagen duidelijk lager in oud medium ten opzichte van vers medium.

Eerdere studies toonden aan dat herhaaldelijk hergebruik van het medium resulteert in een verminderde groei van Spirulina alsook in een toename van organisch materiaal in het medium. De hoge concentratie aan organisch materiaal bemoeilijkt ook het oogstproces van Spirulina via filtratie (Depraetere et al., 2015).



Figuur 1: Verloop van de groei van Spirulina (uitgedrukt in optical density zoals gemeten bij 750 nm) over de tijd heen waarbij een cultuur werd opgezet met vers medium (zwarte bollen) versus een cultuur met oud medium (zwarte vierkanten).

Herhaaldelijk hergebruik van het medium, zonder enige behandeling, kan resulteren in een verminderde groei van Spirulina maar ook in contaminatie met andere microalgen zoals *Chlorella*. Deze microalg is namelijk ongeveer 10 micrometer in diameter en ontsnapt aan het oogstproces van Spirulina via het filtratiesysteem. Hierdoor werd *Chlorella* met het gerecycleerde medium telkens teruggestuurd waardoor er na een aantal recyclagebeurten een dominantie optrad in de raceway ponds. Het is dus noodzakelijk om het medium te behandelen vooraleer te recyclen.

#### 3.2 BEHANDELEN VAN HET GERECYCLEERDE MEDIUM VOOR DE KWEEK VAN SPIRULINA

Om *Chlorella* af te doden werden op het PCG een aantal testen gedaan met waterstofperoxide. Er bleken echter naar tuinbouwnormen hoge concentraties aan waterstofperoxide nodig te zijn om *Chlorella* te vernietigen. Pas vanaf een minimum-concentratie van 200 ppm waterstofperoxide kon er een behoorlijke afdoding van *Chlorella* plaatsvinden. Het gebruik van waterstofperoxide vraagt echter enige voorzichtigheid wanneer het medium gerecicleerd wordt na behandeling want ook bij Spirulina kan hierdoor groeiremming of sterfte optreden.

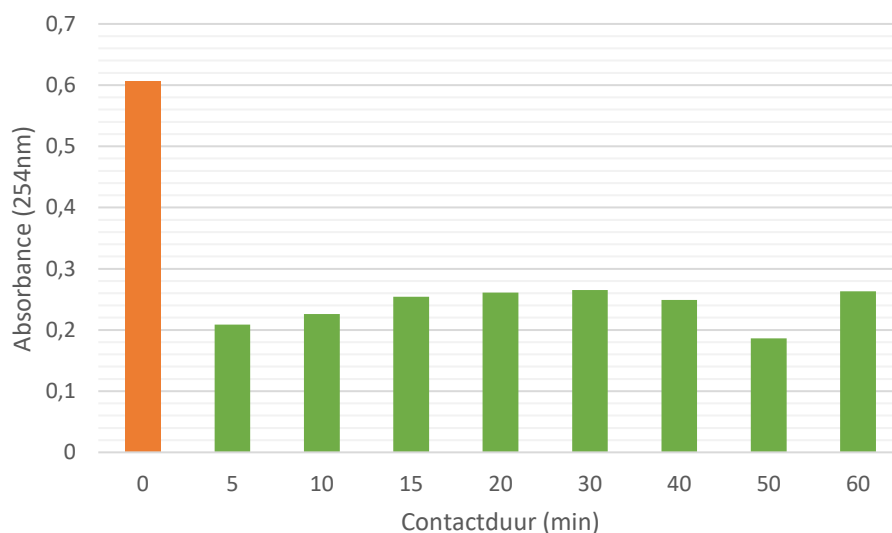
In het labo van de KUL werden ook verschillende behandelingen getest voor de verwijdering van organisch materiaal uit het 'oud' medium. PCG leverde daarvoor Zarrowk medium na meerdere maanden Spirulina-kweek. De volgende behandelingen werden getest:

- actieve kool (korrels),
- actieve kool (poeder),
- membraanfiltratie,
- Ozon,
- H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>,
- H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en UV.

De absorbantie bij 254 nm werd bepaald als maat voor de hoeveelheid organisch materiaal in 'oud' Spirulina-medium.

### 3.2.1 Actieve kool (korrels)

Er werd nagegaan wat het effect is van actieve kool op het verwijderen van organisch materiaal uit 'oud' Zarrowk medium in functie van contacttijd (Figuur 2). Korrels actieve kool werden toegevoegd aan het medium, de blootstellingsduur van de korrels aan het medium werd gevarieerd van 0 tot 60 minuten.

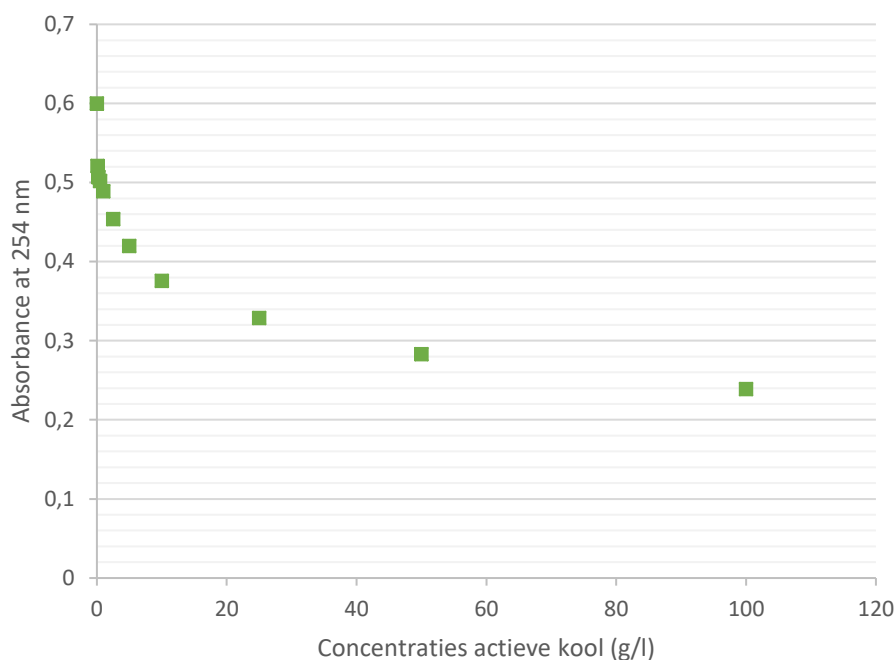


*Figuur 2: De absorbantie bij 254 nm werd bepaald als maat voor de hoeveelheid organisch materiaal in 'oud' Spirulina-medium na behandeling met actieve koolkorrels. De contactduur van de actieve kool en het medium werd gevarieerd.*

Conclusie, actieve kool is effectief in het verwijderen van organisch materiaal, zelfs al na 5 minuten.

### 3.2.2 Actieve kool (poeder)

Er werd nagegaan wat het effect is van actieve kool op het verwijderen van organisch materiaal uit 'oud' Zarrowk medium in functie van de concentratie actieve kool in poeder vorm (Figuur 3). De contacttijd bedroeg 10 minuten.



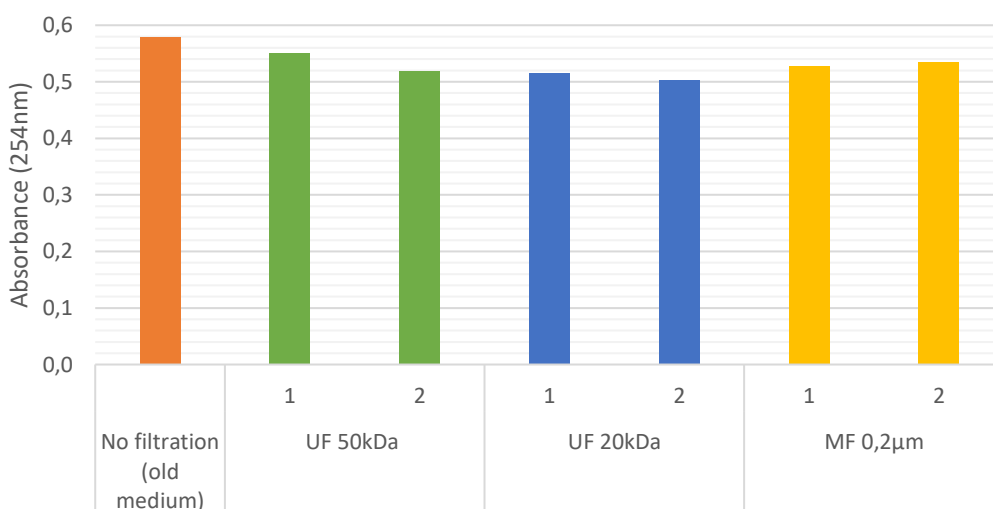
Figuur 3: De absorbantie bij 254 nm werd bepaald als maat voor de hoeveelheid organisch materiaal in 'oud' Spirulina-medium na behandeling met verschillende concentraties actieve koolpoeder. De contacttijd bedroeg 10 minuten.

Actieve kool is effectief in het verwijderen van organisch materiaal. Na een initiële sterke afname van organisch materiaal bij lage concentraties actieve kool, valt de verwijdering van organisch materiaal wat stil naarmate de concentratie verder toeneemt.

### 3.2.3 Membraanfiltratie

Het effect van membraanfiltratie werd nagegaan op het verwijderen van organisch materiaal uit 'oud' Zarrouk medium. Volgende membranen werden getest:

- Microfiltratie – Poriegrootte 0,2  $\mu\text{m}$
- Ultrafiltratie – Poriegrootte 20 kDa
- Ultrafiltratie – Poriegrootte 50 kDa

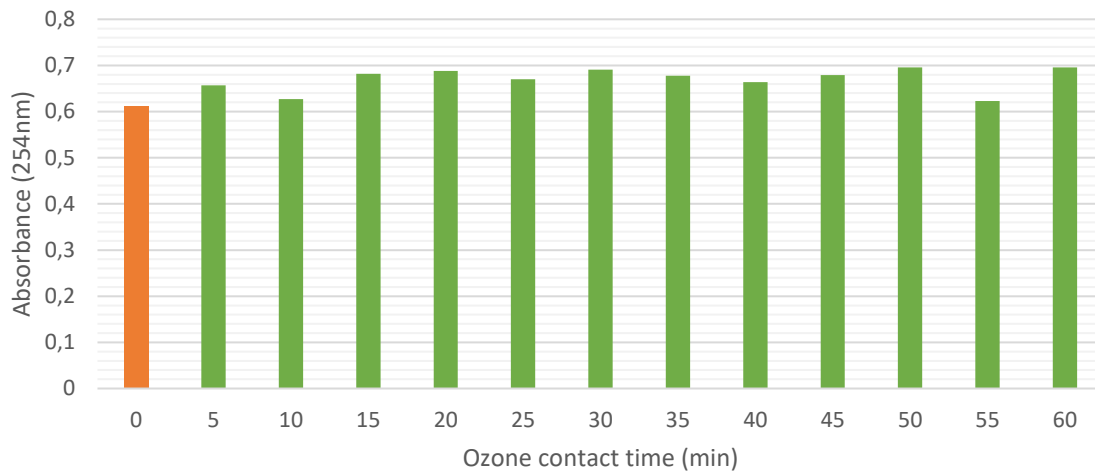


Figuur 4: De absorbantie bij 254 nm werd bepaald als maat voor de hoeveelheid organisch materiaal in 'oud' Spirulina-medium na membraanfiltratie. Ultrafiltratie (UF) en Microfiltratie (MF).

Membraanfiltratie heeft weinig effect op het verwijderen van organisch materiaal (Figuur 4).

### 3.2.4 Ozon

Het effect van ozon werd nagegaan op het verwijderen van organisch materiaal uit 'oud' Zarrouk medium in functie van contacttijd met ozon (Figuur 5). Lucht verrijkt met ozon werd door oud medium gestuurd via een bruissteen in een smal cilindrisch vat voor optimaal contact.

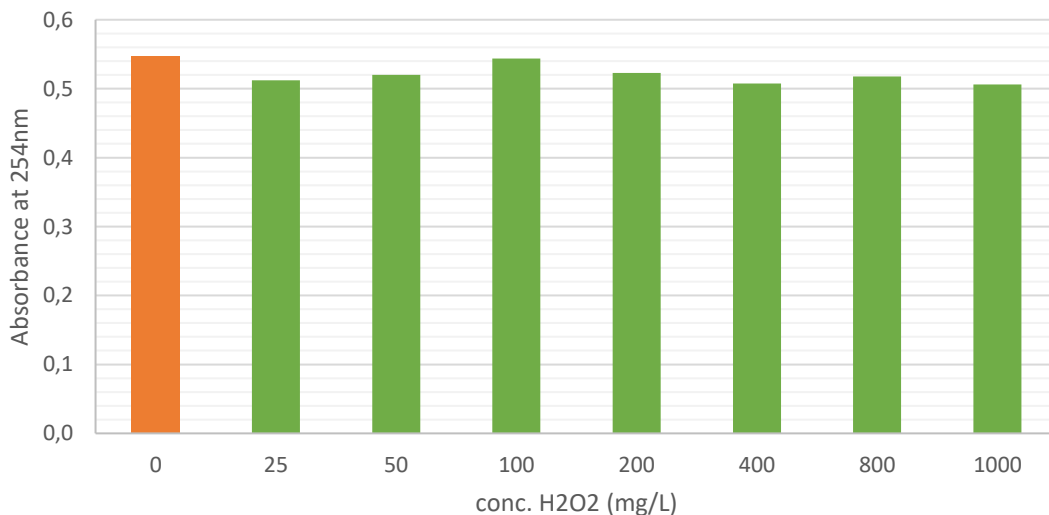


*Figuur 5: De absorbantie bij 254 nm werd bepaald als maat voor de hoeveelheid organisch materiaal in 'oud' Spirulina-medium na een ozonbehandeling waarbij de behandelingsduur werd gevarieerd.*

Oud medium voor minder dan een uur behandelen met ozon lijkt geen effect te hebben op het verwijderen van organisch materiaal.

### 3.2.5 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

Het effect van H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> werd nagaan op het verwijderen van organisch materiaal uit 'oud' Zarrouk medium waarbij de concentratie werd gevarieerd (Figuur 6).



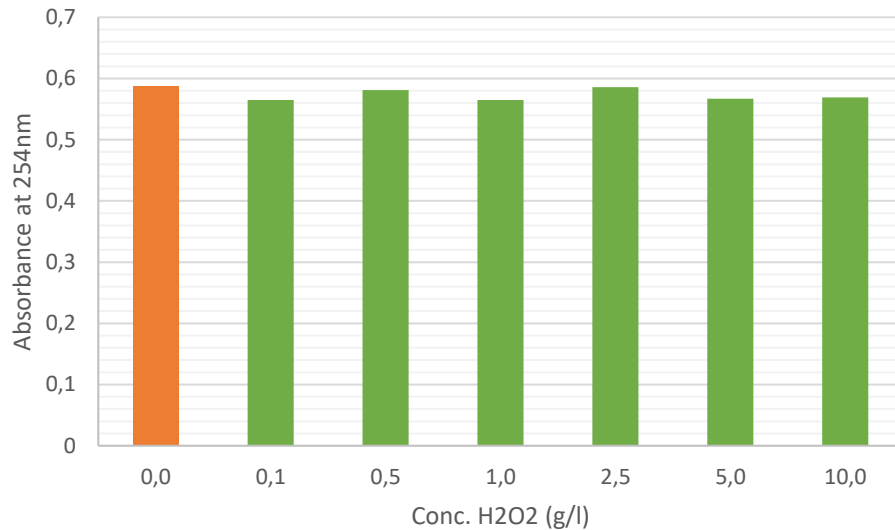
*Figuur 6: De absorbantie bij 254 nm werd bepaald als maat voor de hoeveelheid organisch materiaal in 'oud' Spirulina-medium na een behandeling met verschillende concentraties H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.*

Er werd geen effect waargenomen van ozon op het verwijderen van organisch materiaal.



### 3.2.6 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en UV

Als laatste behandeling werd de invloed nagegaan van waterstofperoxide na activatie met UV-licht op het verwijderen van organisch materiaal uit 'oud' Zarrouk medium waarbij de concentratie werd gevarieerd (Figuur 7). De contacttijd met UV bedroeg 4 uur.



Figuur 7: De absorbantie bij 254 nm werd bepaald als maat voor de hoeveelheid organisch materiaal in 'oud' Spirulina-medium na een behandeling met verschillende concentraties H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> met UV activatie.

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> activeren met UV heeft geen waarneembaar effect op het verwijderen van organisch materiaal.

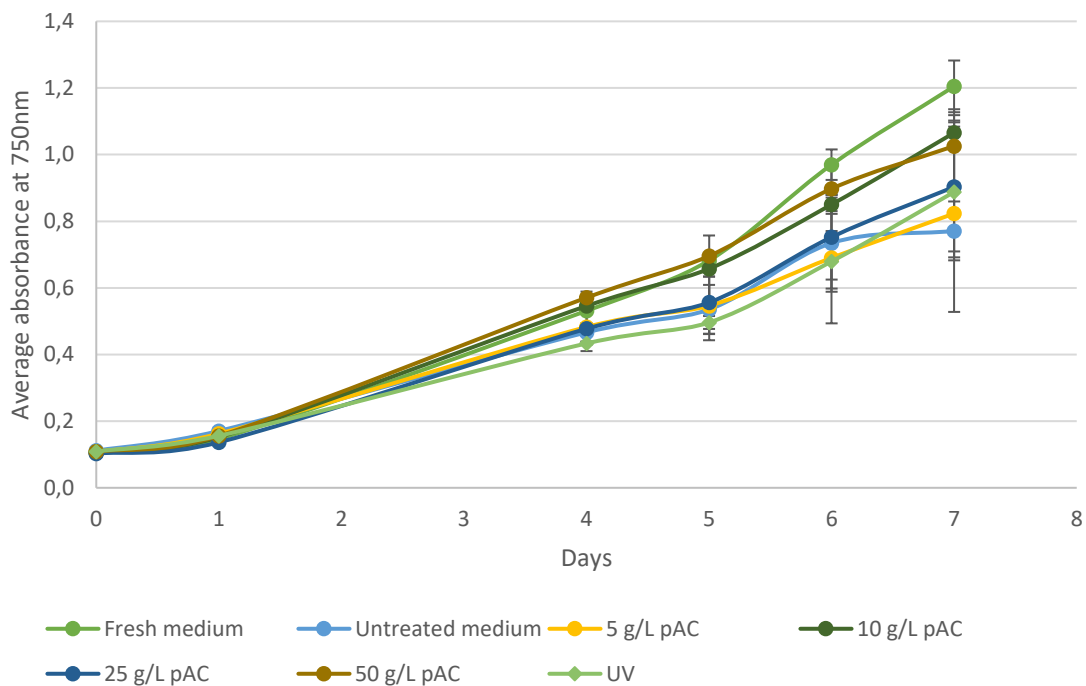
### 3.3 SPIRULINA-KWEEK OP BEHANDELD MEDIUM

Het effect van actieve kool was het grootst op het verwijderen van organisch materiaal uit 'oud' medium, vandaar werd gekozen om een groter volume 'oud' medium te behandelen met actieve kool (poeder) voor een groeiexperiment met Spirulina (*Arthrospira platensis* 21.99).

Het 'oud' medium werd behandeld met actieve kool (poeder) in concentraties van 5, 10, 25 en 50 g/L (contacttijd = 1u). Het onbehandelde 'oud' medium dient als negatieve controle. Een batch vers Zarrouk medium dient als positieve controle. Alle media werden in duplo voorbereid.

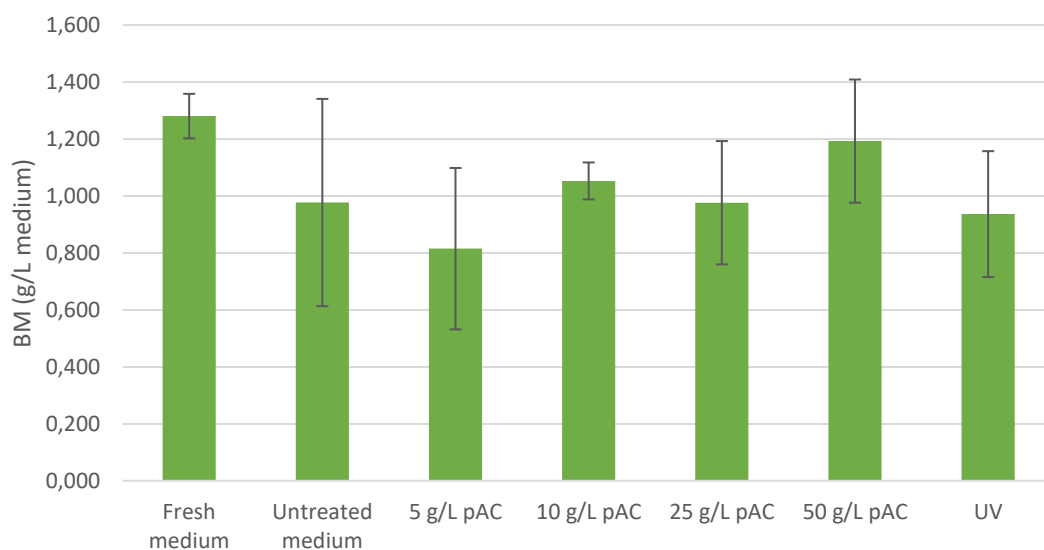
Om na te gaan of er geen tekorten aan nutriënten zijn werden het verse medium, het 'oude' medium en het behandelde medium eerst geanalyseerd op geleidbaarheid, stikstof-, fosfor- en carbonaatgehalte.

Vervolgens werden alle media geïnoculeerd met een gelijke hoeveelheid *Arthrospira platensis* (stam SAG 21.99) biomassa, zodat de optische densiteit van de culturen ± 0,100 bij 750nm bedraagt bij de start. De culturen werden dagelijks opgevolgd in functie van de optische densiteit (Figuur 8).



Figuur 8: Verloop van de absorptie bij 750 nm als maat voor de groei van *Spirulina* op verschillende media. Actieve kool in poedervorm (pAC).

Na 7 dagen werden de culturen geoogst en het drooggewicht berekend (Figuur 9).



Figuur 9: Geogste droge biomassa van *Spirulina* na 7 dagen groei op verschillende media. Actieve kool in poedervorm (pAC).

### 3.4 CONCLUSIE

Actieve kool heeft het beste effect op het verwijderen van organisch materiaal uit gebruikt Zarrouk medium. Dit wordt bevestigd door een verbeterde groei van *Spirulina* in behandeld medium vergeleken met 'oud' medium. Hoe hoger de concentratie actieve kool gebruikt bij de behandeling, hoe beter de groei.

## 4 EENDENKROOS VOOR DE VERWERKING VAN SPIRULINA-SPUI

### 4.1 MEERWAARDE VAN EENDENKROOS

De eendenkroosfamilie (*Lemnaceae*) komt van nature voor in kleine wateren, zoals poelen, vijvers, en grachten. De plantjes in deze familie behoren tot de snelst groeiende planten ter wereld en dat maakt hen uniek. In ideale omstandigheden werd vastgesteld dat het zich om de 2 dagen verdubbeld (Ziegler et al., 2015). Bovendien kan eendenkroos 30 tot 45 % eiwit bevatten (Landolt et al., 1987). Deze twee eigenschappen zorgen ervoor dat eendenkroos veel eiwit kan produceren op een kleine oppervlakte. In dit onderzoek werd waargenomen dat de eiwitproductiviteit onder buitenomstandigheden 3,3 tot 4,1 ton eiwit/ha/jaar bedraagt. Dit is 3 tot 4 keer hoger dan de eiwitproductiviteit van conventioneel geteelde soja uit Brazilië of de Verenigde Staten.

Naast een hoge eiwitproductie heeft eendenkroos ook potentieel in de waterzuivering. Eendenkroos neemt nutriënten op uit het water en zet ze om tot biomassa, de voornaamste nutriënten zijn nitraat, ammonium, fosfaat en kalium. Deze nutriënten kunnen als minerale meststoffen worden toegediend, maar zijn evengoed aanwezig in restwaters zoals Spirulina-spui. Restwaters omzetten naar loosbaar water vereist dat het nitraat, ammonium en fosfor verwijderd worden tot gehalten lager dan de lozingsnormen. Door eendenkroos te telen op het restwater kunnen de nutriënten worden benut en worden omgezet tot een hoogwaardig eiwit.

### 4.2 WATERKWALITEIT EN NUTRITIONELE BEHOEFTE VAN EENDENKROOS

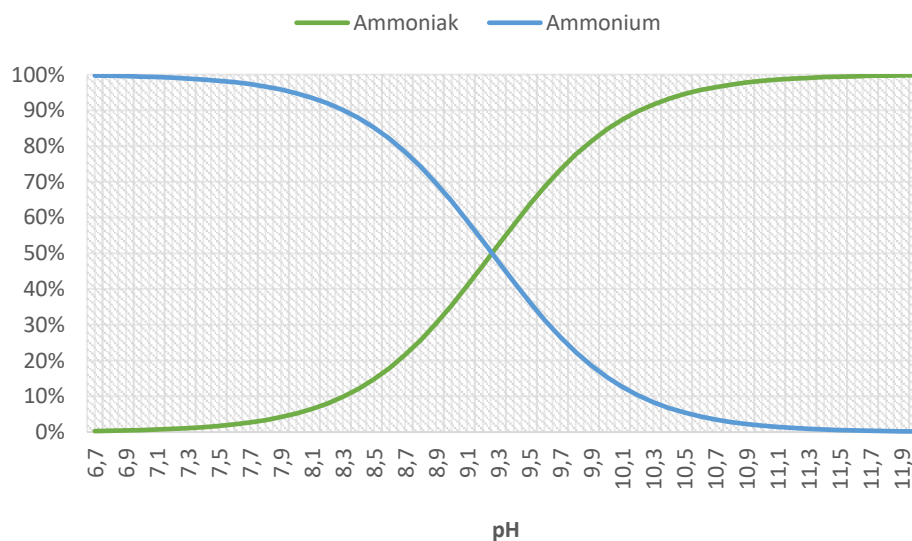
Het is vanzelfsprekend dat de watersamenstelling een impact heeft op de groei van het eendenkroos. Er zijn tal van waterparameters die de groei van eendenkroos kunnen beïnvloeden. De belangrijkste parameters zijn de zuurtegraad (pH), de geleidbaarheid van het water (EC) en het nutriëntengehalte (NH<sub>4</sub>, NO<sub>3</sub>, P, K, Na, Ca, Mg, Cl). Als één van de waardes van deze parameters onder een extreme ondergrens ligt of boven een extreme bovengrens, dan is de groei van eendenkroos niet mogelijk. Optimale groei wordt wel bereikt binnen een kleiner bereik van optimale grenzen. De optimale en extreme grenzen waarbinnen eendenkroos groeit zijn weergegeven in Tabel 2.

Tabel 2: Optimale en extreme onder- en bovengrenzen voor eendenkroosteelt. Als een parameter buiten de extreme grenzen ligt is groei onmogelijk, en als de parameter binnen de optimale grenzen ligt is de groei optimaal (Landolt et al., 1987)

|                     |       | Extreme ondergrens | Optimale ondergrens | Optimale bovengrens | Extreme bovengrens |
|---------------------|-------|--------------------|---------------------|---------------------|--------------------|
| pH                  |       | 5                  | 6,5                 | 7,5                 | 9                  |
| EC                  | μS/cm | 10                 | 600                 | 1400                | 10900              |
| NH <sub>4</sub> _N* | mg/l  | 9                  | 45                  | 90                  | 1350               |
| NO <sub>3</sub> _N* | mg/l  | 0                  | 70                  | 700                 | 1400               |
| P                   | mg/l  | 0                  | 0.4                 | 11                  | 55                 |
| K                   | mg/l  | 0.2                | 39                  | 780                 | 2000               |
| Na                  | mg/l  | 0.0                | 120                 | 230                 | 3400               |
| Ca                  | mg/l  | 0.1                | 20                  | 400                 | 2000               |
| Mg                  | mg/l  | 0.2                | 4.9                 | 97                  | 1200               |
| Cl                  | mg/l  | 0.0                | 0.4                 | 36                  | 3500               |
| S                   | mg/l  | 0.1                | 48                  | 1900                | 4800               |

\* De optimale range voor N afkomstig uit NH<sub>4</sub> of uit NO<sub>3</sub> is verschillend. De gegeven grenzen gelden enkel bij gebruik van ofwel een nitraatstikstofbron, ofwel een ammoniumstikstofbron en niet wanneer ze gecombineerd worden.

De parameters interageren echter ook sterk met elkaar. Een eerste belangrijke interactie is die tussen de pH en het **ammonium (NH<sub>4</sub><sup>+</sup>) /ammoniak (NH<sub>3</sub>) evenwicht**. Het (NH<sub>4</sub><sup>+</sup>/NH<sub>3</sub>)-evenwicht is namelijk pH-afhankelijk (zie Figuur 10). Ammoniakstikstof is zeer toxisch en verhindert de groei van eendenkroos bij concentraties vanaf 8,0 mg NH<sub>3</sub>\_N/l, terwijl ammonium dan weer de meest efficiënte stikstofbron voor eendenkroos is (Caicedo et al., 2000). Met als gevolg dat de extreme grenzen van eendenkroosgroei veel lager liggen bij een hoge pH. Bij een pH 7 is slechts 1 % van de totale hoeveelheid ammonium en ammoniak in ammoniak-vorm<sup>1</sup>. Dus kan er in het totaal 550 mg ammonium- en ammoniakstikstof aanwezig zijn zonder dat de hoeveelheid ammoniak de limiet van 8,0 mg NH<sub>4</sub><sup>+</sup>\_N/l overschrijdt. Bij een pH 9 bevindt zich reeds 35 % in ammoniak-vorm, waardoor de maximale hoeveelheid ammonium- en ammoniakstikstof slechts 23 mg/l meer bedraagt. Deze concentratie is zelf lager dan wat theoretisch een gewenste ondergrens is. Tot conclusie, de extreme bovengrenzen van eendenkroosgroei (Tabel 2) liggen lager bij een stijgende pH.



Figuur 10: Het ammoniak/ammonium-evenwicht ten opzichte van de pH. De gegevens werden berekend via het chemisch evenwicht tussen ammonium en ammoniak met een evenwichtswaarde van 9,26.

De pH heeft niet alleen een invloed op de vorm waarin stikstof in het medium zit, maar omgekeerd geldt ook dat de stikstof-vorm een invloed heeft op de pH. Het verschil tussen nitraat en ammonium is hier voornamelijk belangrijk. Eendenkroos neemt namelijk NO<sub>3</sub><sup>-</sup> ionen op door een nitraat/H<sup>+</sup> co-transportpomp, terwijl NH<sub>4</sub><sup>+</sup> voornamelijk door een proton-extrusiepomp werkt. Met andere woorden, de opname van nitraat doet de pH stijgen, terwijl bij opname van ammonium de pH daalt (Ulrich, 1987).

Daarnaast heeft de pH in combinatie met calcium ook een effect op de **fosforbeschikbaarheid**. Diaz et al. (1993) toonden aan dat de aanwezigheid van calcium bij een hoge pH het onoplosbare calciumfosfaat vormen. Voor een calciumconcentratie van 20 mg/l en een pH van 10 stelden ze vast dat 30 % van het fosfor onder onoplosbare vorm voorkomt.

Tot slot speelt ook de geleidbaarheid of elektrische conductiviteit (EC) een belangrijke rol. Dit is een maatstaf voor het aantal positieve en negatieve geladen deeltjes in het water. Als regel geldt, hoe meer geladen deeltjes of ionen, hoe hoger de elektrische geleiding en dus hoe hoger de EC. De

<sup>1</sup> De gegevens werden berekend via het chemisch evenwicht tussen ammonium en ammoniak met een evenwichtswaarde van 9,26 waarbij de volgende formule geldt:  $10^{-pKa} = \frac{[NH_3][H^+]}{[NH_4^+]}$

gemeten geleidbaarheid maakt echter geen volledig onderscheid tussen nuttige ionen zoals fosfaten en nitraten en minder gunstige zoals natriumionen, chlorides en carbonaten. Een hoge EC met veel gunstige ionen kan dus wel nog leefbaar zijn voor eendenkroos terwijl een lagere EC met overwegend minder gunstige ionen dit niet meer is. De geleidbaarheid blijft echter een gemakkelijk en snel te meten parameter die een indicatie geeft over het aantal geladen deeltjes en dus de kans aangeeft dat een bepaald deeltje een toxische grens overschrijdt. In de literatuur is een maximale geleidbaarheid waargenomen van 10,9 mS/cm, maar doorgaans ondervonden we in dit onderzoek schade bij lagere geleidbaarheden van 7,3 mS/cm.

## 4.3 BAKKENPROEVEN

### 4.3.1 Proefopzet

De haalbaarheid voor de kweek van eendenkroos op Spirulina-restwater werd nagegaan onder gecontroleerde omstandigheden tijdens een bakkenproef.

Er werden 2 groeimedia gemaakt op basis van 2 verdunningen van zuiver restwater (Tabel 1, PCG Medium 2). De voornaamste bedoeling van de verdunningen was de geleidbaarheid van het restwater verlagen tot maximaal 5000  $\mu\text{S}/\text{cm}$ . Daarvoor bleken verdunningen van 5 en 10 % restwater te volstaan. Daarnaast werden voor beide verdunningen twee nieuwe objecten gecreëerd door een deel van de replica's aan te zuren tot een neutrale pH met een 5 M zoutzuuroplossing. De vier objecten werden in triplo opgezet in Euronorm bakken (300x200x120 mm). Elke bak bevatte 3,5 liter groeimedium. Vervolgens werd per replica 20 gram vers eendenkroos geïnoculeerd. Het eendenkroos was afkomstig van een kloon die bij Inagro onder buitenomstandigheden op restwater van snoekbaarskweek groeit.

Tabel 3: Samenstelling van de groeimedia en de zuivere bestanddelen van de groeimedia. De referentie van 0% is regenwater en 100% is zuiver Spirulina restwater.

| Fractie restwater <i>Spirulina</i> |                              | Referenties |        | Groeimedia |       |       |       |
|------------------------------------|------------------------------|-------------|--------|------------|-------|-------|-------|
|                                    |                              | 0 %         | 100 %  | 10 %       | 5 %   | 10 %  | 5 %   |
| pH correctie                       |                              | Nee         | Nee    | Nee        | Nee   | Ja    | Ja    |
| pH                                 |                              | 7,3         | 9,9    | 10,2       | 10,2  | 7,5   | 7,4   |
| Geleidbaarheid                     | $\mu\text{S}/\text{cm}$ 25°C | 85          | 27 800 | 3 600      | 2 000 | 3 900 | 2 100 |
| Nitraat                            | mg/l                         | 3,4         | 1 700  | 190        | 105   | 190   | 105   |
| Ammonium                           | mg/l                         | 1,3         | 7,2    | 1,8        | 1,5   | 1,9   | 1,6   |
| Fosfaat                            | mg P/l                       | 0,01        | 100    | 10         | 5,0   | 10    | 5,0   |

De proef werd uitgevoerd onder artificiële belichting ( $120 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , 16 uur licht, 8 uur donker) in een klimaatkamer bij een temperatuur van 26 °C en een relatieve vochtigheid van 60 %.

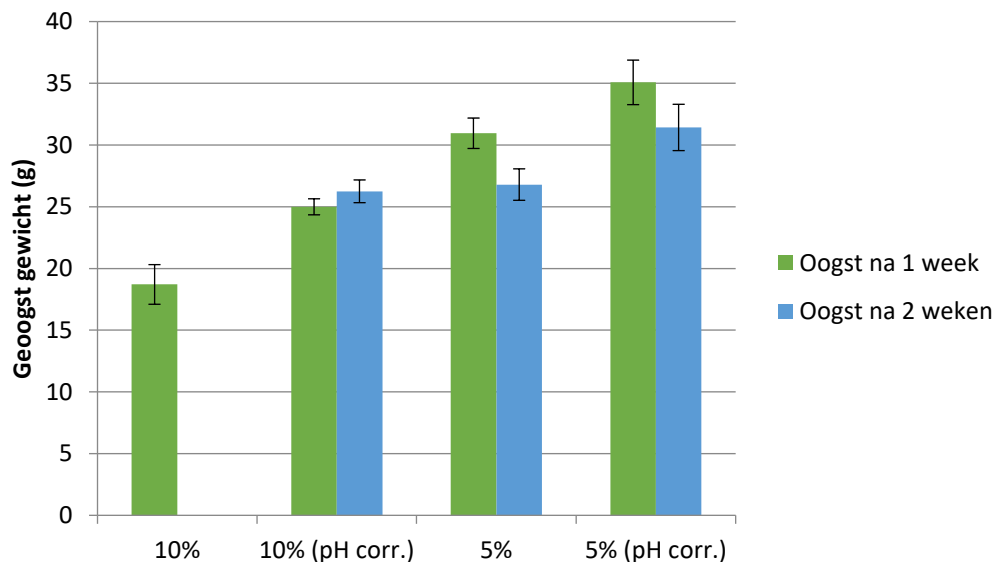
Na 1 week werd het eendenkroos geoogst waarbij het vers gewicht werd bepaald. Er werd een waterstaal genomen van het medium voor verdere analyses. Van de oogst werd 20 gram opnieuw geïnoculeerd op hetzelfde medium. Na een nieuwe week werd het kroos opnieuw geoogst, het vers gewicht werd bepaald, net als de nutritionele samenstelling van het medium.

### 4.3.2 Resultaten en discussie

Figuur 11 illustreert de groei die werd waargenomen op de 4 verschillende media. Daaruit blijkt dat er significante verschillen bestaan tussen de verschillende behandelingen.

De groei tijdens de eerste week geeft het belang weer van verdunnen en pH-correctie. Hoe hoger de verdunning, hoe beter de groei. Een pH-correctie bovenop de verdunning heeft een synergetisch effect op de groei. Maximaal werd er een 75 % biomassa aangroei waargenomen (5 % verdunning met pH-correctie)

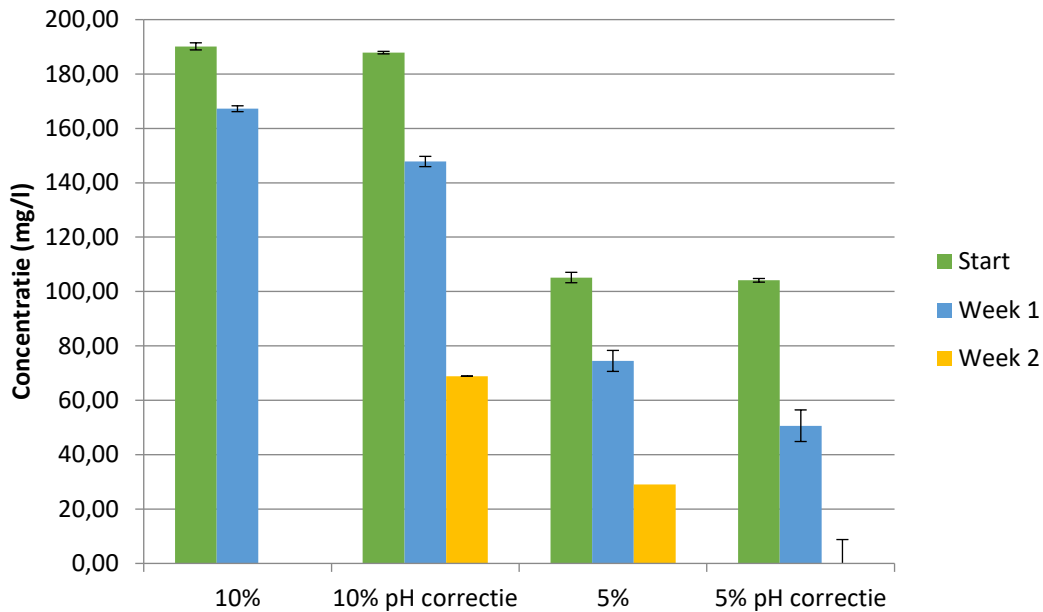
De groei tijdens de tweede week was door depletie van nutriënten trager dan tijdens de eerste week, maar was nog goed voor een aangroei van maximaal 60 % (5 % verdunning met pH-correctie). Een verdunning van 10 % zonder pH-correctie leidde niet tot aangroei van biomassa en werd daarom niet verder meegenomen.



*Figuur 11: De gemiddelde verse gewichten ( $\pm$  standaarddeviatie) van eendenkroos staan weergegeven voor 4 verschillende behandelingen ( $n=3$ ). Bij de start werd 20 g vers kroos geïnoculeerd op media bestaande uit 5% en 10% Spirulina restwater. Voor elke verdunning werd de pH van een deel van de replica's gecorrigeerd naar 7. Na 1 week werd het kroos geoogst, gewogen en op hetzelfde medium opnieuw geïnoculeerd met 20 g van de oogst. Het object met een fractie van 10% Spirulina restwater zonder pH-correctie, vertoonde geen netto aangroei na 1 week waardoor het object niet werd meegenomen tijdens de 2<sup>e</sup> week.*

Figuur 12 geeft de evolutie van de nitraatconcentratie voor de verschillende groeimedia weer. Ondanks het feit dat eendenkroos afstierf op 10 % spui zonder pH-correctie, neemt het nitraat in het medium ook af. Andere processen zoals opname door algen die zich ontwikkelen bij gebrek aan vitaal eendenkroos en nitrificatie/denitrificatie door bacteriën kunnen aan de oorzaak liggen voor dit verschijnsel.

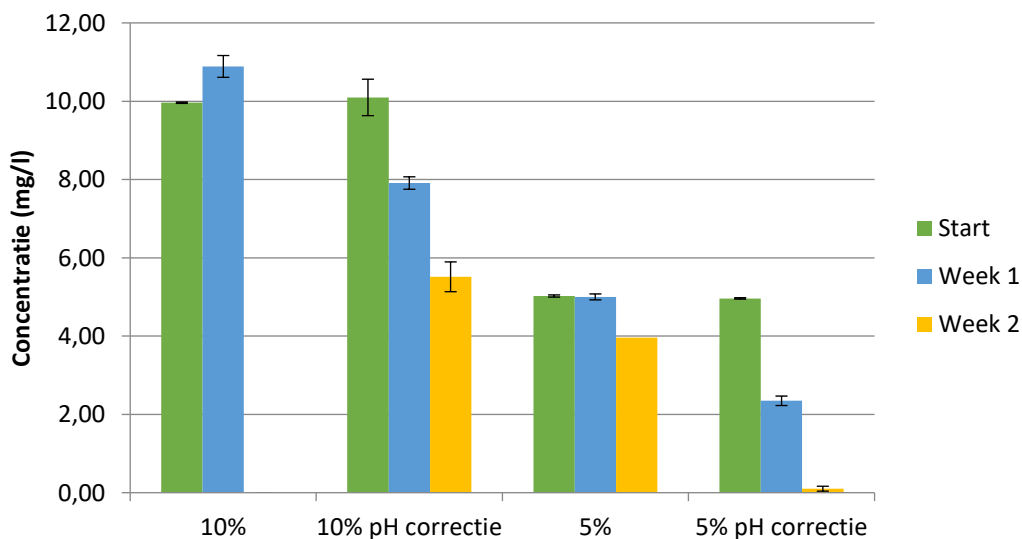
De nitraatverwijdering bij objecten die wel groei vertoonden is proportioneel groter waardoor kan worden besloten dat eendenkroos een additioneel effect heeft op de nitraatverwijdering. Bij het object dat de beste groei vertoonde (5 % spui met pH-correctie), is de nitraatverwijdering na twee weken zelfs 100 %. Dit verklaard mede de verminderde groei tijdens de tweede groeiweek van het experiment.



*Figuur 12: De gemiddelde nitraatconcentratie ( $\pm$  standaarddeviatie) van groeimedium staan weergegeven voor 4 verschillende behandelingen ( $n=3$ ). Het object met een fractie van 10% Spirulina-restwater zonder pH-correctie, vertoonde geen netto aangroei na 1 week waardoor het object niet werd meegenomen tijdens de 2<sup>e</sup> week.*

Tot slot is ook de evolutie van het fosfaatgehalte weergegeven (Figuur 13). Voor 10 % zonder pH-correctie lijkt de fosfaatconcentratie te stijgen, dit kan echter eenvoudig worden verklaard aangezien er niet werd gecorrigeerd voor verdamping. De totale hoeveelheid fosfor bleef ongewijzigd.

Een pH-correctie van het medium resulteert in een opvallende daling van fosfaat. Wanneer de pH niet wordt gecorrigeerd is er ondanks het feit dat eendenkroos wel aangroeit, veel minder afname van het fosfaat. Dit toont aan dat de fosforbeschikbaarheid wordt verhoogd door het Spirulina-medium te verzuren tot een pH van 7. Wanneer het fosfaat vrij beschikbaar is en de pH binnen de optimale grenzen valt, kan eendenkroos het fosfaat optimaal benutten. Fosfaat wordt opgenomen uit het medium en kan worden ingebouwd in het eendenkroos.



*Figuur 13: De gemiddelde fosfaatconcentratie ( $\pm$  standaarddeviatie) van groeimedium staan weergegeven voor 4 verschillende behandelingen ( $n=3$ ). Het object met een fractie van 10% Spirulina restwater zonder pH-correctie, vertoonde geen netto aangroei na 1 week waardoor het object niet werd meegenomen tijdens de 2<sup>e</sup> week.*

### 4.3.3 Conclusie

Eendenkroos kan worden gebruikt om nutriënten uit Spirulina-spui te verwijderen. Er moeten echter een aantal obstakels overwonnen worden vooraleer de spui geschikt is voor een succesvolle eendenkrooskweek.

In de eerste plaats is een verdunning noodzakelijk. Van de verschillende spuiwaters uit Tabel 1 heeft het water van Anko Projects de laagste verdunning nodig, daar kan een verdunning van 30 tot 40 % spui volstaan om de geleidbaarheid tot onder 5000  $\mu\text{S}/\text{cm}$  te verlagen. Voor het zoutere water van PCG is een verdunning nodig van minimaal 25 %. Om echter binnen het optimale interval voor eendenkrooskweek uit te komen (600-1400  $\mu\text{S}/\text{cm}$ ), zijn verdunningen nodig van 5 tot 10 %. Dit betekent dat het volume van de spui minimaal vertienvoudigd wanneer het voor de kweek van eendenkroos wordt aangewend. De milieu impact van de Spirulina-kweek verkleinen door de spui te verdunnen met loosbaar water om het geschikt te maken voor eendenkroos, is tegenstrijdig met een duurzame teelt als voornaamste doel.

In tweede instantie moet de pH worden gecorrigeerd om het medium geschikt te maken voor eendenkroos. Aangezien de spui sterk gebufferd is door de carbonaten in oplossing, heeft verdunning nauwelijks invloed op de pH van het medium. Om dit te omzeilen zijn er twee opties. Er kan ervoor worden gekozen om het medium aan te zuren, maar eenmalig aanzuren volstaat daarbij niet. Omwille van de sterke bufferwerking zal de pH na verloop van tijd opnieuw beginnen stijgen. De pH wordt in het beste geval continu gemonitord en gecorrigeerd. Er kan ook worden getracht om de buffer te doorbreken. Carbonaat ligt aan de oorzaak van de buffercapaciteit van het medium. Door de carbonaten uit oplossing te halen en neer te slaan, kan de pH stabiel geneutraliseerd worden. Dit kan door middel van calciumhydroxide. Zoals echter reeds werd aangehaald, impliceert dit dat ook fosfaat zal neerslaan (Diaz et al., 1993) waardoor een belangrijk nutriënt voor eendenkroos uit het medium verdwijnt.

Al deze factoren, maar voornamelijk de enorme volumetoename van het restwater die noodzakelijk is om de kweek van eendenkroos haalbaar te maken, hebben er toe geleid dat een grootschalige kweek van eendenkroos op Spirulina-spui niet in de praktijk is gebracht.



## 5 SPIRULINA-SPUI VERWERKEN MET ZWARTE SOLDATENVLIEG (*HERMETIA ILLUCENS*)

De zwarte soldatenvlieg vormt een veelbelovende bron van proteïnen voor diervoeders. Er is echter nood aan bijkomende kennis over de efficiëntie, de opschaling en de automatisatie van de kweek van deze insecten. De optie werd bekeken om zwarte soldatenvliegen aan te wenden om de spui van de spirulinateelt weg te werken.

### 5.1 VERVANGING VAN REGENWATER DOOR SPIRULINA-SPUI

Voor de opkweek van zwarte soldatenvlieglarven met een standaard kippenvoer wordt droog kippenvoer gemengd met water (70 % water en 30 % voer). Per kilogram geoogste larven is er 8 kg nat voer nodig, wat neerkomt op 5,6 liter water voor een kilogram larven. Voor een batch larven werd het water vervangen door Spirulina-spui. De larven ondervonden geen problemen van het zoutere substraat en groeiden even goed als de larven op het standaard mengsel van kippenvoer en regenwater.

Op het einde van de kweek restte enkel een droog substraat waaruit het merendeel van het water verdampt was. De samenstelling van het resterende substraat staat weergegeven in Tabel 4. Voor de meeste geanalyseerde parameters zijn de verschillen minimaal. Het voornaamste verschil is het natrium gehalte dat beduidend hoger ligt. Er kan geen uitsluitel worden gegeven of nitraat opgenomen is aangezien de laboanalyses die werden uitgevoerd geen nitraat detecteren. Hoe dan ook is er geen positief effect op de groei van de larven, er is met andere woorden geen toegevoegde waarde van de extra nutriënten in de Spirulina-spui. De methode is wel een energie-efficiënte manier om de spui om te zetten naar een droog substraat.

*Tabel 4: Samenstelling van de mest van zwarte soldatenvlieglarven opgekweekt op een mengsel van 70:30 kippenmeel en water (spirulina spui of regenwater).*

|                     | <b>Eenheid</b>  | <b>KM : spirulina</b> | <b>KM : regenwater</b> |
|---------------------|-----------------|-----------------------|------------------------|
| Organische koolstof | kg / 1000 kg VS | 310                   | 320                    |
| Ammonium stikstof   | kg / 1000 kg VS | 1,5                   | 2,5                    |
| Kjeldahl stikstof   | kg / 1000 kg VS | 22                    | 29                     |
| Calcium             | kg / 1000 kg VS | 14                    | 13                     |
| Magnesium           | kg / 1000 kg VS | 7,5                   | 7,7                    |
| Natrium             | kg / 1000 kg VS | 25                    | 4,5                    |
| Kalium              | kg / 1000 kg VS | 24                    | 21                     |
| Fosfor              | kg / 1000 kg VS | 24                    | 25                     |
| Droge stof          | kg / 1000 kg VS | 690                   | 670                    |
| Organische stof     | kg / 1000 kg VS | 560                   | 570                    |
| C/N                 |                 | 14                    | 11                     |

### 5.2 ALKALISEREN VAN GEFERMENTEERD SUBSTRAAT MET SPUI

Spirulina-spui werd ook op een pragmatische manier getest als middel om de pH van gefermenteerd brijvoer te verhogen. Fermenteren is een veelgebruikte methode om natte diervoeders te stabiliseren en te bewaren. Gefermenteerd brijvoer kan ook worden gebruikt voor de kweek van larven. Het enige nadeel daaraan is dat larven de voorkeur geven aan een substraat met een pH rond de 9, terwijl het gefermenteerd substraat een pH heeft rond 4. Larven kunnen zelf de pH van het substraat corrigeren tot het gewenste niveau, maar dit vergt energie en resulteert in een tragere groei.

De hoge pH van spui werd daarom getest als mogelijke oplossing. Spui en gefermenteerd brijvoer werden gemengd en de pH werd opgevolgd met een sensor. De pH kon door middel van de spui worden verhoogd. Daarvoor was echter te veel spui nodig waardoor het vochtgehalte van het mengsel hoger werd dan 75 %, in een dergelijk vochtig medium verdrinken de larven. Gefermenteerd voer alkaliseren met spui werd daarom niet verder getest.

## 6 CONCLUSIE

---

Onbehandeld restwater van de Spirulina-teelt hergebruiken voor een nieuwe teeltronde is in principe mogelijk, echter zullen de groeiprestaties van Spirulina er sterk op achteruit gaan en is er daarnaast een vergrote kans op contaminatie door *Chlorella*. Het water behandelen voor hergebruik is daarom aangewezen. Van de verschillende behandelingsmethodes die werden bekeken, leek het toevoegen van actieve kool de beste optie. Hoe hoger de concentratie, hoe beter de groeiprestatie van Spirulina.

Eendenkroos kweken op zuiver Spirulina-restwater is niet mogelijk. Groei kan wel worden bekomen door het water te verdunnen en aan te zuren. Dit betekent echter een sterke volumetoename van het restwater en de nood aan grote volumes regenwater. Eendenkroos is dus niet de meest efficiënte methode om het restwater te behandelen.

Tot slot werd gekeken of het restwater kan worden aangewend als vervanging van regenwater voor de kweek van zwarte soldatenvlieglarven. De opkweek van de larven houdt in dat het water wordt verdampt waardoor enkel een droge fractie rest. Deze methode werkt goed om de volumes restwater weg te werken. Echter wordt er geen extra toegevoegde waarde gecreëerd uit alle nutriënten die nog aanwezig zijn in het restwater.

Uit de drie onderzochte mogelijkheden voor het restwater, lijkt het behandelen met actieve kool om het te gaan hergebruiken voor de teelt van Spirulina het meeste potentieel te hebben.

## 7 REFERENTIES

---

- Craggs, R. J., Benemann, J. R. (2013). Wastewater treatment and algal biofuel production. In M. A. Borowitzka and N. R. Moheimani, editors, *Algae for biofuels and energy*, chapter Wastewater, pp. 153–163. Springer, New York
- Depraetere O., Pierre G., Noppe W., Vandamme D., Foubert I., Michaud P., Muylaert K. (2015). Influence of culture medium recycling on the performance of *Arthrospira platensis* cultures. *Algal Research*, 10, pp. 48–54.
- Diaz, O. A., Reddy, K. R., Moore Jr, P. A. (1993). Solubility of inorganic phosphorus in stream water as influenced by pH and calcium concentration. *Wat. Res.* Vol. 28, No. 8, pp. 1755-1763, 1994. Elsevier Science Ltd. Printed in Great Britain.
- González-López, C. V., Cerón-García, M. C., Fernández-Sevilla, J. M., González-Céspedes, A. M., Camacho-Rodríguez, J., & Molina-Grima, E. (2013). Medium recycling for *Nannochloropsis gaditana* cultures for aquaculture. *Bioresource technology*, 129, 430-438.
- Hasan, M. R., Chakrabart, R. (2009). Use of algae and aquatic macrophytes as feed in small-scale aquaculture: a review. *FAO Fisheries and Aquaculture Technical Paper*. No. 531. Rome, FAO. 2009. 123p.
- Iqbal, S., (1999). Duckweed aquaculture: Potentials, possibilities and limitations for combined wastewater treatment and animal feed production in developing countries. *SAn-DEC Report*, pp. 6-99.
- Landolt, E. (1996). Duckweeds (Lemnaceae): Morphological and ecological characteristics and their potential for recycling nutrients. In *Environmental Research Forum Vols. 5-6: Recycling the Resource, Ecological Engineering for Wastewater Treatment*, Transtec Publications, Switzerland. pp. 289-296.
- Ulrich, W. (1987). Nitrate and ammonium uptake in green algae and higher plants: mechanism and relationship with nitrate metabolism. *Inorganic Nitrogen Metabolism*/edited by WR Ulrich. Retrieved from <http://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=US201302063452>
- Wendeou, S. P. H., et al. (2013). Influence of salinity on duckweed growth and duckweed based wastewater treatment system. *Journal of Water Resource and Protection*, 2013, 5, 993-999.
- Ziegler, P., Adelman, K., Zimmer, S., Schmidt, C., & Appenroth, K.-J. (2015). Relative in vitro growth rates of duckweeds (Lemnaceae) - the most rapidly growing higher plants. *Plant Biology*, 17, 33–41. <https://doi.org/10.1111/plb.12184>

## COLOFON

---

Dit rapport kwam tot stand in het project “De Blauwe Keten” in het Interreg V-programma Vlaanderen-Nederland, het grensoverschrijdend samenwerkingsprogramma met financiële steun van het Europese Fonds voor Regionale Ontwikkeling.

Meer info: <http://www.grensregio.eu/projecten/de-blauwe-keten>

