

Productie van zoutwateralgen voor toepassingen in food (en feed) Deelrapport II

Werkpakketten 1&2 van project Foodgrade productie van zoutwateralgen
Deelrapport II: Batchexperimenten met zoute reststromen en verschillende mariene algensoorten

Auteurs: H.J.H. Elissen, S.A. Gastra & R.Y. van der Weide



Productie van zoutwateralgen voor toepassingen in food (en feed) Deelrapport II

Werkpakketten 1&2 van project **Foodgrade productie van zoutwateralgen**
Deelrapport II: Batchexperimenten met zoute reststromen en verschillende mariene algensoorten

Auteurs: H.J.H. Elissen, S. Gaastra & R.Y. van der Weide

Dit onderzoek is in opdracht van SNN/EU- Fryslân Fernijt uitgevoerd door Stichting Wageningen Research, onderzoeksinstituut Wageningen Plant Research, Business unit Praktijkonderzoek AGV, team ACRRES.

Dit project werd medegefinancierd door het ministerie van Economische Zaken, het Samenwerkingsverband Noord Nederland en de provincie Fryslân.

WR is een onderdeel van Wageningen University & Research, samenwerkingsverband tussen Wageningen University en de Stichting Wageningen Research.

Wageningen, januari 2018

Rapport-750

© 2018 Lelystad , Stichting Wageningen Research, Wageningen Plant Research, Business unit Akkerbouw, Groene Ruimte en Vollegrondsgroenteteelt, Postbus 430, 6700 AK Lelystad
T 0320 29 11 11; www.wur.nl/plant-research

KvK: 09098104 te Arnhem
VAT NL no. 8113.83.696.B07

Stichting Wageningen Research. Alle rechten voorbehouden. Niets uit deze uitgave mag worden verveelvoudigd, opgeslagen in een geautomatiseerd gegevensbestand, of openbaar gemaakt, in enige vorm of op enige wijze, hetzij elektronisch, mechanisch, door fotokopieën, opnamen of enige andere manier zonder voorafgaande schriftelijke toestemming van Stichting Wageningen Research.

Stichting Wageningen Research is niet aansprakelijk voor eventuele schadelijke gevolgen die kunnen ontstaan bij gebruik van gegevens uit deze uitgave.

Samenvatting

De commerciële kweek van microalgen voor foodtoepassingen staat sterk in de belangstelling. Het kweken van zoutwatalgen in reactoren met LED lampen heeft verschillende voordelen. Zoutwatalgen bevatten waardevolle inhoudsstoffen, zoals antioxidanten, en hoge saliniteit in kweeksystemen kan leiden tot minder contaminatie. Door ze te kweken in gesloten systemen bij verschillende LED lichtgolflengtes (kleuren) kunnen hoge biomassaconcentraties behaald worden en kunnen productie van biomassa en waardevolle inhoudsstoffen gestuurd worden.

Vanuit verschillende industrieën komen zoute reststromen vrij, die vaak een negatieve waarde hebben. In dit rapport worden een aantal van deze stromen besproken (dunne fractie digestaat van rundermest, kalium- en natriumpekels van zuivelindustrieën, brak grondwater, zeewater, purgewater en ruwe pekels van zoutwinning). Een mogelijkheid om de kosten (voor lozing of zuivering) te verminderen is de kweek van zoutwatalgen op deze stromen. De algen kunnen gebruikt worden als voeding(singrediënt).

Dit rapport beschrijft batchexperimenten waarin de groei van negen verschillende zoutwatalgen getest wordt op de genoemde reststromen. *Nannochloropsis gaditana*, *Phaeodactylum tricornutum*, *Tetraselmis chuii* (twee stammen), *Porphyridium purpureum*, *Dunaliella salina*, *Odontella aurita*, *Arthrospira platensis* en *Tetraselmis tetrathele*.

De experimenten werden uitgevoerd in wellplaten en 1 L reactoren met kunstlicht. Uit de testen bleken een aantal zoutwatalgen kweekbaar op verschillende reststromen. De best kweekbare algen waren *N. gaditana*, *A. platensis*, *P. purpureum* en *T. chuii* (AF&F) met name op de (verdunde) pekels uit de zuivelindustrie en de verdunde vloeibare fractie van digestaat. Het verdient aanbeveling om een aantal van deze combinaties verder experimenteel te optimaliseren.

English summary

There is a lot of interest in the commercial production of microalgae for food applications. Producing marine microalgae in reactors with LED lights has several advantages. Marine microalgae contain valuable components such as antioxidants, and high salinity levels in production systems can prevent contaminations with other organisms. Production in closed systems at different light wavelengths (colours) can result in high biomass concentrations and better control of biomass growth and production of valuable components. Several industries produce salt waste streams, often with associated processing costs. In this report a number of these streams is discussed (liquid fraction of cattle manure biogas slurry, potassium and sodium brines from dairy industries, brackish groundwater, seawater, purge water and brine from salt processing). An option for reducing costs (for disposal or treatment) is the production of marine microalgae on these streams. The algae can be used as food (ingredient).

This report describes batch experiments in which growth of nine microalgae species was tested on these waste streams: *Nannochloropsis gaditana*, *Phaeodactylum tricornutum*, *Tetraselmis chuii* (two strains), *Porphyridium purpureum*, *Dunaliella salina*, *Odontella aurita*, *Arthrospira platensis* and *Tetraselmis tetrathele*.

The experiments were performed in well plates and 1 L reactors with artificial (LED) lights. From the tests it was concluded that several of the algae species can be cultured on different waste streams. The best results were obtained with *N. gaditana*, *A. platensis*, *P. purpureum* en *T. chuii* (AF&F) on (diluted) brines from the dairy industry and the diluted liquid fraction of biogas slurry. It is recommended to optimize some of these combinations further in experiments.

Inhoudsopgave

Samenvatting	3
English summary	4
Afkortingen	7
1 Inleiding	8
2 Zoute reststromen	9
2.1 Zoutconcentraties	9
2.2 Andere parameters	10
2.3 Zoute reststromen	11
2.3.1 Brak grondwater	11
2.3.2 Waddenzeewater	13
2.3.3 Industriële zoute effluenten	13
2.3.4 Pekelwater	13
2.4 Digestaat uit vergisters	14
2.5 Effluenten uit zoutwinning	15
2.5.1 Andere stromen	16
3 Nabehandeling kweekwater	17
3.1 Lozing	17
3.2 Zuivering	17
3.3 Hergebruik	18
4 Experimenten	19
4.1 Well testen	19
4.1.1 Kweekcondities, algenstammen en reststromen	19
4.1.2 Welltesten 1 & 2 (Appendices V en VI)	20
4.1.3 Welltesten 3 & 4 (Appendices VII en VIII)	21
4.2 1L reactoren opzet (testen 5 & 6)	21
4.2.1 Kweekcondities, algenstammen en reststromen	21
4.2.2 1L test 5	22
4.2.3 1L test 6	22
5 Resultaten	23
5.1 Algemeen	23
5.2 Welltesten	23
5.2.1 Algemeen	23
5.2.2 Welltesten 1 & 2	24
5.2.3 Welltest 3	25
5.2.4 Welltest 4	26
5.2.5 Welltesten conclusies	26
5.3 1L reactoren	27
5.3.1 1L test 5	27
5.3.2 1L test 6	27
5.3.3 Algemeen	29

6	Conclusies	30
7	Literatuur	31
8	Appendices	34
	Appendix I Samenstelling geteste reststromen in welltesten 1&2	34
	Appendix II Samenstelling extra geteste reststromen in welltesten 3&4	35
	Kaaspekkel (stroom I)	35
	Appendix III Literatuuroverzicht van media voor zoutwatalgen	36
	Appendix IV Overzicht gebruikte algensoorten welltesten	37
	Foto's start welltesten	37
	Referentiefotos	38
	Appendix V Resultaten welltest 1	40
	Appendix VI Resultaten welltest 2	42
	Appendix VII Resultaten welltest 3	44
	Appendix VIII Resultaten welltest 4	46
	Appendix IX pH en T waarden in Experimenten 5 en 6 (1L reactoren)	48

Afkortingen

C:	zoutconcentratie
DS:	droge stof
dS:	deciSiemens
EC:	electrische conductiviteit
LED:	licht-emitterende diode
Microalgen:	in dit rapport verwijst deze term zowel naar cyanobacteriën, diatomeeën als algen
mmhos:	milli-mhos, omgekeerde van weerstand in Ohms
μS:	microSiemens
N _m :	stikstof mineraal
N _{org} :	stikstof organisch
N _{tot} :	stikstof totaal
OS:	organische stof
<i>Spirulina</i> :	heet tegenwoordig <i>Arthrospira</i> , maar de genus naam wordt nog steeds veelvuldig gebruikt
TDS:	total dissolved solids = totaal opgeloste stoffen
v.e.:	vervuilingseenheid, de gemiddelde hoeveelheid vervuiling van water die één persoon per jaar veroorzaakt

1 Inleiding

Dit rapport is onderdeel van een gezamenlijk project dat uitgevoerd werd door consortiumpartners Kelstein Algen B.V., AF&F B.V. en Wageningen University and Research ACRRES. Het doel was nieuwe innovatieve kweektechnologie te ontwikkelen voor de commerciële foodgrade productie van zoutwatalgen. Er werd gekeken naar soorten met een interessante biomassasamenstelling voor bedrijven in de voedings- en levensmiddelenindustrie. Zoutwatalgen kunnen, net als zoetwatalgen, gekweekt worden in open vijvers/'raceway vijvers', plaat- of buisfotobioreactoren. Fotobioreactoren hebben als voordeel dat ze minder gevoelig voor contaminatie zijn dan open systemen (Hohenadler, 2010). Daarnaast kan de biomassaconcentratie veel hoger worden en als gevolg daarvan dalen de oogstkosten. Nadelen zijn hoge overige productiekosten, algengroei op de wanden, te hoge zuurstofconcentraties en gevoeligheid voor opwarming. Plaat- en buisreactoren hebben een kortere lichtweg, wat biomassaproductie bevordert (Chen et al, 2013). Door gestuurde belichting in de vorm van LEDs kunnen de productie van biomassa en waardevolle inhoudsstoffen verhoogd worden. Het project startte met de ontwikkeling van een nieuwe kweekmethode voor het nabootsen van natuurlijke omstandigheden voor zoutwatalgen in een gesloten kweekstelsel met LED verlichting. Er is onderzocht hoe kweekparameters in de reactoren de stabiele en zuivere productie van geselecteerde zoutwatalgen beïnvloeden. Daarnaast is er onderzocht hoe de productie van de meest interessante inhoudsstoffen gestuurd kan worden. Verder hebben de consortiumpartners gekeken naar het benutten van laagwaardige (rest)stromen zoals restwarmte of zeewater c.q. zilt grondwater. Het is volledig nieuw om op een gecontroleerde wijze zoutwatalgen te laten groeien in een speciaal gesloten reactorsysteem voor de productie van waardevolle inhoudsstoffen waarbij gebruik wordt gemaakt van reststromen of laagwaardige grondstoffen.

Deelrapport I (WPR rapport 749) richt zich op achtergrondinformatie over zoutwatalgen, zoals selectie van soorten, inhoudsstoffen en omgevingsomstandigheden. Het huidige rapport (Deelrapport II) richt zich op het op kleine schaal testen van verschillende soorten zoutwatalgen op een aantal reststromen die mogelijk interessant zijn voor kweek op grote schaal. Dit is zowel in wellaten gedaan als in 1 L reactoren, beide met behulp van kunstlicht.

2 Zoute reststromen

De grootste kostenposten bij de kweek van algen betreffen energie en kunstmest (nutriënten) (Lowrey en Yildiz, 2014). CO₂- en nutriëntenvraag vormen dus de grootste belemmering voor succesvolle opschaling van algentechnologie. Maximale biomassaconcentraties van algen variëren (ongeveer) tussen 0.1 en 100 g DS/L en de hoogste waarden worden bereikt onder heterotrofe condities. Ook het vetgehalte kan sterk toenemen onder heterotrofe condities. Verschillende zoute waterige (rest)stromen kunnen in theorie, na een eventuele verrijking met nutriënten of een voorbehandelingsstap, gebruikt worden voor de kweek van zoutwateralgen. In het meest ideale geval is het een bron die zich in de buurt van de algenkweek bevindt en die na 'gebruik' geloosd of hergebruikt kan worden tegen geen of lage kosten. Wat verder van belang is, is dat de gekweekte algen voor foodgrade doeleinden gebruikt kunnen worden. Algemene selectiecriteria van zoute reststromen voor algenkweek en de mogelijke geschiktheid van specifieke stromen worden hieronder besproken.

2.1 Zoutconcentraties

Er zijn verschillende manieren om zoutconcentraties weer te geven. Voor verschillende soorten water kan er een indeling gemaakt worden op basis van chloorconcentratie, geleidbaarheid (EC in millimhos per centimeter (mmhos/cm), deciSiemens per meter (dS/m), of microSiemens per centimeter (1dS/m = 1000µS/cm)) of zoutpercentage (Tabel 1). 1000 µS/cm komt overeen met 10 mM NaCl.

Tabel 1 Overzicht van typische Cl-concentraties, geleidbaarheden en zoutgehaltes in verschillende waterbronnen

Waterbron	Parameter
	Cl-concentratie (mg/L)
Zeer zoet	<150
Zoet	150-300
Licht brak	300-1000
Brak	1000-5000
Brak-zout	5000-10000
Zout	>10000
Bron: Wamelink and Runhaar, 2000	
	Geleidbaarheid
Puur water	0,055 µS/cm
Gedistilleerd water	0,5 µS/cm
Bergwater	1,0 µS/cm
Huishoudelijk water	500 to 800 µS/cm
Max. voor drinkbaar water	1055 µS/cm
Zeewater	52 mS/cm
Bron: Hanna Instruments	
	Zoutgehalte
Zoetwater	< 0,05 % < 500 ppm
Brak water	0,05 - 3,0 % 500 - 30.000 ppm
Zout water	3,0 - 5,0 % 30.000 - 50.000 ppm
Brijn	> 5,0 % > 50.000 ppm
Bron: Grundfos, 2015	

Water met een zoutgehalte van 3,5 % heeft een geleidbaarheid van 42 mS per cm bij 15 °C. De relatie tussen zoutconcentratie (C) en EC bedraagt ongeveer $C = 640 \cdot EC$.

1000 mg/L of ppm zout staat gelijk aan 1.5 dS/m (of 1500 uS/cm). De zoutconcentratie kan ook worden uitgedrukt als totaal opgeloste stoffen (TDS) in milligram per liter water (mg/L) of gram zout per kubieke meter water (g/m³).

2.2 Andere parameters

Naast het zoutgehalte zijn andere parameters van belang om in te kunnen schatten of er op een reststroom zoutwateralgen kunnen groeien. Heringa et al (2013a) beschrijven dat in het geval van brak grondwater een aantal parameters getest moeten worden (Tabel 2).

Tabel 2 Componenten die geanalyseerd moeten worden om geschiktheid van brak grondwater voor algenkweek in te schatten (Uit: Heringa et al, 2013a)

Nutriënten	Macro ionen	Metalen	Overig
PO ₄	Cl	Fe	Saliniteit
NO ₃	Na	Cd	pH
NO ₂	Ca	Pb	Hardheid
NH ₄	Mg	Hg	Ijzersulfide
Si	K	Cu	
	SO ₄	As	
		Al	

Daarnaast kan in kortdurende bioassays de geschiktheid van waterige stromen bepaald worden voor de kweek van geselecteerde algen. Hiervoor is een standaard 72-uurs protocol beschikbaar (NEN-EN-ISO 10253:2006). Van der Hiele (2014) raadt aan om deze bioassays zowel met als zonder nutriëntenverrijking te doen.

Grondwatermonsters kunnen bijvoorbeeld verrijkt worden met Walne medium (van der Pluijm et al, 2013).

In veel gevallen is voor aquacultuurtoepassingen voorbehandeling nodig van grondwater (aeratie en filtratie voor ijzerverwijdering) (van der Hiele et al, 2014). Een voorbeeld wordt gegeven door van der Pluijm et al (2013) voor grondwater en Oosterscheldewater. De monsters werden 24 uur intensief belucht, gevolgd door twee maal filtreren m.b.v. een set van drie filterkaarsen met poriegroottes van achtereenvolgens 20, 10 en 5 µm. Gedurende het beluchten slaan ijzer(II)sulfide, ijzeroxides, calciumcarbonaat en magnesiumcarbonaat neer, die vervolgens uit het water verwijderd worden door de filtratiestappen. De filterkaarsen verwijderen ook grote anorganische deeltjes zoals zand en klei. Daarnaast brengt de beluchting zuurstof in het grondwater en stabiliseert de pH tot een niveau vergelijkbaar met dat van zeewater (~ pH 8). Tabel 3 geeft de gewenste waarden voor grondwater (en andere stromen) voor de teelt van algen (Heringa et al, 2013b).

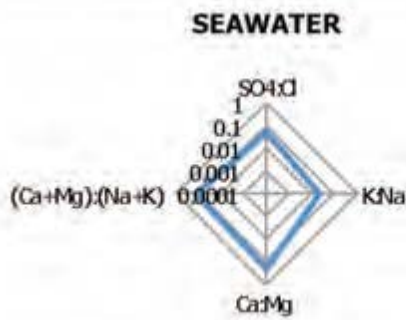
Tabel 3 Gewenste waarden van verschillende parameters in grondwater voor de teelt van algen (Uit: Heringa et al, 2013b)

Parameter	Waarde
Saliniteit g/L	15-35 g/L
Ijzerconcentraties mg/L	>1.5 mg/L
pH	7.0-8.2
N:P ratio	4-20
Absolute N concentratie (som van NH ₄ -N en NO ₃ -N)	>10 mg/L
Absolute PO ₄ -P concentratie	>1 mg/L
Si	>2 mg/L

Concentraties hoger dan 0.1 mg/L koper of zink kunnen groeibeperkend zijn voor algen (van der Weide et al, 2014). Ook kwik en cadmium kunnen toxisch zijn (Wu et al, 2014). De vraag is hoe inhiberende componenten gevonden en selectief verwijderd

kunnen worden (van der Hiele et al, 2014). De meeste chemicaliën binden metalen niet selectief. EDTA vormt bijvoorbeeld oplosbare metaalcomplexen, waardoor de metalen aanwezig blijven in het water. Het strippen van metalen is een betere methode om toxische effecten te verminderen, omdat de metalen verwijderd worden door ze aan harsen te binden zoals Chelex® 100 (Bio-Rad). Arseen kan verwijderd worden door adsorptie aan ijzeroxides, hydrotalciet of chitosan. Voorzover bekend is het balanceren van de ionenconcentraties belangrijker voor diatomeeën dan voor andere microalgen. Voor grootschalige voorbehandeling van grondwater en andere stromen moeten de kosten in overweging genomen worden. Indien de ionenconcentraties aangepast moeten worden, is het toevoegen van zouten bijvoorbeeld vaak te kostbaar. 'Natuurlijke' ionenwisselaars (klei, zeoliet) moeten regelmatig geregenereerd worden, wat energie en chemicaliën kost en dit proces is mogelijk niet effectief in chloride-rijke stromen. Ook het eerder genoemde toepassen van metalenverwijdering m.b.v. harsen is te kostbaar op grote schaal. Als organische componenten tot verstoring leiden kan een milde ozon of waterstofperoxide behandeling en actief kool filtratie gebruikt worden om het water te behandelen, afhankelijk van het benodigde volume.

De volgende verhoudingen zijn van belang wat betreft ionconcentraties: Na:K, Mg:Ca en N:P. Van der Hiele et al (2014) stellen als index voor de hardheid van water $(Ca+Mg):(Na+K)$ voor. Deze index is voor normaal zeewater rond 0.13, terwijl deze in problematische grondwatersoorten meestal tussen 0.25 en 0.30 ligt. Op basis van de ionenratios (sulfaatreductie, kaliumindex, calciumoverschot, hardheid) kan een 'handtekening' geconstrueerd worden, zoals weergegeven in Figuur 1 voor zeewater.



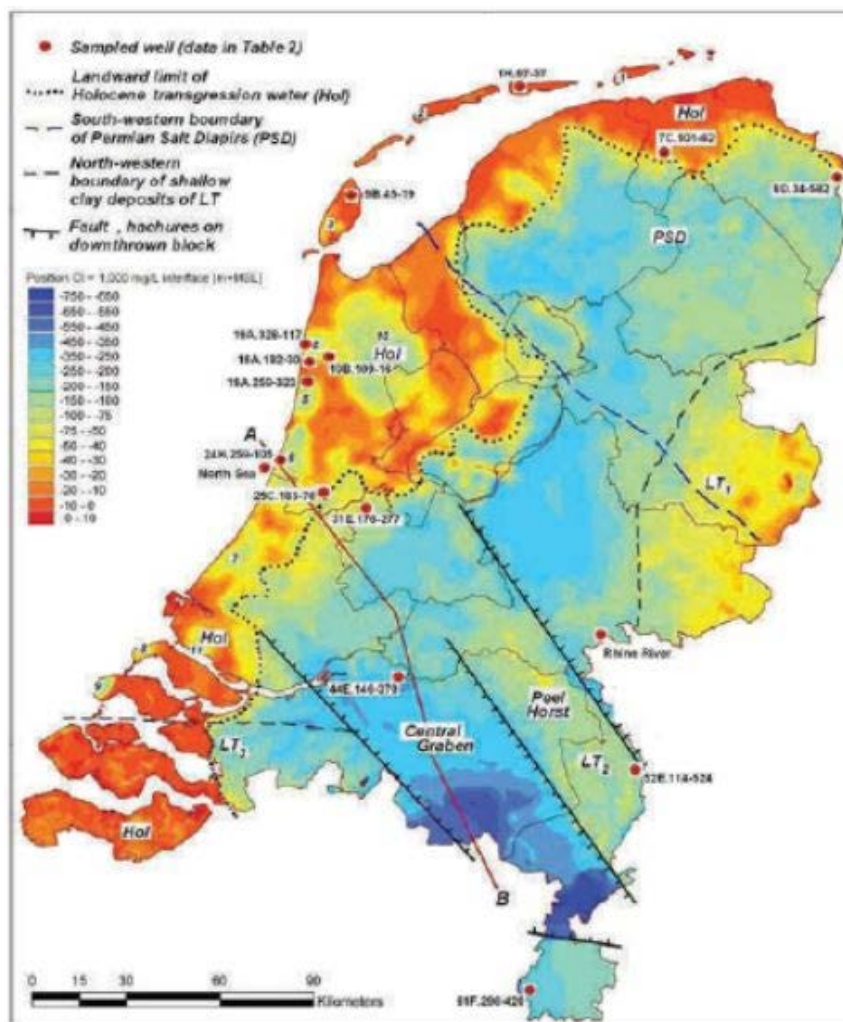
Figuur 1 Ionenratio 'handtekening' voor zeewater (Uit: van der Hiele et al, 2014)

Voor het kweken van zoutwateralgen zijn een aantal zoute reststromen mogelijk interessant. In onderstaande beschrijvingen worden deze gekarakteriseerd, indien mogelijk met voorbeelden die verder onderzocht zijn bij Wageningen University and Research ACRRES.

2.3 Zoute reststromen

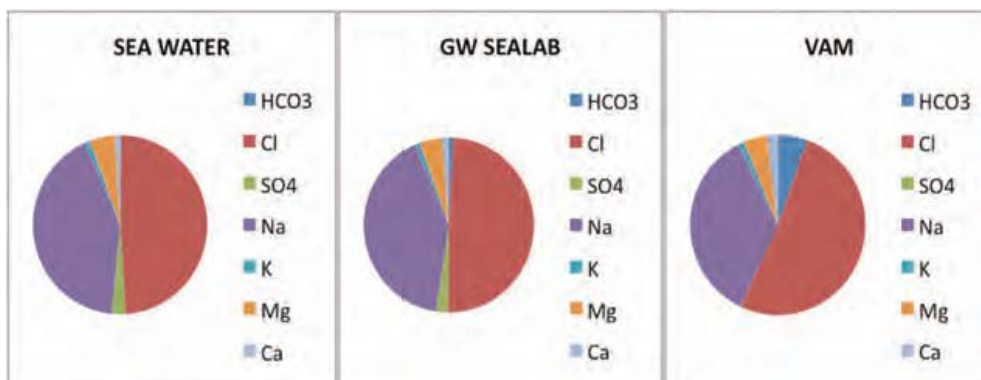
2.3.1 Brak grondwater

In delen van Nederland heeft het grondwater een verhoogd chloride/zoutgehalte (Figuur 2). Ook zijn er in sommige delen van Nederland (Drenthe, Gelderland en Limburg) verhoogde nitraatconcentraties aanwezig met name als gevolg van (over)bemesting (Sjerps et al, 2017).



Figuur 2 Overzichtskaart van Nederland met diepte waarop zich de grens bevindt tussen zoet (<1 g Cl/L) en zout water (>1 g Cl/L). Rood geeft aan dat de grensvlak zich aan het maaiveld bevindt (zout grondwater), blauw geeft aan dat het grensvlak zich ver onder maaiveld bevindt (Uit: Stichting Waterbuffer, 2017)

Er zijn op twee locaties grondwatermonsters genomen: bij ACRRES in Lelystad (locatie Runderweg, reststroom F en F2) en bij Kelstein in Hallum (reststroom D en D2). Het grondwater van de ACRRES locatie aan de Runderweg in Lelystad heeft een geleidbaarheid van 5.19 resp. 2.1 mS/cm en een pH van 7.29 resp. 7.9 (van Gennep, 2015). Het grondwater bij Kelstein heeft een geleidbaarheid van 2.91 resp. 2.5 mS/cm en een pH van 6.94 resp. 7.8. Als we de waarden van brak grondwater in de polder vergelijken met die van grondwater in Zeeland, dan zijn de zoutgehaltes in (dit) water uit Flevoland veel lager. Uit onderzoek blijkt dat lage zoutconcentraties (5-15 ppt) of onevenwichtige ionenconcentraties algengroei niet verhinderen, behalve voor centrische diatomeeën (van der Hiele, 2014). Figuur 3 (van der Hiele, 2014) laat de samenstelling zien van zeewater en twee soorten grondwater, waarbij de rechtersvariant de groei van *Skeletonema costatum* verhinderde (van der Pluijm et al, 2013) .



Figuur 3 Samenstelling (concentratie in mM) van zeewater en twee soorten grondwater (Uit: van der Hiele et al, 2014) waarvan de rechtersvariant niet geschikt was voor aquacultuur

2.3.2 Waddenzeewater

Zeewater kan gebruikt worden voor de groei van algen. De gemiddelde samenstelling van onvervuild zeewater volgens BINAS (2004) wordt weergegeven in Tabel 4.

Tabel 4 Gemiddelde samenstelling van zeewater (BINAS, 2004)

Ion	g/L
Chloride-ionen	19.455
Natrium-ionen	10.820
Sulfaat-ionen	2.715
Magnesium-ionen	1.304
Calcium-ionen	0.410
Kalium-ionen	0.390
Waterstofcarbonaat-ionen	0.144
Bromide-ionen	0.067
Boorzuur	0.027
Strontium-ionen	0.013
Fluoride-ionen	0.001

Verder komen er in zeewater nog sporen voor van argon, koolstof, radium, aluminium-, jodide-, kobalt-, lood-, nikkel-, uraan-, ijzer-, zink- en kwik-ionen. Zeewater kan voorbehandeld worden met NaHCO_3 om een overmaat aan calcium en magnesium neer te slaan (Mary Leema et al, 2010). Vervolgens kan het voorbehandelde zeewater gefilterd worden door een $0.22 \mu\text{m}$ cellulose-acetaat-filter (Millipore). De conductiviteit van Waddenzeewater uit Harlingen (reststroom C) is 38.6 mS/cm .

2.3.3 Industriële zoute effluenten

Lefebvre & Moletta (2006) noemen een aantal zoute reststromen uit de agrofood sector. Dit zijn stromen die vrijkomen bij het inmaken van groentes (bijv. olijven), inblikken/verwerken van vlees (ham, bacon), zuivelproducten (kaas) en visverwerkende industrieën. Deze laatste stromen bevatten grote hoeveelheden stikstof afkomstig van eiwitten, organisch materiaal en zouten. Een voorbeeld van succesvolle algenkweek op zoute reststromen is die van *Phaeodactylum tricornutum* op het effluent van een tarbotkwekerij (Hohenadler, 2010). In de experimenten beschreven in dit rapport wordt de groei van verschillende algen op pekelwater onderzocht.

2.3.4 Pekelwater

Pekelwater wordt gebruikt bij de bereiding van kaas. De kaas en de korst worden hierdoor steviger en het zout heeft een conserverende werking. Pekelwater wordt

gemaakt door een oplossing te maken met 20 % NaCl of KCl (voor mensen met natriumallergieën) en CaCl₂ en deze oplossing aan te zuren met HCl tot een pH van 4.5 (Blankespoor, 2015). Er is zo'n 2 % pekerverlies bij kaasbereiding. Dit houdt in dat er bij een jaarlijkse productie van 100 ton kaas, bijna 2000 liter pekewater vrijkomt per week. Het grootste deel is natriumpekkel (reststroom B) en een kleiner deel is kaliumpekkel (reststroom A). Dit pekewater kan geloosd worden of aan andere kaasfabrieken gegeven worden die hun systemen willen verversen. Pekelbaden worden normaal gesproken nooit compleet verversd. In de VS kost het lozen van pekewater zo'n 0.17 € per liter (CityLab, 2015). Pekewater moet voldoen aan foodgrade kwaliteitseisen en wordt regelmatig geanalyseerd. Het bevat, naast zout, calcium, fosfor, eiwitten (bijv. wei-eiwitten), melkvet, lactose, lactaat, micro-organismen en wrongeldeeltjes (Tamime, 2006; Cassano & Drioli, 2014). Het zoutgehalte van pekewater is extreem hoog. Vergelijkbaar hoge percentages worden ook aangetroffen in zoutmeren (salt evaporation ponds/ salterns/ salt pans) en de hoogste concentratie zout bevindt zich in het Don Juanmeer in Antarctica (40 % zout). Naast natuurlijke zoutmeren bestaan er ook kunstmatige meren voor zoutwinning (zoutpannen). De bekendste halofiele algen zijn van het geslacht *Dunaliella* of diatomeeën zoals *Nitzschia*. De lage pH van pekewater zal ook invloed hebben op de algengroei. Een soort die bijvoorbeeld voorkomt in afvalwater van Rio Tinto (pH 1.7-2.5) is *Chlamydomonas* spp. (Messerli et al, 2005). De bekendere soort *C. reinhardtii* kan leven vanaf pH 3 (optimum vanaf pH 5,5), maar is niet geschikt voor kweek op grote schaal (Perin et al, 2014).

Ook van een zuivelbedrijf zijn twee stromen getest die vrijkomen bij kaas- en zuivelbereiding: kaaspekkel en afvalwater van ontzoutingsinstallaties (brine) (reststromen I en J en een 1:1 mix van beide: reststroom K). De globale samenstelling van deze twee stromen is te vinden in Appendix II.

2.4 Digestaat uit vergisters

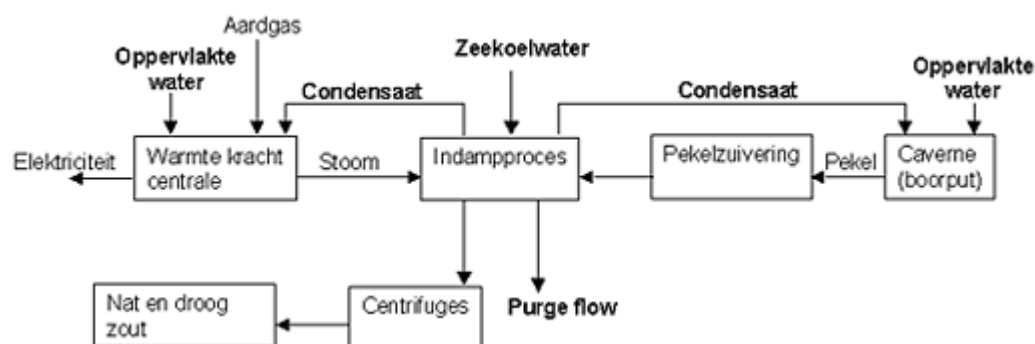
Gedurende anaerobe vergisting breken bacteriën biologische afbreekbare grondstoffen af (Plötnner et al, 2015). Naast biogas blijven er een dunne en een dikke fractie digestaat over. Normaal gesproken bevat digestaat minder C dan de grondstof, maar dode bacteriën en ander organisch C blijven aanwezig. Digestaat bevat grote hoeveelheden cellulose, lignine en anorganische nutriënten zoals NH₄⁺ (60-70 % van de totale N in het digestaat). NH₄⁺ wordt voor een deel omgezet in fytotoxisch NH₃. Digestaat wordt normaalgesproken gebruikt als meststof of, als het erg droog is, verder gecomposteerd, maar het heeft potentie om een goedkope nutriëntenbron voor algenkweek te zijn (Plötnner et al, 2015). Zij beschrijven in hun artikel een gecombineerd systeem voor algenkweek met flagellaten en digestaat. Van der Weide et al (2014) beschrijven dat de volgende zoutwateralgen in staat zijn om op digestaat te groeien: *Dunaliella tertiolecta*, *Rhizoclonium hieroglyphicum* en *Synechococcus*. *D. tertiolecta* groeide zelfs beter op digestaat dan *C. vulgaris*. De typische samenstelling van de dunne fractie van digestaat (ACRRES, rundermest) wordt weergegeven in Tabel 5 (reststroom E).

Tabel 5 Samenstelling dunne fractie digestaat. DS= droge stof, OS=organische stof, N_{tot}= stikstof totaal, N_m= stikstof mineraal, N_{org}= stikstof organisch

Component	Concentratie g/L	Component	Concentratie g/L	Component	Concentratie g/L
DS	38-42	N _m	2.2-2.4	K	5.4-5.7
OS	24-27	N _{org}	1.6-1.8	Mg	<0.4
As	14-15	P	0.15-0.22	Na	0.7
N _{tot}	3.9-4.2	P ₂ O ₅	0.34-0.50	C/N	3

2.5 Effluentten uit zoutwinning

Frisia Zout BV in Harlingen is een zoutverwerkingsinstallatie en produceert 1.2 miljoen ton zout per jaar. De stoom die nodig is voor het proces wordt geleverd door de REC (Reststoffen Energie Centrale van OMRIN) aan de bestaande warmtekrachtcentrale. Met de stoom wordt elektriciteit opgewekt in de WKC en de gereduceerde stoom wordt geleverd aan het indamproces. Het zout is voornamelijk bestemd voor de chemische industrie maar ook voor andere toepassingen in menselijke voeding, diervoeding en waterbehandeling. Het zout dat Frisia wint, bevindt zich in ondergrondse lagen in de nabije omgeving van Harlingen op circa 2,5 tot 3 kilometer diepte (de Groot, 2010). Frisia wint zout door middel van oplosmijnbouw. De gewonnen pekels (zoutoplossing) wordt via pijpleidingen getransporteerd naar de zoutverwerkingslocatie in Harlingen. Daar ondergaat de pekels een zuiveringsproces, waarna door middel van vacuüm-indamping zout geproduceerd wordt. Door water te injecteren in de ondergrondse zoutlaag lost het zout op. Er ontstaan ondergrondse holtes (cavernes) op de plaats waar oorspronkelijk het zout zat. Deze holtes zijn gevuld met verzadigde pekels dat door de druk van het geïnjecteerde water en de gesteentedruk omhoog wordt gestuwd. Het zout 'kruip' vanuit de ondergrondse laag richting de caverne (zoutkruip). Het zoutwinningsproces van Frisia is in onderstaand schema weergegeven (Wetsalt, 2015).



Figuur 4 Overzicht van het zoutwinningsproces van Frisia Zout BV te Harlingen (Uit: Wetsalt, 2015)

Van Frisia zijn twee monsters verkregen: ruwe pekels (reststroom H) en purgewater (reststroom G) met beiden zeer hoge concentraties NaCl (~ 300 g/L). Ruwe pekels komt na het injecteren van (zoet) kanaalwater/oppervlaktewater in de grond naar boven (Weewer, persoonlijke communicatie, 2015). Magnesium en calcium worden uit deze pekels gehaald door het toevoegen van kalk en soda. Hierdoor worden eventuele verontreinigingen in de pekels (bv. zware metalen) afgevangen en is het zout geschikt voor food toepassingen. De temperatuur van de pekels is ongeveer 45 °C. De pekels bevat ook lage concentraties ijzer en bromide. Purgewater is de pekels die niet verder verwerkt kan worden. Deze stroom bevat minder NaCl, is rijk aan sulfaat (aangezien dit ongewenst is in het eindproduct) en bevat meer kalium. Het bevat ook een lage concentratie PO₄ (2-3 mg/L) om scaling (vorming van neerslag door zoutkristallisatie) te voorkomen. Frisia lost 30 tot 40 m³ purgewater per uur in de industriehaven. De gemiddelde analysewaarden geleverd door Frisia BV voor beide stromen staan in Tabel 6.

Tabel 6 Analyse van ruwe pekkel en purgewater van Frisia BV (alle waarden in mg/L tenzij anders aangegeven) (Weewer, 2015)

Stroom	NaCl (g/L)	K	SO ₄	Mg	Ca	pH	Fe	Br
Ruwe pekkel	304	1106	5312	418	1020	6.4	0.4	75.7
Purge	299		60000	0.3	100	12		

Alle verschillende reststromen zijn (onverdund of verdund) geanalyseerd door Eurofins Agro (Appendix I).

2.5.1 Andere stromen

Als mogelijk andere stromen werden in het projectvoorstel genoemd: kwelwater en IJsselmeerwater.

- IJsselmeerwater: De geleidbaarheid van IJsselmeerwater bij 20 °C gemeten over het jaar varieert tussen 490 en 690 µS/cm (Riwa, 2000) wat betekent dat het zoetwater is. Het is daarom verder buiten beschouwing gelaten.
- Kwelwater: Dit is grondwater dat onder invloed van grotere waterdruk aan de oppervlakte komt, bijvoorbeeld water dat via de ondergrond vanuit de boezem naar de polder stroomt. Het is bekend dat hier van nature algen in kunnen groeien (Noordhollands Dagblad, 2017). Hier zijn geen monsters van verkregen.

Stromen die verder niet onderzocht zijn in de huidige experimenten, maar mogelijk interessant zijn, zijn:

- Kassenafvalwater (Feenstra et al, 2012; Wageningen University and Research, 2017)
- Visafvalwater (Hohenadler, 2010)
- Stromen uit aardappelverwerkende industrieën (protamylasse) (Huurman, 2015)
- Compostthee, mest-thee, compost-extract en lekwater
- Vinasse: Vinasse is een bijproduct van bioethanolproductie (KWS, 2017). Het wordt o.a. toegepast als diervoederadditief en meststof (veel kalium). De combi vinasse algenteelt is niet nieuw (Vin2Food project: AlgaeObserver, 2017). Mariene algen kunnen geteeld worden op (fracties) van vinasse.

3 Nabehandeling kweekwater

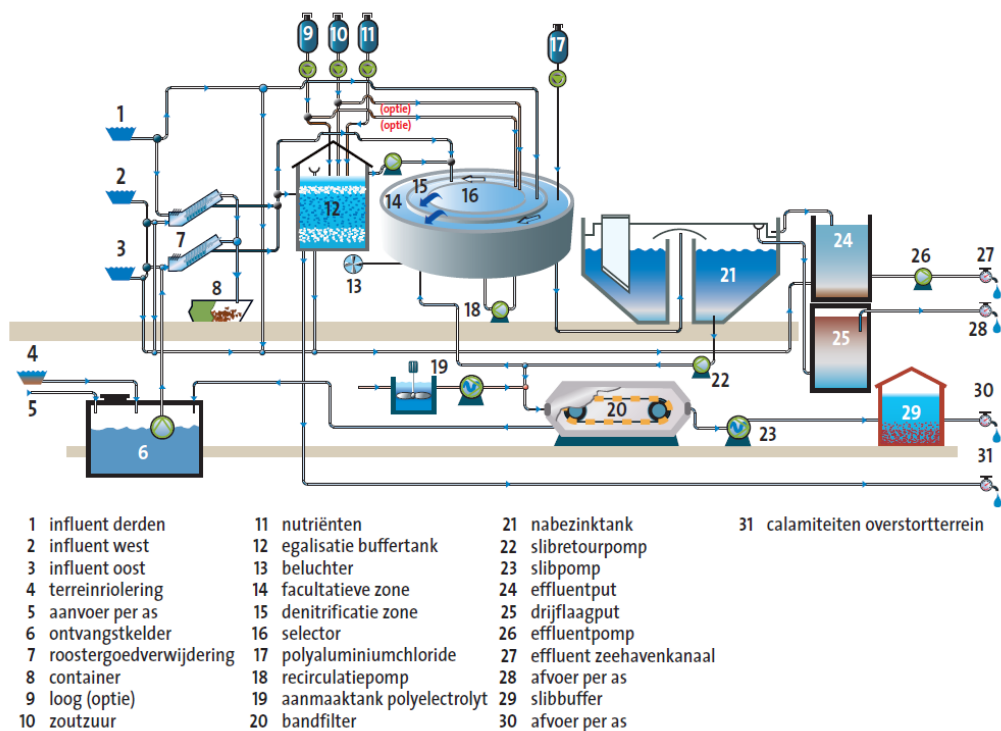
Voor de nabehandeling van zoute effluenten, die zullen ontstaan bij de kweek van algen op zoute reststromen zijn er drie mogelijkheden: Lozing, zuivering en hergebruik.

3.1 Lozing

Wanneer men water wil lozen dient met rekening te houden met het Activiteitenbesluit en Besluit lozen buiten inrichtingen. Om (grond)water te lozen op oppervlaktewater is toestemming vereist van waterschappen of het Rijk (Braakhekke, 2013). Het water moet bovendien aan (wisselende) kwaliteitseisen voldoen, bijvoorbeeld wat betreft ijzer en zuurstofgehalte. De meest bepalende stof in het water is echter chloride. Wanneer het oppervlaktewater ook relatief hoge zoutconcentraties bevat, zal het lozen een minder groot probleem zijn. Lozing kan, naast op oppervlaktewater, op verschillende andere manieren plaatsvinden (Desalitech, 2015): in verdampingsvijvers, als irrigatiewater op het land, d.m.v. diepte injectie, lozing op het riool, als stofcontrolemiddel op velden en wegen in droge klimaten/ zomermaanden en als antivriesmiddel op wegen.

3.2 Zuivering

Lefebvre en Moletta (2006) geven een literatuuroverzicht van behandelingsmethoden voor organische vervuiling in industrieel zout afvalwater. Zij geven aan dat een combinatie van fysisch-chemische en biologische (aerobe /anaerobe) technieken de meeste potentie heeft voor afvalwater uit agro-food, olie- en lederverwerkende industrieën. Een voorbeeld van een actiefslib systeem is de ZAWZI (Zout Afvalwater ZuiveringsInstallatie) van North Water (Brandt et al, 2010) (Figuur 5). Covestro heeft een circulair proces ontwikkeld om via electrolyse uit zouthoudend afvalwater chloor te produceren (Duurzaam geproduceerd, 2017).



Figuur 5 ZAWZI van North Water met capaciteit van 35.000 vervuilingseenheden (v.e.) (Uit: North Water)

Enkele voorbeelden van fysisch-chemische methodes zijn omgekeerde osmose (RO) (Lennotech, 2015), membraandestillatie i.c.m. kristallisatie (Creusen et al, 2014) en ionenwisselaars. Een minder conventionele technologie is Blue Energy (Wetsus, 2015). Hiermee wordt energie gewonnen uit het verschil in zoutconcentratie tussen zout en zoet water, bijvoorbeeld waar een rivier in zee uitmondt of waar gezuiverd rioolwater van een rioolwaterzuiveringsinstallatie in zee stroomt.

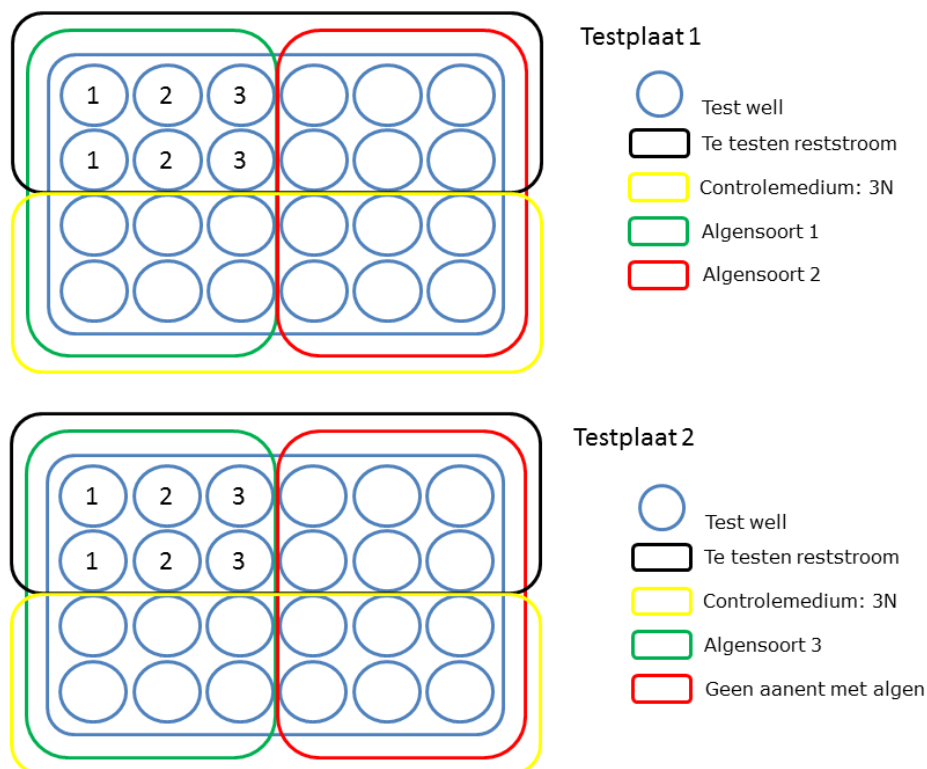
3.3 Hergebruik

Het kweekwater kan na behandeling ook hergebruikt worden, waarbij er suppletie met zoetwater plaatsvindt. Een voorbeeld is het systeem dat toegepast wordt in Dolfinarium Harderwijk (KoiEagle, 2015).

4 Experimenten

4.1 Well testen

Bij ACRRES is een methode ontwikkeld om in cultuurplaten (wellplaten) snel een screening uit te kunnen voeren of een reststroom geschikt is voor algengroei, waarbij in een handzaam formaat meerdere stromen en algen tegelijkertijd getest kunnen worden (Huurman en van der Weide, 2015). De methode geeft een “+/-” resultaat aangaande het wel of niet kunnen groeien van een soort alg op een reststroom en geeft voor de groeiende alg(en) een indicatie over de mate van groei op basis van vorming van biomassa. Voor de screening wordt gebruik gemaakt van 24 wells platen. Zowel OD als aantal algen kunnen geanalyseerd worden als maat voor groei. Figuur 6 geeft een voorbeeld weer van een dergelijke test.



Figuur 6 Opzet van de wellplaat-testen (Uit: Huurman en van der Weide, 2015)

Gezien de hoeveelheid combinaties van algen en reststromen werd gekozen voor testen met 1-4 herhalingen (wells per combinatie). Er zijn in totaal vier series welltesten ingezet.

4.1.1 Kweekcondities, algenstammen en reststromen

Vier wellplaten werden geplaatst op orbitaalschudder bij 100 rpm continu in klimaatkast bij 20°C met witte LED verlichting (ingestelde LED lichtsterkte 12.1). De belichtingssterkte was 72-85 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$.

Per well werd 2.25 ml kweekvloeistof (reststroom of controle kweekmedium) en 0,25 ml voorkweek algen gedoseerd. Van elke voorkweek werd 50 mL gecentrifugeerd gedurende 5 min. bij 3000 rpm. De algen werden vervolgens gewassen door 2x centrifugeren onder dezelfde omstandigheden met 15g/L synthetisch zeewater. Voor de celtellingen werden Bürker Türk 0.0025, 0.04 en 0.1 mm^2 telkamers van Optik Labor gebruikt met een van diepte van 0.1 mm. Alle tellingen werden beoordeeld bij

400x (40x10) onder een Leitz Laborlux S en een Leica DMLS microscoop. Er werden geen OD metingen gedaan, aangezien sommige van de reststromen van nature troebel (m.n. de pekelstromen) of donkergekleurd (digestaat) waren en er gedurende de experimenten zowel toenames als afnames van de troebelheid/kleur gezien werden. Voor de welltesten werden onderstaande beschreven reststromen gebruikt, indien nodig verdund (Tabel 7).

Tabel 7 Types gebruikte reststromen met bron

Bron	Type	Code / verdunningen
Rouveen Kaasspecialiteiten (Rouveen)	Kaliumpekel Natriumpekel	A, 6.25x, 12.5x B, 6.25x, 12.5x
Waddenzee (Harlingen)	Zeewater	C
Kelstein BV (Hallum)	Grondwater	D
ACRRES (Lelystad)	Dunne fractie digestaat Grondwater	E, 6.25x, 12.5x F
Frisia Zout BV (Harlingen)	Purgewater Ruwe pekel	G, 10x, 20x H, 10x, 20x
Zuivelbedrijf	Kaaspekel	I, 0x, 2x
	Brine	J, 0x
	1:1 mix van kaaspekel en brine	K, 0x, 2x

De volgende algenstammen en drie controlemedia (zie ook Appendix III voor een overzicht van vaak gebruikte media) werden gebruikt voor de welltesten (Tabel 8):

Tabel 8 Algenstammen en controlemedia gebruikt in de welltesten

Soort	Code	Stam	Medium
<i>Arthrospira platensis</i>	1	SAG 21.99	Modified <i>Spirulina</i> ¹⁾
<i>Dunaliella salina</i>	2	SAG 184.80	f/2 (CCAP) ²⁾
<i>Nannochloropsis gaditana</i>	3	onbekend	f/2 (CCAP) ²⁾
<i>Porphyridium purpureum</i>	4	SAG 1380-1d	f/2 (CCAP) ²⁾
<i>Phaeodactylum tricornutum</i>	5	SAG 1090-1b	f/2 + Si (CCAP) ³⁾
<i>Tetraselmis chuii</i>	6	SAG 8.6	f/2 (CCAP) ²⁾
<i>Odontella aurita</i>	7	CCAP 1054/1	f/2 + Si (CCAP) ³⁾
<i>Tetraselmis chuii</i>	8	AF&F	f/2 (CCAP) ²⁾
<i>Tetraselmis tetrathele</i>	9	CCAP 66/1B	f/2 (CCAP) ²⁾

Referenties: ¹⁾ Aiba & Ogawa (1977), Schlösser (1994), ²⁾ Guillard & Ryther (1962), ³⁾ Guillard's medium for diatoms

Foto's van de algen bij de start van de welltesten en referentiefoto's van de soorten/stammen zijn weergegeven in Appendix IV. Tabel 9 laat de verschillende combinaties van algen en reststromen zien die in elke test gebruikt werden.

Tabel 9 Geteste combinaties van algen en reststromen in de welltesten (1 t/m 4) en 1L reactoren (5, 6)

	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K
<i>Arthrospira platensis</i>	1, 2	1, 2	1, 2	1, 2	1, 2, 5, 6	1, 2	1, 2	1, 2	3	3	3
<i>Dunaliella salina</i>	1, 2	1, 2	1, 2	1, 2	1, 2	1, 2	1, 2	1, 2			
<i>Nannochloropsis gaditana</i>	1, 2	1, 2	1, 2	1, 2	1, 2, 5, 6	1, 2	1, 2	1, 2	3	3	3
<i>Porphyridium purpureum</i>	1, 2	1, 2	1, 2	1, 2	1, 2, 5, 6	1, 2	1, 2	1, 2	3	3	3
<i>Phaeodactylum tricornutum</i>	1, 2	1, 2	1, 2	1, 2	1, 2	1, 2	1, 2	1, 2			
<i>Tetraselmis chuii</i>	1, 2	1, 2	1, 2	1, 2	1, 2	1, 2	1, 2	1, 2			
<i>Odontella aurita</i>	1, 2	1, 2	1, 2	1, 2	1, 2	1, 2	1, 2	1, 2			
<i>Tetraselmis chuii</i> AF&F	4	4			4, 5, 6				3, 4	3, 4	3, 4
<i>Tetraselmis tetrathele</i>	4	4			4				4	4	4

4.1.2 Welltesten 1 & 2 (Appendices V en VI)

In welltesten 1 & 2 zijn alle combinaties tussen reststromen A t/m H en algen 1 t/m 7 getest. De reststromen met zoutconcentraties hoger dan zeewater werden verdund tot (ongeveer) zeewaterwaarden (~30 g zout/L) en/of de helft van zeewaterwaarden

(Tabel 7). De analyseresultaten van de reststromen zijn weergegeven in Appendix I. Voorafgaand aan analyse moesten A, B, G en H 40-50x verdund worden en C en E 5-6x. Hierdoor zijn een aantal componenten mogelijk onder de detectiegrens gebleven. In Test 4 werd er NaNO_3 toegevoegd aan de reststromen tot een eindconcentratie van 13 mg N/L behalve aan het digestaat (zie ook Test 4). Dit komt overeen met de N concentratie in het f/2 controlemedium.

4.1.3 Welltesten 3 & 4 (Appendices VII en VIII)

In Test 3 werden de drie algensoorten die de beste resultaten lieten zien in de vorige welltesten (*A. platensis*, *P. purpureum* en *N. gaditana*) getest en een nieuwe stam van *T. chuii* ('AF&F') met twee zoute stromen (onverdund, verdund en gemengd) van een zuivelbedrijf (n=4, 10 dagen). In Test 4 werd deze *T. chuii* stam samen met een nieuw verkregen algensoort (*T. tetrathele*) getest met de reststromen die de meeste potentie hadden voor toepassingen: A, B, E, I, J en K (n=3, 10 dagen). *T. tetrathele* werd geselecteerd op basis van Menke et al (2012), die de groei beschrijven van verschillende algensoorten op hypersalien water (een bijproduct van kunstmestproductie). De samenstelling van de reststromen in welltesten 3 & 4 is te vinden in Appendices I en II. In Test 4 werd wederom NaNO_3 toegevoegd aan de reststromen tot een eindconcentratie van 13 mg N/L (vgl. Test 2).

4.2 1L reactoren opzet (testen 5 & 6)

De groei van verschillende algen die het best presteerden in de welltesten op de dunne fractie van digestaat is onderzocht in vier 1L LED reactoren (Figuur 7) (van Dijk et al, 2016). De LED-lampen in elke reactor bevatten zowel rode als blauwe LED's die afzonderlijk in te stellen zijn. In de reactoren kunnen temperatuur, lichtsterkte en pH continu gelogd worden. Ook kan er CO_2 gedoseerd worden en wordt de culture continu geroerd door een in snelheid instelbare roermagneet onderin de reactor).



Figuur 7 De 1 liter reactoren met rode en blauwe LED's (Uit: van Dijk et al, 2016)

4.2.1 Kweekcondities, algenstammen en reststromen

Voor de geteste algenstammen en reststromen zie Tabel 9. De LED lampen werden op 100 % gezet. In de eerste test (Test 5) werden er na 2 weken aan weerszijden van de vier reactoren TL balken geplaatst, zodat ze in dezelfde mate belicht werden. De LED lampen hadden een maximale lichtoutput van 6,9 en 3,7 $\mu\text{mol/s}$ voor respectievelijk de rode en blauwe LED's (totaal 10,6 $\mu\text{mol/s}$). Het mixen vindt plaats via een

roermagneet onderin de reactor. De CO₂-dosering is gebaseerd op de pH, waarbij een streefwaarde van pH 7 is aangehouden. Wanneer de pH hoger dan 7 wordt, wordt er CO₂ gedoseerd via een sparger in de reactor. Er is gewerkt met een mengsel van lucht en CO₂ (10 % CO₂). De reactoren stonden in een broedstoof die op een temperatuur van 18 °C stond, waardoor de temperatuur gedurende de proeven tussen 23 en 26°C was (opwarming door de lampen) (Appendix IX).

4.2.2 1L test 5

De vier reactoren werden geënt met elk 50 mL algenculture (*A. platensis*, *N. gaditana*, *P. purpureum* of *T. chuii* (AF&F)), 80 mL digestaat en aangevuld met demiwater tot 1 L. De algenstammen werden eerst gewassen met synthetisch zeewater (15 g/L). Na twee weken werd er 50 mL extra ent van elke algensoort toegevoegd en werden er 2 TL balken naast de reactoren geplaatst voor extra belichting. De proef werd na 4 weken beëindigd.

4.2.3 1L test 6

De vier reactoren werden elk geënt met 100 mL algenculture (*A. platensis*, *N. gaditana*, *P. purpureum* of *T. chuii* (AF&F)), 15 mL digestaat en aangevuld met demiwater tot 1 L. Na 4 en 8 dagen incubatie werden er nogmaals 15 resp. 30 mL digestaat toegevoegd aan de reactoren. Er was geen extra belichting in de vorm van TL balken. Er werden regelmatig tellingen gedaan gedurende 5 weken en vervolgens nog een keer na ca. 8 en 14 weken.

5 Resultaten

5.1 Algemeen

De begintellingen in de startcultures op controlemedia (Tabel 10) laten grote verschillen zien tussen de verschillende algensoorten en soms tussen de verschillende proeven. *N. gaditana*, *P. tricornutum* en *T. chuii* (AF&F) lieten de beste groei zien, *O. aurita* en *A. platensis* de slechtste.

Tabel 10 Starttellingen (#/mL) in de referentiecultures (stocks) op controlemedia in de vier welltesten en één reactortest (vóór verdunning in de experimenten). nd = conditie van *O. aurita* was slecht in de referentieculture. In Test 5 zijn de referentiecultures niet geteld

Test	1	2	3	4	6
<i>Arthrospira platensis</i>	250,000	500,000	27,000		48,000
<i>Dunaliella salina</i>	700,000	375,000			
<i>Nannochloropsis gaditana</i>	28,800,000	3,225,000	10,800,000		34,400,000
<i>Porphyridium purpureum</i>	1,525,000	725,000	850,000		950,000
<i>Phaeodactylum tricornutum</i>	21,200,000	6,475,000			
<i>Tetraselmis chuii</i>	2,750,000	1,000,000			
<i>Odontella aurita</i>	275,000	nd			
<i>Tetraselmis chuii</i> (AF&F)			850,000	725,000	6,800,000
<i>Tetraselmis tetrathele</i>				875,000	

5.2 Welltesten

5.2.1 Algemeen

In Tabel 11 worden per algensoort de reststromen getoond die de hoogste aantalsgroei van betreffende soort liet zien.

Tabel 11 Combinaties van algen/reststromen die hoogste aantalsgroei lieten zien in welltesten 1 t/m 4. nd= *O. aurita* was niet terug te vinden in de verschillende stromen

Test	1	2	3	4
<i>Arthrospira platensis</i>	E12,5x	H20x	J0x	
<i>Dunaliella salina</i>	A6,25x	D		
<i>Nannochloropsis gaditana</i>	C	H20x	J0x	
<i>Porphyridium purpureum</i>	C	C	J0x	
<i>Phaeodactylum tricornutum</i>	H10x	H10x		
<i>Tetraselmis chuii</i>	C	C		
<i>Odontella aurita</i>	C	nd		
<i>Tetraselmis chuii</i> (AF&F)			J0x	B6,25x
<i>Tetraselmis tetrathele</i>				J/K0x

Veel algen deden het relatief goed op zeewater, maar ook op verdund purgewater van Frisia. De resultaten van Testen 1 & 2 (met toegevoegde N) kwamen niet altijd overeen (Tabellen 11 & 12).

5.2.2 Welltesten 1 & 2

Appendices V en VI laten de wellplaten in Testen 1 & 2 zien na 7 dagen incubatie. Tabel 12 laat de groei zien op de verschillende stromen in de twee testen.

Tabel 12 Groei in aantal t.o.v. t=0 in eerste en tweede (+13 mg N/L, behalve digestaat) welltest (<0% = -, 0% = 0, 0 t/m 100% = +, >100% = ++). na = niet getest

	A. <i>platensis</i>		D. <i>salina</i>		N. <i>gaditana</i>		P. <i>purpureum</i>		P. <i>tricornutum</i>		T. <i>chuii</i>		O. <i>aurita</i>	
K pekel 6x	0	++	++	-	-	-	+	-	-	-	-	+	++	-
K pekel 12x	+	-	na	na	-	-	na	na	na	na	na	na	na	na
Na pekel 6x	+	++	-	-	-	-	+	++	-	-	-	+	++	-
Na pekel 12x	++	0	na	na	+	+	na	na	na	na	na	na	na	na
Zeewater	++	++	-	-	++	++	++	++	-	++	+	++	++	-
Grondwater K	++	++	-	++	-	++	-	+	-	-	-	+	++	-
Digestaat 10x	0	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-
Digestaat 20x	++	-	na	na	-	-	na	na	na	na	na	na	na	na
Grondwater A	++	-	++	-	-	++	-	-	-	-	-	+	+	-
Purge 10x	++	+	-	-	-	-	+	++	-	-	-	-	++	-
Purge 20x	++	++	na	na	-	++	na	na	na	na	na	na	na	na
Pekel 10x	++	++	-	-	++	++	++	++	-	++	0	+	++	-
Pekel 20x	++	++	na	na	-	++	na	na	na	na	na	na	na	na
Controlemedia	++	++	++	-	++	++	++	-	-	++	+	++	++	-

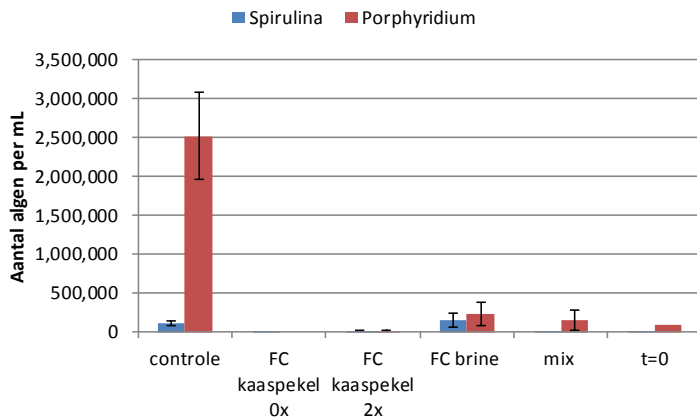
5.2.2.1 Algemeen

De controles zonder algen (controlemedia en reststromen) waren schoon aan het einde van de testen. De controles met algen lieten bijna altijd goede groei zien. De meeste combinaties zijn in enkelvoud getest, op enkele na. De enkele combinaties die in duplo ingezet waren lieten vaak een factor twee of meer verschil zien in aantallen algen. Het toevoegen van een extra stikstofbron (Test 2) leidde meestal niet tot een beter resultaat. Alle reststromen lieten groei zien van 1 of meerdere algensoorten.

O. aurita en *T. chuii* zagen er vaak morfologisch niet goed uit. Groei op de reststromen was vaak niet met het blote oog te zien, alleen bij *A. platensis* en *N. gaditana* was er een verband waar te nemen tussen toenemende aantallen en groene kleur van het medium (Appendices V en VI). Dit gold ook voor welltest 3 waarin deze beide soorten ook getest werden. De kleur van digestaat werd gedurende de testen veel lichter in wells met algen in vergelijking met de controles zonder algen. In beide testen was er in sommige stromen ingroei van schimmels en andere algen (bijv. *Fusarium* achtige schimmels in de kaaspekels, en *Scenedesmus* sp. in het ACRRES grondwater). Dit wordt uiteraard veroorzaakt omdat er met niet-steriele media gewerkt wordt. In welltesten 1&2 werd overall de beste groei gevonden met *A. platensis*, *N. gaditana* en *P. purpureum*.

5.2.3 Welltest 3

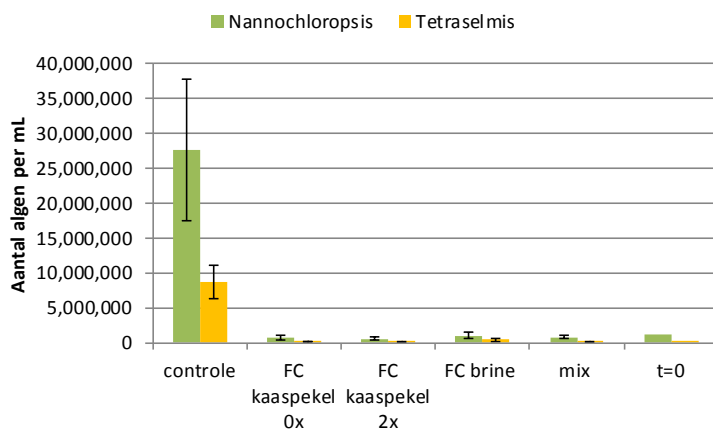
Appendix VII laat de wellplaten in Test 3 zien na 10 dagen incubatie. Figuur 8 laat de groei van *A. platensis* en *P. purpureum* zien op verschillende reststromen.



Figuur 8 Groei van *A. platensis* en *P. purpureum* op 2 verschillende reststromen en een mix van beide na 10 dagen (n=4)

De groei van *P. purpureum* was op alle stromen zeer laag (meer dan een factor 10 lager) in vergelijking met groei op het controlemedium. *A. platensis* groeide op de brine van het zuivelbedrijf ongeveer even goed als op het controlemedium. Behalve in deze laatste combinatie namen beide soorten t.o.v. t=0 verder bijna niet toe of zelfs af. In de brine was er vaak ingroei van *Woronichinia* sp. cyanobacteriën.

Figuur 9 laat de groei van *N. gaditana* en *T. chuii* (AF&F) zien op verschillende reststromen.

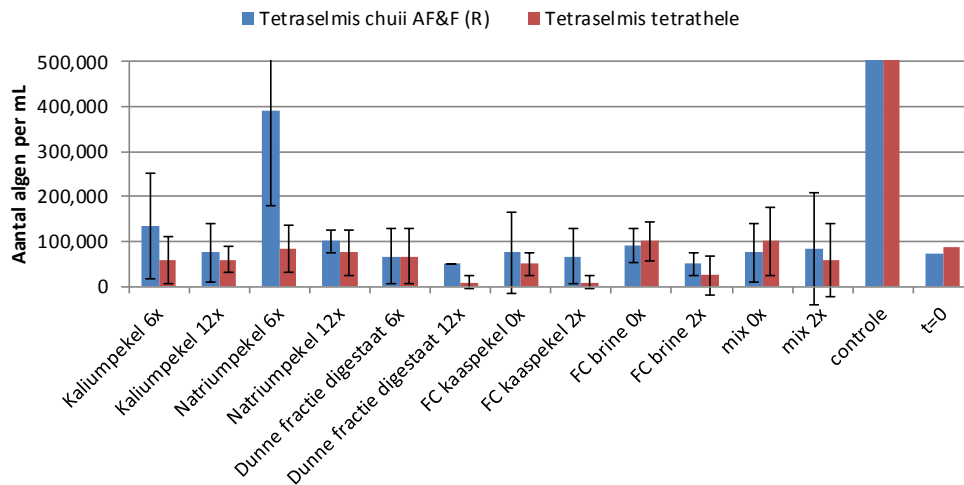


Figuur 9 Groei van *N. gaditana* en *T. chuii* (AF&F) op 2 verschillende reststromen en een mix van beide na 10 dagen (n=4)

De groei van beide algensoorten op de stromen was in alle gevallen zeer laag in vergelijking met groei op het controlemedium. Ook t.o.v. t=0 namen ze amper toe of zelfs af. Alleen *T. chuii* (AF&F) vertoonde enige groei (verviervoudiging) t.o.v. t=0 in de brine.

5.2.4 Welltest 4

Appendix VIII laat de wellplaten in Test 4 zien na 10 dagen incubatie. Figuur 10 laat de groei van *T. chuii* (AF&F) en *T. tetrathele* zien op verschillende reststromen.



Figuur 10 Groei van *Tetraselmis chuii* (AF&F) en *Tetraselmis tetrathele* op 6 verschillende reststromen in 2 verdunningen na 10 dagen (n=3). Controle *T. chuii* (AF&F) $5,9 \pm 3,6$ miljoen per mL, controle *T. tetrathele* $4,7 \pm 2,9$ miljoen per mL

In Test 4 werd er wederom ingroei van schimmels waargenomen in een groot deel van de wells met kaliumpekel en natriumpekel. Dit gold ook voor de wells met kaaspekel en de meest verdunde brine en mix van het zuivelbedrijf. In de brine werd er weer ingroei van *Woronichinia* sp. cyanobacteriën waargenomen. De aantallen algen in de wells met controlemedium waren vele malen hoger (~5-6 miljoen algen per mL) dan in de combinaties met reststromen. De gemiddelde aantallen kwamen bijna nooit uit boven 100,000 per mL. Ook was er t.o.v. t=0 amper groei. De beste combinatie was de minst verdunde natriumpekel met *Tetraselmis chuii* (AF&F). Ondanks de nitraatsuppletie liet dit experiment liet dus slechte groei zien in vergelijking met die op de controlemedia.

De resultaten in welltesten 3 & 4 waren beter reproduceerbaar dan in welltesten 1 & 2 maar vertoonden nog steeds grote standaarddeviaties (Figuren 8, 9 en 10). Optisch (Appendices VII en VIII) leken de wells binnen 1 herhaling echter sterk op elkaar.

5.2.5 Welltesten conclusies

Tabel 13 laat de maximale aantallen algen (#/mL) zien in welltesten 1 t/m 4.

Tabel 13 Maximale aantallen op reststromen (#/mL) in welltesten 1 t/m 4 per test en per algensoort

Test	1	2	3	4
<i>Arthrospira platensis</i>	875,000	525,000	145,750	
<i>Dunaliella salina</i>	900,000	125,000		
<i>Nannochloropsis gaditana</i>	51,200,000	6,875,000	1,018,750	
<i>Porphyridium purpureum</i>	825,000	475,000	231,250	
<i>Phaeodactylum tricornutum</i>	1,875,000	3,925,000		
<i>Tetraselmis chuii</i>	350,000	400,000		
<i>Odontella aurita</i>	200,000	nd		
<i>Tetraselmis chuii</i> (AF&F)			431,250	391,667
<i>Tetraselmis tetrathele</i>				100,000

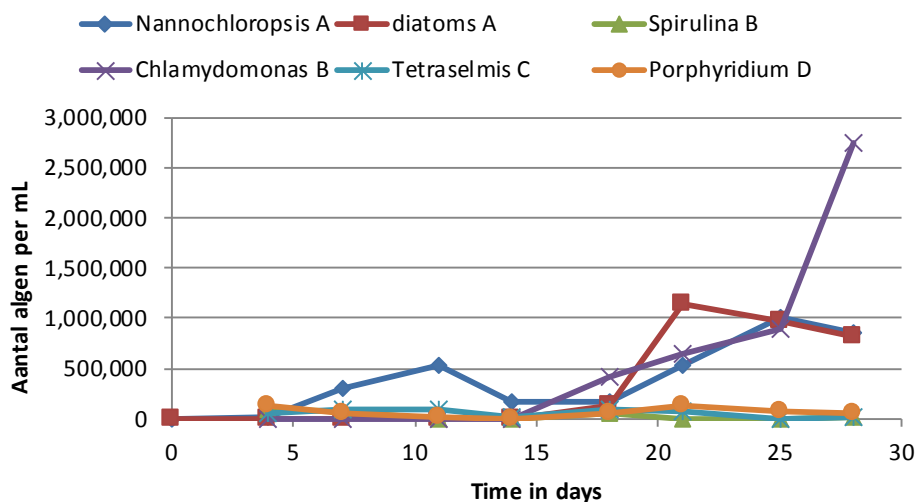
De welltesten waren vooral bedoeld om een eerste inschatting te kunnen maken van de geschiktheid van reststromen voor algenkweek. De resultaten waren niet altijd

reproduceerbaar en lijken beïnvloedbaar door de conditie van de algenstartculture en ingroei van andere organismen (schimmels en andere algen) in de reststromen.

5.3 1L reactoren

De resultaten voor pH en T gedurende Testen 5 en 6 worden weergegeven in Appendix IX. De T was bijna altijd tussen de 23 en 26 °C en de pH rond 7, behalve in Experiment 6 in reactor B met *Spirulina* waar de pH steeg tot ca. 11 door onbekende redenen. Figuur 11 laat de groei van vier verschillende algensoorten op de verdunde vloeibare fractie van digestaat zien in de reactoren. Ook de belangrijkste ingroeïende organismen worden weergegeven.

5.3.1 1L test 5



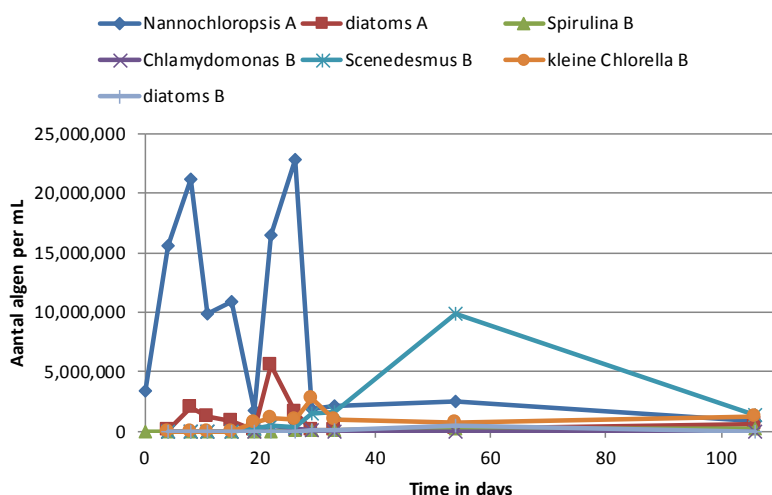
Figuur 11 Algengroei in 1 L reactoren in Test 5, gegroeid op 12,5x verdunde vloeibare fractie van digestaat. Hoofdletters At/m D geven de reactor weer

Van de vier algensoorten groeide *N. gaditana* het best tot een maximale dichtheid van 1 miljoen cellen per mL. Maximale hoeveelheden voor *A. platensis*, *P. purpureum* en *T. chuii* (AF&F) waren resp. 100,000, 125,000 en 100,000 cellen per mL maar deze soorten namen alle drie af in de tijd. Ingroeïende organismen bij *N. gaditana* (diatomeeën) en *A. platensis* (*Chlamydomonas*) bereikten hoge dichtheden van maximaal 1,15 en 2,75 miljoen cellen per mL.

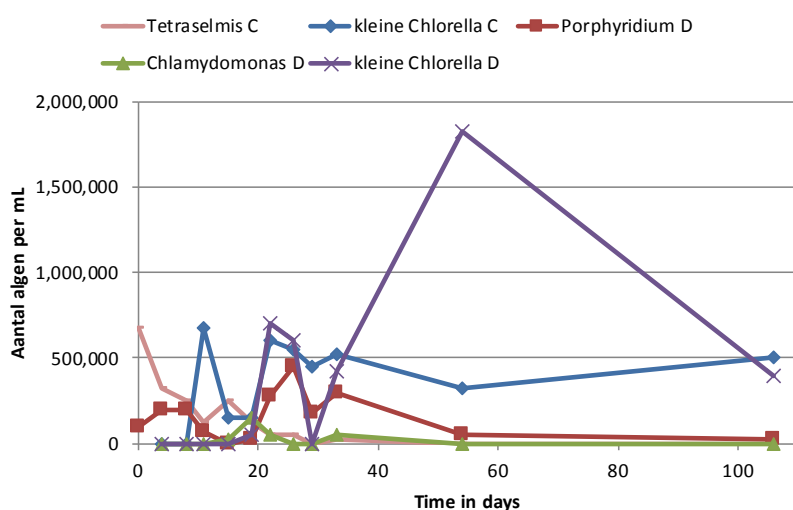
5.3.2 1L test 6

Figuur 12 laat de groei van vier verschillende algensoorten op toenemende concentraties van de verdunde vloeibare fractie van digestaat zien in de reactoren. Ook de belangrijkste ingroeïende organismen worden weergegeven.

A



B



Figuur 12 Aantal algen in 1 L reactoren in Test 6, gegroeid op de 67x verdunde vloeibare fractie van digestaat met oplopende concentratie. Figuur A: reactoren A en B, Figuur B: reactoren C en D

Van de vier algensoorten groeide *N. gaditana* net als in Test 5 het best tot een maximale dichtheid van 22,8 miljoen cellen per mL, maar de populatiedichtheid vertoonde grote schommelingen. Maximale hoeveelheden voor *A. platensis*, *P. purpureum* en *T. chuii* (AF&F) waren resp. 200,000, 450,000 en 250,000 cellen per mL, waarbij *A. platensis* geleidelijk toenam, *T. chuii* (AF&F) voornamelijk afnam en *P. purpureum* schommelingen vertoonde. Bij elke culture was er ingroei van één of meerdere andere algensoorten. Ingroeïende organismen bij *N. gaditana* (diatomeeën) bereikten een hoge dichtheid van maximaal 5,6 miljoen cellen per mL en bij *A. platensis* (*Chlamydomonas*, *Scenedesmus*, kleine *Chlorella* en diatomeeën) van resp. 500,000, 9,9 miljoen, 2,8 miljoen en 475,000 cellen per mL. Ingroeïende organismen bij *T. chuii* (AF&F) (kleine *Chlorella*) en *P. purpureum* (*Chlamydomonas* en kleine *Chlorella*) bereikten dichtheden van maximaal resp. 150,000, 675,000 en 1,8 miljoen per mL.

De ingroeïende organismen zijn waarschijnlijk afkomstig uit het digestaat, aangezien de entpopulaties schoon waren. Het is duidelijk dat de meeste ingroei plaatsvond in Test 6 met hogere digestaatverdunning. De beste combinatie met digestaat is in beide testen echter *N. gaditana*. Het verdient aanbeveling om deze kweek verder te optimaliseren qua substraatverdunning, mengsnelheid, lichtsterkte/golflengte en temperatuur. Ook kan er gekeken worden of de ingroeïende organismen nader

gedetermineerd kunnen worden en mogelijk ook interessant zijn om te kweken op de vloeibare fractie van digestaat.

5.3.3 Algemeen

De maximale aantallen van de vier soorten in de reactoren (*N. gaditana*, *A. platensis*, *P. purpureum* en *T. chuii* (AF&F)) waren vergelijkbaar met die in de welltesten (Tabel 13). De groei in het tweede experiment met oplopende concentraties digestaat was beter voor de eerste drie soorten dan de groei van deze soorten in het eerste experiment. De aantallen *T. chuii* (AF&F) namen in beide experimenten geleidelijk af.

6 Conclusies

Uit vier welltesten en twee testen met 1 L reactoren bleken een aantal zoutwatalgen kweekbaar op verschillende reststromen. De best kweekbare algen waren *N. gaditana*, *A. platensis*, *P. purpureum* en *T. chuii* (AF&F) met name op de (verdunde) pekels uit de zuivelindustrie en de verdunde vloeibare fractie van digestaat. De toevoeging van nitraat leek weinig invloed te hebben. Aandachtspunten zijn de ingroei van andere algen en schimmels evenals de verdunning/batchgewijze toediening van de reststromen, zodat de concentraties geleidelijk oplopen. Dit is met name relevant i.v.m. zoutgehalte en kleur. Relatief goede groei werd gevonden van *A. platensis* (*Spirulina*) en *T. chuii* (AF&F) op zuivelbedrijf brine en van *T. chuii* (AF&F) op natriumpekel in de welltesten. In de 1 L reactoren was de beste combinatie die van *N. gaditana* met oplopende concentraties digestaat. Het verdient aanbeveling om een aantal van deze combinaties verder experimenteel te optimaliseren.

7 Literatuur

- Aiba, S. and T. Ogawa, 1977. Assessment of growth yield of a blue-green alga: *Spirulina platensis*, in axenic and continuous culture. J. Gen. Microbiol. 1977, 102: 179-182
- AlgaeObserver website, 2017. <http://www.algaeobserver.com/vin2food-vinasse-algenzucht>
- Batista, A. P., L. Gouveia, N. M. Bandarra, J. M. Franco and A. Raymundo, 2013. Comparison of microalgal biomass profiles as novel functional ingredient for food products. Algal Research 2(2): 164-173
- BINAS, 2004. Informatieboek vwo-havo voor het onderwijs in de natuurwetenschappen
- Blankespoor, J., 2015. Personal communication, Rouveen Kaasspecialiteiten
- Braakhekke, M., 2013. Effecten van lozingen uit bodemenergiesystemen. STOWA rapport 2013 34.
- Brandt, E., M. de Wit and A. Hammenga, 2010. Industriepark legt zuivering voor zout afvalwater aan. Land + Water 3: 28-29
- Cassano, A. and E. Drioli, 2014. Integrated Membrane Operations: In the Food Production. 357 pp.
- Chauton, M. S., Y. Olsen and O. Vadstein, 2013. Biomass production from the microalga *Phaeodactylum tricornutum*: Nutrient stress and chemical composition in exponential fed-batch cultures. Biomass and Bioenergy 58: 87-94
- Chen, C. Y., P. C. Kao, C. J. Tsai, D. J. Lee and J. S. Chang, 2013. Engineering strategies for simultaneous enhancement of C-phycocyanin production and CO₂ fixation with *Spirulina platensis*. Bioresource Technology 145: 307-312
- Chen, H. B., J. Y. Wu, C. F. Wang, C. C. Fu, C. J. Shieh, C. I. Chen, C. Y. Wang and Y. C. Liu, 2010. Modeling on chlorophyll a and phycocyanin production by *Spirulina platensis* under various light-emitting diodes. Biochemical Engineering Journal 53(1): 52-56
- Cho, J. Y., H. J. Jin, H. J. Lim, J. N. C. Whyte and Y. K. Hong, 1998. Growth activation of the microalga *Isochrysis galbana* by the aqueous extract of the seaweed *Monostroma nitidum*. Journal of Applied Phycology 10(6): 561-567
- Citylab website, 2015. <http://www.citylab.com/commute/2013/11/can-cheese-products-save-our-winter-roads/7667/>
- Creusen, R., J. van Medevoort, J. H. Hanemaaijer, K. Barrera, A. van Renesse van Duivenbode and M. Roelands, 2014. NoWaste (Membrane). A combined membrane distillation-crystallization process for the production of solid salts and pure water out of brines. TNO report R11030. 79 pp.
- Das, P., W. Lei, S. S. Aziz and J. P. Obbard, 2011a. Enhanced algae growth in both phototrophic and mixotrophic culture under blue light. Bioresource Technology 102(4): 3883-3887
- Das, P., S. S. Aziz and J. P. Obbard, 2011b. Two phase microalgae growth in the open system for enhanced lipid productivity. Renewable Energy 36(9): 2524-2528
- De Groot, 2010. Milieueffecten continueren van de zoutwinning in Noord-West Friesland Deel A. Frisia Zout B.V. Arcadis rapport. 159 pp.
- Desalitech website, 2015. <http://desalitech.com/7-ways-to-dispose-of-brine-waste/>
- Dijk, van W., R. van der Weide and A. Kroon, 2016. Groen proceswater: zuivering brouwerijprocesafvalwater met microalgen. Wageningen University and Research report PPO-721. 41 pp.
- Doan, T. T. Y. and J. P. Obbard, 2012. Enhanced intracellular lipid in *Nannochloropsis* sp. via random mutagenesis and flow cytometric cell sorting. Algal Research 1(1): 17-21
- Duurzaam Geproduceerd website, 2017. <https://www.duurzaamgeproduceerd.nl/onderzoek-onderwijs/20160130-nieuw-circulair-proces-covestro-kan-voor-schoner-rijn-water-zorgen>
- Feenstra, L., M. Nijhuis, R. Bisselink, N. Kuipers and R. Jurgens, 2012. Valorisatie van concentraatstromen. Fase 2 – Laboratoriumonderzoek. Werkpakket 6: Valorisatie reststromen. TNO-rapport TNO-060-UT-2012-01396. 80 pp.
- Gennep, C. van, 2015. Personal communication, Algae Food & Fuel
- Fu, W., O. Guomundsson, G. Paglia, G. Herjólfsson, O. S. Andrésen, B. O. Palsson and S. Brynjólfsson, 2013. Enhancement of carotenoid biosynthesis in the green microalga *Dunaliella salina* with light-emitting diodes and adaptive laboratory evolution. Applied Microbiology and Biotechnology 97(6): 2395-2403
- Golueke, C. G. and W. J. Oswald, 1962. The mass culture of *Porphyridium cruentum*. Appl. Microbiol. 10: 102-107
- Gómez-Loredo, A., J. Benavides and M. Rito-Palomares, 2016. Growth kinetics and fucoxanthin production of *Phaeodactylum tricornutum* and *Isochrysis galbana* cultures at different light and agitation conditions. Journal of Applied Phycology 28 (2): 849-860
- Grundfos, 2015. http://cbs.grundfos.com/GNL_Netherlands/lexica/WW_Brackish_water.html
- Guihéneuf, F. and D. B. Stengel, 2015. Towards the biorefinery concept: Interaction of light, temperature and nitrogen for optimizing the co-production of high-value compounds in *Porphyridium purpureum*. Algal Research 10: 152-163
- Guillard R.R.L. and J.H. Ryther, 1962. Studies of marine planktonic diatoms. I. *Cyclotella nana* Husted and *Detonula confervaceae* (Cleve). Gran. Can. J. Microbiol. 8: 229-239
- Hanna Instruments. Catalogus H03. Geleidbaarheid/TDS meters. Een inleiding tot Hanna's EC/TDS instrumenten. 27 pp.
- Heringa, J., T. van der Hiele and J. Creemers, 2013a. Eindrapportage afwegingskader grondwatergeschiktheid van zout grondwater voor aquacultuuroeleinden.

Heringa, J., T. van der Hiele, J. Creemers and J. Rijstenbil, 2013b. Zout grondwater voor aquacultuur toepassingen. Afwegingskader voor ondernemers.

Hiele, T. van der, J. W. Rijstenbil, J. Creemers and J. Heringa, 2014. Composition, treatment and use of saline groundwater for aquaculture in the Netherlands. *World Aquaculture* 23-29

Hohenadler, 2010. Extensieve algenkweek in verschillende media en systemen. Een praktisch onderzoek naar de productiviteit van *Phaeodactylum tricornutum* in verschillende media en kweeksystemen. Eindrapport. Spring- Centrum voor duurzaamheid en water/Hogeschool Zeeland. 51 pp.

Huurman, S. and R. van der Weide, 2015. Aquatische biomassa, het verwaarden van waterige reststromen op lokaal niveau. Technisch deelrapport 1: Verkenning van de mogelijkheden van reststromen en aquatische biomassa. Wageningen University and Research ACRRES report PPO-650. 53 pp.

Kent, M., H. M. Welladsen, A. Mangott and Y. Li, 2015. Nutritional evaluation of Australian microalgae as potential human health supplements. *PLoS ONE* 10(2)

Kim, C. W., M. G. Sung, K. Nam, M. Moon, J. H. Kwon and J. W. Yang, 2014. Effect of monochromatic illumination on lipid accumulation of *Nannochloropsis gaditana* under continuous cultivation. *Bioresource Technology* 159: 30-35

KWS website, 2017. http://www.kwsbenelux.be/aw/KWS/netherlands/Products/suikerbiet/Bio_ethanol/Wat_u_wilt_weten_over_bioethanol/~bxwy/Vinasse_8211_een_interessant_bijproduct_/

Lamers, P. P., M. Janssen, R. C. H. De Vos, R. J. Bino and R. H. Wijffels, 2012. Carotenoid and fatty acid metabolism in nitrogen-starved *Dunaliella salina*, a unicellular green microalga. *Journal of Biotechnology* 162(1): 21-27

Lefebvre, O. and R. Moletta, 2006. Treatment of organic pollution in industrial saline wastewater: a literature review. *Water research* 40, 3671-3682

Lenntech website, 2015. <http://www.lenntech.nl/processen/zee/ontzilting-algemeen.htm>

Lowrey, J. and I. Yildiz, 2014. Investigation of heterotrophic cultivation potential of *Chlorella vulgaris* and *Tetraselmis chuii* in controlled environment wastewater growth media from dairy, poultry and aquaculture industries. *Acta Horticulturae*. 1037: 1109-1114

KoiEagle website, 2015. http://www.koieagle.nl/e107_plugins/content/content.php?content.956

Madkour, F. F., A. E. W. Kamil and H. S. Nasr, 2012. Production and nutritive value of *Spirulina platensis* in reduced cost media. *Egyptian Journal of Aquatic Research* 38(1): 51-57

Markou, G., 2014. Effect of various colors of light-emitting diodes (LEDs) on the biomass composition of *Arthrospira platensis* cultivated in semi-continuous mode. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 172(5): 2758-2768

Marrez, D. A., M. M. Naguib, Y. Y. Sultan, Z. Y. Daw and A. M. Higazy, 2014. Evaluation of chemical composition for *Spirulina platensis* in different culture media. *Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences* 5(4): 1161-1171

Mary Leema, J. T., R. Kirubakaran, N. V. Vinithkumar, P. S. Dheenan and S. Karthikayulu, 2010. High value pigment production from *Arthrospira (Spirulina) platensis* cultured in seawater. *Bioresource Technology* 101(23): 9221-9227

Menke, S. A. Sennhenn, J.-H. Sachse, E. Majewski, B. Huchzermeyer and Thomas Rath, 2012. Screening of microalgae for feasible mass production in industrial hypersaline wastewater using disposable bioreactors. *Clean – Soil, Air, Water* 40 (12): 1401-1407

Messerli, M. A., L. A. Amaral-Zettler, E. Zettler, S.-K. Jung, P. J. S. Smith and M. L. Sogin, 2005. Life at acidic pH imposes an increased energetic cost for a eukaryotic acidophile. *The Journal of Experimental Biology* 208, 2569-2579

Noordhollands Dagblad website, 2017. <https://www.noordhollandsdagblad.nl/den-helder-eo/texelse-waterplas-knalroze-door-algen-en-droogte>

Pasquet, V., L. Ulmann, V. Mimouni, F. Guihéneuf, B. Jacqueline, A. Morant-Manceau and G. Tremblin 2014. Fatty acids profile and temperature in the cultured marine diatom *Odontella aurita*. *Journal of Applied Phycology*: 1-7

Perin, G., A. Segalla, S. Basso, D. Simionato, A. Meneghesso, E. Sforza, A. Bertucco and T. Morosinotto, 2014. Biotechnological optimization of light use efficiency in *Nannochloropsis* cultures for biodiesel production. *Chemical Engineering Transactions*. 37: 763-768

Plötner, W. A., H. Hillebrand, R. Ptacnikova and R. Ptacnik, 2014. Heterotrophic flagellates increase microalgal biomass yield. *Journal of Applied Phycology* 27 (1): pp 87-96

Pluijm, G. van der, J. Wiersma and A. Vansovičs, 2013. Suitability of different saline groundwater sources for aquaculture in Zeeland. Investigation of saline groundwater from GroVisCo, SEAFARM and VAM. Final report minor 2012/2013

Razaghi, A., A. Godhe and E. Albers, 2014. Effects of nitrogen on growth and carbohydrate formation in *Porphyridium cruentum*. *Central European Journal of Biology* 9(2): 156-162

Riwa, 2000. Jaarverslag 1999-2000. Deel A De Rijn

San Pedro, A., C. V. González-López, F. G. Acién and E. Molina-Grima, 2013. "Marine microalgae selection and culture conditions optimization for biodiesel production. *Bioresource Technology* 134: 353-361

Schlösser, U.G., 1994. SAG-Sammlung von Algenkulturen at the University of Göttingen Catalogue of Strains 1994. *Bot. Acta* 107: 111 - 186

Simionato, D., M. A. Block, N. La Rocca, J. Jouhet, E. Maréchal, G. Finazzi and T. Morosinotto, 2013. The response of *Nannochloropsis gaditana* to nitrogen starvation includes de novo biosynthesis of triacylglycerols, a decrease of chloroplast galactolipids, and reorganization of the photosynthetic apparatus. *Eukaryotic Cell* 12(5): 665-676

Simionato, D., E. Sforza, E. Corteggiani Carpinelli, A. Bertucco, G. M. Giacometti and T. Morosinotto, 2011. Acclimation of *Nannochloropsis gaditana* to different illumination regimes: Effects on lipids accumulation. *Bioresource Technology* 102(10): 6026-6032

Sjerps, R., M. Maessen, B. Raterman, T. ter Laak and P. Stuyfzand, 2017. Grondwaterkwaliteit Nederland 2015-2016. *Chemie grondwatermeetnetten en nulmeting nieuwe stoffen*. KWR rapport 2017.024. 123 pp.

Stichting Waterbuffer website, 2017. <http://www.waterbuffer.net/nieuws-agenda/item/10849832/Bijeenkomst-17-2-2014-Ondergrondse-voorraadvorming-zoetwater>

Tamime, A. Y. 2006. *Brined cheeses*. Wiley-Blackwell, 344 pp.

Velea, S., L. Ilie and L. Filipescu, 2011. Optimization of *Porphyridium purpureum* culture growth using two variables experimental design: Light and sodium bicarbonate. *UPB Scientific Bulletin, Series B: Chemistry and Materials Science* 73(4): 81-94

Wageningen University and Research website, 2017. <http://www.wur.nl/nl/show/Algenteelt-als-voer-voor-oesters-op-afvoerwater-uit-glastuinbouw.htm>

Wamelink, G.W.W. and J. Runhaar, 2000. Abiotische Randvoorwaarden voor natuurdoeltypen, Alterra: Wageningen Alterra rapport 181

Wang, C. Y., C. C. Fu and Y. C. Liu, 2007. Effects of using light-emitting diodes on the cultivation of *Spirulina platensis*. *Biochemical Engineering Journal* 37(1): 21-25

Weewer, J., 2015. Persoonlijke communicatie, Frisia BV.

Weide, R. Y. van der, R. Schipperus & W. van Dijk, 2014. Algae cultivation using digestate as nutrient source: opportunities and challenges. 22nd European Biomass Conference and Exhibition, 23-26 June 2014, Hamburg, Germany

Wetsalt website, 2015. <http://www.wetsalt.nl/site.htm>

Wetus website, 2017. <https://www.wetus.nl/research/research-themes/blue-energy>

Wu, Y.-H., H.-Y. Hu, Y. Yu, T.-Y. Zhang, S.-F. Zhu, L.-L. Zhuang, X. Zhang and Y. Lu, 2014. Microalgal species for sustainable biomass/lipid production using wastewater as resource: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 33: 675-688

Xia, S., K. Wang, L. Wan, A. Li, Q. Hu and C. Zhang, 2013a. Production, characterization, and antioxidant activity of fucoxanthin from the marine diatom *Odontella aurita*. *Marine Drugs* 11(7): 2667-2681

Xia, S., L. Wan, A. Li, M. Sang and C. Zhang, 2013b. Effects of nutrients and light intensity on the growth and biochemical composition of a marine microalga *Odontella aurita*. *Chinese Journal of Oceanology and Limnology* 31(6): 1163-1173

Xie, Y., Y. Jin, X. Zeng, J. Chen, Y. Lu and K. Jing, 2015. Fed-batch strategy for enhancing cell growth and C-phycoerythrin production of *Arthrospira (Spirulina) platensis* under phototrophic cultivation. *Bioresource Technology* 180: 281-287

Xue, S., Z. Su and W. Cong, 2011. Growth of *Spirulina platensis* enhanced under intermittent illumination. *Journal of Biotechnology* 151(3): 271-277

Zhang, L., L. Chen, J. Wang, Y. Chen, X. Gao, Z. Zhang and T. Liu, 2015. Attached cultivation for improving the biomass productivity of *Spirulina platensis*. *Bioresource Technology* 181: 136-142

Zhao, P., W. Gu, S. Wu, A. Huang, L. He, X. Xie, S. Gao, B. Zhang, J. Niu, A. Peng Lin and G. Wang, 2014. Silicon enhances the growth of *Phaeodactylum tricornutum* Bohlin under green light and low temperature. *Scientific Reports* 4

Zijffers, J. W. F., K. J. Schippers, K. Zheng, M. Janssen, J. Tramper and R. H. Wijffels, 2010. Maximum photosynthetic yield of green microalgae in photobioreactors. *Marine Biotechnology* 12(6): 708-718

8 Appendices

Appendix I Samenstelling geteste reststromen in welltesten 1&2

Tabel IA Analyses van onverdunde reststromen (g element/L tenzij anders aangegeven). Lege cellen onder detectielimiet of niet gemeten. *De concentraties zijn berekend uit analyses van verdunde reststromen, ** met toegevoegde NaNO₃

	A	B	C	D	E	F	G	H	D2**	F2**
EC voor verdunning	303	229	43.6	2.25	29.4	4.88	257	264	2.5	2.1
Verdunningsfactor voor analyse*	41	40.5	5	0	6.4	0	51.5	50.6	0	0
EC na verdunning	8.96	9.21	10.32		5.64		10.9	9.72		
N-NH₄					2	0.02				0.01
K	90	0.9	0.3	0.01		0.02	10	1	0.01	0.02
Na	3	71.7	8.4	0.1	10	0.6	112	99	0.13	0.25
Ca	2	1.8	0.3	0.3	5	0.3		1	0.39	0.12
Mg	0.3		0.9	0.1		0.1		0.4	0.09	0.04
N-NO₃									0.01	0.01
Cl	93.3	115	15.5	0.1	3	1.2	150	151	0.09	0.32
S			0.6	0.4	0		9	1	0.37	0.09
C-HCO₃			0.005	0.01		0.03	0.05		0.01	0.01
P	0.3	0.6								
Fe (mg/L)	6.2	0.5			0.1	0.02			0.01	0.02
Mn (mg/L)	0.9			0.7		1.0			3.8	1.3
Zn (mg/L)	1.1		0.03	0.02		0.03	1		0.03	0.01
B (mg/L)			3.0	1.2	0.1	0.1	3		1.09	0.23
Cu (mg/L)										0.01
Mo (mg/L)										
Si				0.01		0.01			0.01	0.01
DS					39					
As					13					
OS					26					

Tabel IB EC en pH in verdunde stromen gebruikt in welltesten 1&2 (na= niet geanalyseerd). *6x=6,25x verdund, 12x=12,5x verdund

Stroom/verduunning*	EC	pH
A6x	53.4	4.7
A12X	26.7	5.3
B6x	50.1	5.4
B12x	27.0	6.0
C	39.6	8.4
D	3.1	8.0
D2	na	na
E6x	5.7	8.5
E12x	3.1	8.7
F	4.5	6.9
F2	na	na
G10x	55.9	12.0
G20x	26.6	11.7
H10x	42.3	7.3
H20x	25.7	na
F2+Si controlemedium	46.3	8.8
F2 controle medium	46.6	8.7
Spir controlemedium	23.4	9.8

Appendix II Samenstelling extra geteste reststromen in welltesten 3&4

Kaaspekkel (stroom I)

Drogestofgehalte	%(m/m)	20,8	20,8	18,5
Eiwit gehalte ISO	Nx 6.38%	0,18	0,20	0,14
pH	(-)	4,27	4,44	4,42
IJzer (ICP)	mg/100g	0,02	0,06	0,03
Zink (ICP)	mg/100g	0,08	0,10	0,08
Magnesium (ICP)	mg/100g	10,6	11,5	10,9
Natrium (ICP)	mg/100g	6990	6944	6265
Kalium (ICP)	mg/100g	97,1	92,4	95,8
Calcium (ICP)	mg/100g	180	170	157
Fosfor (ICP)	mg/100g	72,0	89,9	80,1
Koper (ICP)	µg/100g	20	30	26
Mangaan (ICP)	µg/100g	0,9	2,9	3,3
Lactosegehalte (%)	%(m/m)	0,69	0,39	0,32
Lactaatgehalte (%)	mg/100g	768	970	828
Zuurtegraad	Mmol NAOH/l	53,2	61,1	54,2

Afvalwater van ontzoutingsinstallaties (stroom J)

			IEX Processing aids
Component			Effluent
			2012
Sodium	Na	kton	3.2
Potassium	K	kton	1.7
Calcium	Ca	kton	0.5
Magnesium	Mg	kton	0.0
Chloride	Cl	kton	4.7
Sulphate	SO4	kton	0.1
Phosphate	PO4	kton	0.9
SUM		kton	11.1

Appendix III Literatuuroverzicht van media voor zoutwateralgen

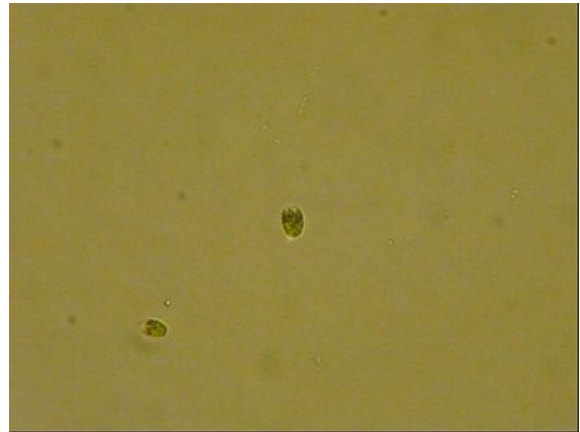
Soort	Medium	Auteur
<i>D. salina</i> UTEX LB#200	Gg-8	Fu et al 2013
<i>D. salina</i> CCAP 19/18	Medium Lamers et al 2010 zonder N (gebaseerd op <i>D. tertiolecta</i>)	Lamers et al 2012
<i>Dunaliella</i> sp.	Aangepast Johnson medium	Kent et al, 2015
<i>D. tertiolecta</i> CCAP 19/6B	Synthetisch zeewater medium	Zijffers et al, 2010
<i>N. gaditana</i> CCMP526	Aangepast f/2, 5x zoveel NaNO ₃	Kim et al 2014
<i>N. gaditana</i> 849/5 CCAP	Steriel f/2 medium	Perin et al, 2014
<i>N. gaditana</i> 849/5 CCAP	Steriel gefilterd f/2 medium	Simionato et al, 2011
<i>N. gaditana</i> 849/5 from CCAP	Steriel gefilterd f/2 medium	Simionato et al, 2013
<i>Nannochloropsis</i> sp.	f/2 Guillard medium	Doan & Obbard, 2012
<i>Nannochloropsis</i> sp.	Sterilized seawater enriched with Guillard F medium	Das et al, 2011b
<i>Nannochloropsis</i> sp.	f/2 medium	Kent et al, 2015
<i>Nannochloropsis</i>	Verrijkt gesteriliseerd zeewater	Das et al 2011a
<i>N. gaditana</i> Lubián CCMP 527	Algal-verrijkt natuurlijk zeewater	San Pedro et al, 2013
<i>S. platensis</i>	Geen standaard medium?	Chen et al, 2013
<i>S. platensis</i> breed F3	Zarrouk medium	Xue et al, 2011
<i>S. platensis</i>	Zarrouk medium	Zhang et al, 2015
<i>S. platensis</i> (ATCC-29408)	Zarrouk medium	Wang et al, 2007
<i>A. platensis</i> (WH879)	Zarrouk medium	Xie et al, 2015
<i>S. platensis</i> (K-2)	Low cost medium	Madkour et al, 2012
<i>S. platensis</i> (K-2)	Zarrouk medium	Madkour et al, 2012
<i>A. platensis</i>	Zarrouk medium	Mary Leema et al, 2010
<i>A. platensis</i>	Seawater media	Mary Leema et al, 2010
<i>S. platensis</i> ATCC29408	Zarrouk	Chen et al 2010
<i>A. platensis</i> SAG 21.99	Zarrouk medium	Markou 2014
<i>S. platensis</i>	BG-11	Marrez et al 2014
	Modified BG-11	
	Zarrouk (ZM)	
	Synthetische urine	
<i>S. maxima</i> (Setchell & Gardner, LB2342)	Spirulina medium	Batista et al, 2013
<i>I. galbana</i> (ISG-1)	f/2	Gómez-Loredo et al 2015
<i>I. galbana</i> (Mary Parke collection)	Wallerstein & Miquel medium (3:1 in filtered seawater with 35% (?) salt)	Batista et al, 2013
<i>I. galbana</i> (CCMP-1324)	f/2 medium	Cho et al, 1998
<i>O. aurita</i> K-1251	Aangepast L1 medium uit kunstmatig zeewater	Xia et al, 2013a
<i>O. aurita</i> CCMP1796	Aangepast kunstmatige zeewater	Pasquet et al 2014
<i>O. aurita</i> K-1251	Gemodificeerd L1 medium	Xia et al 2013b
<i>P. purpureum</i>	Concentrated (2x) seawater-sewage medium with additions	Golueke and Oswald, 1962
<i>P. purpureum</i> GUMACC25	f/2 met hogere concentraties Na ₂ PO ₄ , sporenelementen en viatmines	Razaghi et al, 2014
UTEX 161		
<i>P. purpureum</i>	Kunstmatig zeewater	Velea et al, 2011
<i>P. purpureum</i> PLY#539	f/2-RSE medium	Guihéneuf & Stengel, 2015
<i>P. tricornutum</i> Bohlin CCMP 2561	Guillard f/2 uit gefilterd en gesteriliseerd zeewater	Chauton et al, 2013
<i>P. tricornutum</i>	f/2 uit gesteriliseerd zeewater	Zhao et al 2014
<i>P. tricornutum</i> (PHT-1)	f/2	Gómez-Loredo et al 2015
<i>P. tricornutum</i> SAG 1090-1a	'Algal'-verrijkt natuurlijk zeewater	San Pedro et al, 2013
<i>T. chuii</i>	Aangepast f/2	Lowrey and Yildiz, 2014
<i>T. chuii</i> SAG 8-6	Algal-verrijkt natuurlijk zeewater	San Pedro et al, 2013
<i>T. suecica</i> CCAP 66/4	Algal-verrijkt natuurlijk zeewater	San Pedro et al, 2013
<i>D. vlkianum</i> (Mary Parke collection)	Wallerstein & Miquel medium (3:1 in filtered seawater with 35% (?) salt)	Batista et al, 2013

Appendix IV Overzicht gebruikte algensoorten welltesten

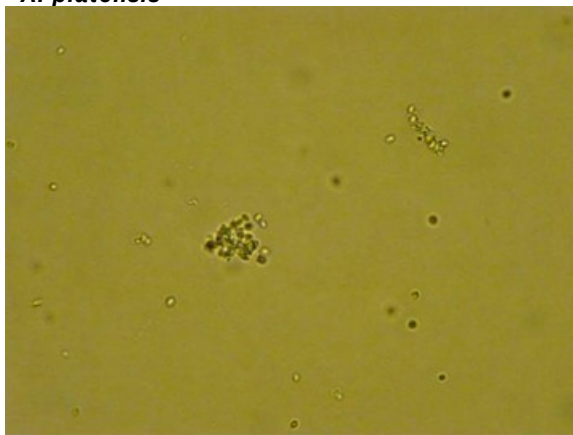
Foto's start welltesten



A. platensis



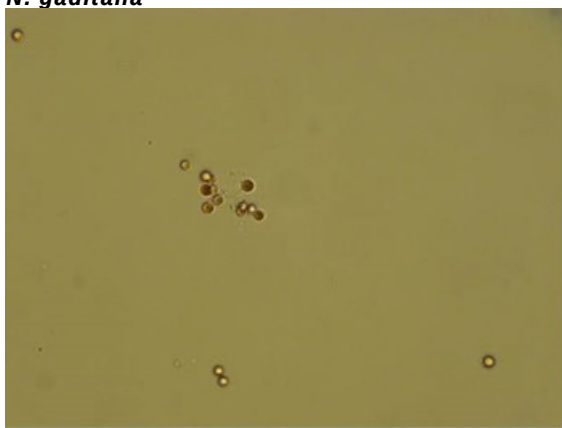
D. salina



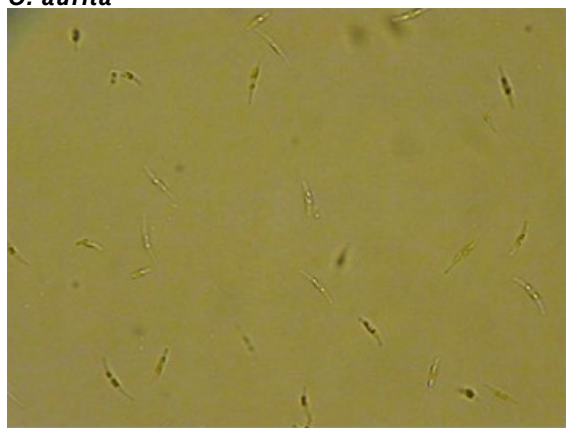
N. gaditana



O. aurita



P. purpureum



P. tricornutum



T. chuii

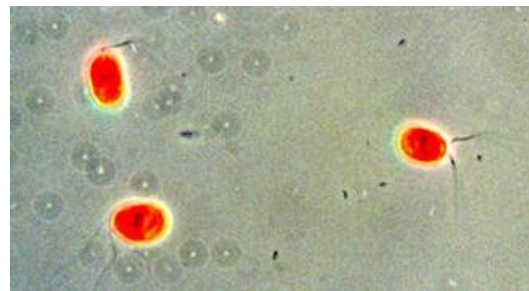


***T. chuii* (AF&F)**

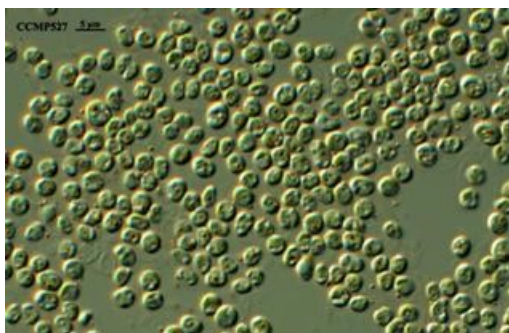


T. tetrathele

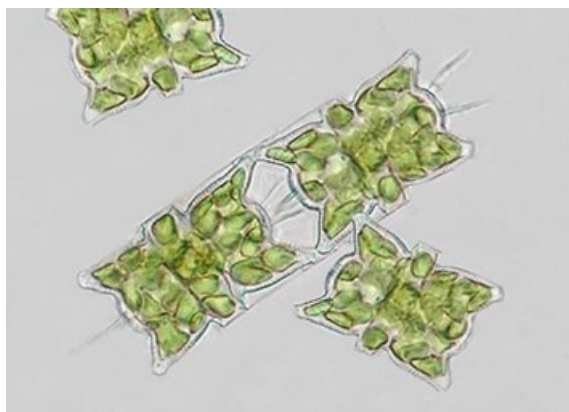
Referentiefotos



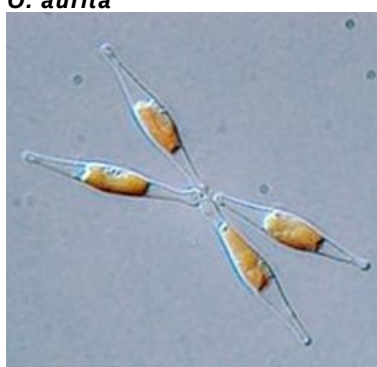
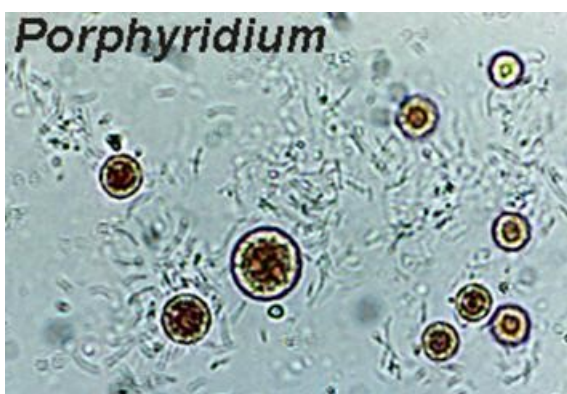
D. salina



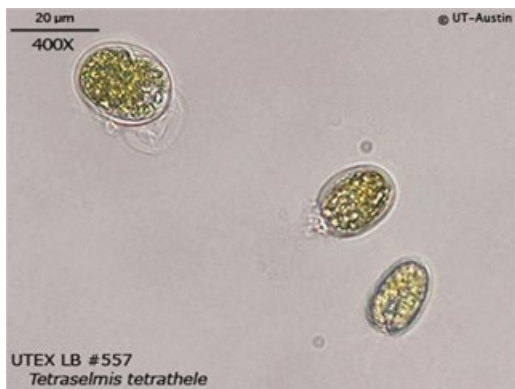
N. gaditana



O. aurita

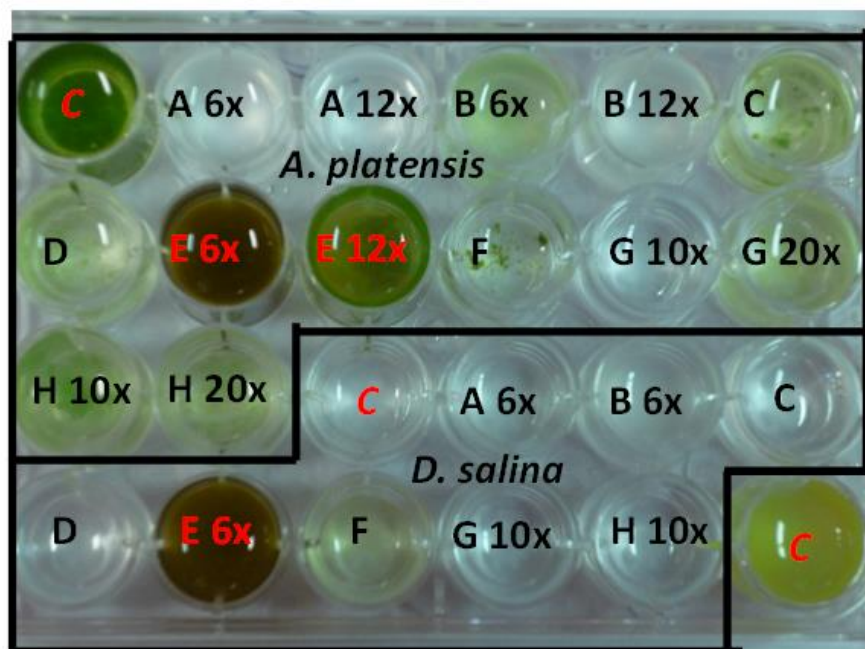


P. tricornutum

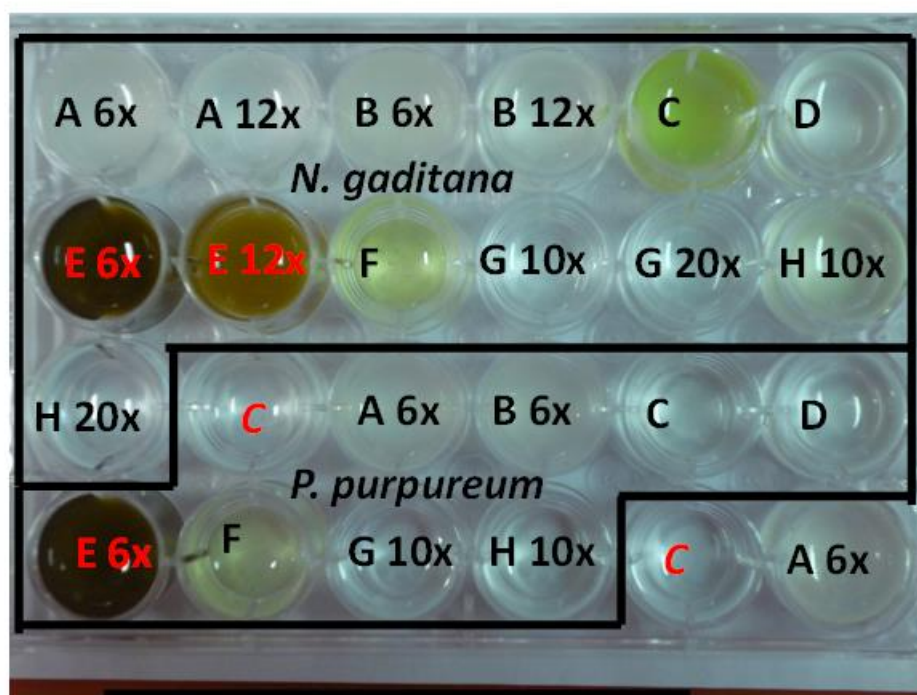


Appendix V Resultaten welltest 1

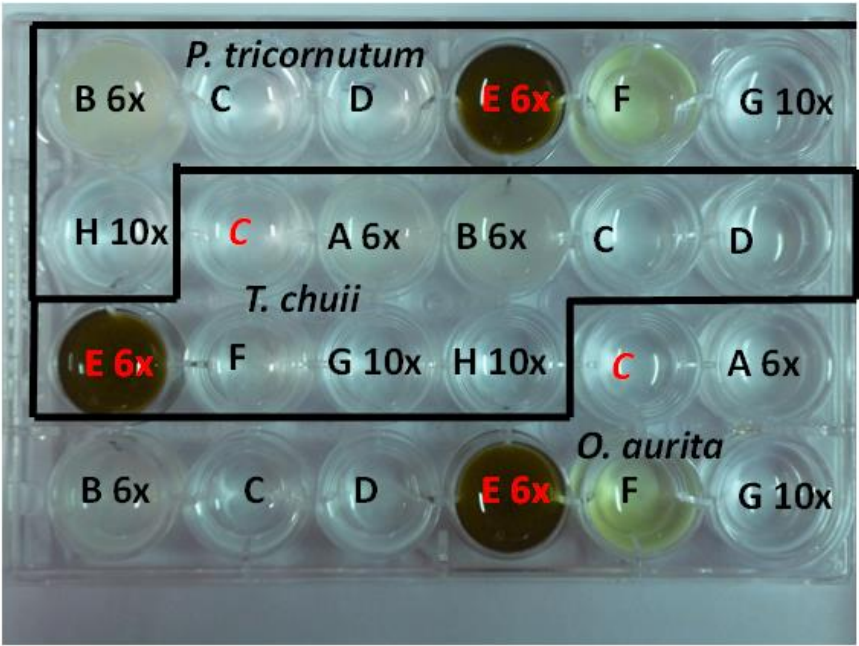
Plaat 1



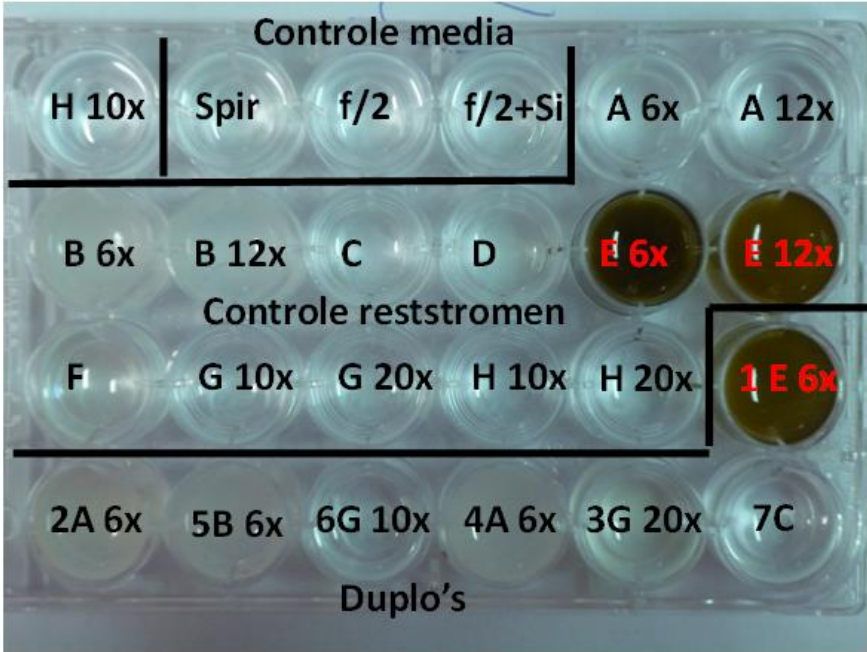
Plaat 2



Plaat 3

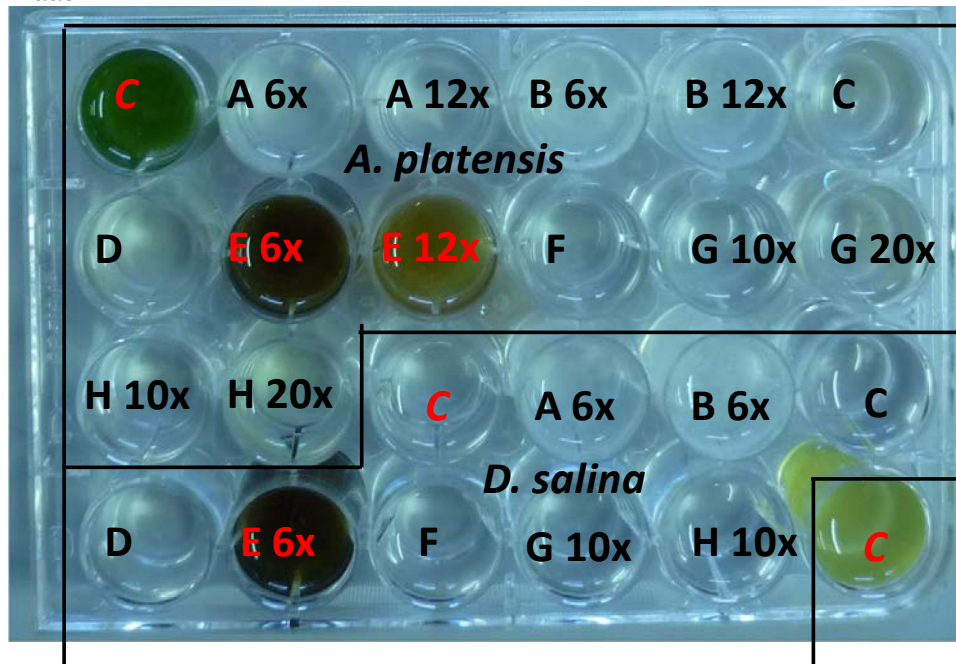


Plaat 4

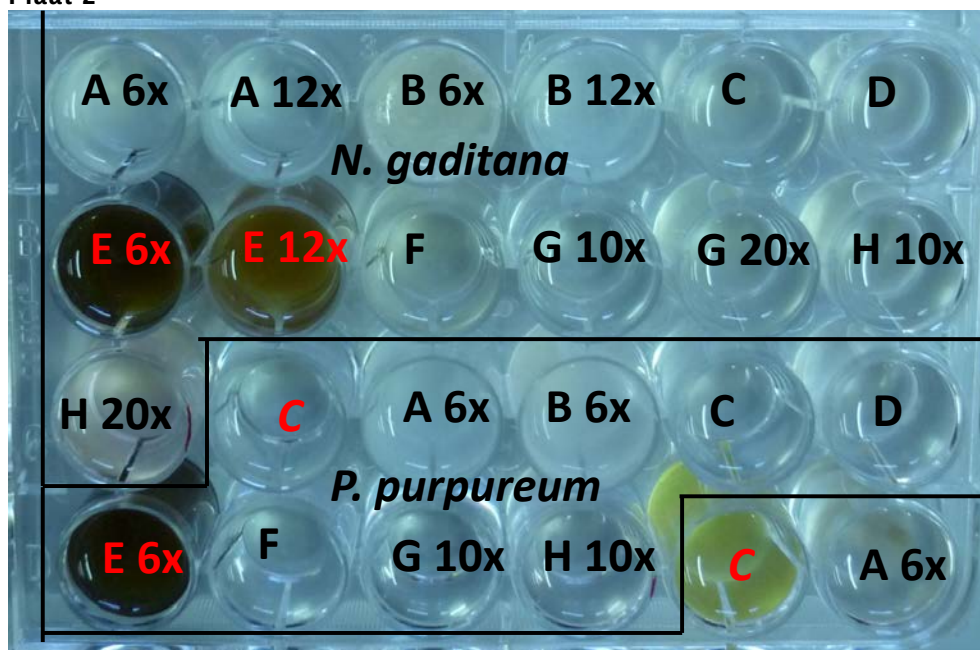


Appendix VI Resultaten welltest 2

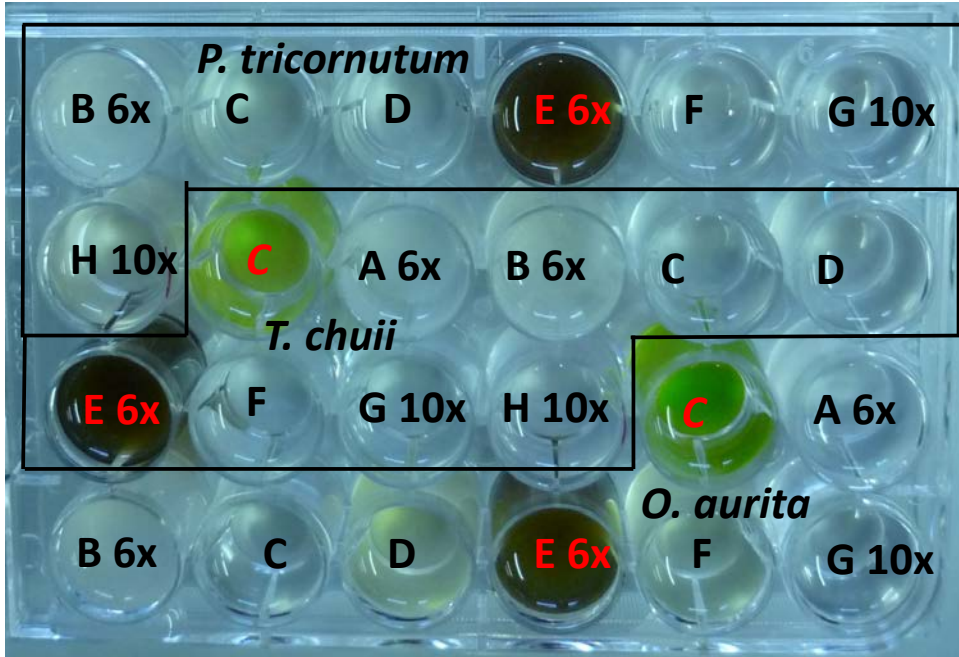
Plaat 1



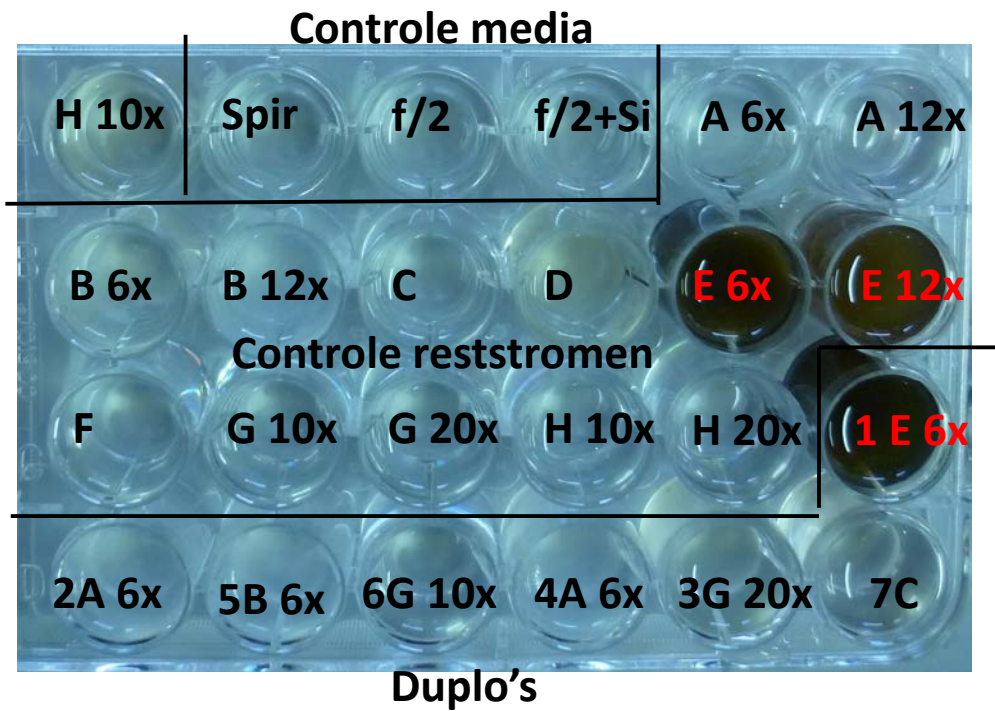
Plaat 2



Plaat 3

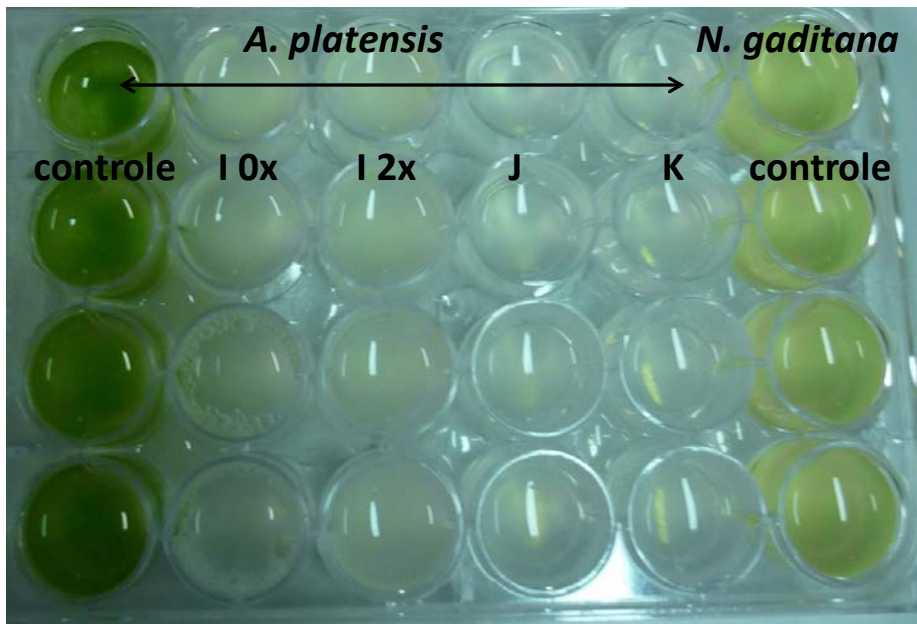


Plaat 4

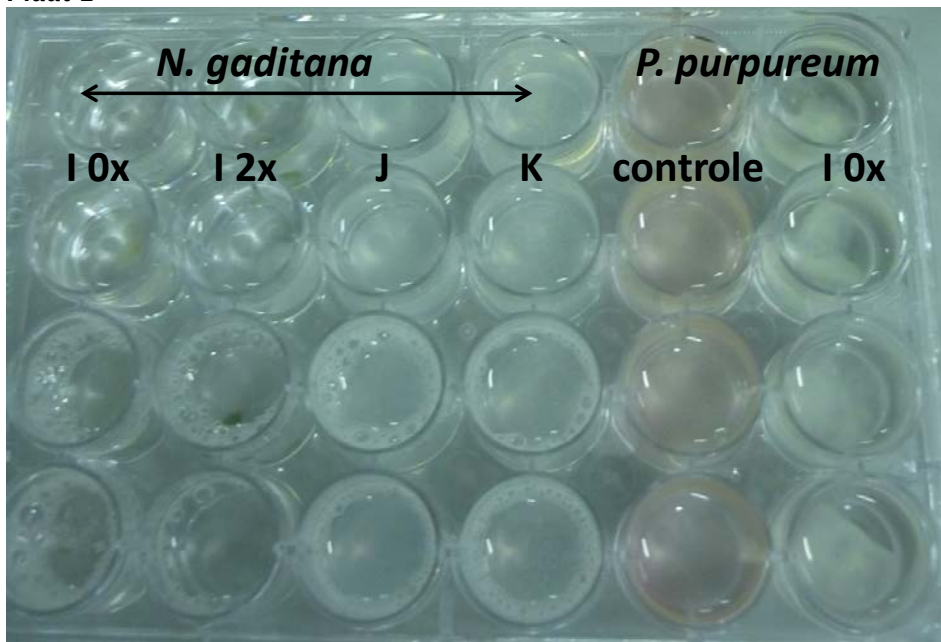


Appendix VII Resultaten welltest 3

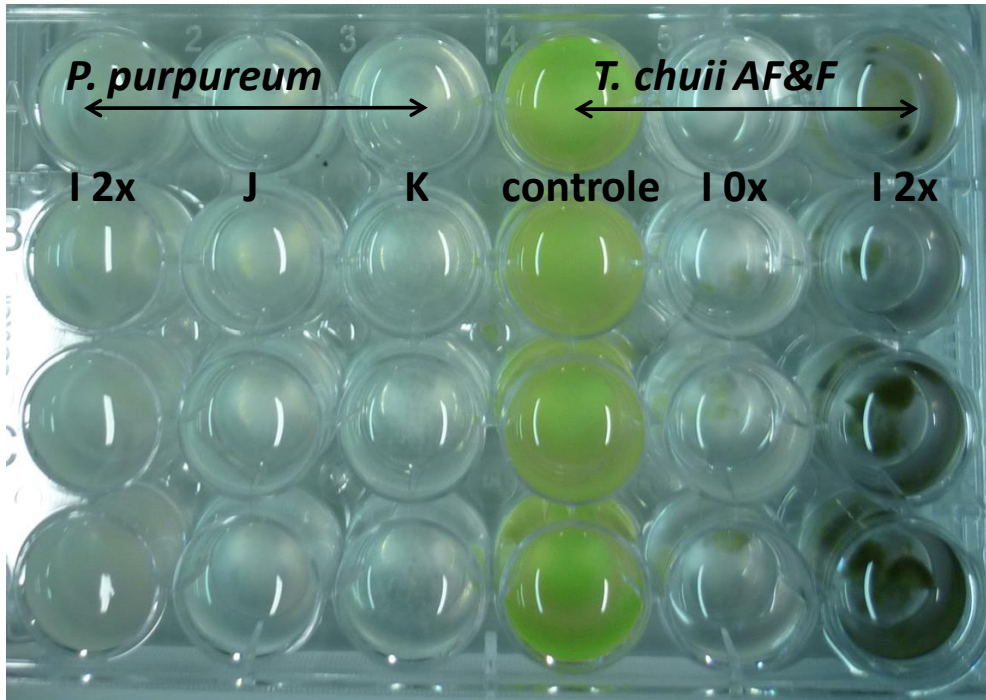
Plaat 1



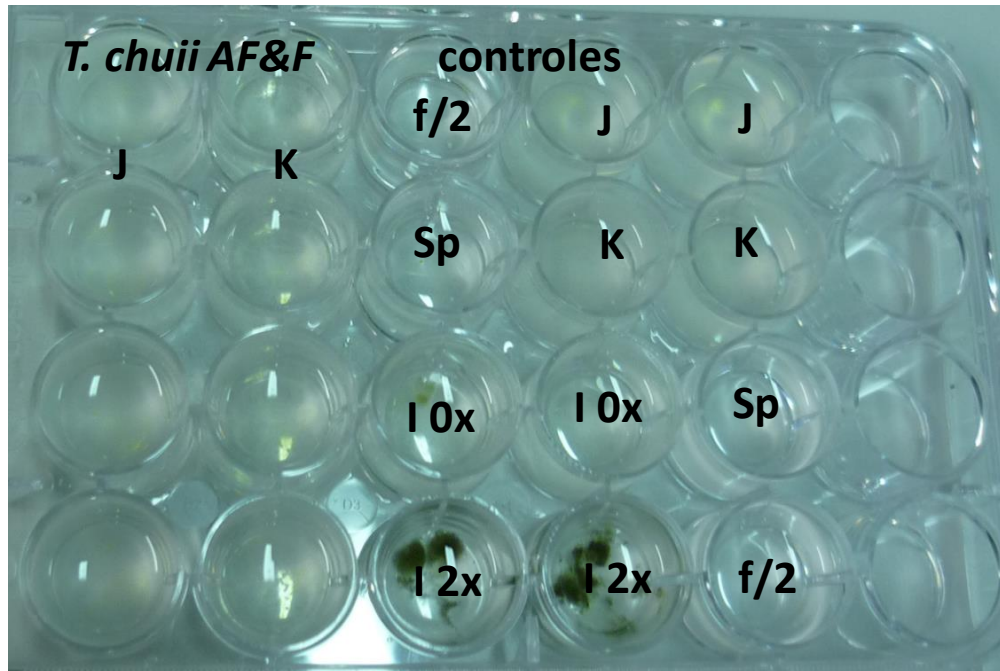
Plaat 2



Plaat 3

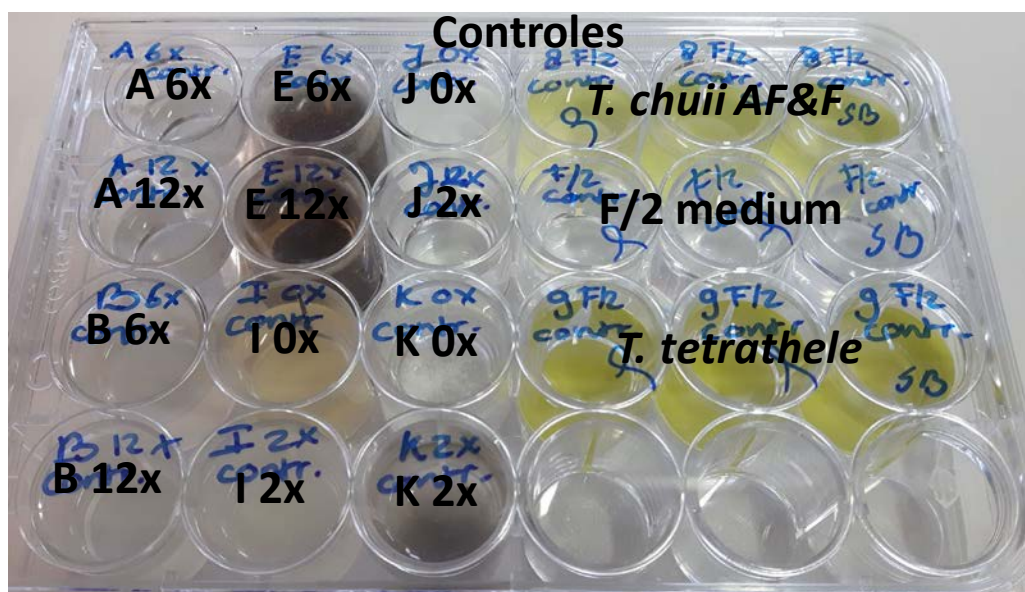


Plaat 4

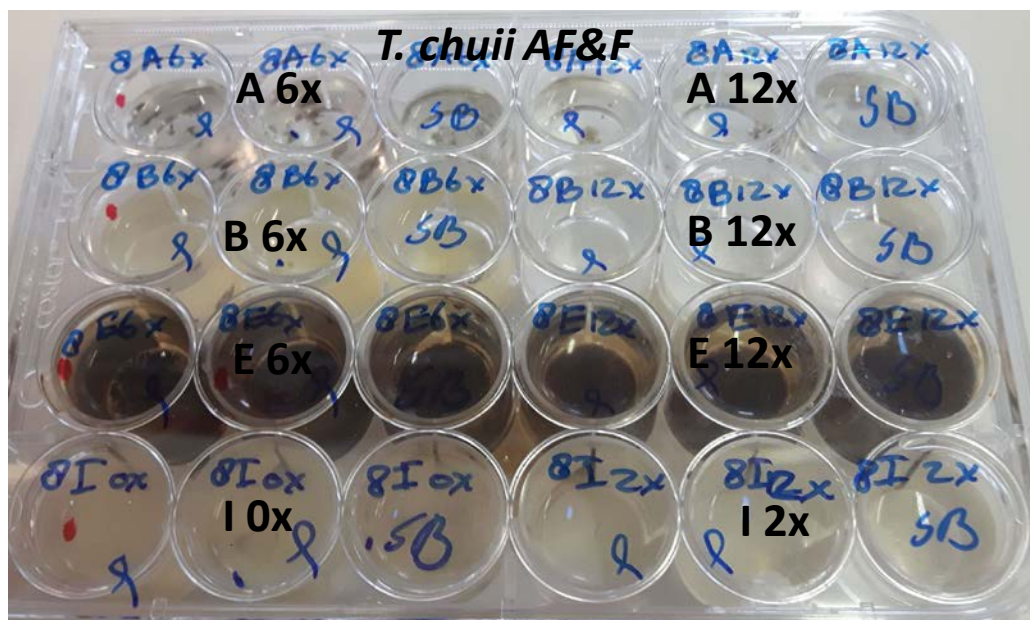


Appendix VIII Resultaten welltest 4

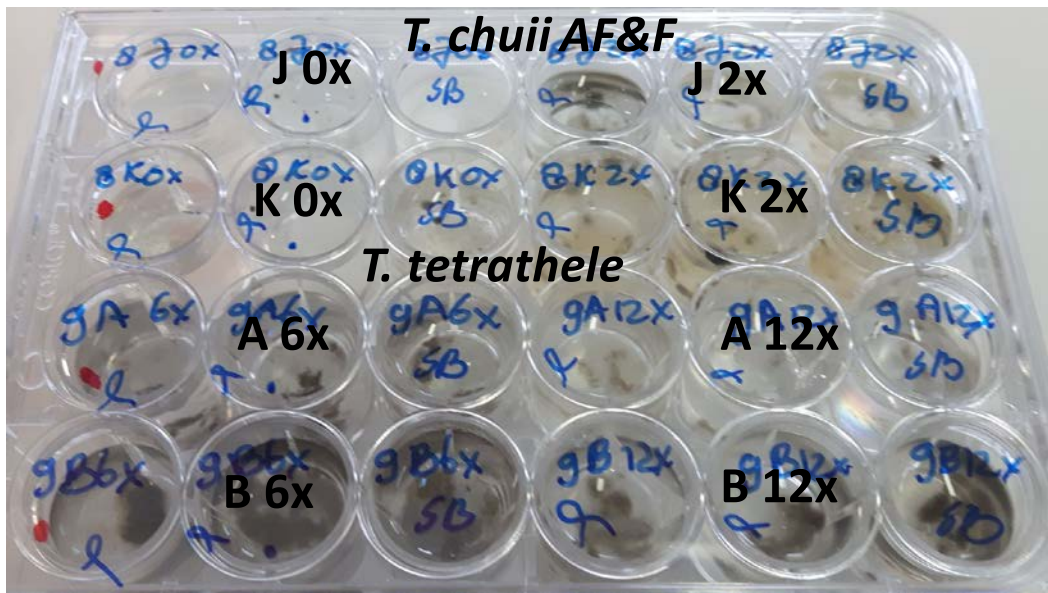
Plaat 1



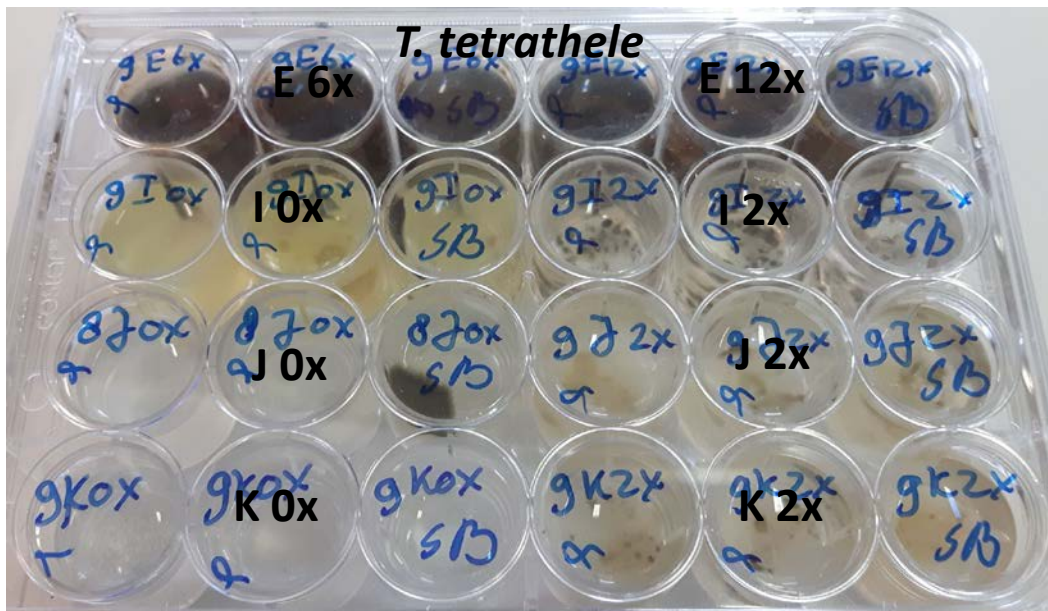
Plaat 2



Plaat 3



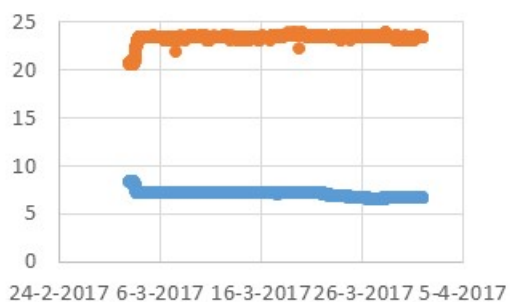
Plaat 4



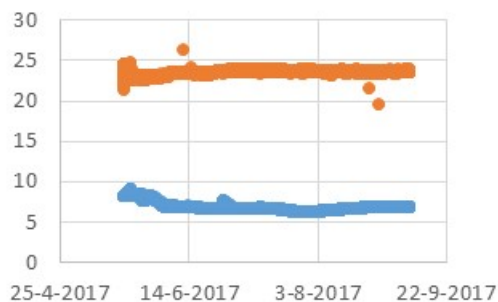
Appendix IX pH en T waarden in Experimenten 5 en 6 (1L reactoren)

Reactor A *N. gaditana*, reactor B *A. platensis*, reactor C *T. chuii* (AF&F), reactor D *P. purpureum*

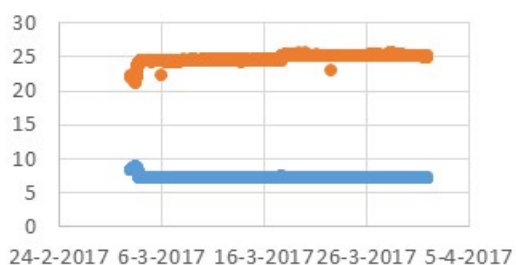
Reactor A Experiment 5



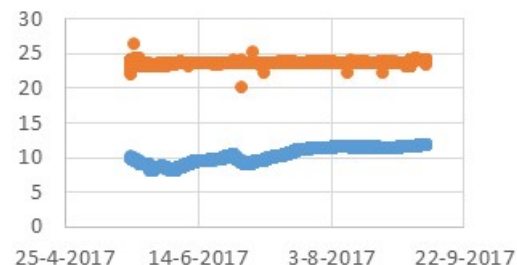
Reactor A Experiment 6



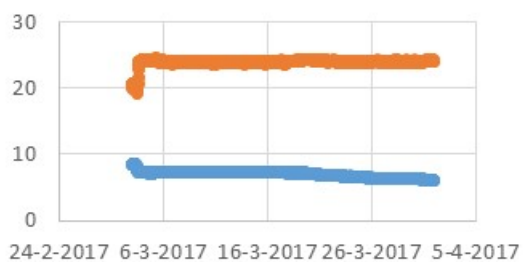
Reactor B Experiment 5



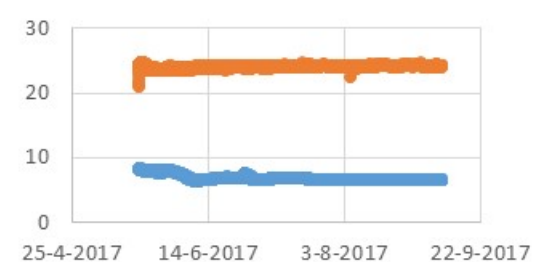
Reactor B Experiment 6



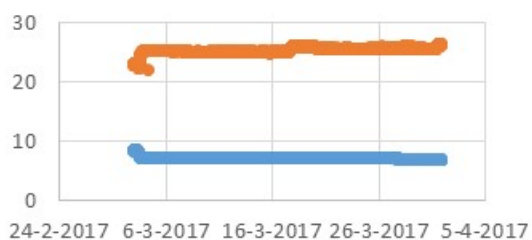
Reactor C Experiment 5



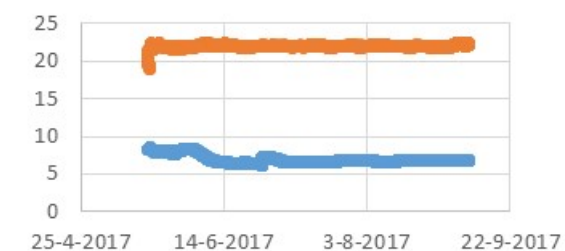
Reactor C Experiment 6



Reactor D Experiment 5



Reactor D Experiment 6



Correspondentie adres voor dit rapport:

Postbus 430
6700 AK Lelystad
T 0320 29 11 11
<http://acrres.nl/>

Rapport 750

De missie van Wageningen University & Research is 'To explore the potential of nature to improve the quality of life'. Binnen Wageningen University & Research bundelen Wageningen University en gespecialiseerde onderzoeksinstituten van Stichting Wageningen Research hun krachten om bij te dragen aan de oplossing van belangrijke vragen in het domein van gezonde voeding en leefomgeving. Met ongeveer 30 vestigingen, 5.000 medewerkers en 10.000 studenten behoort Wageningen University & Research wereldwijd tot de aansprekende kennisinstellingen binnen haar domein. De integrale benadering van de vraagstukken en de samenwerking tussen verschillende disciplines vormen het hart van de unieke Wageningen aanpak.



