



Zuivering brouwerijprocesafvalwater met behulp van microalgen

Resultaten onderzoek 2012

Wim van Dijk, Roelof Schipperus, Saskia Grobben & Rommie van der Weide





© 2012 Wageningen, ACRRES – Wageningen UR

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 enige andere manier zonder voorafgaande schriftelijke toestemming van ACRRES-Wageningen UR.

ACRRES – Wageningen UR is niet aansprakelijk voor eventuele schadelijke gevolgen die kunnen ontstaan bij gebruik van gegevens uit deze uitgave.

Dit project is tot stand gekomen dankzij:



ACRRES – Wageningen UR

Adres : Edelhertweg 1, Lelystad
: Postbus 430, 8200 AK Lelystad
Tel. : 0320 - 29 11 11
Fax : 0320 - 23 04 79
E-mail : info@acres.nl
Internet : www.acres.nl



INHOUDSOPGAVE

SAMENVATTING.....	3
1 INLEIDING.....	7
1.1 Aanleiding	7
1.2 Doelstelling	7
1.3 Globale aanpak.....	8
2 LITERATUUR WATERZUIVERING MET ALGEN	9
2.1 Normen voor stikstof- en fosfaatverwijdering.....	9
2.2 Stikstof- en fosforopname door algen.....	9
2.3 Ervaringen afvalwaterzuivering met algen in Nederland	10
2.4 Buitenlandse ervaringen	11
2.5 Conclusie.....	12
3 NUTRIËNTENSAMENSTELLING PROCESAFVALWATER	13
3.1 Onderzochte procesafvalwaters.....	13
3.2 Resultaten analyses	13
3.3 Conclusie.....	15
4 WELLPLATENPROEVEN.....	17
4.1 Vergelijking procesafvalwaters (proef 1)	17
4.1.1 Opzet.....	17
4.1.2 Resultaten.....	18
4.2 Effect toevoeging sporelementen en gist (proef 2).....	22
4.2.1 Opzet.....	22
4.2.2 Resultaten.....	22
4.3 Conclusie.....	23
5 CHEMOSTAATPROEVEN	25
5.1 Proefopzet en –uitvoering.....	25
5.2 Resultaten.....	27
5.3 Conclusie.....	36
6 CRYOGEEN OPSLAAN ALGEN	37
6.1 Materiaal en Methode.....	37
6.2 Resultaten.....	37
6.3 Conclusie.....	39
7 REFERENTIES.....	41



Samenvatting

In het bierbrouwproces ontstaat procesafvalwater, dat moet worden gezuiverd om het te kunnen lozen op het oppervlaktewater. De huidige wijze van afvalwater zuiveren (anaerobe UASB gevolgd door aerobe nazuivering) is kostbaar, energie-intensief en functioneel te beperkt (onvoldoende fosforverwijdering) om aan de toekomstige lozingseisen te voldoen. Een interessante optie is om na te gaan of de laatste stap van de zuivering (aerobe nazuivering) kan worden uitgevoerd door in het effluent van de UASB reactor algen te laten groeien die stikstof en fosfor opnemen. Hierbij kunnen tevens restwarmte en CO₂ die ontstaan in het brouwerijproces, worden benut. Daarnaast kan door vermarkting van de gevormde algenbiomassa extra toegevoegde waarde worden gecreëerd.

In een samenwerkingsverband van Heineken Nederland BV, Algae Food & Fuel en WUR (Acres) is in 2012 een onderzoeksproject gestart om de mogelijkheden van zuivering van procesafvalwater van de brouwerijen met behulp van algen te onderzoeken. In het kader van dit project is in 2012 een literatuurstudie gedaan naar ervaringen met afvalwaterzuivering door algen en zijn een aantal laboratoriumproeven uitgevoerd naar de stikstof en fosforverwijdering door algen uit procesafvalwater uit de brouwerij. Dit rapport beschrijft de resultaten van de genoemde activiteiten.

Literatuurstudie zuivering afvalwater met algen

Bij de zuivering van afvalwater door algen is het van belang dat de stikstof- en fosforgehalten zodanig dalen dat het geloosde effluent zo weinig mogelijk schade toebrengt aan de ecologische kwaliteit van het oppervlaktewater. Normen hiervoor zijn opgenomen in de Europese KaderRichtlijn Water (KRW). Hierin zijn o.a. normen voor de chemische waterkwaliteit (o.a. stikstof- en fosfor) voor het oppervlaktewater opgenomen. Deze hangen af van het watertype. Het meest kwetsbaar zijn de eutrofiëringsgevoelige stagnante zoete oppervlaktewateren. Hiervoor gelden grenswaarden van 2,2 mg totaal N per liter en 0,15 mg totaal P per liter.

In Nederland zijn of worden een aantal pilots uitgevoerd naar zuivering van afvalwater door algen. De geteste systemen betreffen zowel open algenvijvers als gesloten algenreactoren. Open algenvijvers zijn goedkoper qua uitvoering dan gesloten reactoren, maar de effectiviteit van de eerste hangt af van het seizoensafhankelijke temperatuurs- en stralingsverloop (weinig algengroei in de winter). Met de tussenvorm, open bassins met LED-verlichting, die wel 's winters kunnen doordraaien, werd nog geen ervaring opgedaan.

De resultaten geven aan dat er goede potentie is om stikstof en fosfor te verwijderen met algen. In een praktijkpilot bij RWZI in Alkmaar met een open algenvijver bleek dat het in de zomerperiode mogelijk was het stikstof- en fosforgehalte in het RWZI-effluent tot onder de grenswaarden voor eutrofiëringsgevoelig water te laten dalen. Ook in een proef met gesloten biofilmreactoren kon worden geconcludeerd dat het systeem in staat was om stikstof- en fosforgehalten, zoals die gemiddeld worden gemeten in effluenten van RWZI's (10 mg N per liter en 1 mg P per liter), terug te brengen tot de hierboven genoemde grenswaarden voor eutrofiëringsgevoelige wateren.

Zowel uit binnen- als buitenlands onderzoek blijkt dat algen in staat waren bij uiteenlopende stikstof/fosfor-verhouding in het afvalwater, deze voldoende te zuiveren.



Waarschijnlijk is dit een gevolg van luxe-consumptie waarbij overmaat aan stikstof of fosfor toch wordt opgenomen zonder dat de productie daardoor evenredig toeneemt. Verder is gebleken dat de fosforverwijdering kan worden verhoogd via de pH. Bij een hogere pH zal meer fosfor neerslaan in calcium- en magnesiumfosfaten. Deze neerslagen worden dan bij de oogst van de algen mee verwijderd.

Samenstelling procesafvalwater brouwerijen

Bij aanvang van het onderzoek is van een aantal procesafvalwatermonsters van twee commerciële brouwerijen (hierna aangeduid als brouwerij A en B) het nutriëntengehalte bepaald (stikstof, fosfor, kalium, zwavel, magnesium, calcium en spoorelementen). Het betrof met name influent en effluent-monsters van de UASB-reactor van de beide brouwerijen. Daarbij is in eerste instantie gekeken naar opgeloste anorganische elementen (an- en kationen).

Het beeld dat naar voren kwam is dat er in het UASB-influent weinig tot geen minerale stikstof (ammonium en nitraat) aanwezig was terwijl dat bij het UASB-effluent wel het geval was (circa 10 mg N per liter). Latere analyses (Brouwerij A) waarin ook het stikstof totaalgehalte is gemeten, laten zien dat deze in zowel het UASB-influent als -effluent 30-40 mg N per liter bedroeg. Dit geeft aan dat de stikstof in het UASB-influent vrijwel volledig in organische vorm aanwezig was en in het UASB-effluent voor circa 10-25% in minerale vorm aanwezig was. Aangezien algen alleen minerale stikstof kunnen opnemen moet de organische stikstof eerst worden afgebroken door micro-organismen (o.a. bacteriën).

Het anorganische fosforgehalte (ortho-fosfaat) in het UASB-influent en -effluent bedroeg in de onderzochte monsters respectievelijk circa 3 en 4-7 mg per liter. Latere analyses (Brouwerij A) waarin ook totaal fosfor is bepaald lieten zien dat circa 50-80% van de fosfor in minerale vorm aanwezig was (ortho-P).

Geconcludeerd kan worden dat de stikstof- en fosforgehalten van de verschillende procesafvalwaters voldoende hoog zijn voor algengroei.

Bij de andere nutriënten zijn geen aanwijzingen gevonden dat de gehalten te hoog of te laag zijn voor een mogelijk remmend effect op de algengroei. Opvallend was wel het hoge bicarbonaatgehalte van het procesafvalwater. Dit is gunstig voor de algengroei, omdat het bicarbonaat naast CO₂ kan dienen als koolstofbron.

Laboratoriumproeven

Met behulp van laboratoriumproeven is onderzocht of de verschillende procesafvalwaters geschikt zijn om algencultures erin te kunnen laten groeien en in welke mate stikstof en fosfor kunnen worden verwijderd. Dit is gedaan met wellplatenproeven en chemostaatproeven.

Wellplatenproeven

Met behulp van een wellplatenproef is onderzocht of de verschillende procesafvalwaters van brouwerij A en B (influent en effluent UASB) geschikt zijn voor algengroei. Een wellplaat bestaat uit kleine cups (2 ml) waarin procesafvalwater en algencultuur worden samengebracht. Met behulp van celtellingen en meting van de lichtabsorptie kan de groei van de algen worden gevolgd.

Omdat de geschiktheid voor algengroei niet alleen van de watersamenstelling afhangt, maar ook van de algensoort, is elk watermonster met een aantal verschillende algensoorten geënt. Er is gekozen voor 2 mixcultures (Mix Acrres en Mix Hallum) en een monocultuur van *Chlorella protothecoides* en *Spirulina platensis*. De Acrres-mix bestond uit *Chlorella protothecoides*, *Scenedesmus spp.* en *Pheadactylum tricornutum*, de Hallum-mix uit *Pediastrum spp.*, *Scenedesmus spp.*, *Pheadactylum spp.* en *Chlorella spp.*



Naast de verschillende combinaties van afvalwater en algensoort is er ook een controle meegenomen waarin de algencultures zijn aangebracht op een standaard, synthetisch groeimedium voor algenkweek.

Alle geteste procesafvalwaters bleken geschikt voor algengroei; in alle geteste combinaties van algencultuur en procesafvalwater is een duidelijke groei te zien, zowel wat betreft de cellellingen als de lichtabsorptiemetingen. De verschillen in groei tussen de verschillende procesafvalwaters waren relatief gering. In vergelijking met het standaard groeimedium is de groei op de procesafvalwaters wel geringer. Gemiddeld over de UASB-influenten en effluenten bedroeg de lichtabsorptie 85, 80, 75 en 70% van de waarde bij het standaard groeimedium voor respectievelijk de Hallum-mix, Acrres-mix, *Chlorella protothecoides* en *Spirulina Platensis*.

In een extra proef die later is uitgevoerd, bleek dat het toevoegen van sporenelementen (ijzer, mangaan, zink, molybdeen, kobalt) en gist aan het procesafvalwater een positief effect had op de groei van de algen. Dit biedt dus nog mogelijkheden om de productie van de algenbiomassa te verhogen en daarmee tevens de waterzuivering te verbeteren.

Chemostaatproeven

Na de wellplatenproeven waarin is nagegaan of de algen willen groeien op de procesafvalwaters, is in het laboratorium middels een chemostaatopstelling de stikstof- en fosforverwijdering onderzocht.

Een chemostaat is een bioreactor waarin influent (procesafvalwater) continu wordt toegevoegd, terwijl effluent (algenmengsel) continu met dezelfde hoeveelheid wordt afgevoerd, zodat het volume in de reactor constant blijft. Afhankelijk van de groeisnelheid van de algen en de verblijftijd zal na enige tijd een stabiele situatie ontstaan waarbij de groei van de algen gelijk is aan de hoeveelheid algen die de reactor via de overloop verlaat. Ook de concentraties aan stikstof en fosfor zullen dan niet meer variëren.

Als bioreactor is gekozen voor een glazen vat met een inhoud van 2 liter. De reactor is in een stoof geplaatst waarin de temperatuur op circa 30 °C is gehouden. In de stoof wordt continu belicht met een LED-lamp. Er wordt CO₂ toegevoegd.

Er zijn drie proeven uitgevoerd met verschillende verblijftijden (respectievelijk circa 6, 2 en 1 dag(en)).

De eerste proef is gedaan met de Acrres-algenmix (voor samenstelling zie hierboven) en een cultuur met *Spirulina platensis*. De tweede proef betrof een duplo-uitvoering met de Acrres-mix. In de derde proef is eveneens de Acrres-mix gebruikt en is onderscheid gemaakt tussen het wel en niet toevoegen van sporenelementen.

Bij de proeven was het de bedoeling om UASB-effluent van Brouwerij A te gebruiken (zoals eerder aangegeven vervangt de algenuivering de aerobe nazuiveringsstap in de afvalwaterbehandeling). Per vergissing is in het eerste deel van proef 1 echter UASB-influent gebruikt. Halverwege is overgestapt op UASB-effluent.

Bij een verblijftijd van circa 6 dagen bleek het met behulp van de Acrres-mix mogelijk om circa 80-90% van de stikstof en 85-90% van de fosfor te verwijderen. Bij de Spirulina-mix bedroeg bij dezelfde verblijftijd de stikstof- en fosforverwijdering respectievelijk 50-90 en 70-80%.

Bij beide algencultures was het stikstof- en fosforgehalte van het chemostaateffluent (respectievelijk 3-5 mg N per liter en 1-2 mg P per liter) lager dan het gemiddelde gehalte van AWZI-effluent van Brouwerij A (respectievelijk 9 mg N per liter en 2.7 mg P per liter, periode juni 2012 – juni 2012; dit betreft het effluent van de aerobe nazuivering, dat wordt geloosd op het oppervlaktewater). De algenuivering was hiermee effectiever dan de aerobe nazuivering. De normen voor eutrofiëringsgevoelig



oppervlaktewater (2.2 mg N per liter en 0,15 mg P per liter) werden onder deze omstandigheden voor fosfor niet gehaald.

Bij een verblijftijd van 1 dag werd bij gebruik van de Acrres-mix een verwijderingsrendement gerealiseerd van circa 50% voor stikstof en 50-55% voor fosfor. Voor zowel fosfor als stikstof was het gehalte in het chemostaateffluent (respectievelijk 15-20 mg N per liter en 2.5-3.5 mg P per liter) hoger dan dat van het AWZI-effluent van Brouwerij A en ruim hoger dan de normen voor eutrofiëringsgevoelig oppervlaktewater. Een verblijftijd van 1 dag is mogelijk wel bruikbaar, indien de techniek in serie geschakeld wordt.

Bij een verblijftijd van ruim 2 dagen bedroeg het verwijderingsrendement circa 80% voor stikstof en circa 75% voor fosfor. Het stikstof- en fosforgehalte in het effluent was lager dan dat van AWZI-effluent van Brouwerij A. De normen voor eutrofiëringsgevoelig oppervlaktewater werden onder deze omstandigheden eveneens niet gehaald.

Bij de interpretatie van de zuiveringsrendementen dient men te realiseren dat het voor de laboratoriumomstandigheden niet bekend is welke factor de metabole activiteit van de algen heeft beperkt. Met name voor energie (licht) en C-bron is niet vastgesteld of deze beide in overmaat aanwezig zijn geweest.

Celtellingen bij de eerste proef gaven aan dat de *Spirulina* zich niet heeft weten te handhaven en is verdrongen door *Chlorella*-soorten en de goudalg *Ochromonas*. Bij de Acrres-mix werden aanvankelijk geen duidelijke populatieverschuivingen waargenomen. Aan het eind nam het aandeel *Scenedesmus*-soorten sterk toe.

Cryogeen opslaan

Cryogene opslag van algen is een methode om deze langdurig te kunnen bewaren. Dit houdt in dat algen worden bewaard bij zeer lage temperaturen met behulp van vloeibare stikstof. Nagegaan is in hoeverre de vitaliteit van de algencultures hierdoor wordt beïnvloed.

De proef is uitgevoerd met twee algencultures, de Acrres Mix en de Hallum Mix (voor samenstelling zie hierboven). Voorafgaand aan het invriezen is aan het algenmengsel een bewaarvloeistof toegevoegd. In de proef is zowel 20% Na(MeOH) als 60% Na(Me₂SO₄) getest. Na 4 dagen zijn de monsters weer ontdooid en zijn de algen vervolgens opgekweekt onder normale omstandigheden met licht en bij kamertemperatuur.

De resultaten van het cryogeen bewaren van de algencultures Acrres Mix en Hallum mix waren wisselend. De celdichtheid na ontdooien was bij de Acrres Mix hoger dan bij de Hallum mix (maximaal 70 versus 30 % van de dichtheid voor het invriezen). Er zijn geen duidelijke verschillen waargenomen tussen de bewaarvloeistoffen MeOH en Me₂SO₄.



1 Inleiding

1.1 Aanleiding

In het bierbrouwproces ontstaat procesafvalwater, dat moet worden gezuiverd om het uiteindelijk te mogen lozen op het oppervlaktewater. Het procesafvalwater bevat nutriënten (COD, stikstof, fosfor, spoorelementen) en warmte (ca. 30°C). De huidige wijze van afvalwater zuiveren (anaerobe UASB gevolgd door aerobe actieve slibzuivering) is kostbaar, energie-intensief en functioneel te beperkt (onvoldoende fosforverwijdering) om aan de toekomstige lozingseisen te voldoen. Deze wijze van zuiveren produceert slib als biomassa, hetgeen een negatieve waarde in het handelsverkeer heeft. Daarnaast gaat fosfor voor de voedingsketens verloren, omdat dit ofwel via de slibverwerking wordt vernietigd, ofwel op het oppervlaktewater wordt geloosd. Fosfor, in de vorm van fosfaat, is een essentieel voedingselement voor voedselproductie en de huidige bron, fosfaaterts, is eindig (Udo De Haes et al., 2009). Recycling is vanuit dat oogpunt van groot belang.

Een interessante optie is om na te gaan of het laatste deel van de afvalwaterzuivering kan worden uitgevoerd door in het effluent van de UASB reactor algen te laten groeien (m.b.v. een geschikte licht- en CO₂-bron). De algenzuivering vervangt hiermee de aerobe nazuivering.

De gevormde algenbiomassa heeft voedings- c.q. voederwaarde (eiwit, mineralen en onverzadigde vetzuren). Bovendien nemen de algen fosfor op, zodat deze met de algenbiomassa naar de voedingsketen wordt gerecycled. Met de restwarmte die al in het afvalwater aanwezig is kunnen zonder extra inspanning optimale groeitemperaturen voor algen worden gecreëerd. Door te streven naar een gebalanceerde opname van nutriënten is het wellicht mogelijk om schoon water te produceren. Bovendien komt er bij het brouwen naast rookgas met CO₂ ook nog schone CO₂ vrij die als koolstofbron voor de algen ook een nuttige bestemming gegeven kan worden.

In samenwerkingsverband van Heineken Nederland BV, Algae Food & Fuel en WUR (Acres) is daarom in 2012 een onderzoeksproject gestart om de mogelijkheden van zuivering van procesafvalwater van de brouwerijen met behulp van algen te onderzoeken.

1.2 Doelstelling

Doel van het project is te onderzoeken in welke mate het procesafvalwater kan worden gezuiverd door algen, door vast te stellen welke algensoorten in staat zijn in dit water te groeien, welke algenproductie hierbij mogelijk is en wat dan de hierbij behorende effluentsamenstelling van de algenreactor is en hoe de geproduceerde algenbiomassa optimaal tot waarde kan worden gemaakt.



1.3 Globale aanpak

In de eerste fase is op laboratoriumschaal nagegaan in welke mate verschillende algensoorten willen groeien op het procesafvalwater en in welke mate stikstof en fosfor kunnen worden verwijderd. Tevens is een literatuurstudie uitgevoerd naar de mogelijkheden van zuivering van afvalwater door algen.

In een volgende fase zal een foto-bioreactor worden ontworpen en getest voor toepassing op praktijkschaal. Daarnaast wordt nagegaan wat het marktpotentieel is voor de geproduceerde algenbiomassa.

Dit rapport beschrijft de resultaten van de genoemde literatuurstudie en het laboratoriumonderzoek dat in 2012 heeft plaatsgevonden.



2 Literatuur waterzuivering met algen

Er is een korte literatuurstudie uitgevoerd waarin is gekeken naar de stikstof- en fosforverwijdering uit afvalwater. Achtereenvolgens wordt ingegaan op de normen voor stikstof- en fosforverwijdering met betrekking tot oppervlaktewater, de stikstof- en fosforopname door algen en ervaringen met afvalwaterzuivering in binnen- en buitenland.

2.1 Normen voor stikstof- en fosfaatverwijdering

Bij de zuivering van afvalwater door algen is het van belang dat de stikstof- en fosforgehalten zodanig dalen dat het effluent kan worden geloosd op het oppervlaktewater. Welke gehalten nog acceptabel zijn hangt af van het type water. Binnen de stroomgebiedsbeheersplannen die door de waterschappen in het kader van de KRW (KaderRichtlijn Water) moeten worden opgesteld, wordt aangegeven welke normen gelden voor de chemische waterkwaliteit voor de verschillende watertypen. Het meest kwetsbaar zijn de stagnante zoete oppervlaktewateren. In de Vierde Nota Waterhuishouding (Ministerie Infrastructuur & Milieu) worden voor stagnant zoet oppervlaktewater grenswaarden genoemd van 2,2 mg totaal N per liter en 0,15 mg totaal P per liter. Deze waarden gelden voor het zomerhalfjaar. Voor de langere termijn worden streefwaarden genoemd van 1.0 mg totaal N per liter en 0,05 mg totaal P per liter.

2.2 Stikstof- en fosforopname door algen

Bij optimale groeicondities bedraagt het N- en P-gehalte in de drogestof van algen globaal respectievelijk 7-8,5% N en 1-1,2% P (Reynolds, 2006). Hieruit kan een optimale N/P-verhouding worden afgeleid van 7. Deze verhouding wordt ook wel de Redfield-ratio genoemd. Is de ratio lager dan 7 dan zal stikstof het eerst beperkend worden, is deze hoger dan 7 dan wordt fosfor het eerst beperkend. Indien een nutriënt in overmaat aanwezig is betekent dit niet dat in dat geval de verwijdering minder goed hoeft te zijn. Algen vertonen namelijk, evenals planten, luxe consumptie waardoor het gehalte van het nutriënt stijgt en er, bij een gelijkblijvende productie, toch meer wordt opgenomen (zie ook verderop in dit hoofdstuk). Pas bij lage concentraties treden duidelijke groeilimitaties op. In de literatuur worden half-verzadigingsconstanten genoemd voor stikstof en fosfor van 10-650 μg N per liter en 0,03-19 μg P per liter (Genkai-Kato, 2004; Klausmeier et al., 2004; Hein et al., 1995; Rhee, 1974). Dit is aanzienlijk lager dan de hierboven genoemde grenswaarden van 2200 μg N en 150 μg P per liter. Verwacht mag worden dat stikstof- en fosforlimitatie bij algenzuivering van afvalwater niet een belangrijke rol zal spelen.



2.3 Ervaringen afvalwaterzuivering met algen in Nederland

Project "Effluentpolishing met algentechnologie"

In 2009-2010 is in opdracht van STOWA in een praktijkpilot bij RWZI in Alkmaar nagegaan in hoeverre met algen stikstof- en fosfor kosteneffectief kan worden verwijderd uit effluënten van de rioolwaterzuiveringsinstallaties (STOWA, 2011). De effluënten bevatten doorgaans circa 10 mg N per liter en 1 mg P per liter. Er zijn o.a. praktijkexperimenten uitgevoerd met open algenvijvers volgens het raceway pond systeem. De algen werden verwijderd met een trommelfilter.

De groei van de algen bleek vooral te worden bepaald door de hoeveelheid licht. Laboratoriumproeven gaven aan dat stikstof en fosfor in het effluent niet groei limiterend waren. Ook waren er geen aanwijzingen voor aanwezigheid van groeiremmende stoffen in het RWZI-effluent waarmee de algenvijver werd gevoed. Uit de metingen van het nitraat-, ammonium- en ortho-fosfaatgehalte in het uitgaande effluent van de algenvijver bleek dat de gehalten tot onder de grenswaarden voor eutrofiëringsoepervlaktewater bleken te dalen. Voor fosfor bleek de verwijdering mede af te hangen van de pH. Hoe hoger de pH des te hoger de fosforverwijdering. Dit hangt waarschijnlijk samen met neerslaan van calciumfosfaten bij hoge pH's. Dit wordt bevestigd door buitenlands onderzoek. Zo vonden Nurdogan & Oswald (1995) dat de fosfaatverwijdering kon worden verhoogd door het toevoegen van calcium en magnesium aan de algenvijvers. Hierdoor slaat een deel van de fosfor neer in de vorm van magnesium- en calciumfosfaten.

Proefonderzoek Algenfarming

Door Waterstromen, Ingrepo Renewables en ingenieursbureau Witteveen en Bos is een onderzoek uitgevoerd naar algenproductie op afvalwater van aardappelverwerker Aviko. Onlangs is een rapport met de eerste resultaten verschenen (Verberkt, 2012).

De algenkweek vond plaats in drie open vijvers (raceway pond systeem). De vijvers werden gevoed met effluent met een totaal N-, NH₄-N- en totaal P-gehalte van respectievelijk 210, 180 en 55 mg per liter. De drie vijvers zijn gebruikt om verschillende varianten van systeeminstellingen met elkaar te vergelijken.

Extra toevoer van CO₂ gaf wisselende effecten op de algengroei. Dit komt mogelijk doordat het aardappelafvalwater veel bicarbonaat bevat dat algen naast CO₂ mede als koolstofbron kunnen gebruiken. Een tijdelijke overkapping van de algenvijver in de winter gaf een hogere productie, de kosten hiervan wogen echter niet op tegen de extra productie.

In het project is niet direct gestuurd op verwijdering van stikstof en fosfor. Er is gestuurd op een stikstofgehalte van 20 mg NO₃+NH₄-N per liter en ortho-fosforgehalte van 3 mg per liter in de vijver te handhaven. Uit de resultaten kunnen daarom geen aanwijzingen verkregen worden over zuiveringsrendementen voor stikstof en fosfor.

Pilot Waterschap Aa en Maas RWZI Den Bosch

Dit project wordt uitgevoerd door het waterschap Aa en Maas en Maris Projects. Er wordt geëxperimenteerd met open algenvijvers (raceway ponds). Er zijn nog geen resultaten beschikbaar.

Project "Duurzame nazuivering van rwzi-effluent met behulp van algen (Wetsus)"

In dit project wordt gewerkt aan de ontwikkeling van gesloten biofilm-algenreactoren voor de zuivering van effluënten van RWZI's. Dit betreft een systeem waarbij de algen vastzitten op pvc-plaatjes. De reactoren werden continu belicht. Door gebruik te maken



van kunstmatige effluënten werd voor een 16-tal verschillende combinaties van stikstof- en fosforbelastingen van het systeem de verwijderingscapaciteit onderzocht. Naast de kunstmatige effluënten werd ook een echt effluent van RWZI Leeuwarden meegenomen. Dit effluent bevatte 5.6 mg N per liter en 0.97 mg P per liter. Het onderzoek betreft een samenwerking tussen Wetsus en Wageningen-Universiteit. Eerste resultaten staan beschreven in Boelee et al. (2011).

Tot aan een belasting van 1 g N/m²/dag en 0.13 g P/m²/dag werd in het uitgaande effluent van de algenzuivering voldaan aan de grenswaarden voor eutrofiëringsevoelige wateren van maximaal 2,2 mg N per liter en 0,15 mg P per liter. Geconcludeerd werd dat het beproefde systeem in staat was om N- en P-gehalten, zoals die gemiddeld worden gemeten in effluënten van RWZI's (10 mg N per liter en 1 mg P per liter), terug te brengen tot de zojuist genoemde grenswaarden.

Verder bleek dat ondanks dat de N/P-verhouding in het ingaande effluent lager was dan die gemiddeld in algenbiomassa (zoals het geval was bij het RWZI-effluent van Leeuwarden), de fosfor toch voldoende werd verwijderd. Waarschijnlijk is dit een gevolg van luxe consumptie van fosfor. De N/P-verhouding van de algenbiomassa bleek in dit onderzoek af te hangen van de hoogte van de stikstof- en fosforbelasting. Vergelijkbare effecten werden gevonden door Fulton (2009). De auteur onderzocht de stikstof- en fosforverwijdering bij een range aan N/P-verhoudingen (2.5 – 100) in effluënten van rioolwaterzuiveringsinstallaties. De N/P-verhoudingen werden kunstmatig gecreëerd door stikstof of fosfor toe te voegen aan een bestaand effluent. Het stikstof- en fosforgehalte liep hierbij uiteen van 7-70 mg N per liter en 0.7-5.6 mg P per liter. Het onderzoek betrof laboratoriumproeven waarbij gebruik is gemaakt van een mix van algensoorten (*Chlorella spp.*, *Scenedesmus spp.*, *Chlorococcum spp.* en *Ankistrodesmus spp.*). Bij alle N/P-verhouding in het effluent bleek het mogelijk het stikstof- en fosforgehalte in het uitgaande effluent te verlagen tot onder de 0.5 mg N per liter en 0.03 mg P per liter. Bij toenemende stikstof- en fosforgehalten in het effluent steeg het stikstof- en fosforgehalte van de algenbiomassa. Ook Park et al. (2011) gaven aan dat de N/P-verhouding in algenbiomassa, afhankelijk van algensoort en NP-beschikbaarheid in groeimedium, sterk kan variëren (4-40).

Ecoferm

Dit project heeft als doel de varkenshouderij duurzamer te maken en kringlopen te sluiten. Het concept omvat o.a. mestvergisting, mestraffinage en algenkweek. De bedoeling is dat de algen worden gevoed met nutriënten uit de mest. Op dit moment wordt voor algenkweek echter nog kunstmest gebruikt. Het project geeft niet direct informatie over zuivering van afvalwater. Wel is er gekeken naar de waarde van de algen voor veevoer (zie hoofdstuk 7).

2.4 Buitenlandse ervaringen

Het stikstof- en fosforgehalte van effluënten van bierbrouwerijen hangt af van het productieproces (Driessen en Vereijken, 2003). De genoemde auteurs noemen ranges van 25-80 mg N per liter en 10-50 mg P per liter. In verhouding tot stikstof bevat het effluent relatief veel fosfor.

Filomena de J. Raposo et al. (2010) onderzochten de stikstof- en fosforverwijdering in brouwerijeffluent door algen via laboratoriumproeven. Er is gebruik gemaakt van *Chlorella vulgaris* en een autochtone flora geïsoleerd uit het effluent. Laatstgenoemde bestond uit microalgen (o.a. *Scenedesmus spp.*, *Chlorella spp.*) en bacteriën. De soort *Spirulina platensis* bleek niet te willen groeien.



Er is gebruik gemaakt van zuiver effluent en verdunningen ervan met gedemineraliseerd water (1:1 en 1:2). Als controle is een standaard groeimedium meegenomen. Voor beide algensoorten werd de hoogste productie behaald bij een 1:1 verdunning. Deze was bijna twee keer zo hoog als de controle en het pure effluent.

Het fosforverwijderingsrendement bedroeg 54-66%, voor stikstof was deze 85-90%. Aangegeven werd dat het hogere verwijderingsrendement voor stikstof deels kan samenhangen met ammoniakemissie naar de lucht als gevolg van de hoge pH. Daarnaast moet worden benadrukt dat het fosforgehalte van het gebruikte effluent hoog was (> 50 mg/l) hetgeen nadelig is voor een hoog fosforverwijderingsrendement.

Mata et al. (2012) onderzochten de groei van *Scenedesmus obliquus* op brouwerijafvalwater in laboratoriumproeven. De behandelingsfactoren waren lichtsterkte (4500 versus 12000 lux), belichtingsduur (12 en 24 uur per dag) en wel en niet beluchten. De proeven werden uitgevoerd in 250 ml erlenmeyers bij een temp van 30 °C. De beste combinatie bleek wel beluchten met 12 uur veel licht. Dit leidde tot een algenproductie van 0.9 g droge stof per liter na 9 dagen. Het N-totaal en C-totaalgehalte namen na 13 dagen af met respectievelijk 21% en 57%.

Een positief effect van afwisseling licht/donkerperiodes werd ook gevonden door Grobbelaar et al. (1996). De auteurs deden onderzoek naar de licht/donker-afwisseling op de fotosynthetische activiteit bij een algencultuur die bestond uit een mix van *Scenedesmus obliquus* en *Chlorella spp.* Zij hanteerden daarbij korte licht-donkerperiodes variërend van 0.1 ms tot 10 s en concludeerde dat de fotosynthese exponentieel toenam met toenemende licht-donkerfrequenties en dat een dynamische licht-donkerperiode de productiviteit enorm deed toenemen (6-7x in vergelijking met constant licht).

2.5 Conclusie

Onderzoeksresultaten met betrekking tot zuivering van afvalwater met behulp van algen laten zien stikstof en fosforgehalten sterk kunnen worden verlaagd en dat de grenswaarden voor eutrofiëringsgevoelig oppervlaktewater realiseerbaar zijn. Verder bleek dat algen in staat zijn om afvalwater met uiteenlopende stikstof/fosfor-verhoudingen voldoende te zuiveren.



3 Nutriëntensamenstelling procesafvalwater

3.1 Onderzochte procesafvalwaters

Om na te gaan in hoeverre verschillende soorten procesafvalwaters geschikt zijn voor algengroei is eerst de nutriëntensamenstelling van de volgende vijf procesafvalwaters bepaald van een tweetal commerciële Heinekenbrouwerijen (hierna aangeduid als Brouwerij A en B):

1. Influent UASB Brouwerij A
2. Effluent UASB Brouwerij A
3. Effluent AWZI Brouwerij A
4. Influent UASB Brouwerij B
5. Effluent UASB Brouwerij B

UASB staat voor Upflow Anaerobic Sludge Blanket en is onderdeel van de totale afvalwaterzuiveringsinstallatie (AWZI). Het betreft de eerste zuiveringsstap waarbij organische deeltjes door anaerobe micro-organismen worden afgebroken. Het UASB-influent is dus het ruwe procesafvalwater. Het effluent van de AWZI betreft het water afkomstig van de laatste stap in het zuiveringsproces dat wordt geloosd op het oppervlaktewater.

3.2 Resultaten analyses

De monsternamen zijn plaatsgevonden op 6 februari 2012. De belangrijkste nutriënten voor de algengroei zijn stikstof (in de vorm van NH_4 en NO_3), fosfor en zwavel. De gevonden gehalten staan in Tabel 1. Benadrukt moet worden dat het in alle gevallen gaat om het gehalte aan an- en kationen (opgelost anorganisch). In organische vorm aanwezig nutriënten zijn niet gemeten. Ter vergelijking zijn ook de gehalten van het standaard groeimedium weergegeven dat wordt gebruikt voor algenvoeding in laboratoriumproeven.

Tabel 1. **Stikstof, fosfor, kalium, magnesium- en zwavelgehalten van de watermonsters (monsternamen 6 februari 2012).**

Nutriënt	UASB-infl Br A	UASB-effl Br A	AWZI-effl Br A	UASB-infl Br B	UASB-effl Br B	Standaard groeimedium
NH_4	nd ¹	7.2	Nd	nd	10.8	nd
NO_3	Nd	24.8	24.8	6.2	6.2	520.9
$\text{NH}_4\text{-N}$	Nd	5.6	0.0	0.0	8.4	0.0
$\text{NO}_3\text{-N}$	Nd	5.6	5.6	1.4	1.4	117.7
$\text{NH}_4\text{+NO}_3\text{-N}$	Nd	11.2	5.6	1.4	9.8	117.7
P	2.5	4.0	1.5	3.4	6.5	53.0
K	35	39	27	16	20	74
Mg	15	15	15	nd	10	12
S	45	35	55	13	10	26

¹ nd = niet detecteerbaar



Uitgaande van een standaard stikstof/fosfor-verhouding van 7 (Redfield ratio, massaverhouding) blijkt de concentratie van stikstof de limiterende factor voor de algengroei in de verschillende procesafvalwaters. Benadrukt moet worden dat alleen de anorganische verbindingen zijn gemeten, terwijl ook aanwezige organische verbindingen een bijdrage leveren aan de stikstof- en fosforvoorziening.

Bij het ruwe procesafvalwater (influent UASB) werd of geen minerale stikstof gedetecteerd (Brouwerij A) of was het gehalte laag (Brouwerij B). Een tweede analyse van het UASB-influent van Brouwerij A ter controle gaf een vergelijkbaar resultaat. Latere analyses, gedaan bij de chemostaatproeven (zie hoofdstuk 5), waarbij ook totaal stikstof en fosfor zijn bepaald, lieten zien dat het grootste deel van de stikstof aanwezig is in organische vorm. Met name in het influent dat de UASB-reactor ingaat zal nog veel stikstof in organische vorm aanwezig zijn (in de reactor zelf wordt organische materiaal en de daarin aanwezige stikstof deels afgebroken).

Naast de boven genoemde macro-elementen is in de analyse ook gekeken naar een aantal spoorelementen die mogelijk de groei beïnvloeden (Tabel 2). Van een lineair verband tussen concentratie en groei(remming) is daarbij overigens geen sprake. Er zijn geen opvallende hoge waarden gevonden waarvan groei-remmende werking wordt verwacht. In vergelijking met het standaard groeimedium is vooral het natrium-, ijzer- en chloorgehalte hoog. Verder valt de hoge concentratie boor (B) in beide monsters uit Brouwerij B op. Daarnaast is in alle monsters het gehalte aan bicarbonaat hoog. Dit is gunstig voor de algengroei, omdat het bicarbonaat naast CO₂ kan dienen als koolstofbron.

Tabel 2. **Natrium, Calcium, chloor, bicarbonaat, ijzer, mangaan, zink, boor, koper, molybdeen en silicium gehalten van de watermonsters (monstername 6 februari 2012).**

Element	Eenheid gehalte	UASB- infl Br A	UASB- effl Br A	AWZI-effl Br A	UASB-infl Br B	UASB-effl Br B	Standaard groeimedium
Na	mg/l	476	504	685	515	460	239
Ca	mg/l	56	68	64	8.0	76	56
Cl	mg/l	131	134	177	39	135	82
HCO ₃	mg/l	433	1031	1196	964	1104	98
Si	mg/l	5	5	4	4	12	7
Fe	µg/l	73	117	134	212	670	11
Mn	µg/l	44	39	nd ¹	17	28	66
Zn	µg/l	52	39	46	20	26	85
B	µg/l	52	63	130	368	476	nd
Cu	µg/l	nd	13	13	nd	nd	165
Mo	µg/l	10	10	10	nd	nd	nd

1 nd = niet detecteerbaar



Aandachtspunten

- Voor de waterkwaliteit is het totaal gehalte aan stikstof en fosfor van belang. Dit betreft de som van het anorganische deel en het organische deel. De hoeveelheid opgeloste organische stikstof en fosfor is niet bepaald in de analyses. Om het effluent na zuivering door de algen te kunnen lozen op het oppervlaktewater is het van belang het totaal gehalte te kennen. Ook voor het ingaande effluent kan dit van belang zijn omdat algen nog een deel van de organische stikstof en fosfor kunnen opnemen nadat deze is afgebroken door bacteriën.
- In de monsters zijn geen gehalten gemeten aan de zware metalen kwik, lood en cadmium. Met name met het oog op gebruik van algen voor humane voeding en diervoeding is het van belang te weten hoe hoog de gehalten van deze metalen zijn in het effluent en met name in de algenbiomassa.

3.3 Conclusie

De analyses van de verschillende procesafvalwaters laten zien dat de mineralengehalten naar verwachting voldoende hoog zijn om er algen op te kunnen laten groeien. Ook zijn geen hoge gehalten van bepaalde elementen gevonden die mogelijk groeibelemerend kunnen zijn.





4 Wellplatenproeven

Via laboratoriumproeven is onderzocht of de waterstromen uit de afvalwaterzuivering van een tweetal Heineken-brouwerijen (Brouwerij A en Brouwerij B) geschikt zijn om algencultures te kunnen laten groeien. In eerste instantie is dit gedaan op kleine schaal via wellplatenproeven. Er zijn twee proeven uitgevoerd. In de eerste proef is de groei van algen op de verschillende procesafvalwaters met elkaar vergeleken (proef 1). In een tweede proef is nagegaan of toevoeging van sporenelementen of gist aan het procesafvalwater de algengroei extra stimuleert (proef 2).

4.1 Vergelijking procesafvalwaters (proef 1)

4.1.1 Opzet

De proef is uitgevoerd met de volgende vijf afvalwaters (zie ook hoofdstuk 3):

1. Influent UASB Brouwerij A
2. Effluent UASB Brouwerij A
3. Effluent AWZI Brouwerij A
4. Influent AWZI Brouwerij B
5. Effluent AWZI Brouwerij B

De monsters zijn genomen op 6 februari 2012.

Omdat de geschiktheid voor algengroei niet alleen van de watersamenstelling afhangt, maar ook van de algensoort, is elk watermonster met een aantal verschillende algensoorten geënt. Er is gekozen voor 2 mixcultures (Mix Acrres en Mix Hallum) en een monocultuur van *Chlorella protothecoides* en *Spirulina platensis*:

- a. Mix Acrres (*Chlorella protothecoides* SLYC P28, *Scenedesmus* spp., *Pheadactylum tricornutum* CCAP 1055/8)
- b. Mix Hallum (*Pediastrum* spp., *Scenedesmus* spp., *Pheadactylum* spp., *Chlorella* spp.)
- c. *Chlorella protothecoides* SLYC P28
- d. *Spirulina platensis* 85,79

In de aanvankelijke planning was dezelfde test ook voorzien voor een tweetal algenmixen opgekweekt uit omgevingsmonsters van de brouwerijen. Het is echter niet goed gelukt om uit deze monsters autochtone algen op te kweken.

Voor de test is gebruik gemaakt van wellplaten. Een wellplaat bestaat uit 24 kleine cups waarin effluent en algencultuur zijn samengebracht (1.8 ml afvalwater en 0.2 ml algensuspensie) (Figuur1). Naast de verschillende combinaties van afvalwater en algensoort is er ook controles meegenomen waarin de algencultures zijn aangebracht op het standaard groeimedium.

De wellplaten stonden gedurende de incubatieperiode op een schudder (150-200 rpm) in een stoof die op kamertemperatuur is gehouden (20-22°C). Er is belicht met een LED lamp (660 nm).



De groei van de algen is bijgehouden door middel van celtellingen en absorptiemetingen (meting optische dichtheid, OD) met een spectrofotometer bij 750 nm.



Figuur 1. Opstelling van de wellplaten op een schudder onder LED-verlichting (links) en voorbeeld van een wellplaat na 6 dagen incubatie (rechts).

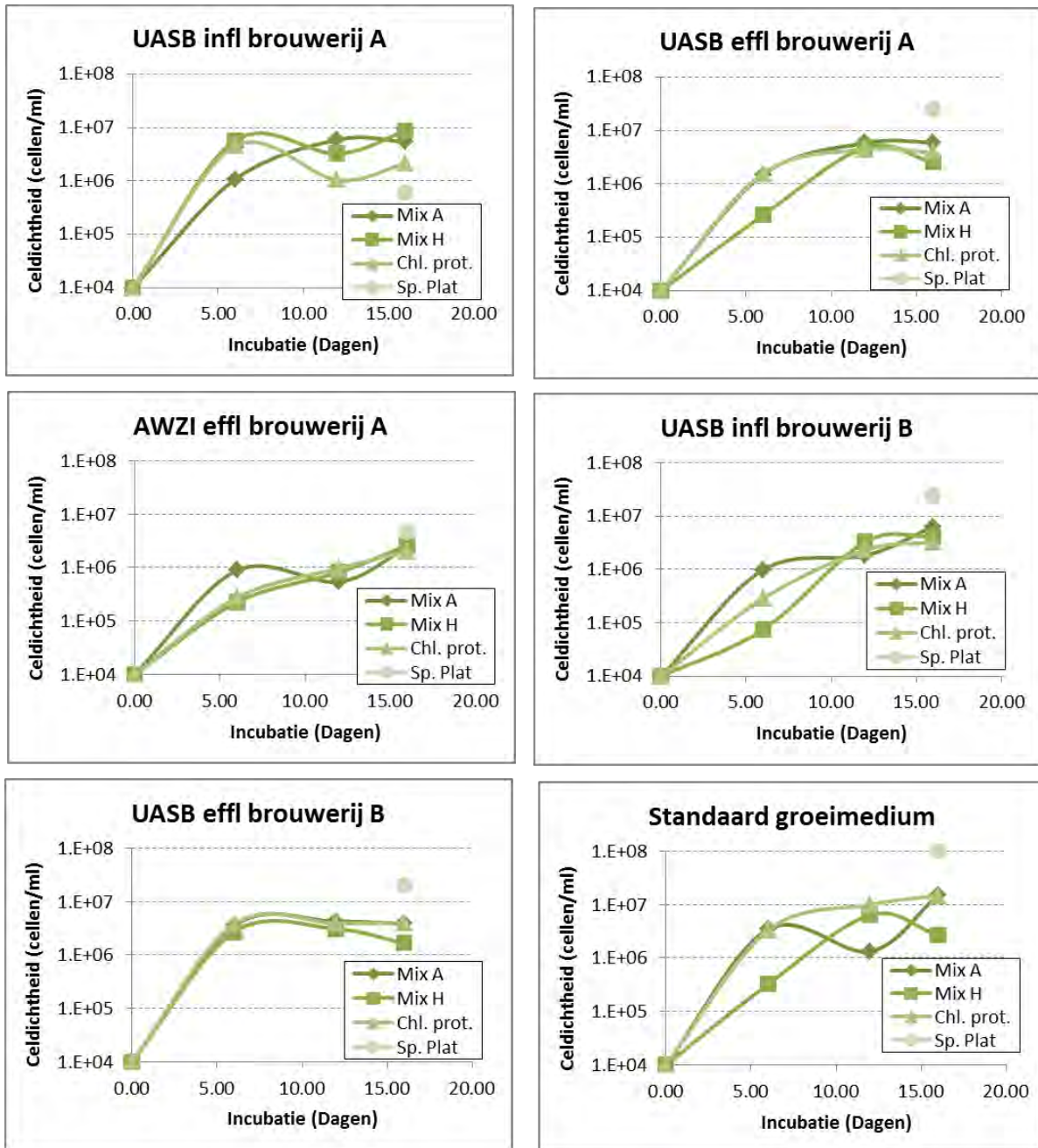
4.1.2 Resultaten

In Figuur 2 en 3 zijn de resultaten van respectievelijk de celtellingen en absorptiemetingen weergegeven van de verschillende combinaties van afvalwater en algencultures. Tevens zijn de resultaten van het standaard groeimedium weergegeven. De waarden voor optische dichtheid (Figuur 3) zijn gecorrigeerd ten opzichte van de waarde gemeten bij tijdstip T0. Dit verklaart de soms negatieve waarde in het begin van de incubatieperiode. Voor *Spirulina platensis* is enkel na 16 dagen de celdichtheid en optische dichtheid bepaald.

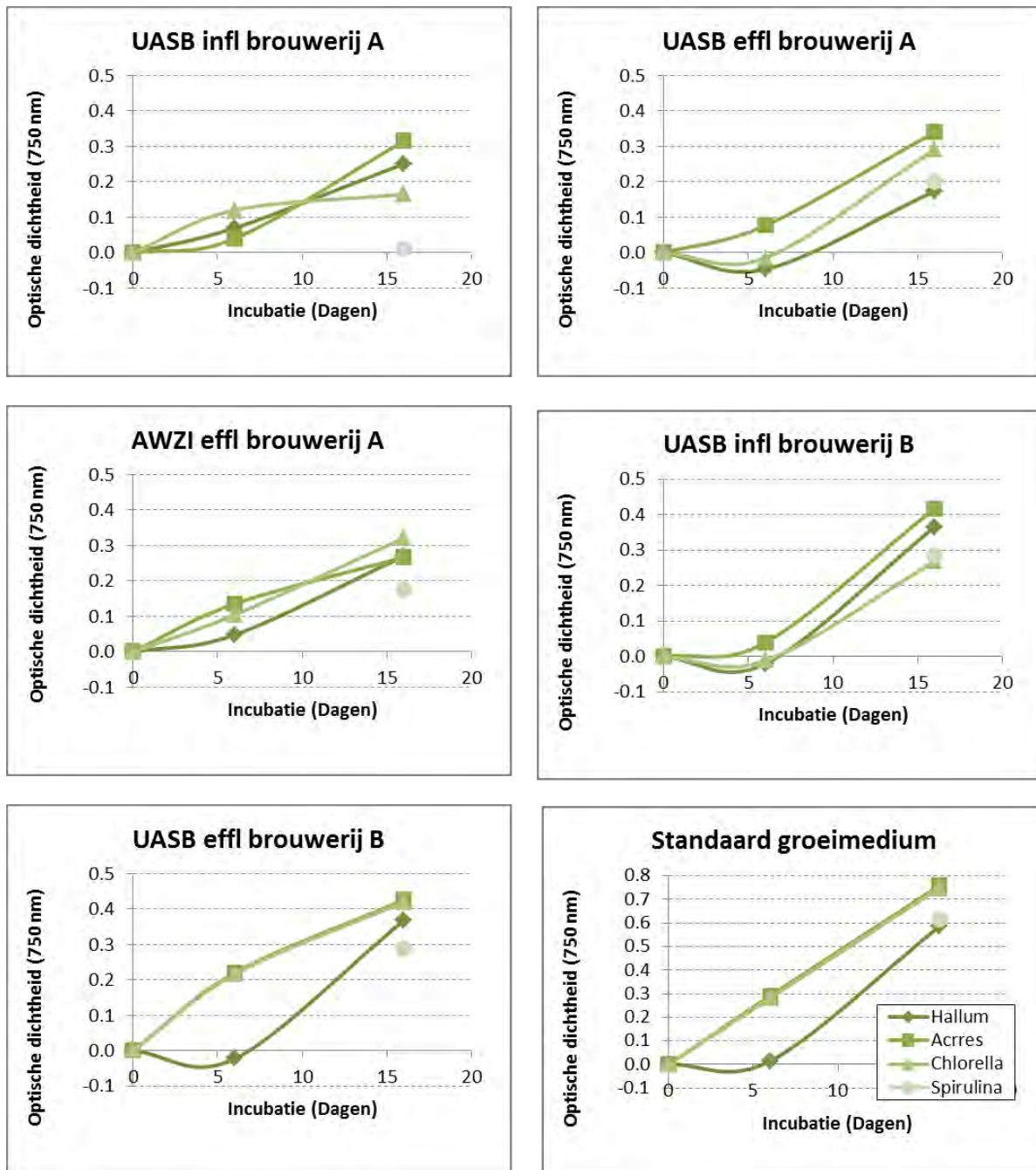
In Figuur 4 is zowel voor de celtellingen als de optische dichtheid de relatieve waarde ten opzichte van de meting bij het N3 medium aan het eind van de incubatieperiode weergegeven.

Bij alle vijf afvalwaters was er bij alle geteste algencultures sprake van een stijging van zowel de celdichtheid als de optische dichtheid. Bij de meeste combinaties van afvalwater en algencultures wordt na circa een week al de maximale hoeveelheid cellen bereikt (afvlakking van de curve). De optische dichtheid blijft in de meeste gevallen gedurende de gehele incubatieperiode doorstijgen.

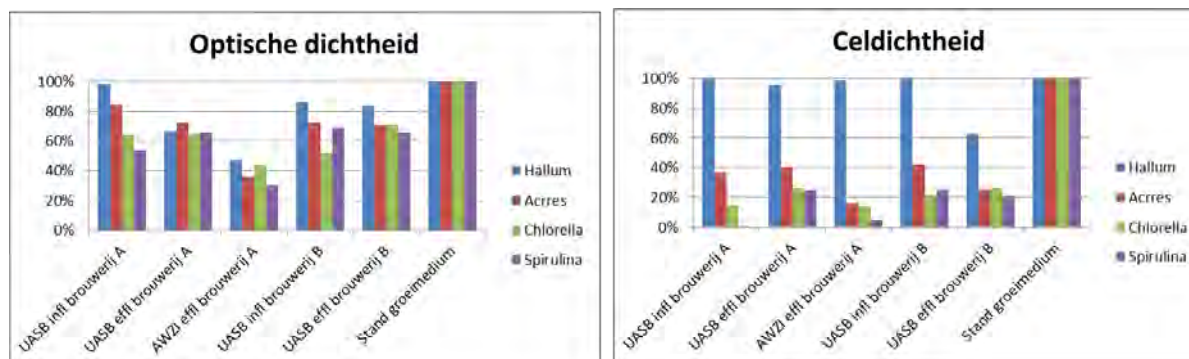
Uit Figuur 4 blijkt dat aan het einde van de incubatieperiode zowel de celdichtheid als de optische dichtheid van de procesafvalwaters bij de meeste algencultures lager zijn dan die van het standaard groeimedium. Bij de celdichtheid is dat sterker het geval dan bij de optische dichtheid. In het algemeen is de algengroei in het AWZI-effluent wat lager dan bij de andere afvalwaters. Mogelijk hangt dit samen het relatief lage fosforgehalte (zie Tabel 1).



Figuur 2. Verloop van de celdichtheid (cellen/ml) van de algencultures bij de vijf procesafvalwaters en het 3N groeimedium.



Figuur 3. Verloop van de optische dichtheid (750 nm) van de algencultures bij de vijf procesafvalwaters en het standaard groeimedium.



Figuur 4. Relatieve optische dichtheid (rechts) en relatieve celdichtheid (links) bij de vijf procesafvalwaters (uitgedrukt als % van de waarde bij het 3N groeimedium) na 16 dagen incubatie.

Naast de groei van de toegevoegde algencultures is ook gekeken naar de aanwezigheid van algen in de watermonsters zelf (autochtone algen). Daarvoor is elk watermonster ook ingezet zonder extra toevoeging van algen. De celtellingen na 16 dagen laten zien dat er algen aanwezig zijn in alle watermonsters (Tabel 3). De variatie is wel hoog (groot verschil tussen duplo's). Waarschijnlijk is het lage celgetal in de monsters hiervan de oorzaak. Relatief kleine absolute verschillen zijn hierdoor verhoudingsgewijs groot.

Tabel 3. Celdichtheid (cellen/ml) van de watermonsters zonder toevoeging van algencultures na 16 dagen incubatie

Watermonster	Duplo	Cellen per ml
UASB infl brouwerij A	1	284.000
	2	6.000
UASB effl brouwerij A	1	92500
	2	134000
AWZI effl brouwerij A	1	68000
	2	92000
UASB infl brouwerij B	1	38000
	2	107500
UASB effl brouwerij B	1	6000
	2	202000



4.2 Effect toevoeging spoorelementen en gist (proef 2)

4.2.1 Opzet

Deze proef is uitgevoerd met het effluent van de UASB-reactor welke ook gebruikt is voor de chemostaatproeven (zie hoofdstuk 5).

De volgende algencultures zijn gebruikt:

- Mix Acrres (Lab Acrres)
- Algencultuur aanwezig in effluent chemostaat geënt met Mix Acrres (Chemostaat Acrres)
- *Spirulina platensis* (Lab Spirulina)
- Algencultuur aanwezig in effluent chemostaat geënt met *Spirulina platensis* (Chemostaat Spirulina)

Voor de samenstelling van de Acrres-mix wordt verwezen naar paragraaf 4.1. Naast de Acrres-mix en *Spirulina platensis* zijn ook de algencultures meegenomen aanwezig in het effluent van de chemostaatproef die is uitgevoerd (zie hoofdstuk 5). Deze proeven zijn uitgevoerd met zowel de Acrres-mix als *Spirulina platensis*. Gedurende de chemostaatproef is de samenstelling van de algen wel veranderd in vergelijking met de samenstelling van de mix waarmee het chemostaatvat is geënt. Zo was in de Spirulina-chemostaat mix geen *Spirulina platensis* meer aanwezig, de algenpopulatie bestond voornamelijk uit *Chlorella spp.* De algenpopulatie in de Acrres-chemostaat-mix was minder veranderd. Voor verdere informatie wat betreft samenstelling van de algencultures in het effluent van de chemostaat wordt verwezen naar hoofdstuk 5.

Aan het effluent zijn extra spoorelementen en gist toegevoegd. Daarnaast zijn controles meegenomen zonder toevoegingen.

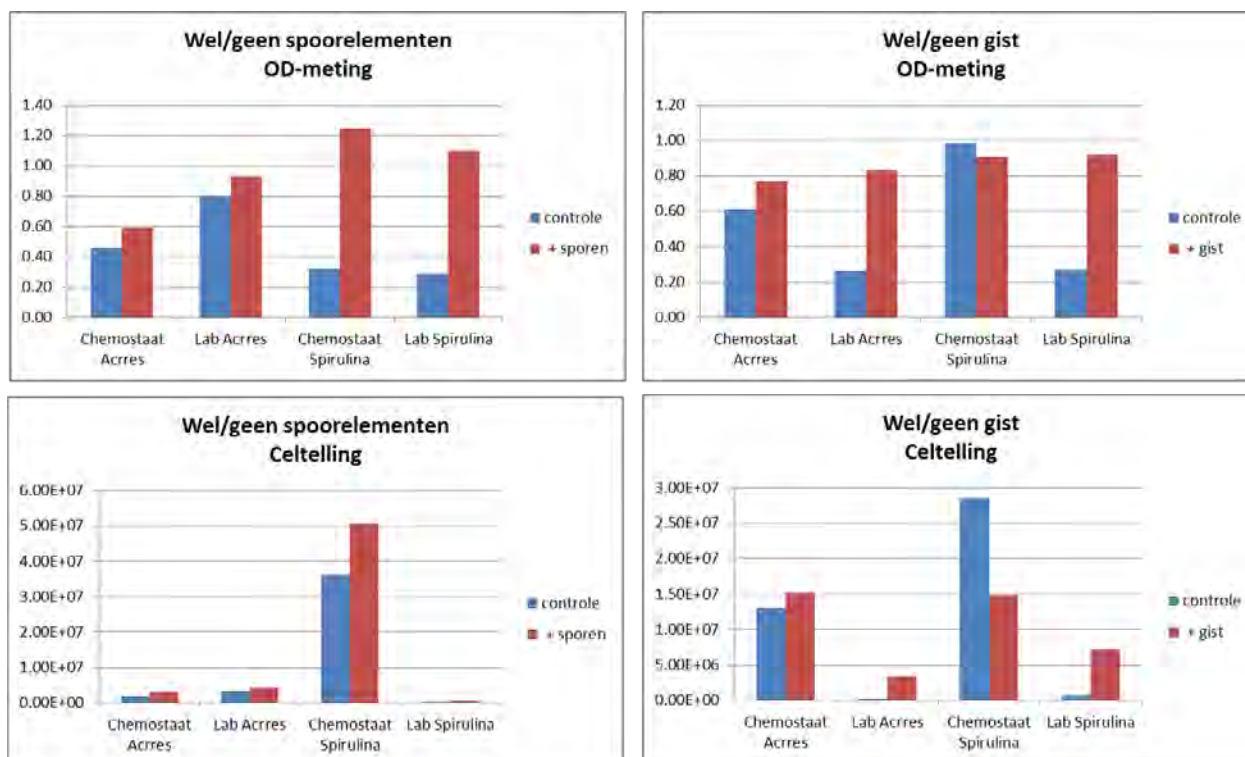
Voor de spoorelementen is gebruik gemaakt van de mix die ook aan het standaard groeimedium wordt toegevoegd. Er is uitgegaan van dezelfde dosering als in het standaard groeimedium. De gistdosering bedroeg 1 gram per 200 ml effluent.

Na afloop van de incubatieperiode (7 dagen) is een meting van de optische dichtheid (OD) en is een celtelling uitgevoerd

4.2.2 Resultaten

In Figuur 5 zijn de resultaten van de OD-meting en de celtelling weergegeven. Het toevoegen van extra spoorelementen had een positief effect op de algengroei. Dit uitte zich zowel in een hogere optische dichtheid als een hoger celgetal. In vergelijking met de controle leek het effect bij de Spirulina aanzienlijk groter dan bij de Acrres mix. Het toevoegen van gist aan het effluent had met uitzondering van de Chemostaat Spirulina ook een positief effect op zowel de optische dichtheid als het celgetal.

Opvallend bij de uitkomsten was dat de controles van de spoorelementen- en gistoefvoeging soms sterk van elkaar verschilden terwijl die qua behandeling identiek zijn (vergelijk bijvoorbeeld bij OD-metingen controles Lab Acrres en Chemostaat Spirulina). Mogelijk heeft dit te maken met de plaats van de welletjes op de schudder.



Figuur 5. Effect van toevoeging van sporelementen en gist op de optische dichtheid en de celdichtheid bij de 4 algencultures.

4.3 Conclusie

Alle geteste procesafvalwaters bleken geschikt voor algengroei; in alle geteste combinaties van algencultuur en procesafvalwater is een duidelijke groei te zien, zowel wat betreft de celtellingen als de absorptiemetingen. De verschillen in groei tussen de verschillende procesafvalwaters waren relatief gering. In vergelijking met het standaard groeimedium is de groei op de procesafvalwaters wel geringer. Het verschil is het grootst bij *Spirulina platensis*.

Het toevoegen van sporelementen en gist lijkt een positief te hebben op de groei van de algen.





5 Chemostaatproeven

Na de wellplatenproeven, waarin is nagegaan of de algen willen groeien op het procesafvalwater, is in een laboratoriumproef de stikstof- en fosforverwijdering onderzocht. Dit is gedaan in een chemostaatopstelling. Een chemostaat is een bioreactor waarin influent (procesafvalwater) continu wordt toegevoegd, terwijl effluent (algenmengsel) continu met dezelfde hoeveelheid wordt afgevoerd, zodat het volume in de reactor constant blijft. Afhankelijk van de groeisnelheid van de algen en de verblijftijd zal na enige tijd een stabiele situatie ontstaan waarbij de groei van de algen gelijk is aan de hoeveelheid algen die de reactor via de overloop verlaat. Ook de concentraties aan stikstof en fosfor zullen dan niet meer variëren. In het afgevoerde effluent wordt vervolgens de algenbiomassa geoogst.

In dit hoofdstuk worden de proefopzet en de resultaten beschreven.

5.1 Proefopzet en –uitvoering

Proefopstelling

In Figuur 6 is de proefopstelling weergegeven. Als bioreactor is gekozen voor een glazen vat met een inhoud van 2 liter. De toevoer vindt plaats via een infuussysteem. Het effluent wordt opgevangen en vervolgens gecentrifugeerd (10 minuten bij 5000 rpm) om de algenbiomassa te oogsten. De geoogste biomassa wordt vervolgens gedroogd om de hoeveelheid geproduceerde drogestof te bepalen.

Met behulp van een pH-controller wordt de pH in de reactor stabiel gehouden tussen 7 en 8.5. Er wordt CO₂ toegevoegd. Het CO₂-gehalte van het toegevoegde gas bedraagt 10%. De reactor is in een stoof geplaatst waarin de temperatuur op circa 30 °C is gehouden. In de stoof wordt continu belicht met een LED-lamp (660 nm).

Verblijftijd en algencultures

Er zijn drie proeven uitgevoerd met verschillende verblijftijden: circa 6, 1 en 2 dagen voor respectievelijk proef 1, 2 en 3 (Tabel 4).

De eerste proef is gedaan met de Acrres-algenmix (*Chlorella protothecoides*, *Scenedesmus spp.*, *Pheadactylum tricornutum*) en een cultuur met *Spirulina platensis*. Proef 2 betrof een duplo-uitvoering met de Acrres-mix. De derde proef is uitgevoerd met de Acrres-mix en de Acrres-mix met een toevoeging van spoorelementen. Dat laatste is gedaan, omdat bij de wellplatenproeven gebleken is dat het toevoegen van extra spoorelementen een positief effect had op de algengroei (zie hoofdstuk 4.2). Voor de dosering van de spoorelementen is uitgegaan van die gebruikt in het standaard groeimedium.

Bij de start van een proef is telkens 200 ml verse entcultuur toegevoegd aan de bioreactor (= 10% van reactorinhoud).



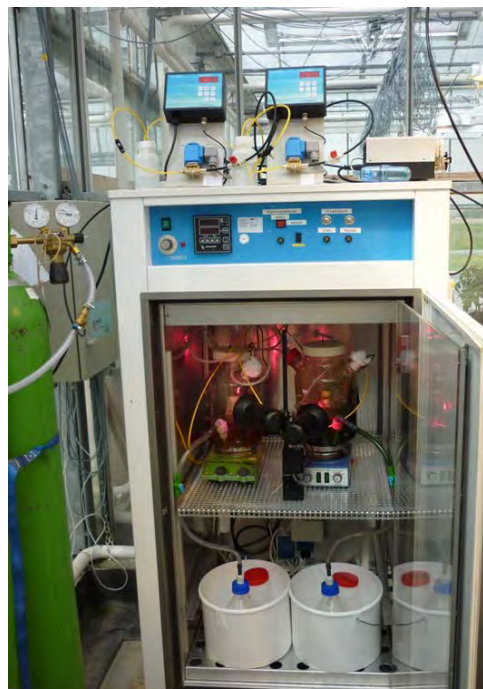
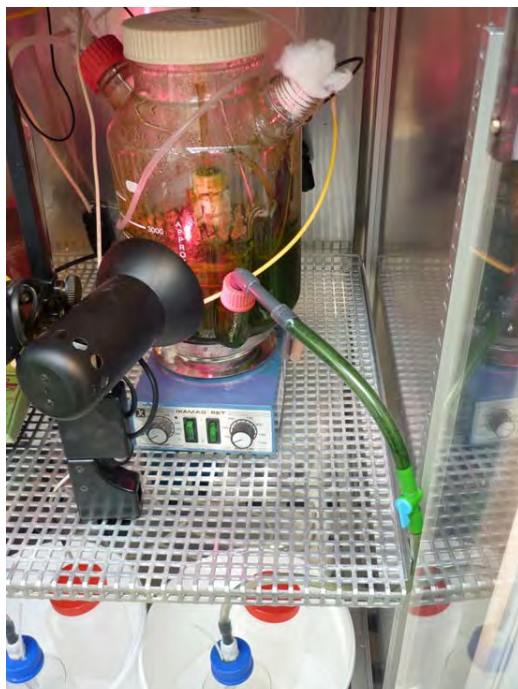
Tabel 4. **Gehanteerde verblijftijden en gebruikte algencultures in de chemostaatproeven.**

	Periode	Verblijftijd (dagen)	Algencultuur
Proef 1	18 april – 1 aug	5.8	Acres Spirulina
Proef 2	15 aug – 31 aug	1.1	Acres (duplo)
Proef 3	1 okt – 26 okt	2.2	Acres Acres + spoorelementen

Waarnemingen

Gedurende de proefperiode is op regelmatige tijdstippen het stikstof- en fosforgehalte van het ingaande influent en uitgaande effluent bepaald (bij effluent na centrifugeren en filtratie met 0.5 μm). Bij alle proeven is het gehalte aan totaal stikstof en fosfor bepaald. In het eerste deel van de proef 1 is tevens het gehalte anorganische stikstof en fosfor (nitraat, ammonium, orthofosfaat) bepaald. Bij de metingen is gebruik gemaakt van de Hach Lange meetapparatuur.

In het uitgaande effluent is op een aantal momenten de hoeveelheid algen biomassa bepaald. Daarnaast zijn in proef 1 op regelmatige tijdstippen celtellingen uitgevoerd onder de microscoop.



Figuur 6. **Opstelling van de chemostaatproef.**



5.2 Resultaten

Stikstof en fosforgehalte influent chemostaat

Bij de proeven was het de bedoeling om als influent voor de chemostaat gebruik te maken van het effluent van de UASB van Brouwerij A. Het is immers de bedoeling de laatste stap in de afvalwaterzuivering (aerobe nazuivering) te vervangen door de algenzuivering. Achteraf bleek dat er waarschijnlijk bij het aftappen van het procesafvalwater, voorafgaand aan de start van de eerste proef, een fout is gemaakt waardoor er UASB-influent (ruw procesafvalwater) in plaats van UASB-effluent is meegenomen en gebruikt is voor het eerste deel van proef 1 (18 april – 12 juni, hierna influent 1 genoemd). Vanaf 12 juni tot het einde van proef 1 (1 augustus) is wel UASB-effluent gebruikt (hierna influent 2 genoemd). Voor proef 2 en 3 is eveneens gebruik gemaakt van UASB-effluent (hierna influent 3 en 4 genoemd).

In Tabel 5 zijn de stikstof en fosforgehalten van de chemostaat-influenten weergegeven zoals bepaalde met de Hach Lange testkits. De codering 1.1 t/m 1.3 betreft de drie jerrycans waarin het influent is gehaald. Influent 1.1 is gebruikt van de start tot 1 mei, 1.2 van 1 mei tot 18 mei en influent 1.3 van 18 mei tot 1 juni. Tussen 1 juni en 12 juni is weer influent 1.2 gebruikt. Bij het tweede deel van proef 1 is influent 2.1 gebruikt van 12 juni tot 9 juli, influent 2.2 van 9 juli tot 27 juli en influent 2.3 van 27 juli tot 1 augustus. Influenten 1 en 2 zijn alleen bij aanvang van de proef bemonsterd. Bij proeven 2 en 3 is het stikstof- en fosforgehalte van het influent (3 en 4) meerdere keren bepaald (op hetzelfde moment als de bepalingen in de chemostaat-effluent).

Het N-totaalgehalte van influent 1 liep uiteen van 39 tot 44 mg per liter en het P-totaalgehalte van 3.6 tot 4 mg per liter. Opvallend is dat er vrijwel geen anorganische stikstof aanwezig was. Ook dit duidt erop dat het waarschijnlijk ging om UASB-influent. Bij het UASB-effluent zal door mineralisatie van organische stikstof in de UASB-reactor een deel van de stikstof in anorganische vorm aanwezig zijn (ammonium, nitraat). Dit blijkt ook uit de eerdere analyses van de verschillende procesafvalwaters (monsters genomen in februari 2012, hoofdstuk 3.2). Het effluent van de UASB van Brouwerij A bevatte toen circa 10 mg N liter anorganische stikstof terwijl dat bij het influent van de chemostaat vrijwel niet aanwezig was.

Influent 2, dat vanaf 12 juni is gebruikt, bevatte iets minder stikstof dan influent 1 (gemiddeld 37 tegen 42 mg N per liter), terwijl het fosforgehalte hoger was (gemiddeld 3.8 tegen 7.0 mg P per liter). In vergelijking met influent 1 is het aandeel anorganische stikstof ($\text{NH}_4\text{-N}$ en $\text{NO}_3\text{-N}$) hoger.

Het N-totaal- en P-totaalgehalte van influent 3 was vergelijkbaar met dat van influent 2. Het aandeel minerale stikstof was hoger dan bij influent 2 (20-25% tegen 10-15%).

Bij influent 4 was het N-totaal- en P-totaalgehalte iets lager dan dat van influent 2 en 3. Het aandeel anorganische stikstof bedroeg ruim 15%.



Tabel 5. **Stikstof en fosforgehalte influent chemostaat (bepaald met Hach Lange meetapparatuur).**

Proef	Influent	N-totaal (mg/l)	NH ₄ -N (mg/l)	NO ₃ -N (mg/l)	P-totaal (mg/l)	PO ₄ -P (mg/l)
Proef 1	Influent 1.1	38.5	0.2	1.6	3.6	2.6
	Influent 1.2	44.3	0.3	2.2	4.0	3.5
	Influent 1.3	43.1	0.3	2.3	3.7	2.9
	Influent 2.1	34.7	3.4	1.1	6.9	
	Influent 2.2	38.2	3.3		7.0	
	Influent 2.3	37.9	3.1		7.0	
Proef 2	Influent 3 (20/8)	36.5			6.7	
	Influent 3 (24/8)	38.7	8.3	1.3	6.6	3.4
	Influent 3 (31/8)	30.0	5.6	1.0	6.4	2.9
Proef 3	Influent 4 (8/10)	28.8			6.1	
	Influent 4 (12/10)	28.6			6.3	
	Influent 4 (17/10)	30.3	3.9	1.0	6.4	

Stikstof en fosforgehalte effluent chemostaat

Proef 1

In Figuur 7 en 8 is het verloop van het stikstofgehalte (N_{totaal}, NH₄-N, NO₃-N) en fosforgehalte (P_{totaal}, PO₄-P) in het effluent van de chemostaat weergegeven gedurende de proefperiode. Het gehalte aan NH₄-N, NO₃-N en PO₄-P is alleen weergegeven in het eerste deel van de proefperiode (tot begin juni bij gebruik van influent 1).

Ter vergelijking is in Figuur 7 tevens de KRW-norm voor eutrofiëringsgevoelig oppervlaktewater weergegeven en het gehalte dat gemiddeld wordt gemeten in het AWZI-effluent van Brouwerij A (gemiddelde van meetwaarden tussen juni 2010 en juni 2012). Dit betreft het effluent na de aerobe nazuivering, dat wordt geloosd op het oppervlaktewater.

Stikstofgehalte

Vanaf half mei was de chemostaat stabiel en veranderde tot half juni het N-totaalgehalte niet veel meer (Figuur 7). Bij de Acres-mix was het gehalte lager dan bij de Spirulina-mix. Als wordt uitgegaan van het gemiddelde gehalte van het influent (gemiddelde van 1.1 t/m 1.3) kan een verwijderingsrendement worden berekend van circa 80% (Acres-mix) en 50% (Spirulina-mix).

De KRW-norm wordt bij geen van beide algenmixen behaald. Bij de Acres-mix was het stikstofgehalte wel wat lager dan dat van het AWZI-effluent, bij de Spirulina-mix was dat niet het geval.

Het ammonium- en nitraat-N-gehalte was laag. Ook hier was het gehalte bij de Acres-mix lager dan bij de Spirulina-mix.

Na half juni is nieuw influent (influent 2) gebruikt met een wat lager N-gehalte en een hoger aandeel anorganisch N (Tabel 5). Het N_{totaal}-gehalte in het effluent van de chemostaat daalde naar uiteindelijk 3-5 mg N per liter. Hieruit kon een verwijderingsrendement worden berekend van circa 90% voor beide algencultures (uitgaande van gemiddeld N-gehalte van influent 2). De lagere N-gehaltenes in het chemostaat-effluent en het hogere verwijderingsrendement bij gebruik van influent 2



hangt waarschijnlijk samen met het lagere N_{totaal}-gehalte en het hogere aandeel anorganische N (in vergelijking met influent 1). Algen kunnen alleen maar anorganische N opnemen, organische N moet eerst worden afgebroken in de chemostaat. Hoe hoger het aandeel anorganische N hoe sneller en makkelijker de algen de aanwezige N kunnen opnemen.

Bij beide algencultures is het stikstofgehalte lager dan dat van het AWZI-effluent. Bij de Acrres-mix werd zelfs de KRW-norm benaderd.

Fosforgehalte

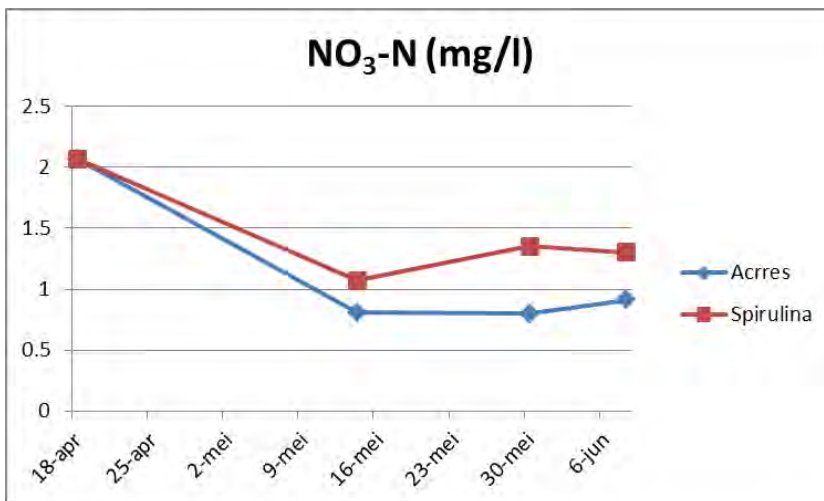
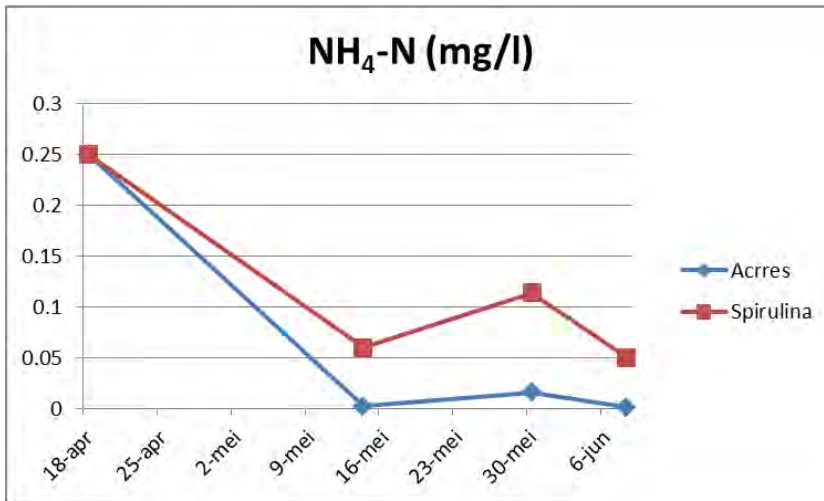
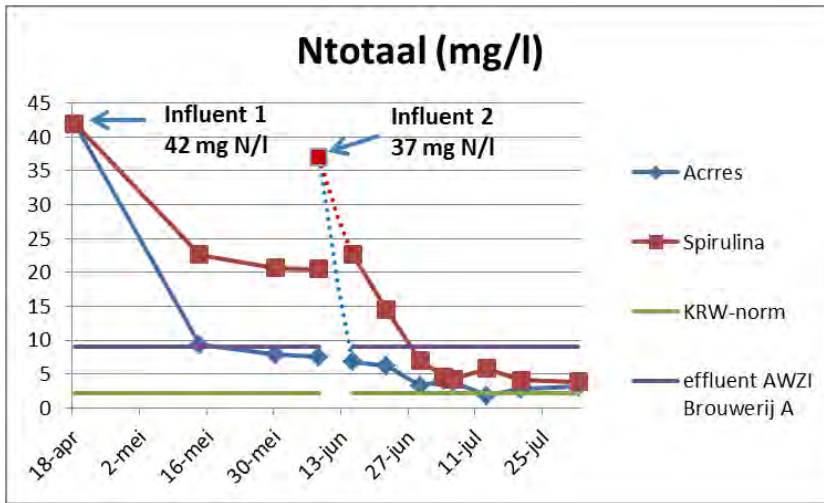
Ook het P-totaal-gehalte nam in de periode dat effluent 1 werd gebruikt (tot half juni) duidelijk af (Figuur 8). Bij de Acrres-mix was dit eerder het geval dan bij de Spirulina-mix. Bij de metingen eind mei en begin juni waren de verschillen tussen de beide algencultures echter relatief gering. Gebaseerd op de metingen op 8 juni en een uitgaande van een gemiddeld fosforgehalte van het influent bedraagt het verwijderingsrendement circa 90% (Acrres-mix) en 80% (Spirulina-mix).

Het fosforgehalte in het chemostaateffluent was in beide algencultures aanzienlijk lager dan dat van het AWZI-effluent. Bij de Acrres-mix werd zelfs de KRW-norm benaderd.

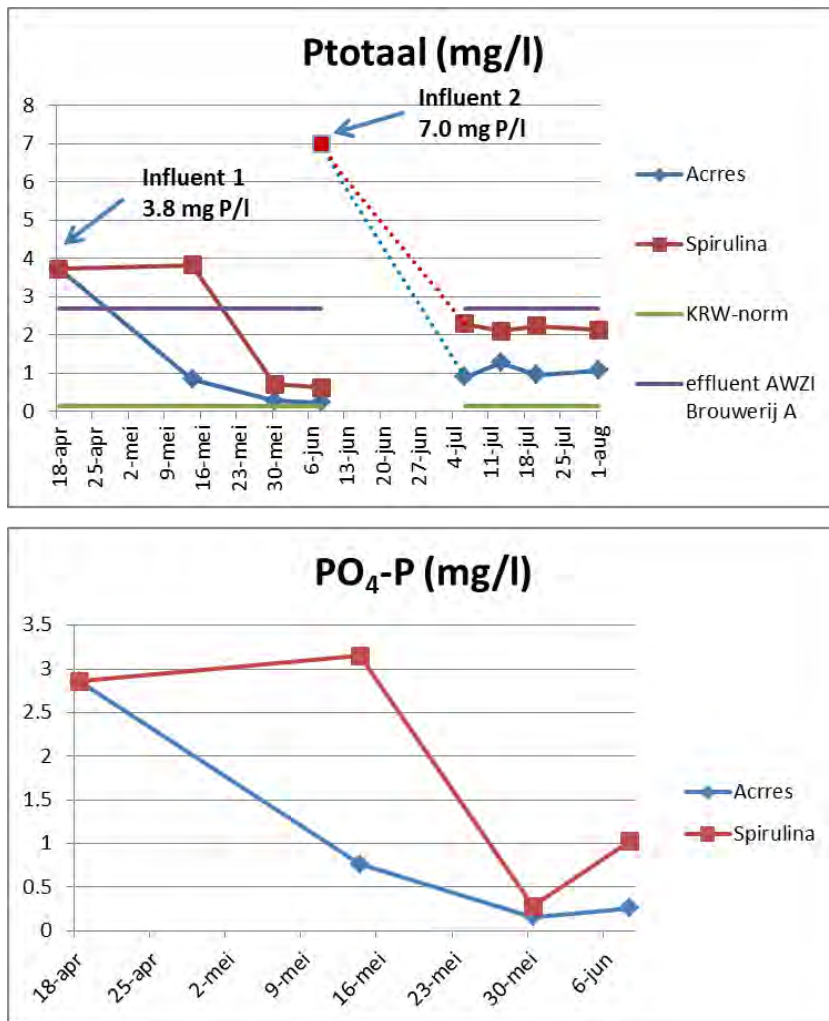
Het ortho-P-gehalte gaf globaal eenzelfde verloop te zien. Wel leek het gehalte bij de Spirulina-mix vanaf eind mei wat minder stabiel te zijn dan bij de Acrres-mix.

Vanaf het moment dat effluent 2 werd gebruikt (vanaf half juni) steeg het fosforgehalte van het chemostaat-effluent. Waarschijnlijk is dit het gevolg van het hogere fosforgehalte van het influent 2 (zie Tabel 5). Vanaf begin juli (Acrres-mix) en half juli (Spirulina mix) bleef het gehalte redelijk constant. Uitgaande van het gemiddelde fosforgehalte van het influent 2 kon een verwijderingsrendement worden berekend van circa 85% (Acrres-mix) en 70% (Spirulina mix).

Het fosforgehalte in het chemostaateffluent was bij gebruik van influent 2 bij beide algencultures lager dan dat van het AWZI-effluent, maar hoger dan de KRW-norm.



Figuur 7. Verloop N-totaal-, NH₄-N en NO₃-N-gehalte (mg/l) in het effluent van de chemostaat bij de Accres- en de Spirulina-mix (proef 1).



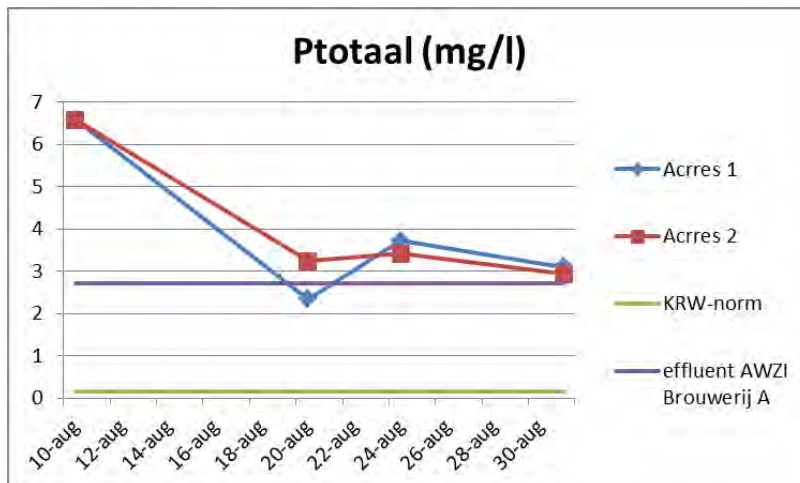
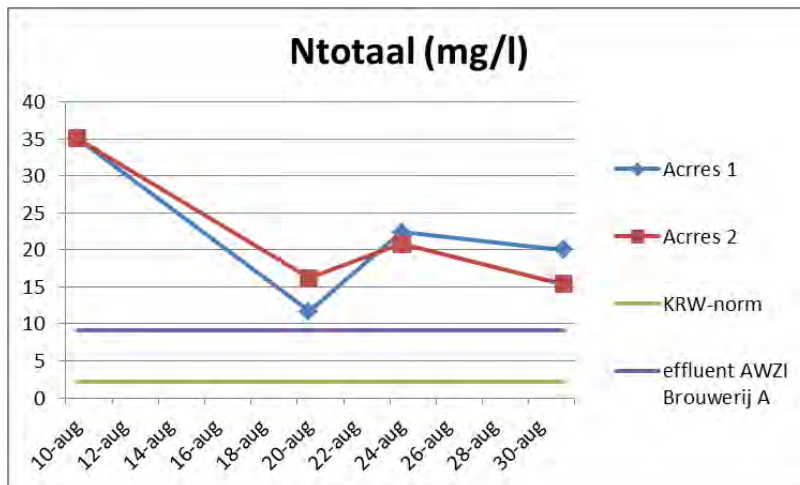
Figuur 8. Verloop P-totaal- en PO₄-P-gehalte (mg/l) in het effluent van de chemostaat bij de Acrcres- en de Spirulina-mix (proef 1).

Proef 2

In Figuur 9 is het verloop van het N-totaal- en P-totaalgehalte weergegeven in het chemostaateffluent bij de Acrcres-mix (duplo) bij een verblijftijd van ruim 1 dag. Ook in deze figuur is weer de KRW-norm voor eutrofiëringsgevoelige wateren en het gemiddelde gehalte in het AWZI-effluent van Brouwerij A weergegeven.

Ondanks de korte verblijftijd was er toch sprake van een substantiële daling van het stikstof en fosforgehalte in het chemostaateffluent. Voor stikstof kon gemiddeld over de drie meetpunten een verwijderingsrendement worden berekend van circa 50%. Het gehalte bleef wel ruim boven de KRW-norm (2.2 mg N per liter) en ook boven het gemiddelde stikstofgehalte in het AWZI-effluent (9 mg N per liter).

Voor fosfor bedroeg het verwijderingsrendement 50-55%. Het gehalte in het chemostaateffluent (gemiddeld 3.1 mg P per liter) was ruim hoger dan de KRW-norm (0.15 mg P per liter), maar benaderde wel het fosforgehalte in het AWZI-effluent (2.7 mg P per liter).



Figuur 9. Verloop N-totaal- en P-totaal-gehalte (mg/l) in het effluent van de chemostaat bij de beide Acres-mixen (proef 2).

Proef 3

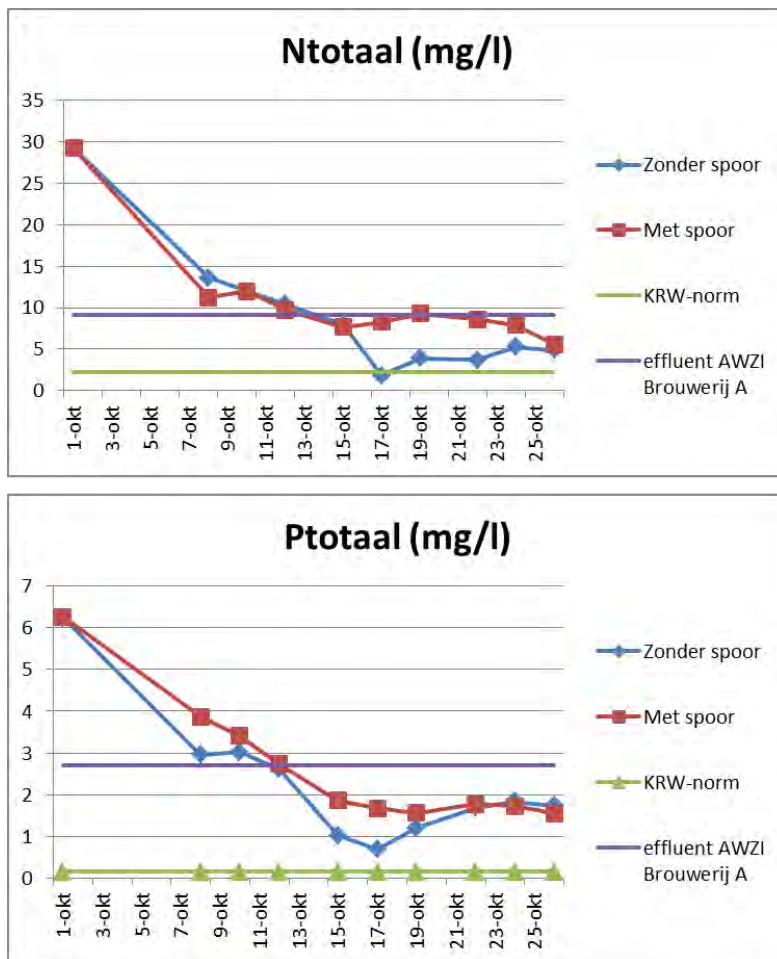
De N-totaal- en P-totaalgehalten in het effluent van de chemostaat van proef 3 zijn weergegeven in Figuur 10.

Het N-totaalgehalte daalde bij beide mixen uiteindelijk naar ruim 5 mg N per liter. Dit is ruim onder het gemiddelde stikstofgehalte in het AWZI-effluent, maar wel hoger dan de KRW-norm.

Aanvankelijk nam het gehalte minder sterk af in de mix waarbij spoorelementen waren toegevoegd. Aan het eind van de proefperiode was er geen verschil meer.

Het P-totaalgehalte daalde naar ruim 1.5 mg P per liter. Evenals als bij stikstof is dit lager dan het gemiddelde stikstofgehalte in het AWZI-effluent, maar hoger dan de KRW-norm.

Het verwijderingsrendement voor stikstof en fosfor bedroeg respectievelijk 82 en 74%.



Figuur 10. Verloop N-totaal- en P-totaal-gehalte (mg/l) in het effluent van de chemostaat bij de Acres-mix met en zonder toevoeging van sporelementen (proef 3).

Algen productie

In de chemostaatproeven is de hoeveelheid algenbiomassa bepaald en in proef 1 is tevens celdichtheid bepaald van de aanwezige algensoorten.

Proef 1

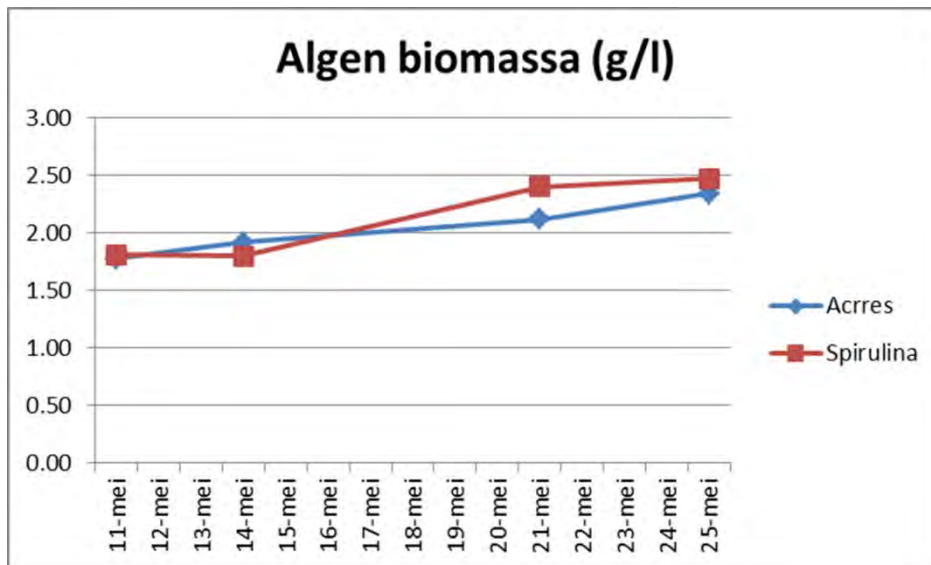
Biomassa

In Figuur 11 is de biomassa productie van de algen in het effluent weergegeven. Hieruit blijkt dat eind mei de hoeveelheid droge algen biomassa circa 2.5 g per liter effluent bedraagt. Er is weinig verschil tussen de twee algencultures.

De gemeten productie is hoog. Eerder is al opgemerkt dat er waarschijnlijk ruw procesafvalwater is gebruikt (in plaats van effluent van UASB). Het kan daarom zijn dat er zich in de geogste biomassa ook verontreinigingen bevinden die in het UASB-influent



aanwezig waren. Uit de visuele beoordeling van het pellet werd echter niet de indruk verkregen dat het deze duidelijk was verontreinigd met niet-algen vaste stof. Verder moet worden benadrukt dat het bij de geogoste biomassa gaat om kleine hoeveelheden, waardoor de resultaten relatief sterk kunnen worden beïnvloed door meetfouten.



Figuur 11. Verloop gehalte algenbiomassa in effluent (gram drogestof per liter) van de chemostaat bij de Accres- en de Spirulina-mix (proef 1).

Algensoorten

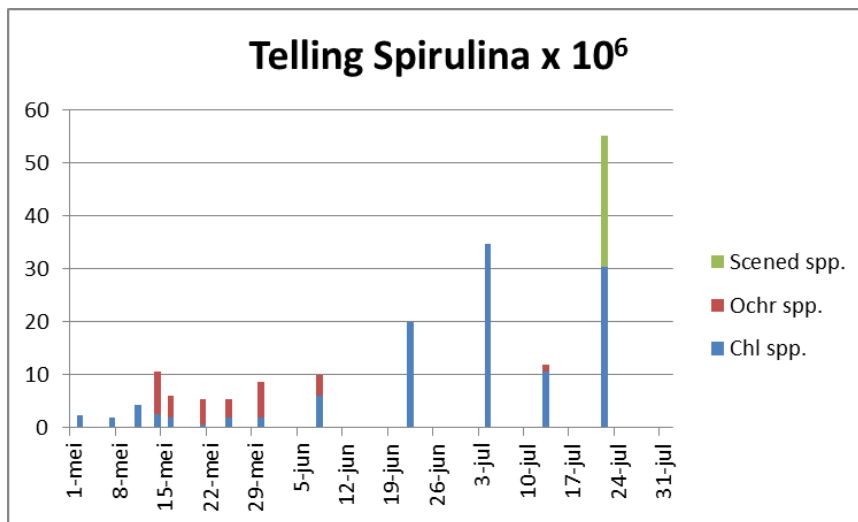
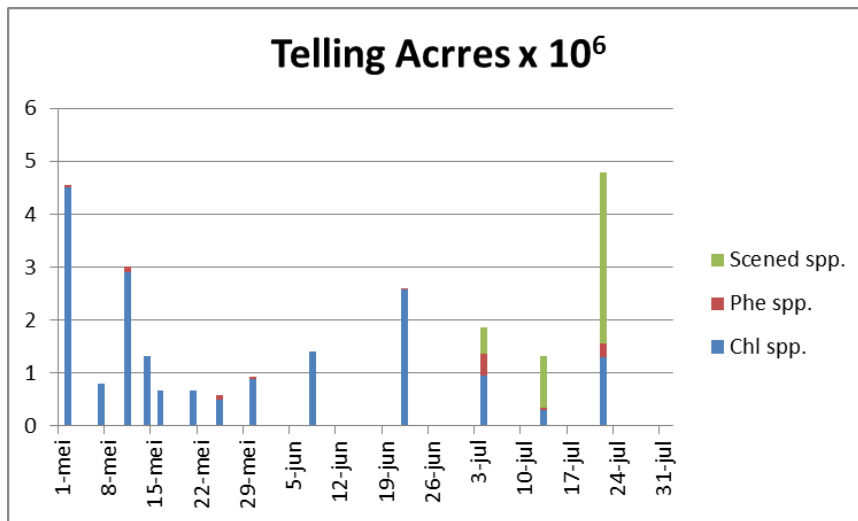
In Figuur 12 zijn de resultaten weergegeven van de tellingen van de algencellen gedurende de chemostaatproef.

De Accres-mix bestaat voor een groot deel uit *Chlorella protothecoides*. Tot begin juli traden geen grote veranderingen op in de samenstelling. Daarna nam het aandeel *Scenedesmus* spp. sterk toe.

De totale celdichtheid nam tot half mei af. Daarna fluctueerde deze tussen 1.0 en 2.5×10^6 cellen per ml. Bij de laatste telling nam de celdichtheid toe tot bijna 5×10^6 cellen per ml.

Bij de Spirulina-mix deden veranderde de samenstelling al sterk aan het begin van de proefperiode. *Spirulina platensis* werd vrijwel niet meer waargenomen in de tellingen. De populatie bestond aanvankelijk uit *Chlorella*-soorten, echter tussen half mei en begin juni, was de goudalg *Ochromonas* de dominante soort. Deze soort o.a. *Spirulina* algen, hetgeen het verdwijnen van *Spirulina*-algen mede kan verklaren. Na half juni werden vooral *Chlorella*-en *Scenedesmus*-soorten waargenomen.

De totale celdichtheid varieerde tot begin juni tussen 2 en 10×10^6 cellen per ml. Daarna nam deze toe tot 55×10^6 cellen per ml.



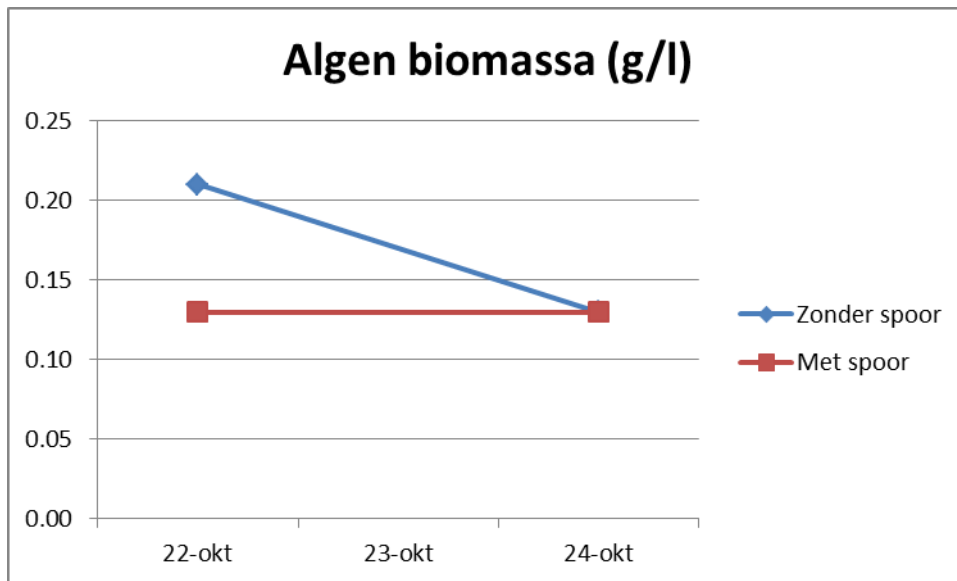
Figuur 12. Verloop celdichtheid in effluent (10^6 cellen per ml) van de chemostaat bij de Accres- en de Spirulina-mix (proef 1).

Proef 2

In deze proef bleek het door de geringere hoeveelheid biomassa niet goed mogelijk een goede massameting uit te voeren.

Proef 3

In Figuur 13 is de biomassa productie van de algen in het effluent weergegeven aan het eind van de proefperiode. Deze bedroeg globaal 0.1-0.2 gram per liter. Bij de eerste meting was de hoeveelheid biomassa lager wanneer extra spoorelementen waren toegevoegd. Bij de tweede meting was er geen verschil. In vergelijking met proef 1 was de hoeveelheid biomassa een factor 10 lager.



Figuur 13. Verloop gehalte algenbiomassa in effluent (gram drogestof per liter) van de chemostaat bij de Acrres-mix zonder en met toevoeging van sporelementen (proef 3).

5.3 Conclusie

Bij een verblijftijd van circa 6 dagen bleek het met behulp van de Acrres-mix mogelijk om circa 80-90% van de stikstof en 85-90% van de fosfor te verwijderen. Bij de Spirulina-mix bedroeg bij dezelfde verblijftijd de stikstof- en fosforverwijdering respectievelijk 50-90 en 70-80%.

Bij beide algencultures was het stikstof- en fosforgehalte van chemostaateffluent lager dan dat van AWZI-effluent van Brouwerij A. De normen voor eutrofiëringsgevoelig oppervlaktewater werden nog licht overschreden.

Bij een verblijftijd van 1 dag werd een verwijderingsrendement gerealiseerd van circa 50% voor stikstof en 50-55% voor fosfor. Voor zowel fosfor als stikstof was het gehalte in het chemostaateffluent hoger dan dat van het AWZI-effluent van Brouwerij A.

Bij een verblijftijd van ruim 2 dagen bedroeg het verwijderingsrendement circa 80% voor stikstof en circa 75% voor fosfor. Het stikstof- en fosforgehalte in het effluent was lager dan dat van AWZI-effluent van Brouwerij A. De normen voor eutrofiëringsgevoelig oppervlaktewater werden wel overschreden.

Celtellingen bij de eerste proef gaven aan dat de Spirulina zich niet heeft weten te handhaven en is verdrongen door Chlorella-soorten en de goudalg Ochromonas. Bij de Acrres-mix werden aanvankelijk geen duidelijke populatieverschuivingen waargenomen. Aan het eind nam het aandeel Scenedesmus-soorten sterk toe.

Bij de interpretatie van de zuiveringsrendementen dient men te realiseren dat het voor de laboratoriumomstandigheden niet bekend is welke factor de metabole activiteit van de algen heeft beperkt. Met name voor energie (licht) en C-bron is niet vastgesteld of deze beide in overmaat aanwezig zijn geweest.



6 Cryogeen opslaan algen

Cryogene opslag van algen is een methode om deze langdurig te kunnen bewaren. Dit houdt in dat algen worden bewaard bij zeer lage temperaturen met behulp van vloeibare stikstof. Nagegaan is in hoeverre de vitaliteit van de algencultures hierdoor wordt beïnvloed.

6.1 Materiaal en Methode

De proef is uitgevoerd met twee algencultures, de Acrres Mix en de Hallum Mix. Voorafgaand aan het invriezen is aan het algengemengsel een bewaarvloeistof toegevoegd. In de proef is zowel 20% Na(MeOH) als 60% Na(Me₂SO₄) getest. De gehanteerde verhouding algengemengsel en bewaarvloeistof was 3:1. Na 4 dagen zijn de monsters weer uit de stikstof gehaald. Na het ontdooien is het algengemengsel in een kolf gedaan met ongeveer 100-150 ml groeimedium en zijn de algen vervolgens opgekweekt onder normale omstandigheden met licht en bij kamertemperatuur.

Voorafgaand aan het invriezen en tijdens het opkweken na het ontdooien zijn celtellingen gedaan (na het ontdooien op drie momenten).

6.2 Resultaten

In Tabel 6 zijn de resultaten van de celtellingen weergegeven. Bij de Acrres Mix bedroeg de totale celdichtheid na het ontdooien maximaal circa 50% (bewaring in MeOH) en 70% (bewaring in Me₂SO₄) ten opzichte van de totale celdichtheid van de algengemengsel voorafgaand aan het invriezen. Bij bewaring in MeOH werd de maximale dichtheid bereikt op 12 dagen na ontdooien en bij bewaring in Me₂SO₄ op 34 dagen na ontdooien.

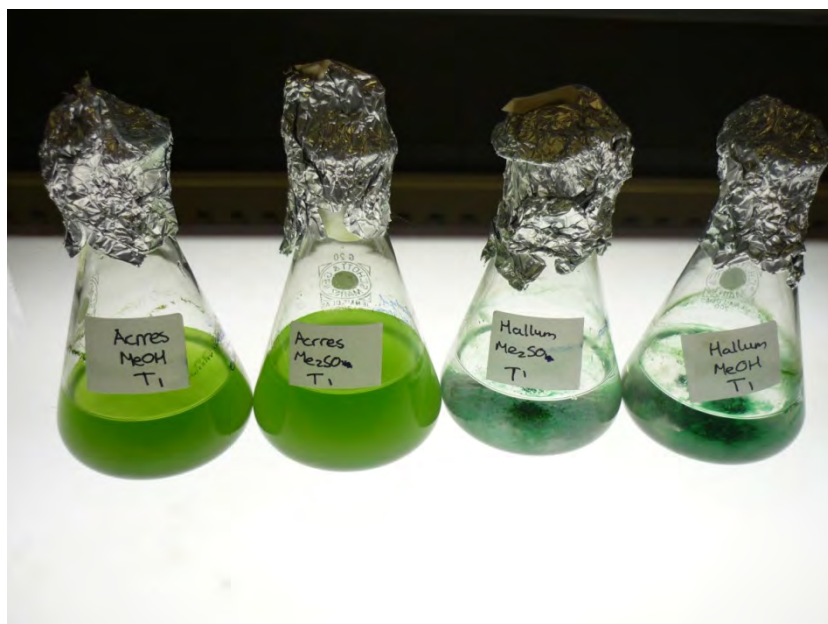
Bij de Hallum Mix werden alleen bij de telling op 12 dagen na ontdooien algen teruggevonden. De totale celdichtheid bedroeg circa 30% (bij zowel bewaring in MeOH en Me₂SO₄) ten opzichte van de celdichtheid van de algengemengsel voorafgaand aan het invriezen. Bij bewaring in MeOH werd vooral *Pediastrum* spp. gevonden en bij bewaring in Me₂SO₄ *Chlorella* spp.

In vergelijking met de Acrres Mix was het resultaat duidelijk minder. In de Hallum Mix was er ook sprake van klontering (zie Figuur 14). Bij de Acrres Mix is dit vrijwel niet waargenomen.



Tabel 6. **Celdichtheid van de Accres Mix en de Hallum Mix voor en na invriezen met Na(MeOH) en Na(Me₂SO₄).**

Algen-mix	Voor/na invriezen	Tijdstip (dagen na ontdooien)	Celdichtheid algen (x 10 ⁶ cellen/ml)					Totaal	
			Chlorella spp	Pheadactylum spp	Scenedesmus spp	Pedias-trum spp	blauwalg		
Accres	Voor	-	2.05	0.88				2.92	
	Na, MeOH	6	0.43	0.03	0.03			0.48	
		12	1.18	0.18	0.05			1.41	
		34	0.61	0.08				0.69	
	Na, Me ₂ SO ₄	6	0.10	0.03	0.08			0.20	
		12	0.43	0.10				0.53	
		34	1.65	0.40				2.05	
	Hallum	Voor	-	0.45			2.05	0.05	2.55
		Na, MeOH	6						
12					0.13	0.56	0.09	0.78	
34									
Na, Me ₂ SO ₄		6							
		12	0.46				0.31	0.78	
		34							



Figuur 14. **Accres en Hallum Mix 6 dagen na ontdooien. Bij de Hallum mix (rechts) is duidelijk de klontering te zien.**



6.3 Conclusie

De resultaten van het cryogeen bewaren van de algencultures Acrres Mix en Hallum mix waren wisselend. De celdichtheid na ontdooien was bij de Acrres Mix hoger dan bij de Hallum mix (maximaal 70 versus 30% van de dichtheid voor het invriezen). Er zijn geen duidelijke verschillen waargenomen tussen de bewaarvloeistoffen MeOH en Me₂SO₄.





7 Referenties

Boelee, N.C., H. Temmink, M. Janssen, C.J.N. Buisman & R.H. Wijffels (2011). Nitrogen and phosphorus removal from municipal wastewater effluent using microalgal biofilms. *Water Research* 45, 5925-5933.

Driessen, W. and T. Vereijken (2003). Recent developments in biological treatment of brewery effluent. Proc. 9th Brewing Convention, Victoria Falls, Zambia, Inst. & Guild of Brew. Africa Sect (Last accessed Sept. 2010 at <http://www.paques.nl>).

Fulton, L.M. (2009). Nutrient removal by algae grown in CO₂-enriched wastewater over a range of nitrogen-to-phosphorus ratios. Master Thesis, Faculty of California Polytechnic State University, San Luis Obispo.

Rhee, G. (1974). Phosphate uptake under nitrate limitation by *Scenedesmus* Sp. and its ecological implications. *Journal of Phycology* 10, 470-475.

Klausmeier, C., Litchman, E., Daufresne, T. and Levin, S. (2004). Optimal nitrogen-to-phosphorus stoichiometry of phytoplankton. *Nature* 429, 171-174

Grobbelaar, J.U., L. Nedbal & V. Tichy (1996). Influence of high frequency light/dark fluctuations on photosynthetic characteristics of microalgae photoacclimated to different light intensities and implications for mass algal cultivation. *Journal of Applied Phycology* 8, 335-343.

Hein, M., Pedersen, M. and Sand-Jensen, K. (1995). Size-dependant nitrogen uptake in micro- and macroalgae. *Marine Ecology Progress Series* 118, 247-253.

Filomena de J. Raposo, M., Oliveira, S.E., Castro, P.M., Bandarra, N.M. and Morais, R.M. (2010). On the utilization of microalgae for brewery effluent treatment and possible applications of the produced biomass. *Journal of the institute of brewing* 116 (3), 285-292.

Mata, T.M., Melo, A.C., Simoes, M. and Caetano, N.S. (2012). Parametric study of a brewery effluent by microalgae *Scenedesmus obliquus*. *Bioresource Technology* 107, 151-158.

Nurdogan, Y. & W.J. Oswald (1995). Enhanced nutrient removal in high-rate ponds. *Water Science Technology* 31 (12), 33-43.

Park, J.B.K., R.J. Craggs & A.N. Shilton (2011). Wastewater treatment high rate algal ponds for biofuel production. *Bioresource Technology* 102, 35-42.

Reynolds, C.S. (2006). *The ecology of Phytoplankton*. Cambridge University Press, Cambridge.

STOWA, 2011. Effluentpolishing met algen. Hoofdrapport.

Udo de Haes, H.A., J.L.A. Jansen, W.J. van der Weijden & A.L. Smit, 2009. Fosfaat – van te veel naar tekort. Beleidsnotitie van de Stuurgroep Technology Assessment van het ministerie van LNV.



Van Donk, Ellen, Slawek Cerbin, Susanne Wilken, Nico R. Helmsing, Robert Ptacnik & Antonie M. Verschoor (2009). The effect of a mixotrophic chrysophyte on toxic and colony-forming cyanobacteria. *Freshwater Biology*, september 2009.

Val Liere, J., G. Boosten, L. van Dijk, G. Hemke & A. Verschoor (2011). Ecoferm! – De kringloopboerderij. Rapport van studie uitgevoerd in opdracht van InnovatieNetwerk.

Verberkt, B. (2012). Proefonderzoek Algenfarming. Terugwinnen van stikstof en fosfaat als grondstof uit afvalwater. Rapport onderzoek uitgevoerd door Waterstromen en Ingrepo Renewables.

www.acrres.nl



WAGENINGEN UR
For quality of life