



Waterzuivering & biomassaproductie

Complementaire waterzuivering met planten en dieren - Fase 1
Maart 2018

Initiatiefnemers



Radboud Universiteit





Titel rapport:	Waterzuivering en biomassaproductie: complementaire waterzuivering met planten en dieren – Fase 1
Auteurs:	Lara Schuijt*, Tamara van Bergen*, Piet Verdonschot, Fons Smolders en Leon Lamers <i>*Deze auteurs hebben evenveel bijgedragen aan het rapport</i>
Opdrachtgevers:	Waterschap Rivierenland, Hoogheemraadschap De Stichtse Rijnlanden, Hoogheemraadschap Hollands Noorderkwartier
Zaaknummer:	WSRL-2018018322

Voor meer informatie:

Website

E-mail

www.aquafarm.nl

info@aquafarm.nl



Inhoudsopgave

Inhoudsopgave	
Samenvatting	11
Hoofdstuk 1: Inleiding	15
Doel	17
Hoofdstuk 2: Het Aquafarm Principe	19
De rioolwaterzuiveringsinstallatie	19
Zuiveringsmoerassen	20
Nutriëntverwijdering door planten	21
Nutriëntverwijdering door dieren	23
Het Aquafarm principe	26
Hoofdstuk 3: Praktijkonderzoek	29
Laboratoriumexperiment met dieren	29
Laboratoriumexperiment met 3 soorten dieren	29
Laboratoriumexperiment met verschillende dichtheden wormen	31
Laboratorium-experiment met planten	33
Maximale biomassaproductie versus waterzuivering	35
Hoofdstuk 4: Cascaderingsexperiment	39
Hypothese	39
Proefopzet	41
Resultaten	41
Conclusie	45
Hoofdstuk 5: Toekomstperspectief	47
Literatuurlijst	51
Bijlagen	57



Samenvatting

Binnen het project Aquafarm wordt door een consortium van de initiatievenfabriek van P2, Waterschap Rivierenland, Hoogheemraadschap De Stichtse Rijnlanden, Hoogheemraadschap Hollands Noorderkwartier, Wageningen Environmental Research (Alterra), Radboud Universiteit - Institute for Water and Wetland Research (RU-IWWR) en B-WARE Research Centre (B-WARE) onderzoek gedaan naar de combinatie van waterzuivering en biomassaproductie. Het doel van Aquafarm is om op basis van natuurlijke omzettingprincipes een productieketen van hoogwaardige bouwstoffen te verwezenlijken door monoculturen te laten groeien op afvalwater. Hierbij wordt gedacht aan eiwitten, vetten en andere organische verbindingen; complexe bouwstoffen met een hoge toegevoegde (markt)waarde. Door beschikbare kennis over de biologie en biochemie van organismen te combineren, zoals de werking van voedselwebben en het natuurlijke zelfreinigend vermogen, wordt gebouwd aan een levende technologie met een hoogwaardige uitkomst.

Dit rapport biedt een overzicht van het toegepast wetenschappelijke onderzoek dat uitgevoerd is tussen april 2016 en september 2017, waarin

getest is hoe we zo efficiënt mogelijk afvalwater kunnen inzetten als groeisubstraat voor diverse plant- en diersoorten die het water zuiveren en daarnaast interessant zijn voor de markt. Het onderzoek is opgebouwd uit:

- een uitgebreide literatuurstudie (kennismontage);
- laboratoriumexperimenten met individuele plant- en diersoorten;
- laboratoriumexperimenten met een cascadering (sequentiële combinatie van organismen).

In het theoretische deel van het onderzoek is uiteengezet welke plant- en diersoorten ingezet kunnen worden bij waterzuivering, en op welke manier zij het water potentieel zuiveren. Waterplanten kunnen grofweg ingedeeld worden in vier groeivormen: helofyten (gewortelde planten die boven het water uitsteken), gewortelde en niet-gewortelde drijvende waterplanten, en ondergedoken waterplanten. Uit literatuuronderzoek bleek dat helofyten en drijvende waterplanten de meeste nutriënten opnemen. Ondergedoken waterplanten bleken hierin achter te blijven, vooral door hun lage groeisnelheid. Deze groep planten kan in een cascade wel gebruikt worden als allerlaatste zuiveringsstap om de

laatste nutriënten uit het water op te nemen. Aquatische dieren kunnen in een ecosysteem ook ingedeeld worden in verschillende functionele groepen, gebaseerd op hun ontwikkelde voedselstrategie (zowel fysiek als gedragsmatig): knippers, verzamelaars, filtreerders, vergaarders en schrapers. Voor het verminderen van actief slib wordt verwacht dat vergaarders en knippers zich hierop het beste kunnen voeden, denk hierbij aan zoetwaterpissebedden, vlokreeften en wormen. Voor het nazuiveren van effluent zijn naar verwachting filtreerders zoals mosselen en sponzen het meest geschikt.

Uit het literatuuronderzoek kwam een *long list* met soorten die potentieel in Aquafarm ingezet kunnen worden. De soorten met de grootste potentie om afvalwater te zuiveren en tevens biomassa te produceren bij groei op afvalwater zijn op de *short list* beland en hiermee zijn laboratoriumexperimenten uitgevoerd op kleine schaal. Het bleek dat naast *Tubificidae* wormen – die het slib reduceerden met ongeveer 2 g ds (droge stof) slib/g ds worm in 28 dagen – ook vlokreeften (*Gammarus pulex*) en zoetwaterpissebedden (*Asellus aquaticus*) in staat te zijn om op slib te overleven en te groeien. Daarnaast

reducerden zij de hoeveelheid slib aanzienlijk, met ongeveer 5,5 g ds slib/g ds vlokreeft en 3,5 g ds slib/g ds zoetwaterpissebed in 28 dagen. De wormen hadden echter de hoogste biomassaproductie in vergelijking met de vlokreeften en zoetwaterpissebedden. Naast wormen, waarvan al bekend was dat zij veel potentie hebben om ingezet te worden voor slibafbraak, zijn nu twee extra soorten macrofauna (vlokreeften en zoetwaterpissebedden) ontdekt die een hoge slibreductie kunnen bewerkstelligen.

Laboratoriumexperimenten met grote kroosvaren (*Azolla filiculoides*) als modelorganisme lieten zien dat er zeer hoge biomassaproductie bewerkstelligd kan worden. Deze drijvende waterplant werd gekweekt op een verdunningsreeks van afvalwater. Hiervoor werd influent afkomstig uit de voorbezinktank gemengd met gedemineraliseerd water en er werd effluent uit de nabezinktank gemengd met gedemineraliseerd water, in verschillende verhoudingen (1:1, 1:2, 1:4). Er werd een zeer hoge biomassaproductie van 9,5 gram ds per m² per dag gevonden wanneer grote kroosvaren groeide op verdund influent (1:1). Dit komt overeen met ongeveer 35 ton ds per hectare per jaar. Potentieel is dit daarmee een veel

productiever systeem dan bijvoorbeeld snijmaïs (15 ton ds per hectare per jaar; CBS, 2016). Wanneer grote kroosvaren op verdund influent groeit kan 67 % van het opgelost fosfor uit het water verwijderd worden in 7 dagen (1,9 mg P/L) en wordt maximaal 225 kg P/ha/jaar (onder deze omstandigheden gelijk aan 0,45 kg P/m³/jr) teruggewonnen in de vorm van grote kroosvaren biomassa. Op puur effluent (afkomstig uit de nabezinktank) werd een lagere groeisnelheid gevonden (5,8 gram ds per m² per dag). Hoewel hierdoor minder fosfor uit het water verwijderd wordt en dus teruggewonnen kan worden in de vorm van grote kroosvaren biomassa (0,7 mg P/L), wordt er wel in relatieve zin meer fosfor verwijderd (79%), waardoor er schoner water als eindproduct uit een dergelijk systeem komt. Dit experiment is ondertussen opgeschaald naar een praktijkproef bij RWZI Dodewaard.

Na de individuele proeven met dieren en planten zijn we verder gegaan met het experimenteren met een cascadering om kennis op te doen over mogelijke complementaire zuivering door dier- en plantsoorten. Als modelorganismen voor de eerste Aquafarm cascade hebben we *Tubificidae* wormen en grote kroosvaren achter elkaar geschakeld. Er is

gekozen om water te zuiveren uit de beluchtingstank, met actief slibdeeltjes erin. Door verschillende behandelingen te gebruiken, konden we testen of *Tubificidae* wormen slibdeeltjes afbreken en grote kroosvaren het water zuivert door opgeloste nutriënten op te nemen. Dit experiment leverde *proof of principle*: wormen bleken zich met slib te voeden en reducerden de deeltjes ten opzichte van de controle-situatie met 26%. Met een dichtheid van 20 kg/m³ werd bijna 60 kg ds slib/m³/jr verwijderd. De biomassa van de wormen nam toe met 0,68 kg ds wormen per m³ per week, en het was een succes om de wormen op substraat te groeien waardoor ze gemakkelijk geoogst kunnen worden. De grote kroosvaren die achter de wormen geschakeld stond nam toe met ongeveer 26 ton ds ha/jr en door middel van biomassaproductie bleek 243 kg fosfor/ha/jr teruggewonnen te worden. Er vond geen vermindering van opgeloste nutriënten plaats, doordat een deel van de afgebroken slibdeeltjes vrijkwam als nutriënten. Hieruit kunnen we concluderen dat de verhouding van volumes van de compartimenten in dit cascaderingsexperiment nog geoptimaliseerd kan worden op een manier zodat er wel waterzuivering plaatsvindt. Daarnaast verwachten wij ook de biomassaproductie van zowel de

// ‘Het Aquafarm
principe werkt!’ //

Zuiveren met waarde

planten als wormen nog ruim te kunnen optimaliseren.

Na de eerste onderzoeksfase kunnen we dus concluderen dat het Aquafarm principe werkt! We zijn in staat om monoculturen van aquatische dieren en planten op afvalwater te laten groeien. Slibdeeltjes en nutriënten worden hierbij efficiënt uit het water onttrokken en er kan tegelijkertijd biomassa geoogst worden. Op deze manier zijn we in staat om nutriëntencycli te sluiten en bij te dragen aan de circulaire economie van afvalwater. Het toekomstige Aquafarm onderzoek zal zich richten op het inzetten van meerdere soorten organismen, welke positie zij in een cascade in kunnen nemen, en hoe we biomassa kunnen verwaarden. Het literatuuronderzoek laat zien dat de meest veelbelovende toepassingen zich richten op specifieke componenten van biomassa (zoals eiwitten en vetten), maar ook in relatief simpele toepassingen zoals groene meststoffen, visvoer, of lijmcoatings. Vooral deze relatief simpele toepassingen moeten mogelijkheden bieden om aansluiting te vinden in de markt voor biobased producten. Op dit moment experimenteren we met het ontwikkelen van een product uit kroos (*Lemna spp.*) in een praktijkproef, waarmee we in willen spelen op de marktvraag. Wat vaststaat

is dat in de toekomst uiteindelijk volledig cyclisch met afvalwater moet worden omgegaan. Aquafarm vertaalt dit idee naar praktische toepassing, en de eerste stap voor de cascade van Aquafarm is gemaakt. Verder onderzoek en praktijkervaringen moeten leiden tot verbeteringen en een succesvolle opschaling en verwaarding van Aquafarm. <<



Hoofdstuk 1: Inleiding

De kwaliteit van het Nederlandse oppervlaktewater staat onder druk [10]. Er is vaak sprake van een geringe biologische kwaliteit en de meeste wateren voldoen niet aan de Europese Kaderrichtlijn Water (KRW). In de KRW zijn op Europees niveau afspraken gemaakt die ervoor moeten zorgen dat uiterlijk in 2027 het water in alle Europese landen voldoende schoon (chemisch op orde) en gezond (ecologisch in evenwicht) is. Naast verontreiniging door onder andere industrie en landbouw, zijn lozingen door rioolwaterzuiveringsinstallaties (RWZI's) een grote bron van nutriënten voor oppervlaktewateren. Ondanks dat het afvalwater in RWZI's moet voldoen aan zuiveringseisen, bevat het nog hoge concentraties aan nutriënten, naast organische vervuilingen (zoals bestrijdingsmiddelen, medicijnresten, hormonen en afbraakproducten) en anorganische vervuilingen (zoals zware metalen). De concentraties van fosfor (P) en stikstof (N) zijn vaak dusdanig hoog dat deze in watersystemen voor (blauw)algenbloei kunnen zorgen [11]. De effluent-lozingseisen zijn bovendien niet gelijk aan de eisen binnen de Europese Kaderrichtlijn Water (KRW) voor de beken en rivieren waarin de lozing plaatsvindt (Informatiebox 1), wat voor problemen blijft zorgen in veel van

deze systemen, omdat het effluent een constante puntbron van vervuiling blijft.

In tegenstelling tot stikstof – dat via het Haber-Bosch proces met behulp van energie in de vorm van ammoniak geproduceerd kan worden en verwerkt tot kunstmest – is fosfor een niet-hernieuwbare hulpbron die alleen verkregen kan worden uit een gelimiteerd aantal fosformijnen. Hoewel niet precies bekend is wanneer deze bronnen uitgeput zullen zijn, is wel al zeker dat de bron van fosfor relatief snel eindig zal zijn [12]. In Nederland hebben we echter, net als in veel andere gebieden die dichtbevolkt zijn, te maken met een teveel aan fosfor in onze watersystemen. Daarom is het belangrijk om fosfor terug te winnen op een manier waarop het weer herbruikbaar is in de landbouw, bijvoorbeeld als meststof.

Het gebruik van planten en dieren voor de (na)zuivering van effluent om aan kwaliteitseisen te voldoen is al sinds lange tijd in beeld [13, 14]. Hierbij wordt de zelfreinigingscapaciteit van oppervlaktewater benut (Figuur 1). Zelfreiniging is het natuurlijke proces waarmee oppervlaktewateren ondanks belasting met stoffen, zoals nutriënten en organisch materiaal, hun oorspronkelijke status

Informatiebox 1: Lozingsnormen RWZI en Kaderrichtlijn Water (KRW).

Een traditionele waterzuivering (2000-100.000 inwonersequivalenten) mag effluent lozen als de totale fosfor (P-totaal) waarde minder dan 2 mg/L (65 µmol/L) is, en de totale stikstof (N-totaal) waarde minder dan 15 mg/L (1,1 mmol/L) is. De gemiddelde waterkwaliteit van het effluent van waterschap Rivierenland is voor P-totaal $0,8 \pm 1,0$ (SD) mg/L en voor N-totaal $6,2 \pm 2,7$ (SD) mg/L.* Dit is dus ruim onder de lozingsnorm. Als we dit echter vergelijken met de Europese Kaderrichtlijn Water (KRW) normen voor rivieren en beken waarin lozing van het effluent dagelijks plaatsvindt, zien we dat de kwaliteit voor **N-totaal matig** is (4-8 mg/L) en voor **P-totaal zeer slecht** (> 0,42 mg/L). Ondanks dat het geloosde effluent wordt verdund in het oppervlaktewater, spelen de RWZI's als puntbron van vervuiling een belangrijk factor in het verslechteren van de waterkwaliteit [7].

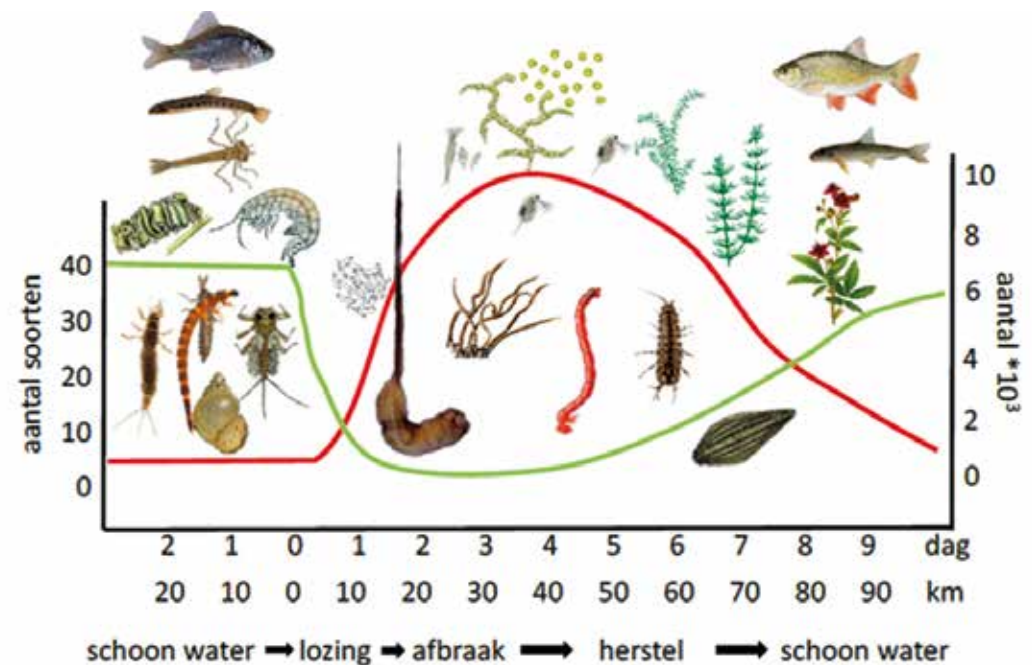
* Dit betreft gemiddelde waarden van de RWZI's van waterschap Rivierenland in de periode januari 2015 tot en met april 2016.

behouden door fysische, chemische en biologische processen [15]. Dit proces van natuurlijke zuivering werd al in het begin van de vorige eeuw herkend en gebruikt in de beoordeling van de waterkwaliteit [16]. Later werd dit inzicht actief toegepast met de introductie van rioolwaterzuiveringsinstallaties [17], helofytenfilters [18, 19], wilgenfilters [20] en recent bijvoorbeeld de waterharmonica [21]. In deze systemen wordt water gezuiverd met organismen. Deze systemen hebben echter veel ruimte nodig, er wordt vaak geen biomassa geoogst, en de nutriëntverwijdering is niet optimaal. Zo wordt in waterharmonica's bijvoorbeeld een brede range van P-verwijdering gevonden, variërend van 40 % afname tot 40 % toename in fosfor [21].

Onderzoek naar de aanwezigheid van hoogwaardige stoffen in planten en dieren heeft, net als het onderzoek naar waterzuivering, al een lange geschiedenis. Dit geldt ook voor het gebruik van planten en dieren voor de productie van deze stoffen. Er is echter, zover ons bekend, zo goed als geen onderzoek gedaan naar het produceren van hoogwaardige stoffen in planten en dieren in de rioolwaterzuivering, alleen naar

Figuur 1: Zelfreiniging in natuurlijke watersystemen.

Het aantal individuen is aangegeven met de rode lijn en aantal soorten met de groene lijn. Wanneer een lozing plaatsvindt, neemt het aantal soorten af terwijl het aantal individuen van de soorten die overblijven toeneemt. Elke groep individuen vervult een specifieke taak in een systeem door hun leef- en voedingswijze, en op deze manier stabiliseert het systeem (binnen bepaalde grenzen) weer terwijl het water gezuiverd wordt.



biomassaproductie. Aquafarm bundelt kennis uit natuurlijke waterzuivering, ecotechnologische waterzuivering en plantaardige en dierlijke productie. Deze kennis wordt op innovatieve wijze gebruikt voor de ontwikkeling van een Aquafarm module bestaande uit verschillende compartimenten waarin individuele soorten planten of dieren onder maximale groeicondities worden gebracht. Deze compartimenten worden zodanig geschakeld dat de organismen in ieder compartiment profiteren van de zuiveringsstap in het voorafgaande compartiment en floreren in hun omgeving. Zo ontstaat een cascade waarin elk compartiment waardevolle producten levert en water zuivert. Hiermee kunnen verschillende planten en dieren complementair zuiveren, en wordt afvalwater gevaloriseerd op een hoogwaardige wijze.

Doel

Het in dit rapport beschreven onderzoek richt zich op het verkrijgen van een overzicht van kennis van natuurlijk (na)zuiveren van afvalwater met zowel aquatische planten als dieren, en de mogelijkheden om gelijktijdig hoogwaardige stoffen te produceren. We verwachten dat het natuurlijk zelfreinigingsproces nagebootst kan worden in een

aaneenschakeling van stappen uit de zuiverende voedselketen, dat ieder van deze stappen kan worden gemaximaliseerd en dat er per stap hoogwaardige stoffen of producten kunnen worden geproduceerd.

Vanuit een theoretisch kader is verder gebouwd naar een praktische invulling. In een literatuurstudie is onderzocht welke planten en dieren potentieel geschikt zijn om een rol in de zuiveringsketen te spelen. Vervolgens is gekeken naar de eisen die deze soorten stellen aan hun milieu en wat hun functionele rol is in natuurlijke watersystemen (m.n. op welke wijze ze bijdragen aan waterzuivering). Daarnaast zijn soorten geselecteerd op hun groeisnelheden, met het oog op het verwaarden van biomassa productie, en is gekwantificeerd in laboratoriumexperimenten hoe snel deze soorten groeien en in welke mate water gezuiverd wordt bij groei op verschillende typen afvalwater. Daarnaast is verkennend onderzoek gedaan naar mogelijke toepassingen en kansen in biomassaverwaarding van deze soorten. Ten slotte hebben we getest of geselecteerde modelorganismen, indien aan elkaar geschakeld, complementair kunnen zuiveren.



// ‘Aquafarm bundelt kennis uit natuurlijke waterzuivering, ecotechnologische waterzuivering en plantaardige en dierlijke productie.’ //

De natuur nabootsen



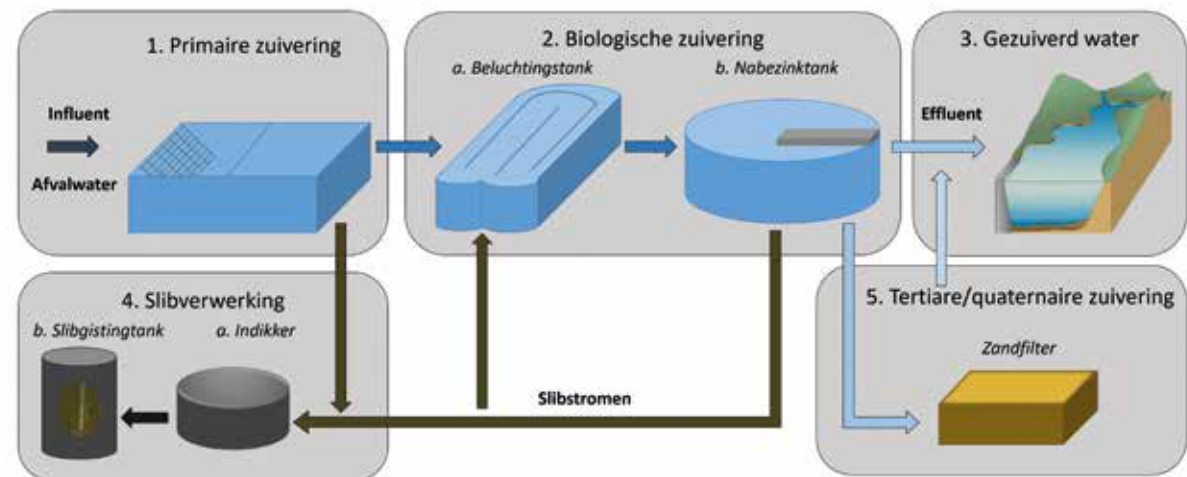
Hoofdstuk 2: Het Aquafarm Principe

De rioolwaterzuiveringsinstallatie

Huishoudelijk afvalwater wordt in Nederland gezuiverd in twee trappen: mechanische en biologische waterzuivering. Met behulp van mechanische zuivering (primaire zuivering) worden grove delen uit het water verwijderd (Figuur 2, 1). Allereerst passeert het afvalwater een fijn rooster dat de grootste delen zoals papier of plastic verwijdert, waarna het water naar een voorbezinktank gaat. Hier worden zware deeltjes verwijderd door middel van bezinking [22].

Na het scheiden van (groe) vaste stoffen uit het afvalwater gaat het water naar de beluchtingstank (de biologische en secundaire zuiveringstrap; (Figuur 2, 2a). In de beluchtingstank wordt het water gemengd met actief slib, wat bestaat uit vlokken met een slijmerige grondstof waarin bacteriën en ook andere micro-organismen leven. Afvalstoffen, opgeloste nutriënten (fosfor en stikstof) en organisch materiaal worden door het actief slib opgenomen en op deze manier uit het water verwijderd. Doordat het water afwisselend belucht wordt vindt er gekoppelde nitrificatie en denitrificatie plaats waarbij stikstof uit het systeem wordt verwijderd [Informatiebox 2] [23].

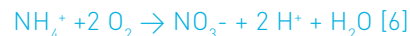
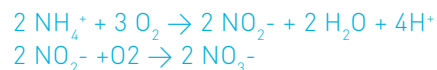
Figuur 2: Schematische weergave van een traditionele rioolwaterzuiveringsinstallatie.



Informatiebox 2: Stikstofverwijdering

Nitrificatie:

Tijdens de nitrificatie (ammonium-oxidatie) wordt ammonium in twee stappen omgezet in nitraat. Verantwoordelijk voor dit proces zijn een groot aantal bacterie- en archaea-soorten die eerst ammonium tot nitriet omzetten, dat vervolgens verder geoxideerd wordt tot nitraat. Voor een goede nitrificatie dient een zuurstofgehalte van tenminste 1,5-2,0 mg/l in de beluchtingszone te worden aangehouden [3].



Denitrificatie:

Bij het denitrificatieproces wordt nitraat omgezet in stikstofgas (N₂) of lachgas (N₂O). In afwezigheid van zuurstof, onder anoxische omstandigheden, kan nitraat als terminale elektronacceptor worden gebruikt voor de oxidatie van organische stof [3].



Anammox:

Bij anaerobe ammoniumoxidatie (anammox) wordt ammonium met nitriet in afwezigheid van zuurstof omgezet in stikstofgas [8].



Nadat het afvalwater biologisch gezuiverd is in de beluchtingstank gaat het naar de nabezinktank (Figuur 2, 2b). In deze tank wordt het actief slib van het water gescheiden door middel van bezinking. Het gezuiverde water wordt vanuit hier geloosd in een natuurlijk watersysteem zoals een sloot of rivier (Figuur 2, 3). Een deel van het actief slib dat bezonken is wordt hergebruikt, het overige deel gaat naar een 'slibindikker' waar zoveel mogelijk water uit het slib wordt gehaald (Figuur 2, 4a). Het ingedikte slib wordt vervolgens naar de slibgistingstanks (Figuur 2, 4b) vervoerd, waar bacteriën bij ongeveer 35 graden het organische afval omzetten in biogas (natuurlijk gistingproces). Het geproduceerde gas kan door de RWZI's gebruikt worden voor eigen energievoorziening, het uitgegiste slib wordt tegen kosten afgevoerd.

Als de eerste 2 trappen niet voldoende zuiveren om aan de lozingsnormen te voldoen, dan vindt er nog een tertiaire zuivering (derde trap) en soms zelfs een quaternaire zuivering plaats (vierde trap). Het water kan door een zandfilter worden geleid, of er kan overgegaan worden op chemische zuivering (Figuur 2, 5). Door ijzer- of aluminiumchloride toe te

voegen kan bijvoorbeeld extra fosfaat verwijderd worden [24]. Een vierde trap om effluent na te zuiveren kan ook bestaan uit een zuiveringsmoeras.

Zuiveringsmoerassen

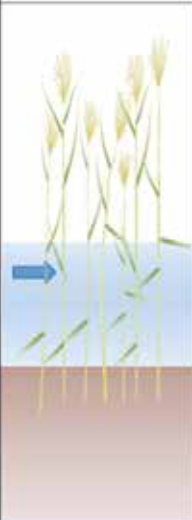
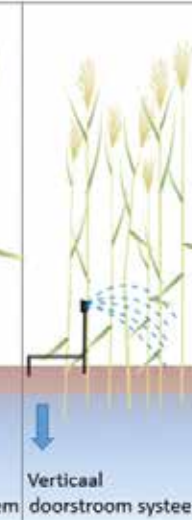
In zuiveringsmoerassen worden planten ingezet om afvalwater te zuiveren (*fyto-remediatie*). De planten dragen bij aan nutriëntverwijdering, vooral van fosfor en stikstof. Deze nutriënten worden direct opgenomen door de planten in de vorm van fosfaat (PO₄³⁻), ammonium (NH₄⁺) en nitraat (NO₃⁻). Er zijn door de jaren heen veel verschillende zuiveringsmoerassen ontwikkeld, waarin verschillende waterplanten kunnen worden ingezet (Informatiebox 3). Er kunnen basaal vier verschillende groeivormen van waterplanten onderscheiden worden: planten die in de bodem wortelen maar met stengel en bladeren boven het water uitsteken (helofyten), ondergedoken planten (met of zonder wortels), gewortelde drijvende planten, en niet-gewortelde drijvende waterplanten. Naast het type zuiverende moerasfilter (zie informatiebox 3) is ook het klimaat bepalend voor de keuze van de in te zetten waterplanten in zuiveringsmoerassen, in verband met hun optimale groeitemperatuur.

Nutriëntverwijdering door planten

Nutriënten worden direct door planten verwijderd doordat ze groeien en stoffen opnemen. Een andere manier van nutriëntverwijdering wordt indirect door planten gemedieerd. Deze indirecte processen komen tot stand door de interactie van planten met hun omgeving [25]. Zo heeft de omgeving van de plantenwortels (*de rhizosfeer*) vaak plaatselijk een verhoogde zuurstofconcentratie, veroorzaakt door het verlies van zuurstof vanuit de wortels. Hierdoor kunnen bacteriën en archaea die afhankelijk zijn van zuurstof voor hun metabolisme hier groeien en stoffen opnemen en omzetten. Voorbeelden hiervan zijn verhoogde nitrificatieactiviteit en verhoogde afbraak van organische verbindingen (decompositie). Hoewel waterplanten overdag de zuurstofconcentratie in het water kunnen verhogen, zijn ze ook in staat om deze juist te verlagen, waardoor een zuurstofgradiënt ontstaat en er gekoppeld nitrificatie en denitrificatie plaats kan vinden. Drijvende waterplanten vormen bijvoorbeeld een barrière tussen water en de lucht, waardoor er minder zuurstof het water in kan diffunderen. Door denitrificatie (en anammox) wordt stikstof uit het aquatische

Informatiebox 3: Zuiveringsmoerassen en moerasplanten.

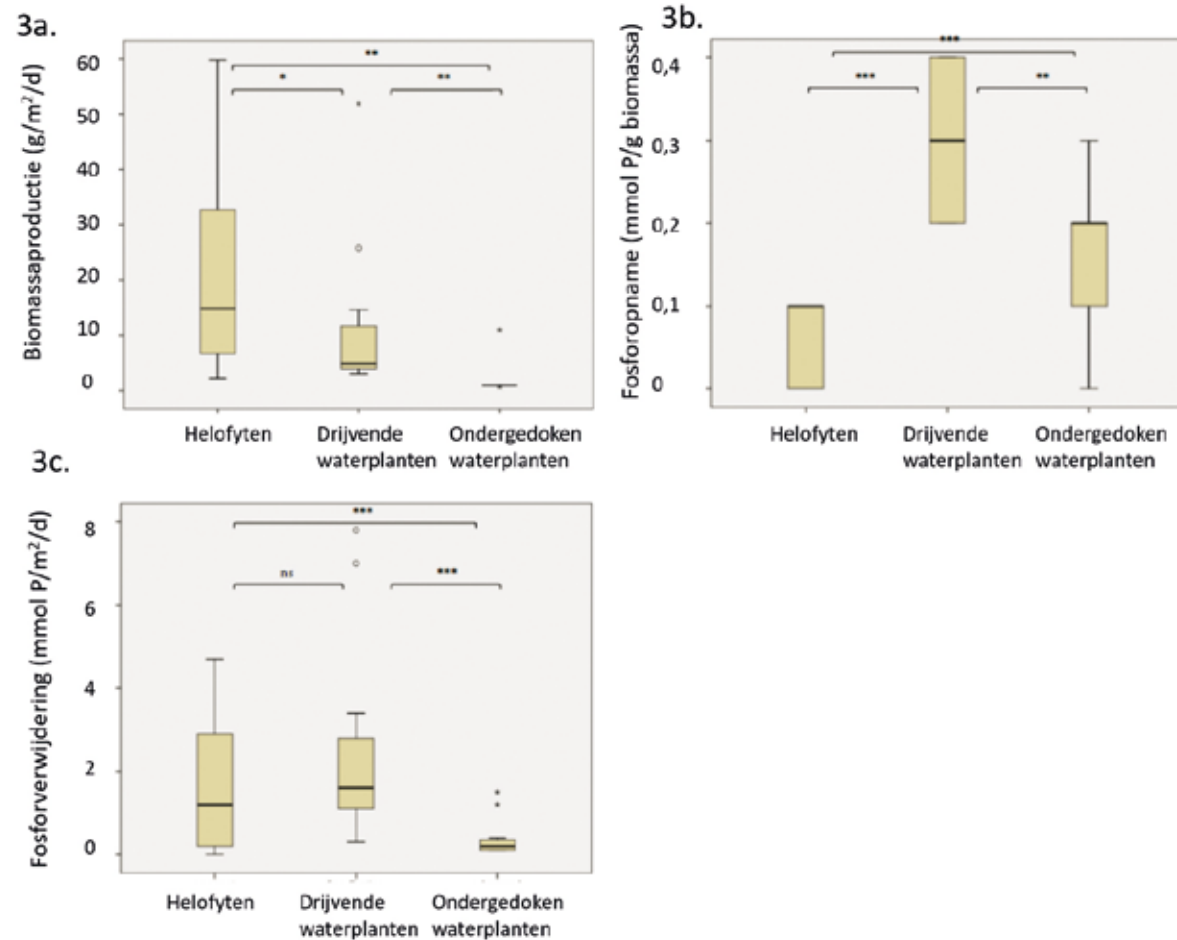
Er wordt onderscheid gemaakt tussen verschillende soorten zuiverende moerasfilters op basis van hydrologie en de stroomrichting van het water [2]. Het waterpeil kan boven het bodemoppervlak liggen, dit wordt in de Engelstalige vakliteratuur een *free water surface constructed wetland* genoemd, of het waterpeil kan onder het bodem oppervlak liggen. In dit laatste geval wordt zo'n moerasfilter een *subsurface constructed wetland* genoemd. Door dit type moerasfilter kan het water zowel verticaal als horizontaal geleid worden, waardoor nutriënten makkelijker via de helofytenwortels opgenomen kunnen worden en beter binden in de bodem. In de figuur hieronder is te zien welke soort waterplant in welk type systeem ingezet kan worden.

Moerasfilter met het water boven het bodem oppervlak (<i>free water surface constructed wetland</i>)				Moerasfilter met het water onder het bodem oppervlak (<i>subsurface constructed wetland</i>)	
					
Helofyt	Ondergedoken waterplant	Drijvende waterplant	Gewortelde drijvende waterplant	Helofyt	Helofyt

systeem verwijderd, in aanvulling op de stikstofopname door organismen. Fysiek zorgen de plantenwortels ook voor een verhoogde groei van micro-organismen, doordat het wortelsysteem als een aanhechtingsplek functioneert. Daarnaast verminderen (met name drijvende) waterplanten de hoeveelheid licht in de waterkolom, wat voorkomt dat er algen en cyanobacteriën ('blauwalgen', waaronder toxische soorten) in de waterlaag gaan domineren.

Om te screenen welke waterplanten het best ingezet kunnen worden in Aquafarm is de wetenschappelijke literatuur systematisch doorzocht en hebben we ons verdiept in de rol van verschillende groeivormen van planten (helofyten, ondergedoken, en niet-gewortelde drijvende waterplanten) bij de directe nutriëntverwijdering. Uit het literatuuronderzoek bleek dat helofyten (zoals riet en lisdodde) het grootste bereik in groeisnelheid laten zien en significant sneller groeien dan drijvende en ondergedoken waterplanten (Figuur 3a). Daaropvolgend groeien drijvende waterplanten het hardst, gevolgd door ondergedoken waterplanten, die relatief langzaam groeien. Bij drijvende waterplanten moet onder andere gedacht worden aan diverse kroossoorten en kroosvaren,

Figuur 3: Biomassaproductie en fosforopname bij diverse soorten waterplanten. Sterretjes geven significante verschillen aan (* $P < 0.1$; ** $P < 0.05$; *** $P < 0.01$; ns = niet significant) [4].



en bij ondergedoken waterplanten aan bijvoorbeeld aarvederkruid en grof hoornblad. Een uitgebreid overzicht van alle planten in dit literatuuronderzoek en de wijze waarop de studieselectie plaatsvond, is te vinden in bijlage 1.

Vervolgens is in dit literatuuronderzoek gekeken naar de concentratie fosfor in de plant, om te onderzoeken hoe theoretisch het meeste fosfor teruggewonnen kan worden. Dan zien we dat drijvende waterplanten de hoogste fosforopname hebben per gram biomassa, gevolgd door ondergedoken waterplanten en helofyten (Figuur 3b). Wanneer we de biomassaproductie en fosfor-opname beide in beschouwing nemen, kan geconcludeerd worden dat er geen verschillen zijn in het terugwinnen van fosfor tussen helofyten en drijvende waterplanten. Dit komt doordat helofyten weliswaar een hogere groeisnelheid laten zien, maar drijvende waterplanten meer fosfor accumuleren in hun biomassa. Per saldo (concentratie x productie) is er geen verschil tussen beide groepen planten (Figuur 3c). Ondergedoken waterplanten blijven echter achter met betrekking tot de hoeveelheid fosfor die teruggewonnen kan worden, voornamelijk door hun lagere

groeisnelheid. Deze planten kunnen alleen als allerlaatste stap ingezet worden in water met redelijk lage fosforconcentraties om water na te zuiveren. Tang et al [36] lieten zien dat dit geldt voor een fosforbelasting lager dan 0,43 mg P/m²/d. Dit wordt ook wel *effluent polishing* genoemd.

Nutriëntverwijdering door dieren

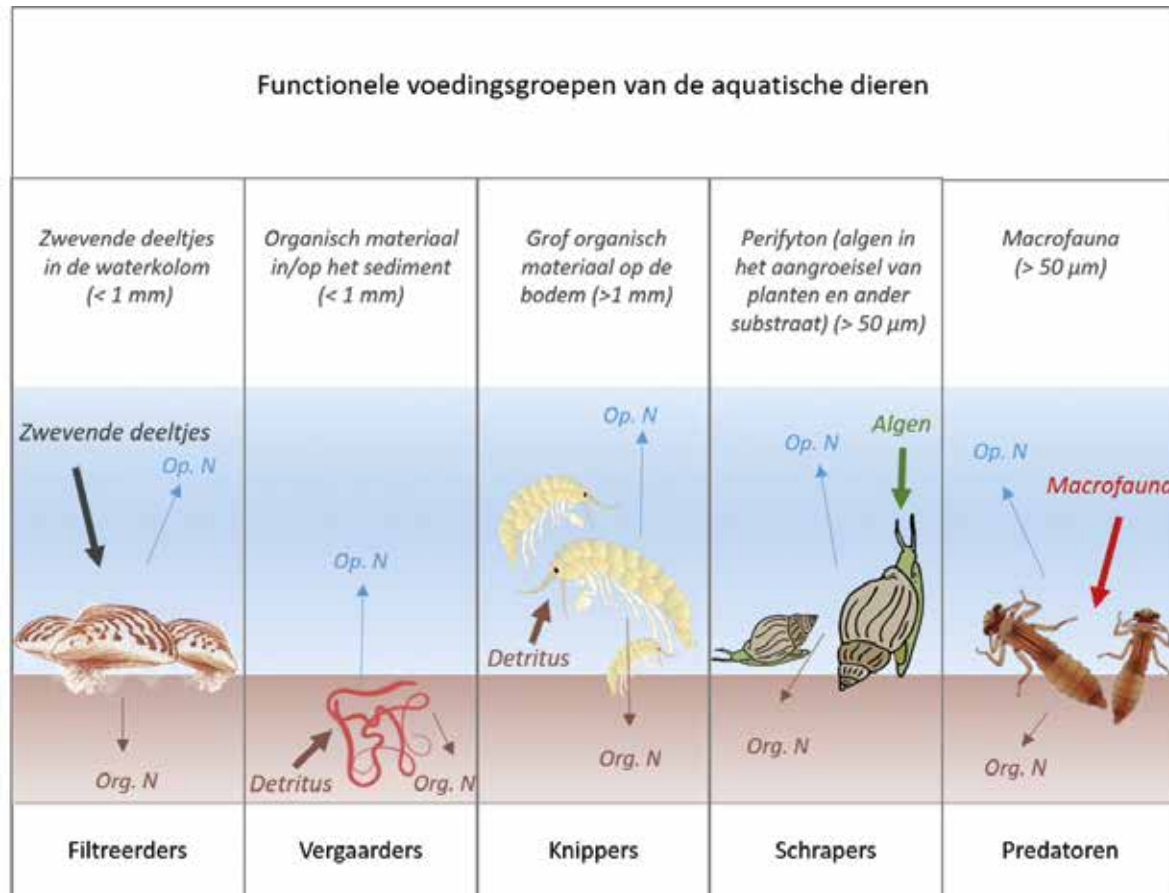
Naast planten kunnen ook aquatische dieren gebruikt worden om nutriënten te verwijderen en vervuilende stoffen af te breken (*zooremediation*). Ondanks dat er in zuiveringsmoerassen ook in kleine hoeveelheden dieren voorkomen, worden dieren zelden op grote schaal ingezet om effluent na te zuiveren. Veel aquatische dieren, met name *macrofauna*, hebben een eenvoudige levenscyclus en vertonen vaak een hoge resistentie tegen stressors zoals (organische) vervuiling en lage zuurstofconcentraties. Daarnaast kunnen veel macrofaunasoorten economische erg interessant zijn als men ze oogst [26].

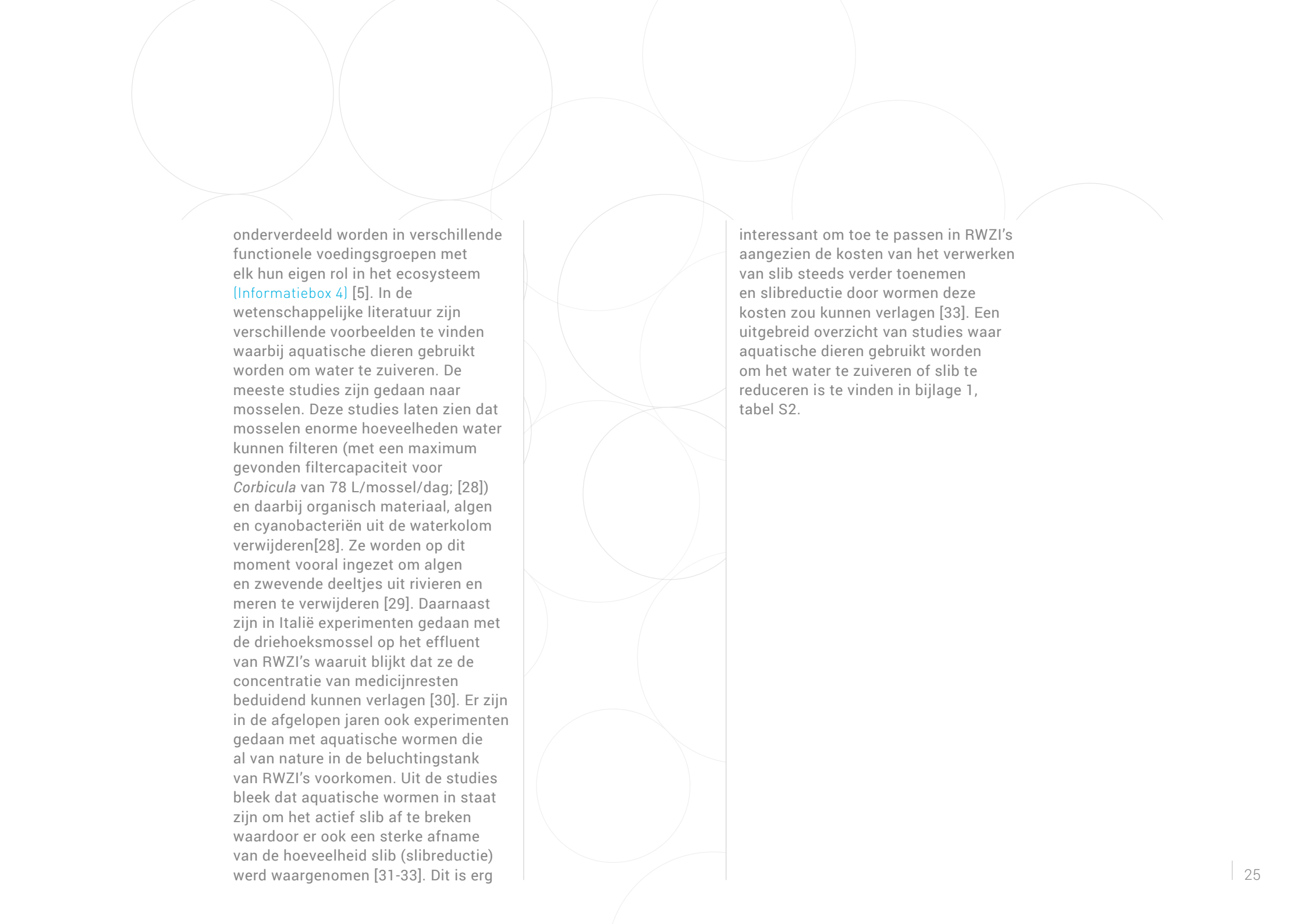
Aquatische dieren nemen kleine deeltjes uit het water op als voedsel. De nutriënten in deze deeltjes worden omgezet in biomassa waardoor de dieren groeien, of uitgescheiden via *excretie* (opgeloste nutriënten) of als feces (organische nutriënten) [27].

De feces van de dieren bestaat uit onverteerd voedsel en kan vervolgens, door vergroting van het oppervlak, makkelijker worden afgebroken door micro-organismen. Hierdoor worden deze organische deeltjes omgezet in opgeloste nutriënten, die vervolgens opgenomen kunnen worden door algen en waterplanten. De nutriënten die via excretie worden uitgescheiden zijn geassimileerd in het lichaam van het organisme en worden direct als opgeloste nutriënten uitgescheiden [27]. Hierbij kunnen de opgeloste nutriënten (fosfor en stikstof) vervolgens worden opgenomen door algen en waterplanten en via deze route uit het water verwijderd worden (zie 'Nutriëntverwijdering door planten'). Daarnaast hebben aquatische dieren ook nog een indirecte rol in de nutriëntencyclus door bioturbatie. Hierbij wordt het sediment op de bodem omgewoeld doordat bentische macrofauna zich ingraaft om in de bodem te zoeken naar voedsel. Hierdoor komt er meer zuurstof in de bodem, waardoor bijvoorbeeld fosfaat gebonden kan worden aan ijzer(hydr)oxiden, maar ook de decompositie en nitrificatie toeneemt. Niet alle dieren eten hetzelfde organisch materiaal dat in het water aanwezig is. Zo kunnen de dieren

Informatiebox 4: De functionele voedselgroepen van de macrofauna.

De macrofauna in aquatische systemen kan ingedeeld worden in 5 functionele voedselgroepen die gebaseerd zijn op hun ontwikkelde voedselstrategie (zowel fysiek als gedragsmatig) [5]. De knippers (shredders) eten voornamelijk grof organisch materiaal zoals planten en bladeren waar micro-organismen op groeien. De verzamelaars (collectors) voeden zich met wat kleiner organisch materiaal op de bodem in de waterkolom waaronder algen en organisch detritus. Deze groep kan ingedeeld worden in de filtreerders (filtering collectors) die zwevende deeltjes uit de waterkolom eten, en de vergaarders (gathering collectors) die zich voeden met deeltjes op de bodem. De macrofauna die bij de schrapers (scrapers) hoort voeden zich voornamelijk met algen en bacteriën die groeien op planten, op stenen of op ander substraat onder water (perifyton). En ten slotte zijn er nog de predatoren, die andere levende aquatische dieren eten. In de figuur hieronder zijn deze functionele voedselgroepen te zien met het voedsel dat ze eten en het uitscheiden van opgeloste nutriënten (Op. N.) en organische nutriënten (Org. N.).





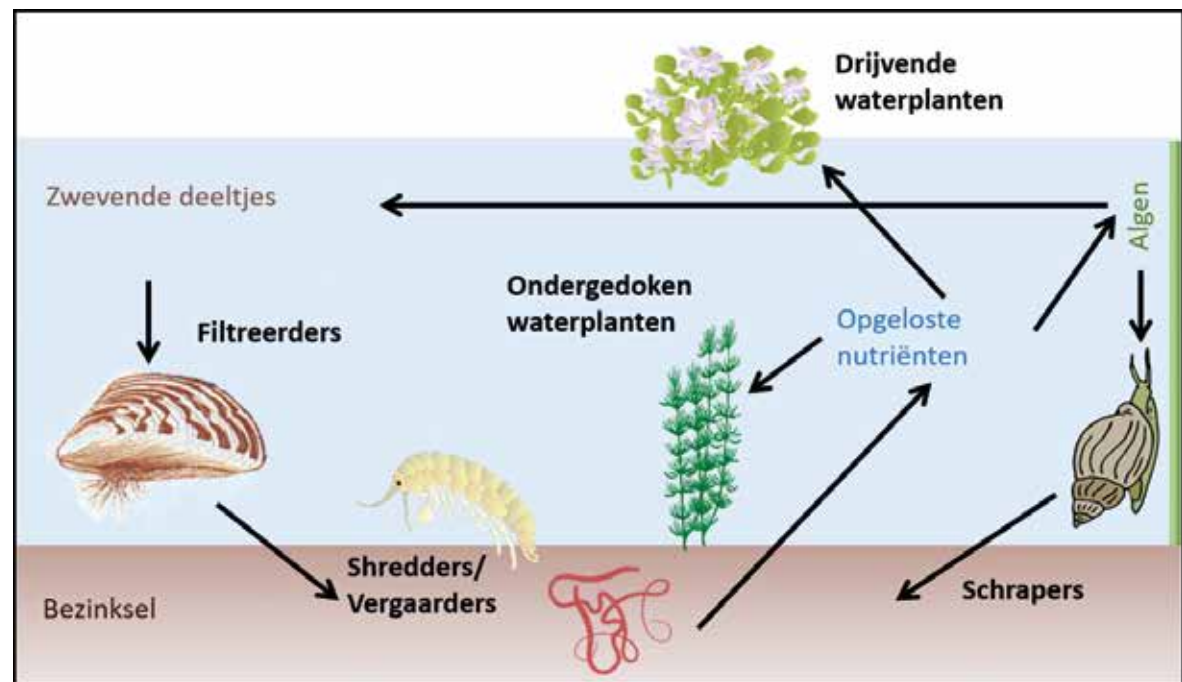
onderverdeeld worden in verschillende functionele voedingsgroepen met elk hun eigen rol in het ecosysteem (Informatiebox 4) [5]. In de wetenschappelijke literatuur zijn verschillende voorbeelden te vinden waarbij aquatische dieren gebruikt worden om water te zuiveren. De meeste studies zijn gedaan naar mosselen. Deze studies laten zien dat mosselen enorme hoeveelheden water kunnen filteren (met een maximum gevonden filtercapaciteit voor *Corbicula* van 78 L/mossel/dag; [28]) en daarbij organisch materiaal, algen en cyanobacteriën uit de waterkolom verwijderen[28]. Ze worden op dit moment vooral ingezet om algen en zwevende deeltjes uit rivieren en meren te verwijderen [29]. Daarnaast zijn in Italië experimenten gedaan met de driehoeksmossel op het effluent van RWZI's waaruit blijkt dat ze de concentratie van medicijnresten beduidend kunnen verlagen [30]. Er zijn in de afgelopen jaren ook experimenten gedaan met aquatische wormen die al van nature in de beluchtingstank van RWZI's voorkomen. Uit de studies bleek dat aquatische wormen in staat zijn om het actief slib af te breken waardoor er ook een sterke afname van de hoeveelheid slib (slibreductie) werd waargenomen [31-33]. Dit is erg

interessant om toe te passen in RWZI's aangezien de kosten van het verwerken van slib steeds verder toenemen en slibreductie door wormen deze kosten zou kunnen verlagen [33]. Een uitgebreid overzicht van studies waar aquatische dieren gebruikt worden om het water te zuiveren of slib te reduceren is te vinden in bijlage 1, tabel S2.

Het Aquafarm principe

Het Aquafarm principe wil complementaire waterzuivering en biomassaproductie realiseren door het groeien van planten en dieren op afvalwater. Er dient een hoge biomassaproductie gerealiseerd te worden waardoor de organismen continu geoogst kunnen worden. De kennis opgedaan in het literatuuronderzoek over planten en dieren vormde een basis voor het verder uitwerken van de experimenten met dit principe. In de natuur worden nutriënten die in resten van planten en dieren zitten en die opgelost in het watersysteem terechtkomen continu door allerlei organismen als voedsel gebruikt. Elk organisme heeft hierbij dus zijn eigen rol en alle organismen samen vullen elkaar ook aan en vormen een ecosysteem zoals te zien is in figuur 4. Wat voor het ene organisme een afvalproduct is, kan door het andere organisme weer gebruikt worden als voedingsbron, waardoor er in de natuur zelfreiniging plaatsvindt.

Figuur 4: De rol van planten en dieren in een ecosysteem met betrekking tot het voedselweb.



Al het afvalwater dat geproduceerd wordt direct in natuurlijke ecosystemen zuiveren met behulp van het zelfreinigingsproces is niet haalbaar, omdat dit niet afdoende is, de ecosysteemkwaliteit tijdelijk te sterk aantast, het tijdrovend is en te veel oppervlakte vraagt. Daarnaast is het moeilijk om hierbij gericht waardevolle stoffen (zoals fosfor) uit het water te onttrekken. De geplande innovatie van Aquafarm bevindt zich in de juiste keuze van organismen die in monoculturen gekweekt worden en tegelijkertijd een deel van het water zuiveren, er gericht stoffen uit onttrekken, en waardevolle biomassa produceren (Figuur 5). Door monoculturen van organismen aaneen te schakelen verwachten we veel meer te kunnen zuiveren dan op dit moment gebeurt in reeds aangelegde zuiveringsmoerassen en tegelijk waardevolle stoffen te produceren. <<

Figuur 5: De rol van planten en dieren in Aquafarm.





Hoofdstuk 3: Praktijkonderzoek

Laboratoriumexperiment met dieren

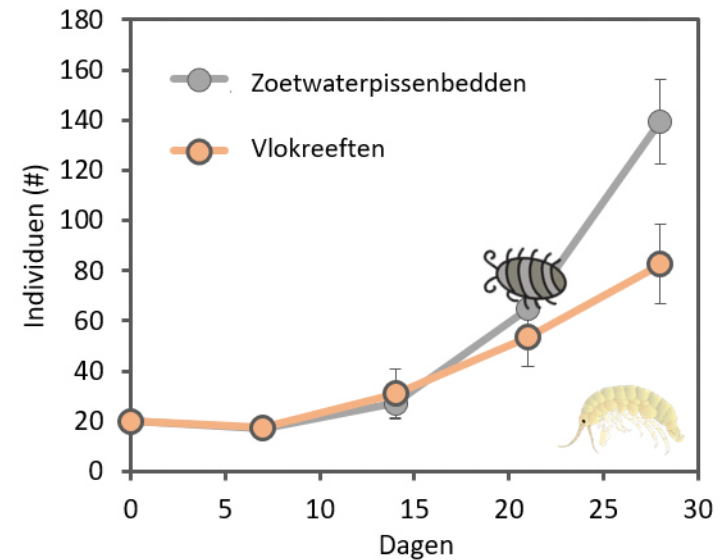
Uit het voorgaande literatuuronderzoek is gebleken dat verschillende functionele macrofauna voedingsgroepen elk een eigen rol kunnen hebben in Aquafarm. We hebben gekozen om te beginnen met het laten groeien van macrofauna in water met actief slib uit de beluchtingstank (zie figuur 1). In RWZI's worden grote hoeveelheden slib geproduceerd waarvan de verwerkingskosten erg hoog zijn. Het reduceren van het zuiveringsslib (na het zuiveringsproces) door aquatische dieren is een mogelijke oplossing om de kosten te verminderen. Daarnaast wordt het slib omgezet in eiwitrijke biomassa die veel waarde heeft en economisch voordelig is. Aangezien actief slibvlokken nog redelijk groot zijn, zullen vooral de vergaarders/knippers zich hier het beste op kunnen voeden. Er is al veel onderzoek gedaan naar de afbraak van slib door aquatische wormen. Zo is er eerder in Nederland op een waterzuivering geëxperimenteerd met een wormenreactor met de vrij zwemmende worm *Aulophorus furcatus* [33] en is er ook veel onderzoek gedaan naar de worm *Lumbriculus variegatus* [31]. Echter, behalve naar wormen is er nog weinig onderzoek gedaan naar andere aquatische dieren die gebruikt

kunnen worden om het slib af te breken in een RWZI.

Laboratoriumexperiment met 3 soorten dieren

In een laboratoriumexperiment hebben we onderzocht welke aquatische dieren potentie hebben om op actief slib van een RWZI te groeien. Hierbij is gekeken naar groei, overleving en voortplanting, maar ook naar het vermogen om tegelijkertijd het slib af te breken en te verminderen. Naast *Tubificidae* wormen, hebben we geëxperimenteerd met zoetwaterpissebedden (*Asellus aquaticus*) en vlokreeften (*Gammarus pulex*). De belangrijkste kenmerken van deze soorten en ook de mogelijke toepassingen na het oogsten ervan worden weergegeven in de bijlage 5 (Tabel S4). Voor dit experiment is slib (3,5 g ds/L in 0,5 L aquaria, 5 replica's) uit de beluchtingstank van de RWZI in Bennekom gebruikt. De startdichtheden van de organismen waren gemiddeld ($\pm$ SD) 0.22 g ds/L (± 0.03) voor zoetwaterpissebedden, 0.20 g ds/L (± 0.01) voor vlokreeften en 0.87 g ds (± 0.01) voor de wormen. Het experiment duurde in totaal 4 weken en het experiment is uitgevoerd in aquaria met een constante beluchting met een minimum zuurstofconcentratie van 5 mg/L in een klimaatcel van 18°C.

Figuur 6: De toename in het aantal individuen van zoetwaterpissebedden en vlokreeften tijdens het experiment (gemiddelden $\pm$ STD).



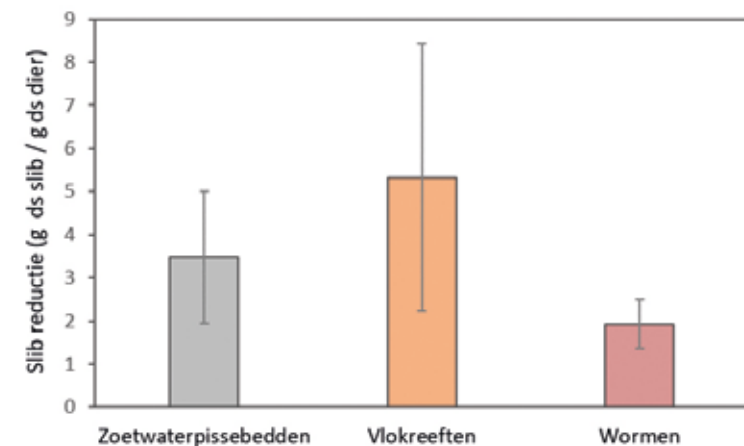
In de experimenten viel op dat zowel de zoetwaterpissebedden als de vlokreeften in staat waren om een maand te overleven op het slib en zich daarnaast ook konden voortplanten. Aan de start van het experiment werden 20 volwassen individuen ingezet voor beide soorten. Na 4 weken telden we voor zoetwaterpissebedden in gemiddeld 140 individuen per aquarium en van vlokreeften gemiddeld meer dan 80 individuen, zoals weergegeven in figuur 6. Het grootste gedeelte hiervan waren nakomelingen. Naast dat er reproductie plaatvond, was er ook sprake van een toename in gewicht van de 20 individuen waarmee het experiment begon. Dit betekent dat zowel zoetwaterpissebedden als vlokreeften in staat zijn om op actief slibvlokken toe te nemen in biomassa en zichzelf voort te planten. Voor de aquatische wormen vonden we een hoogste toename in de biomassa door de tijd, van maximaal 1.5% per dag. Dit valt binnen de range met wat er in een andere studie met de worm *Lumbriculus variegatus* is gerapporteerd, echter is daar ook duidelijk te zien dat de groeisnelheid afhankelijk is van de dichtheid van de wormen [34]. In het vervolg experiment hebben we daarom ook

specifiek gekeken naar het effect van wormendichtheid op de groeisnelheid (zie 'Laboratoriumexperiment met verschillende dichtheden wormen').

Ten slotte waren we natuurlijk niet alleen geïnteresseerd in de groei van de dieren, maar ook in hoe snel ze het slib afbreken. Verrassend genoeg vonden we niet dat de wormen de hoogste slibafbraak hadden, maar dat per gram biomassa de zoetwaterpissebedden en vlokreeften een twee- tot driemaal hogere slib verwijdering hebben (Figuur 7). In vergelijking met het natuurlijke voedsel van zoetwaterpissebedden en vlokreeften (o.a. bladeren in water systemen) zagen we zelfs dat deze soorten een hogere voedselconversie hebben op het slib [35].

Uit dit experiment blijkt dat niet alleen wormen in staat zijn om in actief slib van RWZI's te overleven en te groeien, maar dat zoetwaterpissebedden en vlokreeften hier, tenminste op laboratoriumschaal, ook toe in staat zijn. Naast wormen hebben we nu nog twee andere soorten (zoetwaterpissebedden en vlokreeften) gevonden die een hoge slibreductie kunnen bewerkstelligen. In de toekomst zou het dan ook erg interessant zijn om deze soorten op te nemen in het Aquafarm onderzoek.

Figuur 7: Cumulatieve slibafbraak door zoetwaterpissebedden, vlokreeften en aquatische wormen (duur: 28 dagen). Voor de berekening van de slibreductie (gemiddelden $\pm$ SD), zie bijlage 3.



Laboratoriumexperiment met verschillende dichtheden wormen

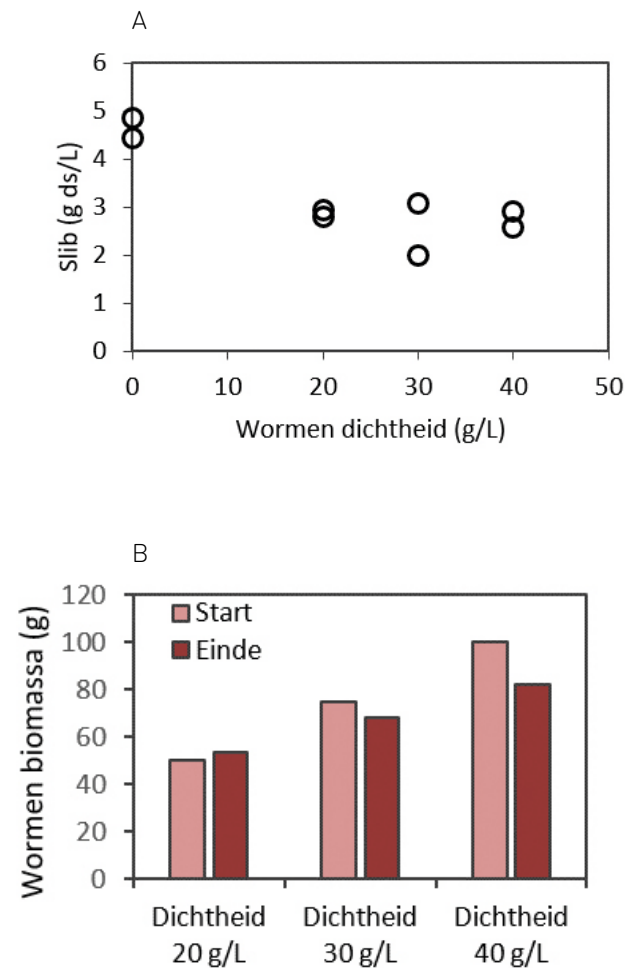
Als vervolgstudie op de hoge biomassaproductie van wormen, zijn we verdergegaan met een laboratoriumexperiment om te kijken naar het effect van de wormendichtheid op de wormenbiomassa toename en slibreductie. Voor dit experiment zijn de wormen op rekjes gekweekt. Voorafgaand aan dit experiment hebben we een kort pilot-experiment gedaan om te kijken aan welk rekje de wormen het meeste zich gingen hechten, om in de toekomst het oogsten van de wormen zo efficiënt mogelijk te maken. Hieruit kwam dat het rekje in figuur 8 het meest geschikt is omdat hierbij bijna de meeste wormen op de rekjes terug te vinden waren.

Het experiment met verschillende wormdichtheden hebben we uitgevoerd in aquaria van 2,5 L, waarbij het zuiveringsslib uit de beluchtingstank van de RWZI in Bennekom gebruikt is (3,5 g ds/L). De 3 startdichtheden van de wormen waren 20 g/L, 30 g/L en 40 g/L (natgewicht). Dit experiment duurde in totaal 3 weken en is uitgevoerd in aquaria met een constante beluchting met een minimum zuurstofconcentratie van 5 mg/L in een klimaatcel van 18°C.

Figuur 8: Rekjes in het zuiveringslib waarop de wormen gekweekt zijn.



Figuur 9: Slib reductie (A) en wormen biomassa productie (B) bij 3 verschillende startdichtheden wormen.



Er zijn nauwelijks verschillen te zien in de hoeveelheid slib die gereduceerd wordt tussen de drie wormen dichtheden (Figuur 9a). Als we echter naar de biomassa productie kijken, dan vinden we alleen bij een startdichtheid van 20g/L een toename gedurende 3 weken dat het experiment duurde en vinden we bij hogere dichtheden een afname (Figuur 9b). Uit dit experiment kunnen we dus concluderen dat op basis van de 3 wormdichtheden waarmee geëxperimenteerd is, de laagste dichtheid (van 20 g/L) het meest geschikt is voor vervollexperimenten.

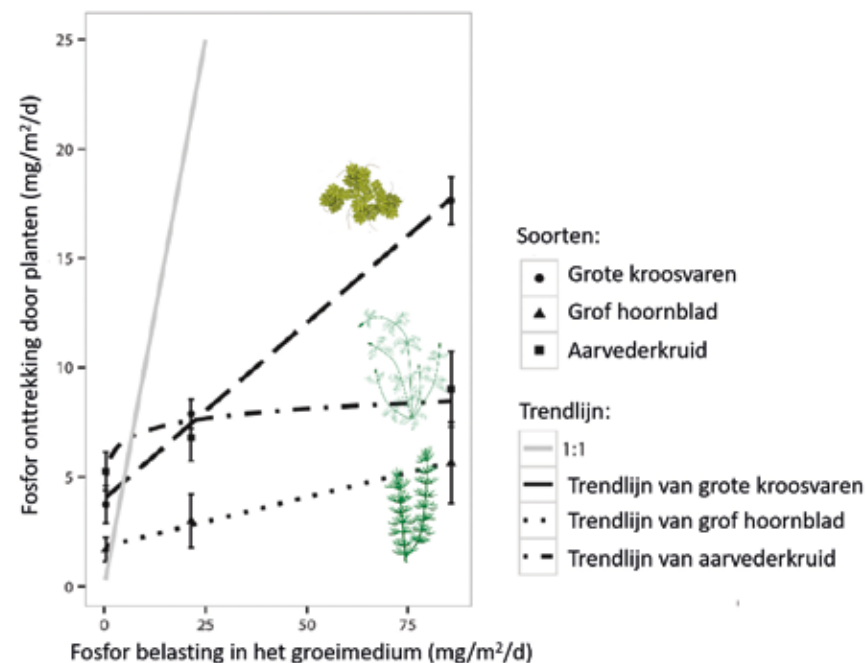
Laboratorium-experiment met planten

Uit het literatuuronderzoek bleek dat drijvende planten het meeste fosfor per vierkante meter uit een watersysteem kunnen onttrekken. Als startpunt is er in dit onderzoek voor gekozen om met het modelorganisme grote kroosvaren (*Azolla filiculoides*) te werken. Er werd een hoge fosfor-opname verwacht door deze waterplant [36]. Uit eerder onderzoek bleek dat de grote kroosvaren, in tegenstelling tot ondergedoken waterplanten, meer fosfor opneemt uit de waterlaag bij een hogere belasting. Ook trad er pas bij hoge P-concentraties verzadiging op in fosfor-onttrekking uit water en werd er geen optimum gevonden bij een belasting onder de 75 mg/m²/d (Informatiebox 5).

Voor grote kroosvaren wordt in de wetenschappelijke literatuur een groeisnelheid gerapporteerd tussen de 30 en 50 ton ds per hectare per jaar [37, 38]. Als we dit vergelijken met de productie van snijmaïs, dan kunnen we concluderen dat een systeem met grote kroosvaren potentie heeft om een veel hogere productiviteit te behalen. In Nederland werd in 2016 ongeveer 15 ton ds snijmaïs per hectare geproduceerd (CBS, 2016). Een ander voordeel ten opzichte van het verbouwen van landgewassen zoals

Informatiebox 5: Fosfor-opname van grote kroosvaren, grof hoornblad en aarvederkruid.

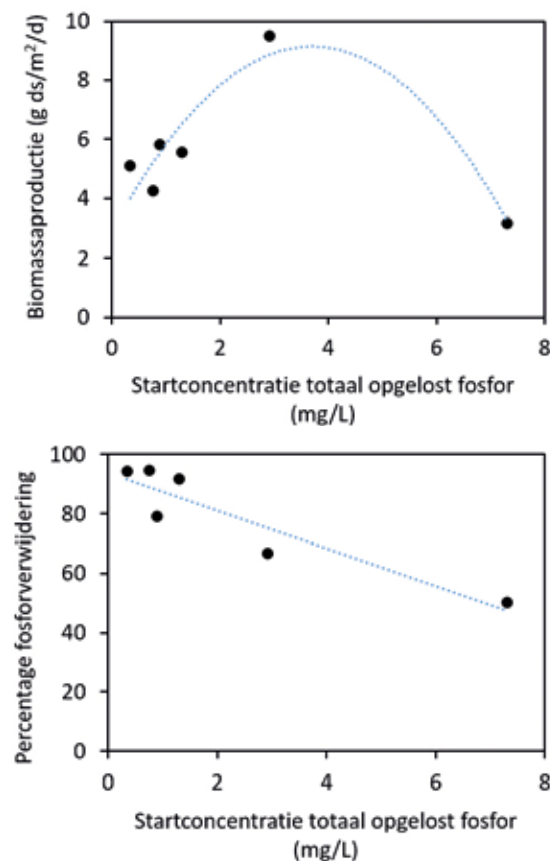
In deze grafiek is de fosfor-opname van verschillende waterplanten te zien [4, 36]. Te zien is dat hoe hoger de fosforbelasting op het water is, hoe meer de planten hiervan kunnen opnemen per m² per dag. Echter, hier zit wel een maximum aan. De maximum fosforonttrekking voor aarvederkruid lag in dit onderzoek op ongeveer 7,5 mg P/m²/d. Bij grof hoornblad was nog geen maximale fosfor-onttrekking opgetreden bij een belasting van 75 mg P/m²/d. Hetzelfde geldt voor de grote kroosvaren, maar met deze plant kan meer dan drie keer zoveel fosfor uit het water gehaald worden (per m² per dag) in vergelijking met aarvederkruid. De ondergedoken waterplanten blijken dus veel minder efficiënt te zijn in het onttrekken van fosfor aan water, en daarmee in het (na)zuiveren van water.



maïs is dat er geen bodemsubstraat en dus land nodig is. Kroosvaren staat er tevens om bekend in een brede range van waterkwaliteiten te groeien, en daardoor verwachten we een hoge groeisnelheid bij een hoge fosfor- en stikstofbelasting in het afvalwater. Zo komt de grote kroosvaren nog voor in natuurlijke wateren met ammoniumconcentraties hoger dan 1,5 mg/L, nitraatconcentraties hoger dan 4,0 mg/L, en fosfaatconcentraties hoger dan 1,5 mg/L [39]. Wateren met deze nutriëntwaarden worden als zéér voedselrijk beschouwd, wat betekent dat de waterkwaliteit erg slecht is. Kroosvaren kan ook in water zonder stikstof overleven, doordat de kroosvaren in symbiose leeft met een cyanobacterie (*Anabaena azollae*) [40]. Deze bacterie bindt stikstof uit de lucht; hierdoor treed er nooit een stikstofgebrek in kroosvaren op en zal deze ook bij hoog stikstofverlies door denitrificatie in een waterzuivering nog steeds optimaal kunnen groeien.

In een experiment is onderzocht op welk type afvalwater kroosvaren de hoogste biomassa productie behaalt en in hoeverre het afvalwater gezuiverd wordt. Voor dit experiment zijn twee typen afvalwater gebruikt: voorbezonden influent en nabezonden effluent. Van beide soorten water is

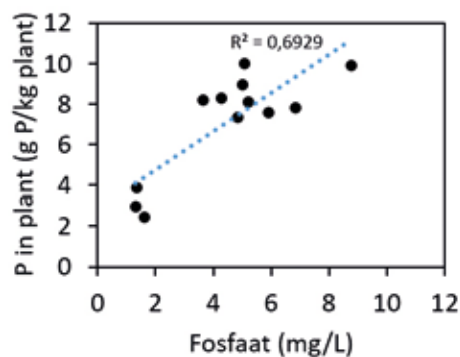
Figuur 10: Biomassaproductie en percentage fosforverwijdering door grote kroosvaren, met verschillende typen afvalwater als groeisubstraat (zonder beluchting).



een verdunningsreeks gemaakt met gedemineraliseerd water (1:1, 1:2 en 1:4). Daarnaast is er ook gekeken naar het effect van beluchting. Kroosvaren hebben we dus op 6 soorten afvalwater laten groeien met beluchting, en op 6 soorten afvalwater zonder beluchting. Er is geëxperimenteerd met beluchting omdat we de vorming van toxische stoffen onder afwezigheid van zuurstof verwachtten (zoals hoge ammonium- of sulfide-concentraties). Uit het experiment bleek dat planten niet belucht hoeven te worden, dat dit de groei niet positief beïnvloed, en de hoogste groei vertonen op 1:1 verdund influent (afvalwater verzameld uit de voorbezinktank verdund met eenzelfde volume gedemineraliseerd water). De duur van dit experiment was 7 dagen.

Kroosvaren behaalde een biomassa productie van 9,5 gram ds per m² per dag op verdund influent (1:1 ratio) (Figuur 10a). Dit komt overeen met een productie van 34,7 ton ds per hectare per jaar. Uit het afvalwater in dit experiment werd procentueel het meeste fosfor procentueel verwijderd bij de laagste fosfor belasting. Hoe meer fosfor er in het water zit, hoe minder het water dus relatief gezuiverd wordt. Bij kroosvaren groei op verdund influent (1:1) werd bijvoorbeeld 1,9 mg opgelost P/L verwijderd (67%, Figuur 10b),

Figuur 11: Hoeveelheid fosfor in de grote kroosvaren bij verschillende fosfaatconcentraties in het water [1].



terwijl dit bij onverdund effluent 0,7 mg opgelost P/L was (79%, Figuur 10b). Absoluut gezien kan er dus wel meer fosfor teruggewonnen worden uit afvalwater bij een hoge P belasting, alleen dan wordt het water minder schoon omdat er percentueel minder verwijderd wordt.

Dit hebben we vervolgens verder onderzocht. Uit een uitgebreider laboratoriumexperiment bleek dat de hoeveelheid fosfor in de kroosvaren toeneemt als de concentratie fosfaat (plant opneembaar fosfor) in het water hoger is en de plantengroei niet geremd wordt door toxische stoffen (Figuur 11). Bij onverdund influent neemt de groeisnelheid van de plant echter af door een grotere hoeveelheid toxische stoffen, zoals ammonium, en hoog microbieel zuurstofgebruik in het water, waardoor wortels afsterven. Dan is geen hoge fosforonttrekking per vierkante meter te realiseren door groei-inhibitie. De maximale gevonden hoeveelheid fosfor in het plantmateriaal was ongeveer 10 mg fosfor per gram ds plant. In dit laboratoriumexperiment is door middel van biomassaproductie van de kroosvaren maximaal 225 kg P/ha/jaar onttrokken uit het afvalwater. Deze hoeveelheid zou direct beschikbaar zijn om te recyclen.

Maximale biomassaproductie versus waterzuivering

Uit onze experimenten kunnen we opmaken dat het influent uit de waterzuivering (voorbezinktank) ongeschikt is voor de groei van planten door de hoge mate van vervuiling en het hoge biologisch zuurstofverbruik met als gevolg wortelsterfte en weinig biomassaproductie. Als dit afvalwater verdund wordt in een verhouding 1:1, dan wordt echter de hoogste biomassaproductie behaald. Hiermee kan tevens het meeste fosfor teruggewonnen worden. Doordat op dit type afvalwater maximale biomassaproductie plaats kan vinden, is dit aantrekkelijk voor de productie van grondstoffen. Door de hoge concentratie fosfor in dit type afvalwater is het echter zo dat het water na zuivering met planten niet aan de effluent-eisen voldoet. Dit betekent dat het water dan vervolgens alsnog (verder) gereinigd moet worden langs klassieke weg. Hiervoor kunnen alleen drijvende waterplanten ingezet worden in verband met de competitie met micro-algen (andere planten worden overgroeid en krijgen lichtgebrek). Daarentegen kan Aquafarm op dit punt in de waterzuivering wel gecombineerd

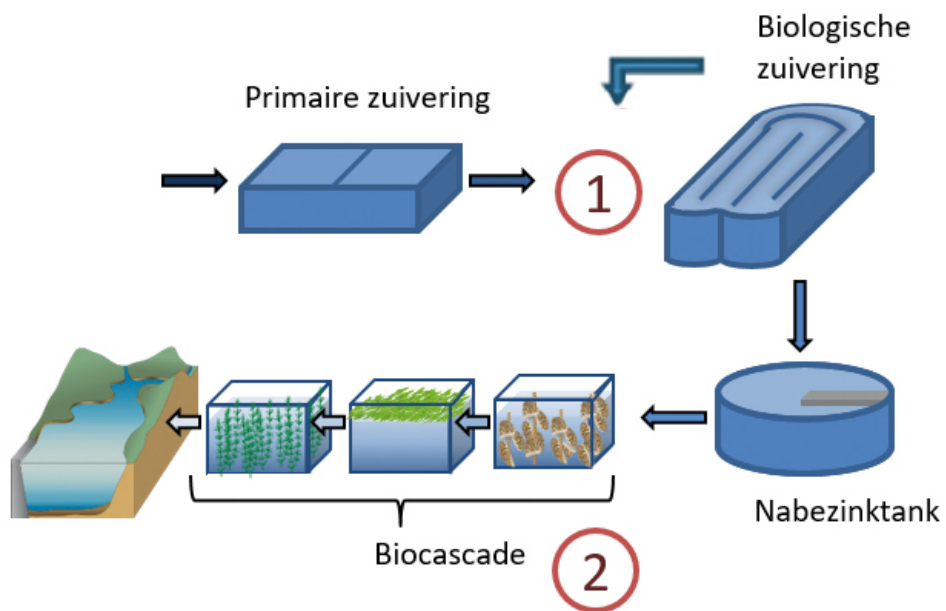
wordt met andere innovatieve technieken (zoals Nereda, A-trap systemen of membraanbioreactor) [41-43].

Voordelen van het gebruik van effluent (uit de nabezinktank) zijn een verdere onttrekking van nutriënten richting kaderrichtlijn water kwaliteit, maar de productie ligt hierbij wel een heel stuk lager (Figuur 10). Ook hier geldt dat in eerste instantie alleen drijvende waterplanten ingezet kunnen worden. Tevens zou de wat lagere biomassaproductie verhoogd kunnen worden door bijvoorbeeld CO₂ toevoer, groei in een optimaal lichtregime (8-16h) en een hogere temperatuur [44]. Een voordeel van het zuiveren tot de kaderrichtlijn water niveau is dat er water geloosd wordt met dezelfde kwaliteit als het ecosysteem waar het in terecht komt. Hiermee is het effluent van de RWZI geen puntbron meer van vervuiling voor natuurlijke watersystemen, waardoor er ook minder kans is op (blauw)algenbloei in deze systemen. Ook kunnen andere plantensoorten (zoals helofyten of ondergedoken waterplanten) ingezet worden in een later stadium van de Aquafarm, wat leidt tot de productie van andere vermarktbare producten op afvalwater.

De uitkomst van dit experiment leidt tot twee bruikbare modules binnen Aquafarm (Figuur 12):

1. Maximale biomassaproductie met een cascade van planten en dieren, waarbij deze groeien op een mengsel van influent en effluent (gemixt in een 1:1 ratio). Hiervan zijn de voordelen: maximale valorisatie van afvalwater, het experimenteren met vermarktbaarheid van biomassa, en mogelijkheden tot combineren met andere zuiveringstechnieken;
2. Maximale waterzuivering met een cascade van planten en dieren, startend aan het einde van het zuiveringsproces. Hiervan zijn de voordelen: het recyclen van fosfor, schoner water als eindproduct (kaderrichtlijn water kwaliteit), en gezondere natuurlijke watersystemen waarin effluent-lozing plaatsvindt. <<

Figuur 12: Twee bruikbare modules binnen Aquafarm, waarin optimale biomassaproductie met planten plaatsvindt (Module 1) of maximale waterzuivering met een cascade van planten en dieren (Module 2).



// 'Dit experiment leidt tot twee bruikbare modules binnen Aquafarm' //

Iedere toepassing een eigen oplossing!



Hoofdstuk 4: Cascaderingsexperiment

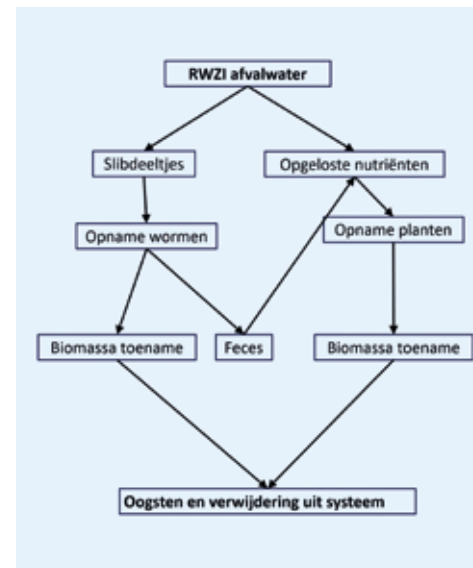
De volgende stap in het onderzoek was om te experimenteren met een cascadering, om kennis op te doen over een mogelijke complementaire zuivering van dier- en plantsoorten. Voor het combineren van dieren en planten in een laboratoriumschaal opstelling, is gekozen om te werken met een mengsel van wormensoorten (*Tubificidae*), waarin de soort *Tubifex tubifex* dominant was, en met de grote kroosvaren (*Azolla filiculoides*). Deze soorten waren naar verwachting relatief gemakkelijk aaneen te schakelen in een kleinschalige opstelling, waarin onderzocht kon worden of deze soorten in staat zijn complementair water te zuiveren, doordat de wormen partikels uit het water consumeren en opnemen, en planten opgeloste nutriënten (PO_4^{3-} , NH_4^+ , NO_3^-) opnemen.

Hypothese

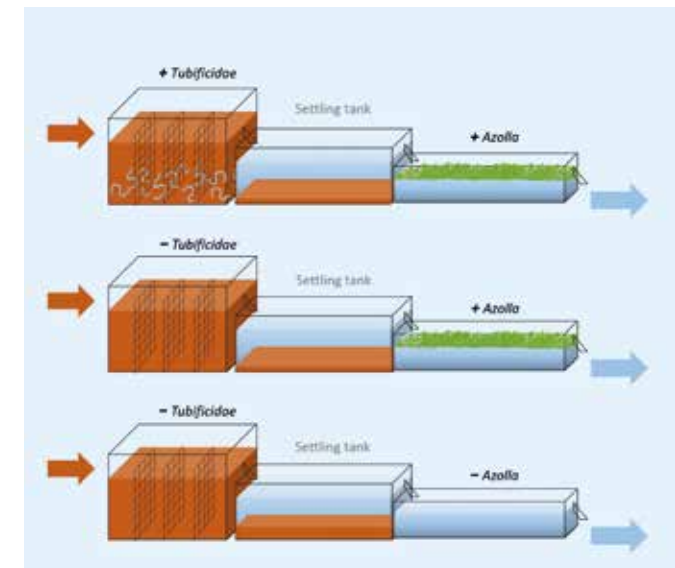
De verwachting hierbij was dat wormen slibdeeltjes consumeren. Na consumptie wordt een groot deel door de wormen geassimileerd als nieuwe biomassa, het overige (naar verwachting kleinere) deel wordt uitgescheiden via de ontlasting. Vervolgens lost de wormenontlasting weer op in het water, waarna het als opgeloste nutriënten weer beschikbaar wordt voor opname door planten en het vrijkomen van deze nutriënten op deze

Informatiebox 6: Overzicht van hypothese en behandelingen in het cascaderingsexperiment.

6a



6b



wijze gemitigeerd wordt. De biomassa van wormen en planten kan vervolgens geoogst worden, waardoor er verwijdering van slibdeeltjes en nutriënten uit het systeem plaatsvindt (Informatiebox 6a).

Proefopzet

In dit experiment hebben we een waterzuiveringssysteem met drie compartimenten getest: een wormenaquarium, een bezinkaquarium om overtollige slibdeeltjes te verwijderen, en een plantenaquarium. We hebben dit getest met behulp van drie behandelingen (Informatiebox 6b):

1. Wormen + planten: in deze behandeling bevonden zich in het eerste compartiment wormen en in het derde compartiment planten.
2. Controle + planten: hierbij was het eerste compartiment zonder wormen en bevonden zich in het derde compartiment planten. Deze behandeling was om te kijken of er effecten waren van de wormen op de groei van de planten in vergelijking met behandeling 1.
3. Controle + controle: ter controle was er één behandeling met zowel compartiment 1 en 3 zonder organismen.

Van elke behandeling hadden we vier replica's. De exacte proefopzet is in bijlage 3 uitgebreid omschreven. Allereerst zal de waterzuiveringscapaciteit van onze drietrapszuivering besproken worden, en vervolgens de biomassaproductie van wormen en planten.

Resultaten

Waterzuivering

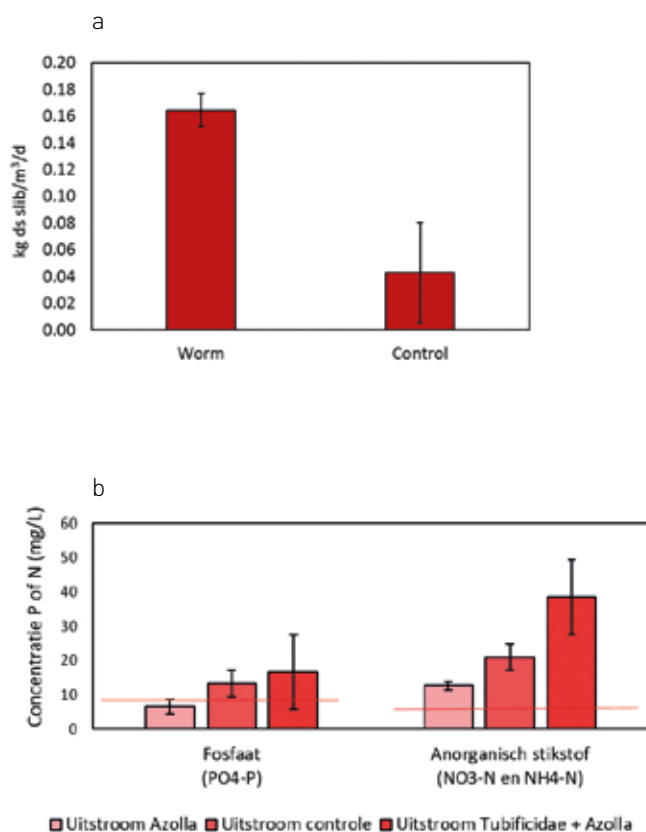
Het water uit de nabezinktank van RWZI Nijmegen, waarmee we het waterzuiveringssysteem voedde, had een gemiddelde opgelost fosfaat-, nitraat- en ammoniumconcentratie van respectievelijk $8,6 \text{ PO}_4^{3-}\text{-P mg/L}$, $1,1 \text{ NO}_3^-\text{-N mg/L}$ en $4,8 \text{ NH}_4^+\text{-N mg/L}$. De spreiding rondom het gemiddelde (standaard deviatie) was 6,5, 2,3 en 3,4 voor fosfaat, nitraat en ammonium respectievelijk. Gemiddeld zat er 2,2 g ds/L aan slibdeeltjes – met een standaarddeviatie van 0,6 – in het afvalwater. De gemiddelde temperatuur van het water was $17,5^\circ\text{C}$ gedurende het experiment (met een standaarddeviatie van 0,6).

De wormen bleken de slibdeeltjes gemiddeld ongeveer 26 % meer te reduceren in de wormenaquaria (Figuur 13a). Van de deeltjes die het wormenaquarium binnenstroonden werd 10,6 % afgebroken, in de

controlebehandeling lag dit percentage slechts op 2,8 % gemiddeld. In de controlebehandelingen werd de afbraak veroorzaakt door microbiële oxidatieprocessen, welke ook een rol speelden in de wormenaquaria. Er kan dus geconcludeerd worden dat 7,8 % van de slibdeeltjes afgebroken zijn door de activiteit van *Tubificidae*. Dit komt neer op 0,12 kg droogstof slib/m³/d.

Als we naar de opgeloste nutriënten in de uitstroom van de compartimenten van de drie behandelingen kijken, dan zien we de hoogste concentraties fosfaat en anorganisch stikstof (nitraat en ammonium) in de behandeling met wormen en planten (gemiddeld respectievelijk $16,7 \text{ mg PO}_4^{3-}\text{-P/L}$ en $38,4 \text{ mg N/L}$; Figuur 13b). Daarna had de controlebehandeling de hoogste concentratie (gemiddeld respectievelijk $13,2 \text{ mg PO}_4^{3-}\text{-P/L}$ en $21,0 \text{ mg N/L}$), gevolgd door de behandeling zonder wormen, maar met planten (gemiddeld respectievelijk $6,6 \text{ mg PO}_4^{3-}\text{-P/L}$ en $12,6 \text{ mg N/L}$). In de controlebehandeling zonder organismen vond ook een stijging van de hoeveelheid opgeloste nutriënten plaats ten opzichte van de instroom (water uit de beluchtingstank van RWZI Nijmegen). Op basis hiervan kunnen we concluderen dat dit komt door oxidatie (en dus afbraak) van

Figuur 13: Slibreductie in wormen en controlebehandeling (a); en concentraties fosfaat en anorganisch stikstof in de compartiment-uitstroom van alledrie de behandelingen (b). De rode lijn in grafiek b geeft de gemiddelde instroomconcentratie van fosfor en stikstof weer.



het slib. Als we de uitstroom van de controlebehandeling als nullijn vergelijken met de uitstroom van de behandeling met wormen en planten, dan zien we voor fosfor een stijging van 3,5 mg PO₄³⁻-P/L en voor anorganisch stikstof een stijging van 17,4 mg N/L. Dit komt door de ongeveer 26% hogere afbraak van deeltjes in het compartiment waar wormen aanwezig zijn en is te wijten hun afbraakactiviteit. Ondanks de aanwezigheid van planten bevat de uitstroom van het systeem met wormen en planten de meeste opgeloste nutriënten.

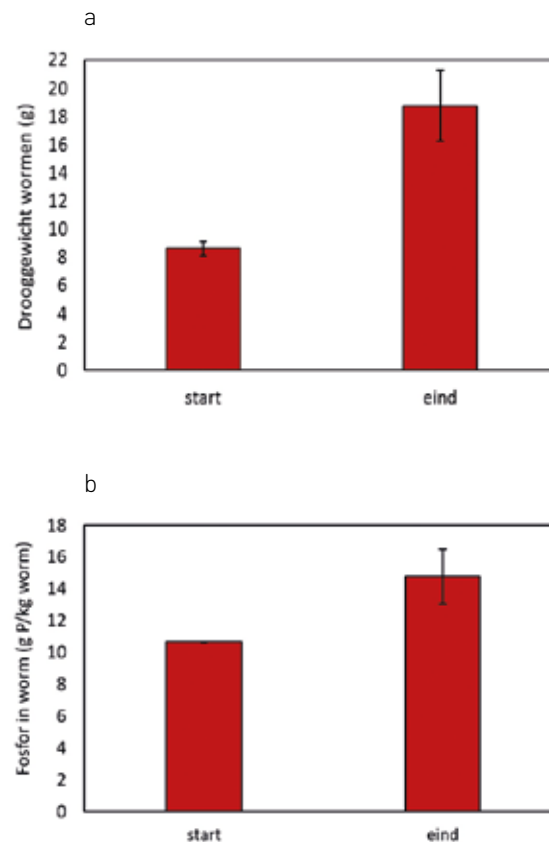
Er is vooral veel anorganisch stikstof vrijgekomen wanneer er wormen in dit zuiveringssysteem aanwezig zijn. Dit komt doordat *Tubificidae* wormen veel ammonium produceren [45]. Doordat het eerste compartiment van het waterzuiveringssysteem belucht werd om wormensterfte te voorkomen (gemiddeld 9,1 mg/L zuurstof), is bijna al het anorganisch stikstof omgezet naar nitraat via nitrificatie wanneer het water het zuiveringssysteem uitstroomt (34,3 en 4,1 mg/L nitraat en ammonium, respectievelijk). In het wormencompartiment vonden we ongeveer 25 keer zoveel opgelost anorganisch stikstof dan in de instroom. Hiervan was 33,8 % ammonium, en dit was 14 keer hoger

dan in de instroom met een waarde van 19,8 mg NH₄⁺-N/L. Een groot deel was dus al omgezet naar nitraat via nitrificatie. Bij het nitrificatieproces komt zuur (H⁺) vrij (Informatiebox 2). Dit was ook meetbaar in de pH: in het plantencompartiment dat achter de wormen geschakeld stond was de pH gezakt tot een gemiddelde van 4,0; in het plantencompartiment dat achter de controle zonder wormen geschakeld stond was de pH juist gestegen tot 8,3; terwijl de pH in de controlebehandeling zonder wormen 6,4 bleef (gelijk aan de instroom: 6,5).

Biomassaproductie

De massa van de wormen in het experiment is gemiddeld toegenomen naar 217%. Dit betekent dus dat ze in biomassa méér dan verdubbeld zijn in 6 weken. Van gemiddeld (theoretisch) 8,6 gram droge stof inzetgewicht zijn ze toegenomen tot gemiddeld 18,8 gram droge stof (Figuur 14a). Dit komt neer op een biomassatoename van 0,68 kg ds wormen per m³ per week. Daarnaast is de hoeveelheid fosfor in de wormenbiomassa gestegen van gemiddeld 10,7 g/kg ds worm aan de start van het experiment naar 14,8 g P/kg ds worm op het einde (Figuur 14b).

Figuur 14: Biomassa wormen aan de start en het einde van het experiment (a); en de concentratie fosfor in wormenbiomassa aan de start en het einde van het experiment (b).



Wanneer grote kroosvaren achter de *Tubificidae* wormen geschakeld stond, bleken de planten onverwacht veel harder te groeien dan wanneer ze achter een beluchttingscompartiment zonder wormen geschakeld stonden. De biomassaproductie was gemiddeld 7,1 g ds/m²/d achter de wormen, en slechts 1,9 g ds/m²/d gemiddeld achter een controlecompartiment. Ook in de bladkleur was een duidelijk verschil te zien (Figuur 15): de planten met de hogere biomassaproductie waren duidelijk groener (hogere chlorofylconcentratie) en dus vitaler. In de aquaria waarin de kroosvaren een lage biomassaproductie liet zien, kregen bovendien draadalg de kans om te gaan groeien, wat resulteerde in een mix van kroosvaren en draadalg bovenop het wateroppervlak. Naast biomassaproductie hebben we ook de fosforconcentratie in de grote kroosvaren (of in de mix van draadalg en kroosvaren) gemeten. De grote kroosvaren die achter het wormencompartiment geschakeld stond bleek gemiddeld 9,3 g P/kg ds biomassa te bevatten, en de mix van grote kroosvaren en draadalg bleek gemiddeld 16,6 g P/kg ds biomassa te bevatten. Aan de start van het experiment was de hoeveelheid fosfor in de kroosvaren biomassa 7,0 g P/kg ds.

Figuur 15: Grote kroosvaren achter een behandeling met (a) en zonder (b) wormen geschakeld.



- a. Biomassaproductie wanneer grote kroosvaren groeit achter een beluchttingscompartiment met Tubificidae wormen.



- b. Biomassaproductie wanneer grote kroosvaren groeit achter een beluchttingscompartiment zonder Tubificidae wormen.

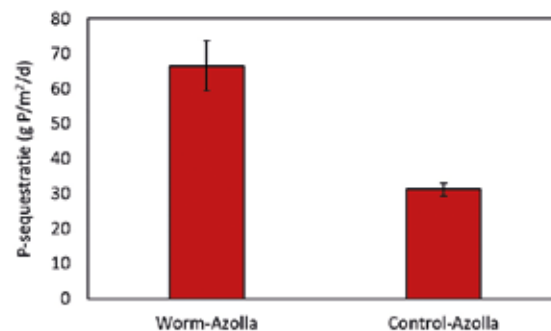
// ‘Onze proof of principle laat zien dat we in staat zijn een aanzienlijke biomassaproductie te realiseren.’ //

Soorten versterken elkaar

De hoeveelheid fosfor die uiteindelijk teruggewonnen kan worden hangt af van zowel de biomassaproductie als de concentratie fosfor in de biomassa. Als we naar beide factoren samen kijken (*de fosforsequestratie*), dan wint de grote kroosvaren die achter de wormen geschakeld stond 67 g/m²/d terug tegenover 31 g/m²/d wanneer de grote kroosvaren achter de controlebehandeling zonder wormen geschakeld stond (Figuur 16). De hoeveelheid die terug te winnen is wordt hierbij vooral bepaald door de snelheid van biomassaproductie.

Het lijkt er sterk op dat beluchting leidt tot een verminderde groei van grote kroosvaren, tenzij de pH voldoende sterk daalt als gevolg van de verzuring door de ammoniumoxidatie. Uit de resultaten blijkt dat fosfor in ieder geval niet beperkend was voor de groei van kroosvaren, omdat het percentage fosfor in de plant (P per gram droge stof) in alle behandelingen hoger was dan 0.1 %, wat de kritieke waarde voor fosforlimitatie is [46]. Dit duidt erop dat een ander element de groei van kroosvaren beperkt. De concentratie opgelost ijzer blijft in zuurstofrijk water laag omdat het in geoxideerde toestand alleen oplost bij zeer lage pH waarden. De pH verlaging

Figuur 16: Fosforterugwinning uit afvalwater via grote kroosvaren biomassaproductie.

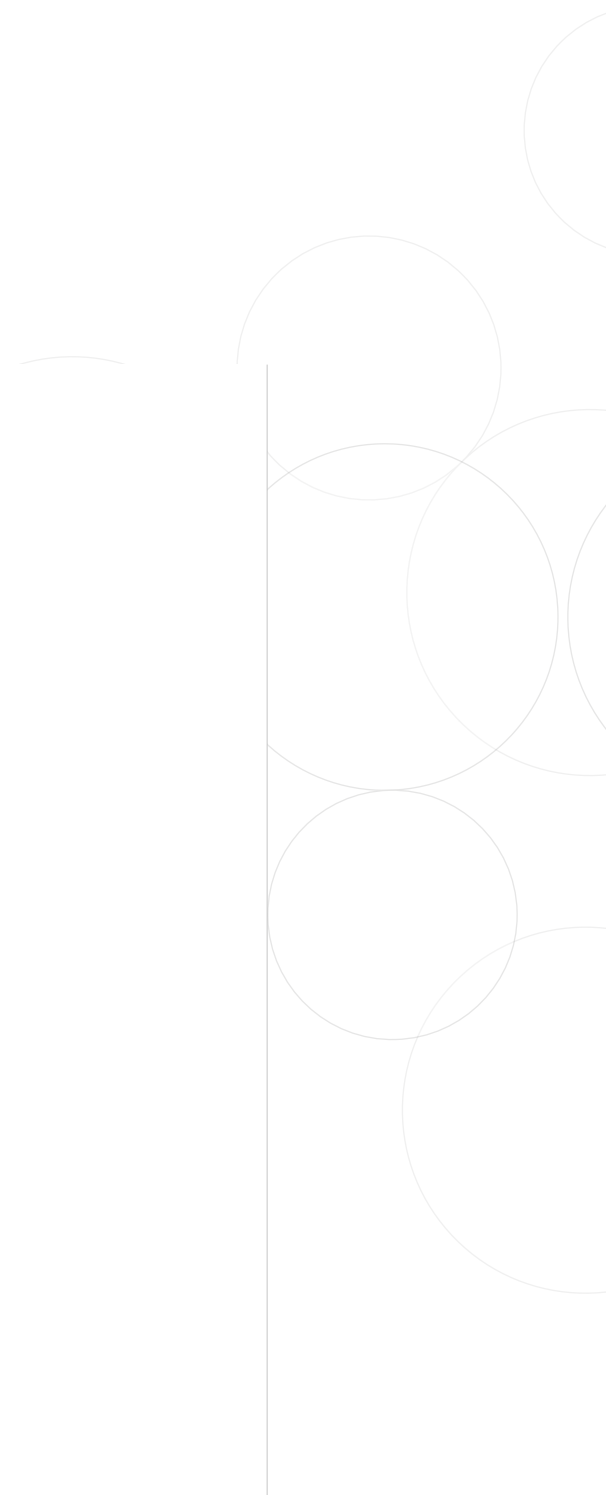


als gevolg van de oxidatie van door de wormen uitgescheiden ammonium is er dan ook waarschijnlijk verantwoordelijk voor dat de ijzerbeschikbaarheid in deze behandeling voldoende hoog was om groei van kroosvaren optimaal te houden. Het is bekend dat ijzergebrek vaak verantwoordelijk is voor een slechte groei van kroosvaren (Temming et al., (in druk)) [98]. De wormen blijken dus op een zeer onverwachte wijze de groei van kroosvaren te hebben gestimuleerd, wat een belangrijke extra reden is voor cascadering.

Conclusie

Uit de *proof of principle* die we met het laatste experiment geleverd hebben, blijkt dat de hypothese over de cascadering met wormen en planten juist was: wormen voeden zich met slib, breken deze deeltjes af en de rest komt beschikbaar voor planten opgelost als fosfaat, nitraat of (in kleine mate) ammonium.

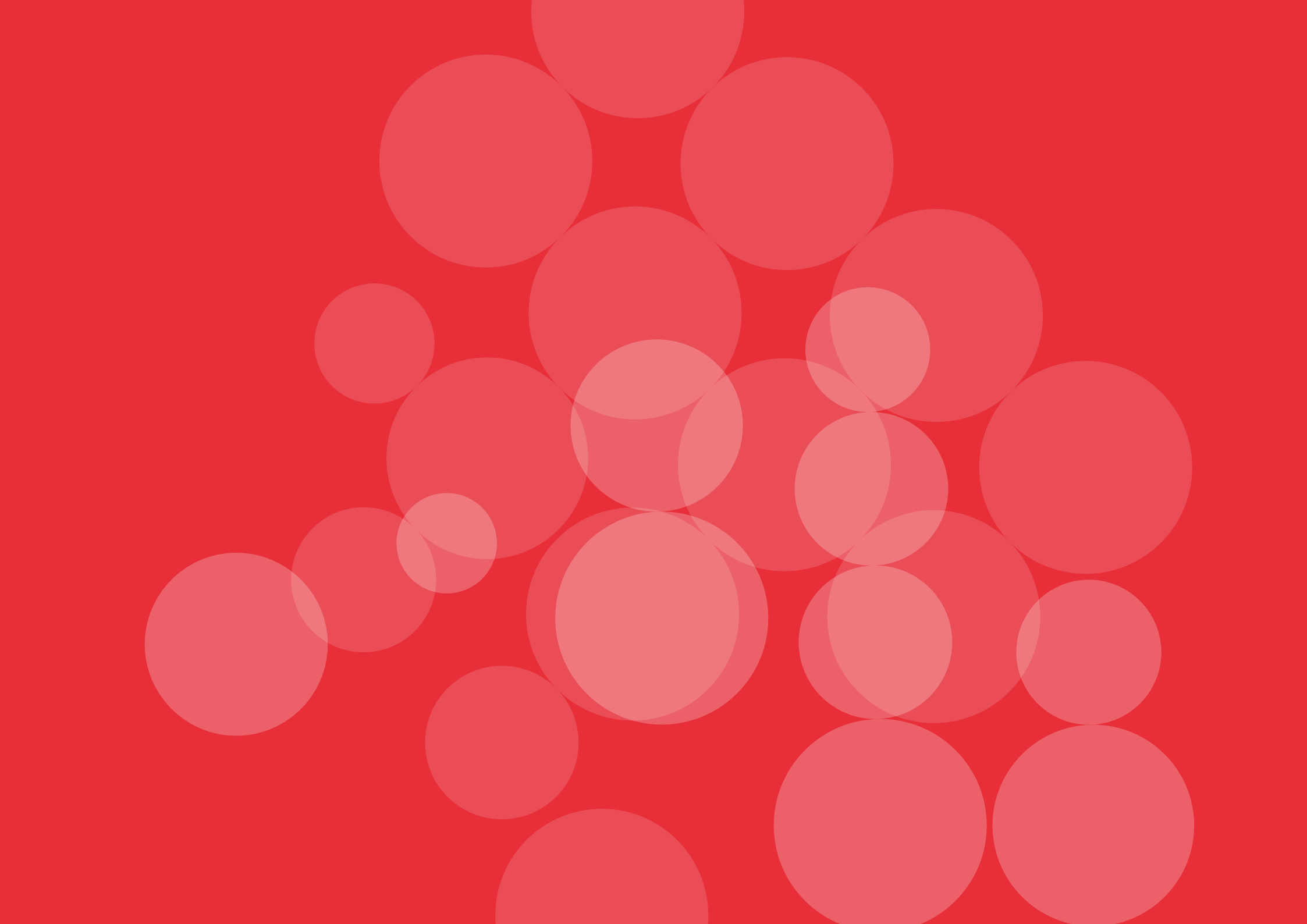
De wormen bleken de slibdeeltjes te reduceren ten opzichte van de controle met 26 %. Met een inzetgewicht van 20 g wormen/L reduceerde het waterzuiveringssysteem slib met 58.4 kg ds/m³/jr. De grote kroosvaren die achter het wormencompartiment geschakeld stond bleek 243 kg P/ha/jr terug te winnen. De biomassa



nam toe met ongeveer 26 ton ds/ha/jr. Deze groeisnelheid ligt aan de lage kant voor grote kroosvaren als we dit vergelijken met de literatuur [37, 38]. Dit is waarschijnlijk te wijten aan de lage temperatuur (gemiddeld 17,5 °C; ongeveer de jaargemiddelde temperatuur op een RWZI). Om deze reden verwachten wij de biomassaproductie van zowel wormen en planten, net als hun zuiveringscapaciteit, nog ruim te kunnen optimaliseren. De hoeveelheid opgeloste nutriënten die toeneemt in het afvalwater in ons systeem (fosfaat en anorganisch stikstof) geeft aan dat de verhouding van volumes van de compartimenten nog geoptimaliseerd moet worden. Hoe meer deeltjes afgebroken worden, hoe meer nutriënten oplossen beschikbaar voor plantopname. Met andere woorden, als er dus méér opgelost is, moeten we een relatief groter plantencompartiment achter het wormencompartiment schakelen en de verhouding van watervolumes aanpassen om waterzuivering te realiseren.

Onze *proof of principle* laat zien dat we bij een jaargemiddelde temperatuur in staat zijn een aanzienlijke biomassaproductie te realiseren. De hoeveelheid droge stof grote kroosvaren die op dit systeem

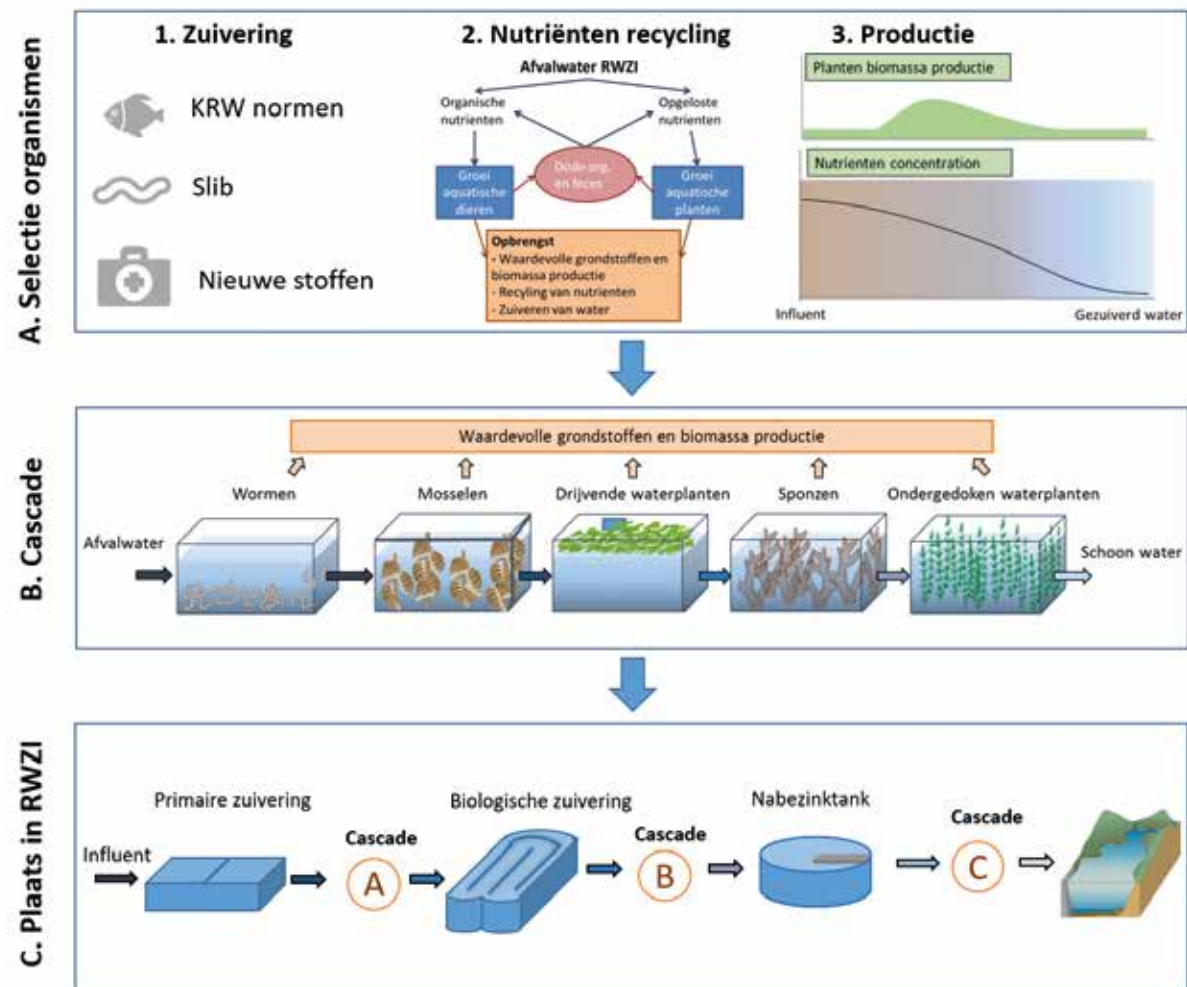
gerealiseerd werd, is hoger dan de jaarlijkse opbrengst van maïs in ons Nederlandse klimaat (15 ton ds/ha/jr; CBS, 2016). Ook was het succesvol om wormen in rekjes op substraat te groeien (Figuur 8); dit geeft veel potentie voor de oogstbaarheid van de *Tubificidae* wormen, slibreductie en -verwaarding. <<



Hoofdstuk 5: Toekomstperspectief

Na de eerste fase van het onderzoek kunnen we concluderen dat het Aquafarm principe werkt! Allereerst zijn we in staat om monoculturen van aquatische organismen (zowel dieren als planten) op het afvalwater te laten groeien. Door deze groei worden nutriënten efficiënt uit het water onttrokken en is het mogelijk om in de toekomst organismen zoals *Tubificidae* wormen en grote kroosvaren te oogsten (zie ook Hoofdstuk 3: Het onderzoek). Vervolgens zijn we nog een stap verder gegaan en is het gelukt om een effectieve cascade met aquatische wormen en grote kroosvaren te bouwen waar het afvalwater doorheen stroomt (Hoofdstuk 4: Cascaderingsexperiment). In het door ons ontwikkelde waterzuiveringssysteem werkten de *Tubificidae* wormen en planten synergistisch, waardoor er meer fosfor verwijderd werd in aanwezigheid van deze beide soorten. Op deze manier zijn we in staat om koolstof-, stikstof-, organisch materiaal- en fosforcycli te sluiten en op deze manier bij te dragen aan de circulaire economie van afvalwater. Nu het duidelijk is dat het mogelijk is om een cascade van organismen te laten groeien op afvalwater is het van belang om te onderzoeken welke andere organismen hier geschikt voor

Figuur 17: Toekomstperspectief Aquafarm.



zouden zijn en welke positie in de cascade ze hierbij innemen (Figuur 17, A en B). Hier zal ons toekomstig onderzoek zich op richten. Daarnaast komen er ook veel nieuwe stoffen in het afvalwater terecht, zoals medicijnresten en bestrijdingsmiddelen, waarvan de druk steeds hoger zal worden in de toekomst om deze uit het afvalwater te verwijderen. Er zijn al studies die aantonen dat het mogelijk is om deze stoffen te verwijderen met organismen zoals mosselen en riet, lisdodde of diverse kroossoorten [47, 48].

Ook hebben we laten zien dat de cascades van Aquafarm op meerdere posities in de zuiveringsketen zou kunnen worden toegepast (Figuur 17, C) en op deze manier ook goed gecombineerd kan worden met andere zuiveringstechnieken (zie ook Hoofdstuk 3, “Maximale biomassaproductie versus waterzuivering”). Zo zou cascade A kunnen bestaan uit kroosvaren en andere drijvende waterplanten die op een mengsel van influent en effluent groeien en kan nog verder onderzocht worden of de cascade uitgebreid kan worden met fauna. In deze cascade is dan maximale biomassaproductie van planten mogelijk. Een voorbeeld van cascade B hebben we laten zien in ons cascade experiment, waar wormen

actief slib reduceren en planten nutriënten verwijderen. Daarnaast heeft het onderzoek ook laten zien dat naast aquatische wormen ook crustaceeën, waaronder vlokreeften en zoetwaterpissebedden, potentieel een nog hogere slibreductie kunnen bereiken. In de toekomst moet nader onderzocht worden hoe dit systeem geoptimaliseerd kan worden zodat het water voldoende gezuiverd wordt en voldoet aan de huidige lozingseisen (of het water zelfs verder gezuiverd kan worden dan deze eisen stellen). Ten slotte kan cascade C ingezet worden voor het nazuiveren van het afvalwater tot een benadering van KRW waterkwaliteit.

Toepassingen biomassa in een circulaire economie

Een volgende uitdagende stap is de verwaarding van organismen die op het afvalwater kunnen groeien. Op dit moment is er nog een zeer beperkte afzetmarkt voor organismen die op afvalwater groeien in Nederland. Er is van een aantal organismen al bekend dat naast dat ze efficiënt water zuiveren ze ook waardevolle grondstoffen produceren. Een voorbeeld hiervan zijn sponzen, waarvan bekend is dat ze een enorme filtercapaciteit hebben van het water

[49] en daarnaast economisch erg interessant zijn omdat ze metaboliëten produceren die in de farmaceutische industrie gebruikt kunnen worden [50]. Wormen, zoals *Tubificidae*, bestaan vooral uit eiwit en kleinere fracties vet en suiker [51]. Een (simpele) toepassing waarvoor deze wormen al gebruikt worden is als voer voor (aquarium) vissen [52]. De meest veelbelovende toepassingen richten zich op specifieke componenten van de biomassa (bijvoorbeeld bepaalde aminozuren, vetzuren en mogelijk enzymen) [51]. Hetzelfde geldt voor de grote kroosvaren (*Azolla filiculoides*). Een (simpele) toepassing van kroosvaren biomassa is om het te gebruiken als groene meststof [53]. Ook voor dit organisme zijn toepassingen die zich richten op specifieke componenten uit de biomassa erg veelbelovend. Zo zou het door de aanwezige eiwitten [tot wel 29 % van de droge stof; 37, 54, 55] als voedingssupplement zou kunnen dienen voor vee [37, 56]. Verder heeft de biomassa veel potentie om gebruikt te worden voor biodiesel, bio-ethanol of oleochemicaliën [54, 57, 58].

Echter, totdat processen voor het isoleren van specifieke componenten uit biomassa geoptimaliseerd zijn en er een stabiele aanvoer van biomassa is zal eerst de marktvraag tegemoet

gekomen moeten worden. Daarvoor is het verstandig om de focus op simpelere toepassingen te leggen, zoals visvoer of groene meststof.

Opschaling naar praktijkschaal RWZI

Op dit moment experimenteren we samen met ABC-Kroos om een product uit kroos (*Lemna* spp.) te ontwikkelen waarbij we in willen spelen op de marktvraag [59]. Hiervoor is een praktijkproef aangelegd op RWZI Dodewaard. Samen met ABC-Kroos zal de komende jaren op praktijkschaal geëxperimenteerd worden met de productie van kroos op afvalwater voor technische toepassingen van industrieel eiwit. Hiervoor zal gekeken worden naar toepassingen in de lijm- en coatingsindustrie [60]. Het kroos zal gegroeid worden op influent, een mengsel van influent en effluent, en effluent (op basis van de eerder uitgevoerde laboratoriumexperimenten met planten, hoofdstuk 3).

De komende jaren is het van belang dat er een brug wordt geslagen naar de vermarktbaarheid van organismen die goed kunnen groeien op afvalwater, en daarnaast het water kunnen zuiveren. Voor de organismen die we gebruikt hebben in onze experimenten zijn al enkele toepassingsmogelijkheden

onderzocht (Bijlage 4). Het is nodig om in de komende jaren nader te onderzoeken wat een mogelijke afzetmarkt zou kunnen zijn voor de organismen in Aquafarm. Wat vaststaat is dat in de toekomst uiteindelijk volledig cyclisch met afvalwater moet worden omgegaan [9]. Aquafarm vertaalt dit idee naar praktische toepassing en de eerste stap voor de cascade van aquafarm is gemaakt. Verder onderzoek en praktijkervaringen moeten leiden tot verbeteringen en uiteindelijk ook de opschaling en verwaarding van Aquafarm.

<<

Figuur 15: Opschaling – praktijkproef Dodewaard.





Literatuurlijst

1. Sayers, L., *Nutrient removal from domestic wastewater by Azolla filliculoides*. Bachelor internship report. Radboud University, 2016: p. 29.
2. Vymazal, J., *Removal of nutrients in various types of constructed wetlands*. Science of the total environment, 2007. **380**(1): p. 48-65.
3. Nieuwenhuijzen, A.v., *Het actief-slibproces: de mogelijkheden en grenzen*.
4. Nauta, J., *The effect of emergent, free-floating and submerged macrophytes on nutrient removal in constructed free water surface wetlands*. Master thesis. Radboud University, 2016: p. 30.
5. Cummins, K.W. and M.J. Klug, *Feeding ecology of stream invertebrates*. Annual review of ecology and systematics, 1979. **10**(1): p. 147-172.
6. Reddy, K.R. and R.D. DeLaune, *Biogeochemistry of wetlands: science and applications*. 2008: CRC press.
7. Ahearn, D.S., et al., *Land use and land cover influence on water quality in the last free-flowing river draining the western Sierra Nevada, California*. Journal of Hydrology, 2005. **313**(3): p. 234-247.
8. Jetten, M.S., et al., *The anaerobic oxidation of ammonium*. FEMS Microbiology reviews, 1998. **22**(5): p. 421-437.
9. Ghisellini, P., C. Cialani, and S. Ulgiati, *A review on circular economy: the expected transition to a balanced interplay of environmental and economic systems*. Journal of Cleaner Production, 2016. **114**: p. 11-32.
10. CBS, PBL, and WageningenUR, *Waterkwaliteit KRW, 2015*. 2016.
11. Hecky, R. and P. Kilham, *Nutrient limitation of phytoplankton in freshwater and marine environments: a review of recent evidence on the effects of enrichment*. Limnology and Oceanography, 1988. **33**(4part2): p. 796-822.
12. Chowdhury, R.B., et al., *Key sustainability challenges for the global phosphorus resource, their implications for global food security, and options for mitigation*. Journal of Cleaner Production, 2017. **140**: p. 945-963.
13. Bick, H., *A review of central European methods for the biological estimation of water pollution levels*. Bulletin of the World Health Organization, 1963. **29**(3): p. 401.
14. McKinney, R.E., *Microbiology for sanitary engineers*, in *Microbiology for sanitary engineers*. 1962, McGraw-Hill.
15. BENOIT, R., *CHAPTER 4. SELF-PURIFICATION IN NATURAL WATERS*. 1971.
16. Kolkwitz, R. and M. Marsson, *Ökologie der tierischen Saprobien. Beiträge zur Lehre von der biologischen Gewässerbeurteilung*. International review of Hydrobiology, 1909. **2**(1 2): p. 126-152.
17. Mendoza-Espinosa, L. and T. Stephenson, *A review of biological aerated filters (BAFs) for wastewater treatment*. Environmental engineering science, 1999. **16**(3): p. 201-216.
18. Kadlec, R. and R. Knight, *Treatment wetlands*. CRC. Boca Raton, FL, 1996.
19. Wissing, F., *Wasserreinigung mit Pflanzen*. Ulmer, D-Stuttgart. 207pp, 1995.
20. Greenway, M. and K. Bolton. *From wastes to resources-turning over a new leaf: Melaleuca trees for wastewater treatment*. in Retrospective Collection. 1996. Trans Tech Publ.
21. van den Boomen, R., R. Kampf, and E. Foekema, *Waterharmonica's in nederland-1996-2011: van effluent tot bruikbaar oppervlaktewater*. 2012: Stowa.

22. Derden, A., et al., *Gids waterzuiveringstechnieken*. 2001: Academia Press.
23. Henze, M., et al., *Biological wastewater treatment*. 2008: IWA publishing.
24. Trentelman, C., *Neveneffecten van fosfaatverwijdering uit afvalwater*. H twee O: tijdschrift voor watervoorziening en afvalwaterbehandeling: p. 526-530.
25. Stottmeister, U., et al., *Effects of plants and microorganisms in constructed wetlands for wastewater treatment*. Biotechnology advances, 2003. **22**(1): p. 93-117.
26. Gifford, S., et al., *Aquatic zooremediation: deploying animals to remediate contaminated aquatic environments*. TRENDS in Biotechnology, 2007. **25**(2): p. 60-65.
27. Vanni, M.J., *Nutrient cycling by animals in freshwater ecosystems*. Annual Review of Ecology and Systematics, 2002. **33**(1): p. 341-370.
28. Marescaux, J., et al., *Assessing filtration rates of exotic bivalves: dependence on algae concentration and seasonal factors*. Hydrobiologia, 2016. **777**(1): p. 67-78.
29. Jasper, J.T., et al., *Unit process wetlands for removal of trace organic contaminants and pathogens from municipal wastewater effluents*. Environmental engineering science, 2013. **30**(8): p. 421-436.
30. Binelli, A., et al., *The biofiltration process by the bivalve *D. polymorpha* for the removal of some pharmaceuticals and drugs of abuse from civil wastewaters*. Ecological Engineering, 2014. **71**: p. 710-721.
31. Elissen, H.J., et al., *A new reactor concept for sludge reduction using aquatic worms*. Water Research, 2006. **40**(20): p. 3713-3718.
32. Hendrickx, T., et al., *Aquatic worms eating waste sludge in a continuous system*. Bioresource Technology, 2009. **100**(20): p. 4642-4648.
33. Tamis, J., G. van Schouwenburg, and H. Bronckhorst, *Slibafbraak door oligochaeten*. 2010: STOWA.
34. Hendrickx, T., et al., *Design parameters for sludge reduction in an aquatic worm reactor*. Water research, 2010. **44**(3): p. 1017-1023.
35. Gergs, R. and K.O. ROTHHAUPT, *Feeding rates, assimilation efficiencies and growth of two amphipod species on biodeposited material from zebra mussels*. Freshwater Biology, 2008. **53**(12): p. 2494-2503.
36. Tang, Y., et al., *Aquatic macrophytes can be used for wastewater polishing but not for purification in constructed wetlands*. Biogeosciences, 2017. **14**(4): p. 755.
37. Becerra, M., et al., *Azolla filiculoides as partial replacement for traditional protein supplements in diets for growing-fattening pigs based on sugar cane juice*. Livestock Research for Rural Development, 1990. **2**(2): p. 15-22.
38. Henry-Silva, G.G., A.F. Camargo, and M.M. Pezzato, *Growth of free-floating aquatic macrophytes in different concentrations of nutrients*. Hydrobiologia, 2008. **610**(1): p. 153.
39. De Lyon, M. and J. Roelofs, *Waterplanten in relatie tot waterkwaliteit en bodemgesteldheid: parts 1 and 2*. University of Nijmegen, Nijmegen, 1986. **106**.
40. Peters, G.A. and B.C. Mayne, *The Azolla, Anabaena Azollae Relationship*. Plant Physiology, 1974. **53**(6): p. 813-819.
41. Giesen, A., et al., *Advancements in the application of aerobic granular biomass technology for sustainable treatment of wastewater*. Water Practice and Technology, 2013. **8**(1): p. wpt. 2013007.
42. Judd, S., *The MBR book: Principles and applications of membrane bioreactors in water and wastewater treatment*, S. Judd and C. Judd, eds., Elsevier. 2006, Oxford, UK.

43. Graaff, M.d., et al., *Vervolgonderzoek A-trap: bouwstenen voor het A-trap procesontwerp*. STOWA rapport, 2014.
44. Kempen, M.M., et al., *Interacting effects of atmospheric CO₂ enrichment and solar radiation on growth of the aquatic fern Azolla filiculoides*. Freshwater Biology, 2016. **61**(5): p. 596-606.
45. Pelegrí, S.P. and T.H. Blackburn, *Effects of Tubifex tubifex (Oligochaeta: Tubificidae) on N-mineralization in freshwater sediments, measured with ¹⁵N isotopes*. Aquatic Microbial Ecology, 1995. **9**(3): p. 289-294.
46. Ali, S. and I. Watanabe, *Response of Azolla to P, K, and Zn in different wetland rice soils in relation to chemistry of floodwater*. Soil science and plant nutrition, 1986. **32**(2): p. 239-253.
47. Binelli, A., et al., *In vivo experiments for the evaluation of genotoxic and cytotoxic effects of triclosan in zebra mussel hemocytes*. Aquatic Toxicology, 2009. **91**(3): p. 238-244.
48. Carvalho, P.N., et al., *A review of plant-pharmaceutical interactions: from uptake and effects in crop plants to phytoremediation in constructed wetlands*. Environmental Science and Pollution Research, 2014. **21**(20): p. 11729-11763.
49. Milanese, M., et al., *The marine sponge Chondrilla nucula Schmidt, 1862 as an elective candidate for bioremediation in integrated aquaculture*. Biomolecular engineering, 2003. **20**(4): p. 363-368.
50. Hadas, E., M. Shpigel, and M. Ilan, *Sea ranching of the marine sponge Negombata magnifica (Demospongiae, Latrunculiidae) as a first step for latrunculin B mass production*. Aquaculture, 2005. **244**(1): p. 159-169.
51. Elissen, H., et al., *Aquatic worms grown on biosolids: Biomass composition and potential applications*. Bioresource technology, 2010. **101**(2): p. 804-811.
52. Mount, D.R., et al., *Use of the oligochaete, Lumbriculus variegatus, as a prey organism for toxicant exposure of fish through the diet*. Environmental toxicology and chemistry, 2006. **25**(10): p. 2760-2767.
53. Wagner, G.M., *Azolla: a review of its biology and utilization*. The Botanical Review, 1997. **63**(1): p. 1-26.
54. Costa, M.L., M.C. Santos, and F. Carrapiço, *Biomass characterization of Azolla filiculoides grown in natural ecosystems and wastewater, in Biology, Ecology and Management of Aquatic Plants*. 1999, Springer. p. 323-327.
55. Fasakin, E. and A. Balogun, *Nutritional and anti-nutritional analyses of Azolla africana Desv. and Spirodela polyrrhiza L. Schleiden as feedstuffs for fish production*. 2001.
56. Ahmed, H., et al., *Performance of growing sheep on Azolla based diets*. Indian Journal of Animal Research, 2016. **50**(5): p. 721-724.
57. Paoletti, C., et al., *Lipid composition of Azolla caroliniana biomass and its seasonal variation*. Phytochemistry, 1987. **26**(4): p. 1045-1047.
58. Brouwer, P., et al., *Lipid yield and composition of Azolla filiculoides and the Implications for biodiesel production*. BioEnergy Research, 2016. **9**(1): p. 369-377.
59. ABC-Kroos-BV. 2015; Available from: <http://abc-kroos.nl/>.
60. Derksen, H. and L. Zwart, *Haalbaarheidsstudie naar de ontwikkeling van eendenkroos als een nieuw zetmeelgewas*. 2010.
61. Tanner, C.C., *Plants for constructed wetland treatment systems—a comparison of the growth and nutrient uptake of eight emergent species*. Ecological engineering, 1996. **7**(1): p. 59-83.

62. Wu, H., et al., *Nutrient removal in constructed microcosm wetlands for treating polluted river water in northern China*. Ecological Engineering, 2011. **37**(4): p. 560-568.
63. Boyd, C.E., *Vascular aquatic plants for mineral nutrient removal from polluted waters*. Economic Botany, 1970. **24**(1): p. 95-103.
64. Rogers, F.E., K.H. Rogers, and J.S. Buzer, *Wetlands for wastewater treatment: with special reference to municipal wastewaters*. 1985: Witwatersrand University Press.
65. Reddy, K. and W. DeBusk, *Growth characteristics of aquatic macrophytes cultured in nutrient-enriched water: I. Water hyacinth, water lettuce, and pennywort*. Economic Botany, 1984. **38**(2): p. 229-239.
66. Reddy, K., *Fate of nitrogen and phosphorus in a waste-water retention reservoir containing aquatic macrophytes*. Journal of Environmental Quality, 1983. **12**(1): p. 137-141.
67. Binelli, A., et al., *Toxicity decrease in urban wastewaters treated by a new biofiltration process*. Science of the Total Environment, 2015. **537**: p. 235-242.
68. Magni, S., et al., *Removal of metallic elements from real wastewater using zebra mussel bio-filtration process*. Journal of Environmental Chemical Engineering, 2015. **3**(2): p. 915-921.
69. Waajen, G.W., et al., *Biomanipulation with quagga mussels (Dreissena rostriformis bugensis) to control harmful algal blooms in eutrophic urban ponds*. Ecological Engineering, 2016. **90**: p. 141-150.
70. Mackie, G. and C. Wright, *Ability of the zebra mussel, Dreissena polymorpha to biodeposit and remove phosphorus and BOD from diluted activated sewage sludge*. Water Research, 1994. **28**(5): p. 1123-1130.
71. Elliott, P., D.C. Aldridge, and G.D. Moggridge, *Zebra mussel filtration and its potential uses in industrial water treatment*. Water Research, 2008. **42**(6): p. 1664-1674.
72. Reeders, H. and A. Vaate, *Bioprocessing of polluted suspended matter from the water column by the zebra mussel (Dreissena polymorpha Pallas)*. Hydrobiologia, 1992. **239**(1): p. 53-63.
73. Ismail, N.S., et al., *Improvement of urban lake water quality by removal of Escherichia coli through the action of the bivalve Anodonta californiensis*. Environmental science & technology, 2015. **49**(3): p. 1664-1672.
74. McIvor, A.L., *Freshwater mussels as biofilters*. 2004, University of Cambridge.
75. Al Mamun, A. and M.A. Khan, *Freshwater Mussels (Margaritifera margaritifera): Bio-filter Against Water Pollution*. World Applied Sciences Journal, 2011. **12**(5): p. 580-585.
76. Rosa, I.C., et al., *Bioremediation of metal-rich effluents: could the invasive bivalve work as a biofilter?* Journal of environmental quality, 2014. **43**(5): p. 1536-1545.
77. Pau, C., et al., *Filtering capacity of Daphnia magna on sludge particles in treated wastewater*. Water research, 2013. **47**(1): p. 181-186.
78. Matamoros, V., L. Sala, and V. Salvadó, *Evaluation of a biologically-based filtration water reclamation plant for removing emerging contaminants: a pilot plant study*. Bioresource technology, 2012. **104**: p. 243-249.
79. Hartikainen, H., et al., *Bryozoan populations reflect nutrient enrichment and productivity gradients in rivers*. Freshwater Biology, 2009. **54**(11): p. 2320-2334.
80. Hendrickx, T., et al., *The effect of operating conditions on aquatic worms eating waste sludge*. Water Research, 2009. **43**(4): p. 943-950.

81. Hendrickx, T., et al., *Aquatic worms eat sludge: mass balances and processing of worm faeces*. Journal of hazardous materials, 2010. **177**(1): p. 633-638.
82. Hendrickx, T.L., et al., *Operation of an aquatic worm reactor suitable for sludge reduction at large scale*. Water research, 2011. **45**(16): p. 4923-4929.
83. Tamis, J., et al., *A full scale worm reactor for efficient sludge reduction by predation in a wastewater treatment plant*. Water research, 2011. **45**(18): p. 5916-5924.
84. de Valk, S., et al., *Physical and biochemical changes in sludge upon Tubifex tubifex predation*. Environmental technology, 2017. **38**(12): p. 1524-1538.
85. Zhang, Q., et al., *Achieving one-stage sludge reduction by adding Chironomid larvae in wastewater treatment systems*. Ecological Engineering, 2015. **83**: p. 291-295.
86. Coogan, M.A. and T.W.L. Point, *Snail bioaccumulation of triclocarban, triclosan, and methyltriclosan in a North Texas, USA, stream affected by wastewater treatment plant runoff*. Environmental Toxicology and Chemistry, 2008. **27**(8): p. 1788-1793.
87. Jin, C., et al., *The pulmonata snail Lymnaea is a potential biomanipulation species for use against cyanobacteria blooms*. Journal of Freshwater Ecology, 2015. **30**(4): p. 479-490.
88. Apha, *Standard methods for the examination of water and wastewater*. 1985: Apha.
89. Geurts, J.J., et al., *Sediment Fe: PO4 ratio as a diagnostic and prognostic tool for the restoration of macrophyte biodiversity in fen waters*. Freshwater Biology, 2008. **53**(10): p. 2101-2116.
90. Van Kempen, M.M. and A.J. Smolders, *Azolla: Van plaagsoort tot groenproduct*. Vakblad natuur bos landschap, 2015. **Themanummer groene grondstoffen** (12(2015)118).
91. Hasan, M.R. and C. Rina, *Use of algae and aquatic macrophytes as feed in small-scale aquaculture: a review*. 2009: Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO).
92. Teygeler, R., *Waterhyacintpapier. Bijdrage aan een duurzame toekomst/Water hyacinth paper. Contribution to a sustainable future [bi-lingual]*. Torley and Gentenaar (Eds.), Papier en Water/Paper and Water, 2000: p. 168-188.
93. Schmidt-Kloiber, A. and D. Hering, *The taxa and autecology database for freshwater organisms, version 7.0*. Available from: <http://www.freshwaterecology.info>, 2016.
94. Økland, K.A., *Life history and growth of Asellus aquaticus (L.) in relation to environment in a eutrophic lake in Norway*. Hydrobiologia, 1978. **59**(3): p. 243-259.
95. Park, B.K. and M.-M. Kim, *Applications of chitin and its derivatives in biological medicine*. International journal of molecular sciences, 2010. **11**(12): p. 5152-5164.
96. Graca, M., L. Maltby, and P. Calow, *Comparative ecology of Gammarus pulex (L.) and Asellus aquaticus (L.) I: population dynamics and microdistribution*. Hydrobiologia, 1994. **281**(3): p. 155-162.
97. Elissen, H.J., *Sludge reduction by aquatic worms in wastewater treatment: with emphasis on the potential application of Lumbriculus variegatus*. 2007.
98. Temmink, R.J.M., et al., *Azolla along a phosphorus gradient: biphasic growth response linked to diazotroph traits and phosphorus-induced iron chlorosis*. Scientific Reports, in press. <<

Bijlagen

Bijlage 1: Selectie waterplanten literatuuronderzoek

Studies zijn gezocht met de zoekmachines Google Scholar en ISI Web of Knowledge, met behulp van de volgende zoektermen: “nutrient removal” or “nutrient sequestration” and/or “constructed wetlands” and/or “macrophytes”. De studies zijn geselecteerd als 1) het onderzoek een Free Water Surface zuiveringsmoeras betrof (waarbij het waterpeil boven het bodemoppervlak staat); 2) sequestratie snelheden voor fosfor gekwantificeerd waren; en 3) als de fosfor concentratie in de plant zelf gemeten was. De maximum P sequestratie is in dit onderzoek opgenomen.

Tabel S1: Overzicht en *long list* moerasplanten geïncludeerd in het literatuuronderzoek naar het inzetten van planten bij waterzuivering en fosforterugwinning (nb = niet beschikbaar).

Plantensoort	Nederlandse naam	P concentratie groeimedium (mg/L)	N concentratie groeimedium (mg/L)	Studie
<i>Phragmites australis</i>	Riet	11,4	79,8	[61]
<i>Juncus effusus</i>	Pitrus	11,4	79,8	[61]
<i>Schoenoplectus validus</i>	Ruwe bies	11,4	79,8	[61]
<i>Cyperus involucratus</i>	Parapluplant	11,4	79,8	[61]
<i>Glyceria maxima</i>	Liesgras	11,4	79,8	[61]
<i>Zizania latifolia</i>	Wilde rijst	11,4	79,8	[61]
<i>Iris pseudocarus</i>	Gele lis	18,8	1,6	[62]
<i>Typha latifolia</i>	Grote lisdodde	nb	nb	[63]
<i>Cyperus papyrus</i>	Papyrus	nb	nb	[64]
<i>Azolla filiculoides</i>	Kroosvaren	21,0	3,0	[65]
<i>Lemna minor</i>	Klein kroos	21,0	3,0	[65]
<i>Spirodela polyrhiza</i>	Veelwortelig kroos	21,0	3,0	[65]
<i>Eichhornia crassipes</i>	Water hyacinth	nb	nb	[63]
<i>Pistia stratiotes</i>	Watersla	nb	nb	[64]
<i>Hydrocotyle umbellata</i>	Waternavel	10,0	5,0	[66]
<i>Ceratophyllum demersum</i>	Grof hoornblad	nb	nb	[36]
<i>Myriophyllum spicatum</i>	Aarvederkruid	nb	nb	[36]
<i>Potamogeton pectinatus</i>	Schedefonteinkruid	nb	nb	[64]
<i>Egeria densa</i>	waterpest	10,0	5,0	[66]

Bijlage 2: Literatuuronderzoek
aquatische dieren en waterzuivering

Tabel S2: Overzicht van de verschillende soorten dieren waar tot nu toe onderzoek naar is gedaan naar waterzuivering en slibreductie.

Soort	Nederlandse naam	Water type	Studie
Filtreerders			
<u>Tweekleppigen</u>			
<i>Dreissena spp.</i>	Driehoeksmossel	RWZI Effluent	[67] [30] [68]
<i>Dreissena rostriformis bugensis</i>	Quaggamossel	Eutroof oppervlakte water	[69]
<i>Dreissena polymorpha</i>	Driehoeksmossel	Actief slib RWZI (verdund)	[70]
<i>Dreissena polymorpha</i>	Driehoeksmossel	Industrieel effluent	[71]
<i>Dreissena polymorpha</i>	Driehoeksmossel	Eutroof oppervlakte water	[72]
<i>Anodonta californiensis</i>		Eutroof oppervlakte water	[73]
<i>Anodonta anatina</i> , <i>Unio pictorum</i> en <i>Unio tumidus</i>	Vijvermossel, schildermossel en Bolle stroommossel	Influent drinkwaterzuivering	[74]
<i>Margaritifera margaritifera</i>	Beekparelmossel	Eutroof water	[75]
<i>Corbicula fluminea</i>	Aziatische korfmossel	Industrieel effluent	[76]
<u>Zoöplankton</u>			
<i>Daphnia magna</i>	Watervlooiensoort	RWZI Effluent	[77]
Zoöplankton: verschillende soorten		RWZI Effluent	[78]
<u>Sponzen/mosdiertjes</u>			
<i>Fredericella sultana</i>	Mosdiertjessoort	Eutroof water	[79]
Vergaarders			
<u>Wormen</u>			
<i>Lumbriculus variegatus</i>	Broze slibworm	Actief slib RWZI	[31, 32, 34, 80-82]
<i>Aulophorus furcatus</i>		Actief slib RWZI	[33, 83]
<i>Tubifex tubifex</i>	Gewone slingerworm	Actief slib RWZI	[84]
<u>Muggenlarven</u>			
<i>Chironomid larvae</i>	Muggenlarven	Actief slib RWZI	[85]
Schrapers/grazers			
<u>Slakken</u>			
<i>Helisoma trivolvis</i>		Oppervlaktewater na RWZI effluent	[86]
<i>Lymnaea spp.</i>	Poelslak	Aquacultuur vijvers	[87]

Bijlage 3: Formule gebruikt voor berekenen slibreductie

De slibreductie (SR, g ds slib/ g ds dier) voor de verschillende soorten dieren hebben we berekend aan de hand van de volgende formule:

$$SR = \frac{(F_0 \times C_F) - F_t}{W}$$

Waarin F_0 (g ds/L) de concentratie slibdeeltjes aan het begin van het experiment zijn, F_t (g ds/L) de slibdeeltjes die nog over zijn aan het einde van het experiment, W is het drooggewicht van de dieren (g) en C_F is een correctiefactor voor de afbraak van de microbiële oxidatie processen.

De correctiefactor C_F is berekend aan de hand van de volgende formule:

$$C_F = \frac{C_t}{C_0}$$

In deze formule is C_t de slibdeeltjes die nog over zijn aan het einde van het experiment in de controle aquaria (zonder dieren) en C_0 de concentratie slibdeeltjes in de controle aquaria aan de start van het experiment.

Bijlage 4: Proefopzet cascaderingsexperiment

Voor het cascaderingsexperiment hebben we op laboratoriumschaal een waterzuiveringssysteem gebouwd met drie compartimenten: een wormenaquarium (17 x 10 x 15 cm, l x h x b), een bezinkaquarium om overtollige deeltjes te verwijderen (20 x 12.5 x 10 cm), en een plantenaquarium (50 x 10 x 10 cm). Uit eerdere pilotexperimenten bleek dat het zeer ingewikkeld is om de wormenbiomassa en het aantal slibdeeltjes dat door het waterzuiveringssysteem komt goed op elkaar af te stemmen. Dit heeft voornamelijk te maken met een hoog biologisch zuurstofverbruik; om deze reden is een bezinkbak (tweede compartiment) tussen het wormen- (eerste compartiment) en plantenaquarium (derde compartiment) geplaatst. Een te hoog zuurstofverbruik door micro-organismen bij de afbraak van organisch stof kan ervoor zorgen dat de wormen onvoldoende zuurstof krijgen en afsterven. Daarnaast duurt het een aantal weken voordat het systeem opgestart is. Om die reden zijn de wormen tenminste één maand opgekweekt op water uit de beluchtingstank, en de planten op

effluent uit de nabezinktank. Om de afvalwaterzuiveringscapaciteiten van de wormen en planten gezamenlijk en apart te testen, zijn er drie verschillende behandelingen ingezet ([Informatiebox 6b](#)):

1. Wormen + planten: in deze behandeling zaten in het eerste compartiment wormen en in het derde compartiment planten.
2. Controle + planten: hierbij was het eerste compartiment zonder wormen en zaten in het derde compartiment planten. Deze behandeling was om te kijken of er effecten waren van de wormen op de groei van de planten in vergelijking met behandeling 1.
3. Controle + Controle: ter controle was er één behandeling met zowel compartiment 1 en 3 zonder organismen.

Alle behandelingen zijn uitgevoerd met 4 replica's.

Slibdeeltjes werden uit het de bezinkaquaria verwijderd met behulp van filterpompen. Filters werden dagelijks gereinigd, en de hoeveelheid deeltjes die vanuit de wormenaquaria in de bezinktank terechtkwamen gemeten. Alle aquaria stonden in een waterbad, met een constante temperatuur

van gemiddeld $17,5 \pm 0,6$ (SD) °C. Boven het experiment hingen extra lampen (400 W) die een licht:donker cyclus van 16:8 uur aanhielden, de lampen gingen aan als de natuurlijke lichtintensiteit onder 250 W/m^2 lag. De eerste twee compartimenten van het systeem, en de controlebehandelingen van de plantenaquaria, werden afgedekt met folie om algengroei te voorkomen (**Figuur S1**). Afvalwater werd tweewekelijks verzameld uit de beluchtingstank op RWZI Nijmegen, gekoeld bij 4 °C en om de dag aangevoerd vanuit een 30 L emmer naar het waterzuiveringssysteem. De aanvoeremmer was gekoeld (18 °C), en deze bleef gemixt met behulp van een pomp om deeltjes gelijkmatig aan te voeren in alle behandelingen. Vanuit de aanvoeremmer werd het water met behulp van peristaltische pompen (Masterflex L/S; Cole-Parmer, USA) in het eerste compartiment gepompt. Via een overloop in de aquaria liep het water door het systeem heen. Elk aquaria had een volume van 2,5 L, en de pompsnelheid waarmee het water aangevoerd werd was $1,12 \pm 0,02$ L/uur. De pompen waren aangesloten op een tijdsschakelaar om pulsgewijs water in het systeem te leiden, wat resulteerde in een verblijftijd van 3 dagen. De duur van het experiment was

4 weken, en vooraf daaraan duurde de acclimatisatieperiode voor de wormen in dit systeem 2 weken.

De biomassaproductie van wormen is gemeten door aan het begin van het experiment (vooraf aan de acclimatisatieperiode) het natgewicht te bepalen (en een conversiefactor van de natgewicht:drooggewicht ratio). Aan het einde van het experiment is de biomassatoename bepaald. Aan de start van het experiment zijn de wormen ingezet met een dichtheid van 20 g/L (wat neerkomt op 50 gram natgewicht per aquarium, een optimum kweekdichtheid volgens ons dichtheidsexperiment (Zie hoofdstuk 3: laboratoriumexperiment met verschillende dichtheden wormen). Planten werden tweemaal per week geoogst om te voorkomen dat de dichtheid te groot werd en de groei om die reden zou stagneren.

In de instroom, het eerste compartiment (wormenaquaria) en het tweede compartiment (bezinkaquaria) is wekelijks het aantal slibdeeltjes bepaald (total suspended solids, TSS), volgens standaard methoden om (afval) water te analyseren [88]. De volume specifieke afbraaksnelheid (r_s , kg ds slib/m³/d) is aan de hand van de volgende formule berekend [33]:

$$R_s = \frac{F (X_{in} - X_{uit})}{V_r}$$

Waarin F de volume debiet (m³/d) is, X_{in} de ingaande slibconcentratie (kg/m³), X_{uit} de uitgaande slibconcentratie (kg/m³) en V_r de volume van de aquaria (m³).

Van alle aquaria, de instroom en uitstroom is de concentratie van de belangrijkste nutriënten bepaald (fosfaat, nitraat en ammonium) [zoals in Geurts et al. 2008; 89]. Wekelijks zijn de temperatuur, zuurstofconcentratie, chemisch zuurstofverbruik en pH gemeten [88]. Daarnaast is bepaald hoeveel fosfor er in de geoogste biomassa zit met een destructie [zoals in Geurts et al. 2008; 89], en hoeveel we dus in de vorm van biomassa kunnen onttrekken aan afvalwater. In dit rapport zijn alleen de resultaten van de laatste week van het experiment weergegeven, toen het systeem optimaal werkte. Voor de wormen is de biomassa weergegeven aan het 'begin' (vooraf aan de acclimatisatieperiode) en aan het einde van het experiment (dit is dus de groei in 6 weken).

Figuur S1: Proefopstelling cascade *Tubificidae* wormen en *Azolla filiculoides* (grote kroosvaren) in het kassencomplex van de Radboud Universiteit.



Bijlage 5: Kansrijke toepassingen van de verschillende organismen

Naast effluentwater nazuiveren en fosfor recycleren, willen we met Aquafarm ook biomassa produceren op afvalwater en het water daarmee valoriseren. Er is verkennend onderzoek gedaan naar de meest kansrijke toepassingen van diverse waterplanten. Omdat we ons in de rest van dit rapport richten op drijvende waterplanten, is alleen een korte samenvatting van de meest kansrijke toepassingen voor een aantal drijvende waterplanten weergegeven in tabel S3. Ook voor de aquatische dieren waarmee experimenten zijn gedaan in dit rapport zijn de belangrijkste kenmerken weergegeven met de meest kansrijke toepassingen (tabel S4).

Tabel S3: *Short list* van de meest kansrijke toepassingen van verschillende drijvende waterplanten.

Soorten	Waardevolle planteigenschappen	Meest kansrijke toepassing
<i>Azolla filiculoides</i> [37, 53, 58, 90, 91] Kroosvaren	Hoog eiwitgehalte, hoge fosfor- en stikstofopname, hoge biomassa productie	Groene meststof, eiwitbron (veevoer), biodiesel, oleochemicaliën
<i>Eichhornia crassipes</i> [91, 92] Water hyacint	Hoog vezelgehalte, hoge fosfor- en stikstofopname, hoge biomassa productie	Vezelproducten (papier, manden)
<i>Lemna spp.</i> [60, 91] Kroos	Hoog eiwit- en zetmeelgehalte, hoge fosfor- en stikstofopname, hoge biomassa productie	Bioplastics, eiwitbron, niet-voedsel toepassingen gelijk aan soja (zoals bijvoorbeeld lijn, verdikkingsmiddel)
(Draad)algen [91]	Hoog eiwitgehalte, hoge fosfor- en stikstofopname, hoge biomassa productie	Textiel

Tabel S4: *Short list* van de aquatische dieren die gebruikt zijn in de experimenten met hun kenmerken en mogelijke toepassingen

Soorten	Kenmerken	Mogelijke toepassingen
Zoetwaterpissebed (<i>Asellus aquaticus</i>)	<u>Ecologie</u>: Een veel voorkomende soort in Europa en is voornamelijk te vinden in langzaam stromende en stilstaande wateren. Kan in hoge dichtheden voorkomen en is redelijk tolerant tegen organische vervuiling. <u>Functional feeding group</u>: Grazer/scrapper:3, Shredder: 3, Gatherer/collector: 4 [93] <u>Voortplanting</u>: Kan het hele jaar door als de temperatuur hoog genoeg is (>8°C) en vrouwtjes kunnen per keer zo'n 200 eieren uitbroeden [94].	Chitine: chitosan voor indikken van slib voor waterschappen en daarnaast kan het potentieel gebruikt worden voor medische en farmaceutische doeleinden [95]
Vlokreeft (<i>Gammarus pulex</i>)	<u>Ecologie</u>: Een wijdverspreide en veel voorkomende soort in Europa en komt voornamelijk voor in stromende wateren [96], waaronder sloten, beken en rivieren. <u>Functional feeding group</u>: Grazer/scrapper:1, Shredder: 6, Gatherer/collector: 2, Predator: 1[93] <u>Voortplanting</u>: In natuurlijke systemen vindt de voortplanting plaats van begin lente tot het midden van de herfst [96]. Echter als de temperaturen hoog genoeg zijn kunnen ze zich het hele jaar voortplanten.	Chitine: chitosan voor indikken van slib voor waterschappen en daarnaast kan het potentieel gebruikt worden voor medische en farmaceutische doeleinden [95]
Tubificidae wormen	<u>Ecologie</u>: Deze aquatische wormen leven op de bodem wateren en kunnen in hoge dichtheden voorkomen .De meeste soorten zijn erg tolerant voor eutrofe condities en lage zuurstof concentraties [97]. <u>Functional feeding group</u>: Gatherer/collector: 10 [93] <u>Voortplanting</u>: Er vindt seksuele reproductie plaats en ze kunnen tot 300 eieren per worm binnen 100 dagen produceren [97].	Coatings, lijm, emulgatoren, bevochtigingsmiddelen, zeep, plastic, visvoer [51]

Website
E-mail

www.aquafarm.nl
info@aquafarm.nl

