



UNIVERSITEIT
GENT

Faculteit Bio-ingenieurswetenschappen

Academiejaar 2009-2010

MATTEN ALS DRAGERMATERIAAL VOOR DE ZUIVERING VAN
HUISHOUELIJK AFVALWATER DOOR PERIFYTON

Jeroen Baets

Promotor: Prof. dr. ir. Willy Verstraete

Tutor: M. Sc. Jan Arends

Masterproef voorgedragen tot het behalen van de graad van

MASTER IN DE BIO-INGENIEURSWETENSCHAPPEN -
OPTIE MILIEUTECHNOLOGIE

De auteur en de promotoren geven de toelating dit eindwerk voor consultatie beschikbaar te stellen en delen ervan te kopiëren voor persoonlijk gebruik. Elk ander gebruik valt onder de beperkingen van het auteursrecht, in het bijzonder met betrekking tot de verplichting uitdrukkelijk de bron te vermelden bij het aanhalen van resultaten uit dit eindwerk.

The author and the promoters give the permission to use this thesis for consultation and to copy parts of it for personal use. Every other use is subject to the copyright laws, more specifically the source must be extensively specified when using results from this thesis.

GENT, 02/06/2010

Promotor
Prof. dr. Ir. Willy Verstraete

Tutor
M. Sc. Jan Arends

Auteur
Jeroen Baets

WOORD VOORAF

Bijna anderhalf jaar geleden is het al dat ons werd gevraagd om een thesisonderwerp te kiezen waar we gedurende één jaar intensief aan zouden werken. De keuze was allerm minst evident want de thesissen onderling vertoonden sterke verschillen met betrekking tot het onderwerp en de onderzoeksomgeving (computer, labo of het veld). Die algen leken mij wel iets, zeker binnen het idee van een duurzame samenleving, en de combinatie tussen het labo- en computerwerk trokken mij over de streek om er voor te gaan. Nu, op het einde van de opleiding bio-ingenieur, beschouw ik dit proefwerk als de meest leerrijke studie-ervaring uit mijn leven. Het werd een lange verkennende periode waarin een grote vrijheid in onderzoek werd vertaald naar intensieve studie om de juiste keuzes te maken. Keer op keer doken hardnekkige uitdagingen op die mij leerden om kritisch zijn, bepaalde zaken te herbekijken en op tijd contact op te nemen met de mensen die mij konden helpen.

Prof. Willy Verstraete, met een dergelijke vrijheid een proefwerk tot een goed einde brengen is volgens mij enkel mogelijk in een heel stimulerende en prikkelende omgeving zoals LABMET. U was enthousiast over mijn onderzoek, u nam mij au-sérieux, u corrigeerde mij waar nodig en bracht vage ideeën naar haalbare niveaus. Bedankt!

Jan, je was echt een uitstekend begeleider. Hoewel je eigen onderzoeksdomein veraf ligt, ging er geen week voorbij zonder dat je exact wist waar ik mee bezig was. Je bracht constructieve commentaar alom en toonde een hoog niveau van interesse. Bedankt!

Eddie en Julien, zonder jullie hulp zou het niet mogelijk zijn geweest om de periphyton-incubator te bouwen. Bedankt!

Sofie, Annick, Linde, David, Bert, Jan en Carlos. Jullie wisten het meest af van algen. De algen-clusters waren effectieve vergaderingen waar ik veel uit geleerd heb. Bedankt!

Rita, ik zal niet zeggen dat je mij helemaal hebt omgetoverd in een nette, precieze en respectvolle onderzoeker, maar grote stappen zijn gezet, mede door uw geduld en rechtuitheid. Bedankt!

Labmitters, jullie liep ik overdag uiteraard het meest tegen het lijf. De vele babbels en grapjes maakten onderzoek heel aangenaam. De ontelbare keren dat vijf minuutjes tijd van jullie werd omgezet in een tijdsbeparing van uren voor mij, waren best wel handig. Bedankt!

Studio Brussel. Bedankt!

Vake, moeke, Laura, Stijn, Pieter en Steffi, volgend jaar help ik, ter compensatie, meer mee in het huishouden, dat is wel beloofd! Het onvoorstelbaar begrip en de bijkomende hulp vanaf het begin tot einde zal ik niet vergeten. Bedankt!

Aan Prof. Dr. Ir. Paul Kiekens en medewerker Stijn Rambour van de vakgroep textielkunde en het bedrijf Bonar, bedankt voor de bereidwillige medewerking in het maken van een dragermateriaal voor perifyton. Aan het bedrijf Namgrass België, bedankt voor het gratis ter beschikking stellen van verschillende grasmatten. Aan Prof. Dr. Ir. Ingmar Nopens, bedankt voor de stimulans in het maken van een schuifspanningreactor. Aan Prof. Dr. Ir. Guy Smagghe, bedankt voor het genezen van het perifyton toen het werd gekoloniseerd door agressieve muggenlarven.

SAMENVATTING

Onze maatschappij wordt nog steeds gedreven door de aanwending van onduurzame grondstoffen voor de productie van energie, de verfijning van materialen en producten die worden ingezet in de landbouwnijverheid. Behalve de eindige beschikbaarheid van deze grondstoffen, hebben deze ook een grote invloed op het systeem aarde (klimaatopwarming, rechtstreekse vervuiling, etc.). In de waterzuivering van huishoudelijk afvalwater komt men vooral tegemoet aan de rechtstreekse vervuiling maar wordt weinig rekening gehouden met hergebruik van nutriënten, limitering van supplementaire grondstoffen en beperking van het energiegebruik. Dit is nochtans de basis voor een duurzame samenleving.

Waterzuivering met behulp van een fototrofe biofilm, aangeduid met de term perifyton, lijkt een duurzame aanpak omdat het kan leiden tot een volledige recuperatie van biomassa en nutriënten (in het perifyton) en een laag gebruik van grondstoffen. Dit systeem is reeds gecommercialiseerd (in de zogenaamde *algal turf scrubber* of ATS) voor tertiaire zuivering van huishoudelijk afvalwater. Het energiegebruik in dit systeem is echter wel betrekkelijk hoog. In dit proefwerk werd onderzocht of het perifyton ook geschikt is voor een meer secundaire zuivering van huishoudelijk afvalwater want op die manier kunnen meer nutriënten worden teruggewonnen. Daarbovenop werd nagegaan of bepaalde dragermaterialen kunnen leiden tot een verbetering van de performantie van de ATS. Het onderzoek hiervoor gebeurde in een perifyton-incubator.

Uit de bevindingen blijkt dat secundaire zuivering van huishoudelijk afvalwater met behulp van perifyton mogelijk is. Verschillende dragermaterialen leidden tot verschillende perifytonstructuren (zowel morfologisch als op basis van microbiologische diversiteit) die een invloed hadden op de waterzuivering van het systeem. *Cladophora* als dominant geslacht in perifyton geeft aanleiding tot de meest optimale perifytongemeenschap omdat deze zowel stabiel, makkelijk oogst- en ontwaterbaar was en mogelijks gebruikt kan worden als veevoeder. Uit de economische analyse bleek dat, in landen met een gemiddeld ontwikkelingspeil en een gematigd tot warm klimaat, dit systeem duurzaam en economisch haalbaar kan zijn indien lage energievereisten, hoogwaardig gebruik van de geoogste biomassa en eenvoudige procescontrole verzekerd kunnen worden.

Twee belangrijke zijlijnen in het onderzoek kunnen worden onderscheiden. Ten eerste werd nagegaan of de productiviteit van de micro-alg *Chlorella* kan worden verhoogd door lichtherverdeling in het groeimedium door middel van verticale doorschijnende platen. Dit bleek mogelijk, hoewel geen definitieve conclusie uit deze test getrokken kon worden. Ten tweede werd perifyton voor het eerst gekarakteriseerd met behulp van flowcytometrie. Deze methode bracht de nieuw gedefinieerde Perifyton-Bacterie-Index (PBI) naar voren die potentieel een goede kwantitatieve maatstaf kan worden voor de bacteriële gemeenschap in perifyton.

ABSTRACT

Our society is still mainly driven by unsustainable resources for energy, materials and supplements in agriculture. Except for the problem of depletion of those resources for future generations, the current exploitation has also adverse affects on the system earth (i.e. climate change, direct pollution, etc.). In the treatment of municipal wastewater, the main purpose has always been to decrease the direct pollution without concern for the more global issues such as closure of the nutriënt loop, limitation of supplementary resources and energy use. Nevertheless, these are necessary conditions for a sustainable society.

Water treatment using periphyton in a so-called algal turf scrubber (ATS) seems to be a promising method towards sustainable water treatment. This stems from the low need for supplementary resources and the fact that all nutriënts taken up by the periphyton can potentially be reused. This system has already been commercialised for tertiary treatment of wastewater. The only disadvantage is the energy use for pumping and processing of the periphyton. In this work, the water treatment by means of periphyton was studied in a periphyton incubator. Research was focused on two aspects. The first objective was to examine the capability of periphyton to bring about a secondary treatment and thus to allow for more nutriënt recycling. The results showed a great potential for this treatment. The second objective was to examine the influence of structured support materials on the general performance of the periphyton (water treatment, stability, etc.). The influence was shown to be indirect because the support material influenced the periphyton community which in turn influenced the water treatment performance. *Cladophora* as the dominant algae genus was found to have a high potential because it gave rise to a periphyton community which was stable, easily harvestable and dewatered and even potentially suitable as an animal feed. The economic analysis showed a high economic and sustainability potential for rural areas with a fairly warm climate and a medium development index, provided that pumping energy requirement is moderate, the reuse of the harvested periphyton is assured and simple process-control is feasible.

Two sidelines were elaborated in this work. First, the change in productivity of *Chlorella* as a consequence of the dilution of light in vertical translucent plates was examined. This research showed an increase of productivity although no definite conclusion could be drawn from the results. Secondly, a first attempt was made to characterise the bacterial community of periphyton with a flow cytometer. The used method gave consistent values of a newly established Periphyton-Bacteria-Index which has the potential to be further developed as a tool in the analysis of periphyton.

INHOUDSTAFEL

WOORD VOORAF	I
SAMENVATTING	III
ABSTRACT	IV
INHOUDSTAFEL.....	V
LIJST MET AFKORTINGEN	VIII
DEEL I LITERATUUR- STUDIE	1
1 WATERZUIVERING IN EEN GLOBALE CONTEXT	2
1.1 Huishoudelijk afvalwater.....	2
1.2 Intensieve waterzuivering	4
1.3 Passieve waterzuivering.....	6
1.4 Gespecialiseerde algensystemen	7
1.5 De waterzuivering van de toekomst.....	12
2 PERIFYTON	15
2.1 Diversiteit	15
2.2 Biochemische eigenschappen.....	16
2.3 Ontwikkeling perifyton.....	17
2.4 De invloed van licht en temperatuur	19
3 ONDERZOEK	21
DEEL II MATERIALEN EN METHODES	22
1 ANALYSES MET BETREKKING TOT AFVALWATER.....	23
1.1 Staalbewaring.....	23
1.2 Temperatuur.....	23
1.3 Opgeloste zuurstof.....	23
1.5 Ionen	23
1.6 Totale en opgeloste Kjeldahl Stikstof.....	24
1.7 Totale en opgeloste CZV.....	24
1.8 TSS/VSS bepaling.....	24
1.9 Lichtintensiteit.....	25
1.10 Turbiditeit	25
2 ANALYSES MET BETREKKING TOT PERIFYTON	25
2.1 Staalbewaring.....	25
2.2 Droge stof/ Vluchtige droge stof/As	25
2.3 Totale P-gehalte.....	25

2.4	<i>Totale N-gehalte</i>	25
2.5	<i>Autotrofe Index</i>	26
2.6	<i>Aanhechtingsterkte</i>	26
2.7	<i>Microscopie</i>	26
2.8	<i>Flowcytometrie</i>	26
3	GROEIMEDIA.....	27
4	STATISTISCHE BEREKENINGEN.....	28
5	EXPERIMENTELE OPSTELLINGEN.....	28
DEEL III RESULTATEN		29
1	PERIFYTON-INCUBATOR.....	30
1.1	<i>Literatuur versus eigen ontwerp</i>	30
1.2	<i>werking</i>	30
1.3	<i>Karakterisatie</i>	32
2	EXPERIMENT 1 - TERTIAIRE ZUIVERING MET VERSCHILLENDE DRAGERMATERIALEN.....	34
2.1	<i>Proefopzet</i>	34
2.2	<i>Dragermaterialen</i>	34
2.3	<i>Experimentele omstandigheden</i>	35
2.4	<i>Waarnemingen</i>	36
3	EXPERIMENT 2 - VERSCHIL TUSSEN SECUNDAIRE EN TERTIAIRE ZUIVERING MET PERIFYTON.....	39
3.1	<i>Proefopzet</i>	39
3.2	<i>Verschillende Afvalwaters</i>	40
3.3	<i>Schuifspanningreactor</i>	41
3.4	<i>Experimentele omstandigheden</i>	41
3.5	<i>Waarnemingen</i>	42
4	EXPERIMENT 3 – SECUNDAIRE ZUIVERING MET VERSCHILLENDE DRAGERMATERIALEN.....	48
4.1	<i>Proefopzet</i>	48
4.2	<i>Verschillende dragermaterialen</i>	48
4.3	<i>Waarnemingen</i>	49
5	FLOWCYTOMETRISCHE KWANTIFICERING VAN DE BACTERIËLE GEMEENSCHAP IN PERIFYTON.....	57
5.1	<i>Werkwijze</i>	57
5.2	<i>Waarnemingen</i>	59
6	LICHTHERVERDELING MET DOORSCHIJNENDE PLATEN.....	60
6.1	<i>Proefopzet</i>	60
6.2	<i>Verstrooiing van licht uit doorschijnende platen</i>	61
6.3	<i>Theoretisch voordeel van doorschijnende platen</i>	62
6.4	<i>Waarnemingen</i>	63

7	ONDERSTEUNENDE TESTEN	65
7.1	<i>Verblijftijdsdistributie dragermaterialen</i>	65
7.2	<i>Poly-L-lysine en gewone objectglaasjes</i>	67
7.3	<i>Chlorofylextractie</i>	68
DEEL IV DISCUSSIE		70
1	METHODES	71
1.1	<i>Autotrofe Index</i>	71
1.2	<i>Flowcytometrie</i>	71
2	LICHTHERVERDELING	72
3	PERIFYTON-INCUBATOR	73
3.1	<i>Opbouw & werking</i>	73
3.2	<i>Keuze afvalwaters</i>	73
3.3	<i>Keuze dragermaterialen</i>	74
3.4	<i>Werkwijze</i>	74
4	EXPERIMENTELE BEVINDINGEN MBT PERIFYTON	75
4.1	<i>Secundaire versus tertiaire zuivering</i>	75
4.2	<i>Het belang van het dragermateriaal</i>	77
5	PRAKTIJK, EEN ALGAL TURF SCRUBBER.....	80
5.1	<i>Perifyton-incubator versus ATS</i>	80
5.2	<i>Werkwijze van de ATS</i>	80
5.3	<i>Economische analyse voor Zuid-Amerika & zuidoost Azië</i>	81
5.4	<i>ATS in de nieuwe waterzuivering</i>	84
DEEL V BESLUIT		85
1	BESLUIT	86
2	VERDER ONDERZOEK	87
DEEL VI REFERENTIES.....		88
DEEL VII BIJLAGES		95
1	LIJST MET FIGUREN.....	96
2	LIJST MET TABELLEN.....	97
3	FOTO'S VAN EXPERIMENTELE OPSTELLINGEN	98
4	FOTO'S MICROSCOPIE.....	103

LIJST MET AFKORTINGEN

AI	Autotrofe index
AS	Actiefslib
ATS	<i>Algal turf scrubber</i>
AV	Anaerobe vijver
BG 11	Gespecialiseerd medium voor algencultivatie
BZV	Biologische zuurstofvraag
CW	<i>Constructed wetland</i>
CZV	Chemische zuurstofvraag
DS	Drogestof
EPA	<i>Environmental Protection Agency</i> (federaal agentschap voor milieu in de
EXP	Experiment
FAO	<i>Food and Agricultural Organisation</i> (agentschap van de Verenigde Naties)
FISH	<i>Fluorescent in situ hybridisation</i>
FL	<i>Flow lane</i>
FV	Facultatieve vijver
FTU	<i>Formazine turbidity unit</i>
HDPE	<i>High density polyethylene</i> (of hogedichtheidpolyethyleen)
I	Lichtintensiteit
IE	Inwonersequivalent
Kj-N	Kjeldahl stikstof
LCA	<i>Life cycle assessment</i> (of levenscyclusanalyse)
MV	Maturatievijver
N	Stikstof
NTU	<i>Nephelometric turbidity unit</i>
OESO	Organisatie voor Economische Samenwerking en Ontwikkeling
OZ	Opgeloste zuurstof
P	Fosfor
P/P _{max}	(Maximale) Productiviteit
PAR	<i>Photosynthetic active radiation</i>
PBI/PBI _L /PBI _D	Perifyton-Bacterie-Index, subscript: Levend, Dood
PG	Biologische perifytongemeenschap
PLL	Poly-L-Lysine
PPS	<i>μmol photons per second per square meter</i>
PVC	Polyvinylchloride
RUN	Een intensieve meetperiode tijdens een experiment
TSS	<i>Total suspended solids</i>
VDS	Vluchtige drogestof
VS	Verenigde Staten van Amerika
VSS	<i>Volatile suspended solids</i>
WZI	Waterzuiveringsinstallatie
α	Maximale fotosynthetische efficiëntie
σ	Soortelijke geleidbaarheid

DEEL I
LITERATUUR-
STUDIE

1 WATERZUIVERING IN EEN GLOBALE CONTEXT

1.1 HUISHOUELIJK AFVALWATER

Huishoudelijk afvalwater is een combinatie van huishoudelijke afvalstromen zoals toiletwater, douchewater en kraanwater. Het bevat de menselijke excreties, voedselresten en organische chemicaliën afkomstig van cosmetica, wasproducten etc. Dit impliceert hoge concentraties aan nutriënten zoals stikstof (N) en fosfor (P), chemische zuurstofvraag (CZV), biologische zuurstofvraag (BZV), gesuspendeerde stoffen (*Total suspended solids* TSS), fecale bacteriën, virussen en sporen van zowel organische als anorganische micropolluenten zoals geneesmiddelen en zware metalen (Rittmann and McCarty 2001). In *Tabel 1* wordt de gemiddelde samenstelling van een huishoudelijk afvalwater weergegeven. Deze waarden zijn gebaseerd op uitgebreid onderzoek door Boeije in 1999 en is een verbetering ten opzichte van eerdere schattingen van de organisatie voor economische samenwerking en ontwikkeling (OESO) (Boeije et al. 1999).

Tabel 1 - De gemiddelde samenstelling van een huishoudelijk afvalwater (Boeije et al. 1999)

	Concentratie (mg/L)
Chemische zuurstofvraag (CZV)	439
Totale N	60
Totale P	9,4

Het direct lozen van water met een dergelijke samenstelling leidt tot eutrofiëring van het oppervlaktewater of directe intoxicatie van bepaalde organismen. OM onttrekt door afbraak rechtstreeks de zuurstof uit het water. Hoge concentraties aan N en P verhogen de kans op algenproliferatie. Deze verhogen onrechtstreeks ook de vraag naar zuurstof en leiden tot verstikking (Beeton and Edmondso.Wt 1972). Deze situatie is slecht voor mens en milieu .

Huishoudelijk afvalwater wordt daarom onderworpen aan een zuivering. De mate van zuivering hangt af van land tot land en is voornamelijk het product van politieke wil, economisch & technisch ontwikkelingsniveau en bevolkingsdichtheid (inwonersequivalenten IE). Ze stemt overeen met wat technisch en praktisch mogelijk is (technologische benadering) of wat noodzakelijk is voor het milieu (benadering van ecologische draagkracht) (Ragas et al. 2005).

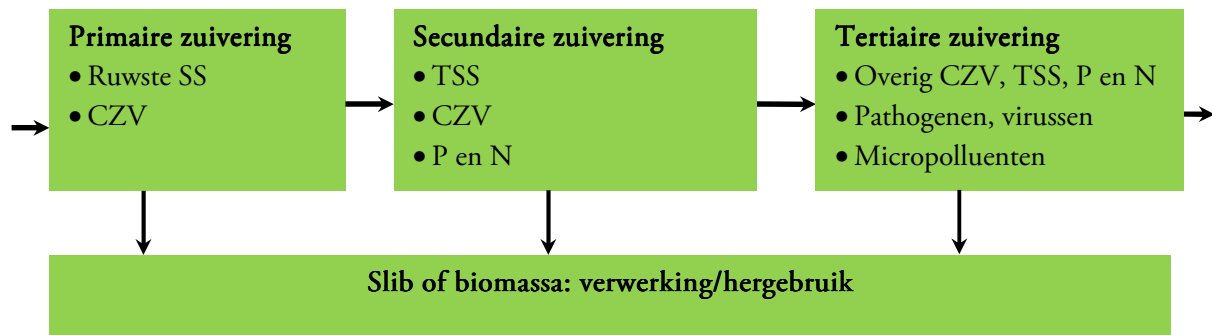
Tabel 2 geeft een overzicht van de nationale lozingsnormen in België en Frankrijk. Vergelijkbare effluentnormen worden in ontwikkelingslanden gehanteerd maar overheden falen daar vaak in de installatie en controle van waterzuiveringinstallaties (Oliveira and von Sperling 2008).

Tabel 2 – De lozingsnormen voor huishoudelijk afvalwater in België en Frankrijk. Er is een onderscheid op basis van de IE.

Land	> IE	< IE	BZV mg/L	CZV mg/L	TSS mg/L	N mg/L	P mg/L	Referentie
België	500	2000	25	125	35	/	/	(VLAREM-II 1995)
	2000	10000	25	125	35	20	2	
Frankrijk	2000	10000	25	125	35	/	/	(Légifrance 1994)
	10000	100000	25	125	35	15	2	

De zuivering van huishoudelijk afvalwater tot de effluentnorm wordt fundamenteel opgesplitst in 3 stappen (*Figuur 1*). De eerste stap, de primaire zuivering, verzorgt de verwijdering van de ruwe gesuspendeerde fractie. Daarna volgt achtereenvolgens een secundaire en tertiaire zuivering voor de verwijdering van de TSS, CZV, N en P. Als laatste stap in de tertiaire zuivering is er de verwijdering van pathogenen en persistente micropolluenten. In dit eindwerk wordt onderzoek verricht naar de zuivering van huishoudelijk afvalwater door middel van algen. Om de zuivering te situeren wordt een onderscheid gemaakt tussen intensieve systemen (*paragraaf 1.2, p4*), passieve systemen (*paragraaf 1.3, p6*) en algensystemen (*paragraaf 1.4, p7*). De klemtoon wordt gelegd op het mechanisme waarmee de TSS, CZV, N en P wordt verwijderd en de voor- en nadelen die verbonden zijn aan dergelijke systemen, zowel economisch als ecologisch.

Waterzuivering is en blijft echter in evolutie. Gedreven door stijgende kosten en milieubewustzijn worden steeds nieuwe technieken onderzocht. Er is een veelheid aan systemen beschikbaar. Naar de toekomst toe zal de nood aan milieuvriendelijke waterzuiveringsystemen nog meer stijgen. De klemtoon zal nog meer moeten liggen op efficiënt energiegebruik, efficiënt (her)gebruik van grondstoffen en integratie van de natuur, in plaats van louter op de effluentnorm (Gronlund et al. 2004). Het laatste onderdeel van dit hoofdstuk (*paragraaf 1.5, p12*) werpt een blik op de toekomst van de zuivering van huishoudelijk afvalwater.



Figuur 1 - Een algemeen schema voor de zuivering van huishoudelijk afvalwater en verwerking van het slib.

1.2 INTENSIEVE WATERZUIVERING

In de moderne samenleving wordt waterzuivering gerealiseerd door intensieve systemen. Ze worden gekenmerkt door materiaal- en energieverisende technieken. Tenzij anders vermeld, is dit deel gebaseerd op Environmental biotechnology van Rittmann en McCarty (2001).

1.2.1 ACTIEF SLIB

De meest wijdverspreide techniek voor de zuivering van huishoudelijk afvalwater is de actiefslib reactor (AS). Deze is gebaseerd op microbiële groei in vlokken. Door permanente stroom van nieuw afvalwater en recyclage van de slibvlokken door sedimentatie of membraantechnologie, kan de concentratie aan actieve micro-organismen enorm hoog worden gehouden. Vandaar de naam 'geactiveerd' slib. Er bestaan veel varianten in de manier waarop de opstelling wordt ontworpen, ter minimalisering van de grootte, optimalisering van de beluchting of selectie van bepaalde bacteriën.

De TSS en CZV worden afgebroken door of opgenomen in de slibvlokken. Onafbreekbare opgeloste verbindingen vormen een uitzondering hierop. In zijn eenvoudigste configuratie, dus zonder bijkomstige N- en P-verwijdering, is de verwijdering van N en P uit het afvalwater te wijten aan de opname in biomassa. Een hoog percentage van de N en P blijft hierbij over. Bij een complexe actiefslibreactor kan ook een bijkomende zuivering bewerkstelligd worden. N kan dan in één of meer AS-eenheden verwijderd worden door een nitrificatie- en denitrificatiecompartiment. Op die manier wordt de overtollige N verwijderd onder de vorm van N₂-gas. P kan niet worden omgezet naar een afzonderlijk te verwijderen afvalstroom. Het kan enkel worden geconcentreerd in het actiefslib. Indien dit gebeurt door chemische

precipitatie, dan moet een aanzienlijke hoeveelheid Fe- en Al-zouten worden toegevoegd. Rekening houdend met bijkomstige neerslag (hydroxiden, etc.) of ligandvorming van Fe en Al, wordt een molaire verhouding Fe:P van 1,5 tot 2,5 gebruikt. De anorganische fractie in het slib wordt hierdoor gevoelig hoger. De biologische P-opname in het slib kan ook bewerkstelligd worden door het inbouwen van complexe compartimenten die de groei van fosfaataccumulerende organismen stimuleert.

1.2.2 HETEROTROFE BIOFILM PROCESSEN

Een andere techniek voor de behandeling van primair afvalwater is het gebruik van een biofilm. De actieve biomassa wordt niet gerecycleerd om een snelle afbraak te bekomen, maar wordt gehecht aan een materiaal met heel hoge specifieke oppervlakte ($40 - 1000 \text{ m}^2/\text{m}^3$). Biofilmprocessen bestaan ook in heel wat configuraties: het oxidatiebed, de roterende biologische contactor, de biofilters, etc. De verschillen onderling hebben te maken met de toevoer van zuurstof en het dragermateriaal.

De heterotrofe CZV-verwijdering is vergelijkbaar met die van AS. Een eenvoudige aerobe biofilm zal ook slechts N en P opnemen door incorporatie in biomassa. Dit is het equivalent van een secundaire zuivering. Nitrificatie kan eveneens gebeuren in dezelfde biofilm (weliswaar dicht tegen het oppervlak van het dragermateriaal). Denitrificatie vergt echter anoxische condities waardoor een 2^{de} (anoxische) biofilm beter geschikt is. Fosforverwijdering kan chemisch door middel van FePO_4 -neerslag. De overtollige biomassa wordt meestal weggenomen door een *backwash* waarbij de biomassa wordt meegesleurd door een puls van water.

1.2.3 TOEPASSING VAN INTENSIEVE SYSTEMEN

De bovenvermelde systemen zijn voorbeelden van sterke knowhow in de waterzuiveringstechnologie. Bacteriën worden zodanig gestuurd dat ze de afbraak of opname van de juiste verbindingen kunnen verwezenlijken. Dergelijke systemen worden vaak gebouwd in dichtbevolkte ontwikkelde gebieden waar oppervlakte duur of niet beschikbaar is en effluentnormen heel streng zijn. De installaties zijn heel compact, maar hebben ook hoge investering- en werkingskosten voor onderhoud, energie en supplementaire stoffen zoals Fe.

Het slib (bij AS en biofilmen) wordt energetisch gevaloriseerd en/of gebruikt als meststof op het land (FAO 1992). Indien het gebruikt wordt als meststof, kan deze als een aanzienlijke recyclage van nutriënten dienen. Slib bevat echter ook zware metalen en organische micropolluenten (antibiotica, surfactantia, hormonen) (Jekel and Reemtsma 2006) en omwille van deze reden is het gebruik op het land in België niet toegelaten (VLAREM-II 1995).

1.3 PASSIEVE WATERZUIVERING

Een interessante optie voor de zuivering van huishoudelijk afvalwater is het gebruik van passieve systemen. Hierin zijn veel pistes onderzocht (öövel et al 2005), maar de meest bekende zijn de *wetlands* of *constructed wetlands*. Een ander type passief systeem is de stabilisatievijver.

1.3.1 CONSTRUCTED WETLANDS

Wetlands zijn een verzamelnaam van voornamelijk moerassen, vennen en veengronden. Ze bevatten zoet, brak of zoutwater, hebben vaste of wisselende waterstanden en kunnen zowel natuurlijk of kunstmatig zijn (Navid 1984). In dat laatste geval spreekt men van *constructed wetlands* (CW). Naast hun ecosysteemfunctie hebben deze systemen hun dienst bewezen in de zuivering van huishoudelijk afvalwater (Moshiri 1993). Op wereldschaal zouden al 20.000 *wetlands* voor waterzuivering operationeel zijn (Vymazal 2009), in Vlaanderen meer dan 100 (Rousseau et al. 2004). Gebaseerd op het voornaamste hydraulisch regime worden CW onderverdeeld in het vloeiveld, het vertikaal doorstroomd CW en het horizontaal doorstroomd CW. Er bestaan tal van hybride systemen ter optimalisatie van de waterbehandeling (Vymazal 2005).

De variëteit aan verwijderingsmechanismen van CZV, N en P is een weerspiegeling van de complexe structuur waaruit een CW is opgebouwd. De TSS-fractie wordt gefiltreerd door de matrix en de CZV wordt voornamelijk afgebroken (aeroob of anaeroob) door de biofilmen die aan de hogere planten (zoals riet, lisdodde, etc.) zijn gehecht (Kadlec and Reddy 2001). N wordt, afhankelijk van het systeem, meer of minder verwijderd door nitrificatie-denitrificatie, volatilisatie en opname in de planten (Kadlec and Reddy 2001). P wordt geadsorbeerd, geprecipiteerd op een natuurlijke wijze of eveneens opgenomen in de planten (Kadlec and Reddy 2001). Soms wordt enkel tertiair gezuiverd. In andere gevallen wordt getracht ook een secundaire en zelfs primaire zuivering te bekomen. Biomassa en nutriënten wordt onttrokken door periodieke oogst van de planten. Deze kunnen, afhankelijk van de kwaliteit, gebruikt worden voor papierproductie, vezelproductie, bodemverbeteraar, veevoeder en energieproductie (Masi 2009).

1.3.2 STABILISATIEVIJVERS

Stabilisatievijvers zijn een verzamelnaam van een reeks vijvers die elk hun eigen functie hebben in de waterzuivering en als geheel een zuivering van huishoudelijk afvalwater kunnen bewerkstelligen. De opeenvolgende vijvers zijn meestal de anaerobe vijver (AV), de facultatieve vijver (FV) en de maturatievijver (MV) (Helmer et al. 1997). De AV is volledig anaeroob omdat de hele lading TSS en CZV in deze vijver terechtkomt en veel meer O₂ vereist dan vanuit fotosynthese of diffusie kan

aangeleverd worden. In de FV dient de bovenste (fototroof beluchte) laag voor de opbouw van TSS (algen en bacteriën) uit zonlicht en afbraak van opgeloste CZV door bacteriën. In deze stap wordt een deel van de opgeloste N en P opgenomen (Lai and Lam 1997). Door sedimentatie in beide vijvers zakt de TSS naar de onderste laag, dat daar onder anaerobe omstandigheden kan worden omgezet naar CO₂ en CH₄. De MV is aeroob en laat de groei van algen toe die verder de N en P uit het water halen door opname in biomassa of precipitatie van PO₄-zouten als gevolg van pH-stijging. Echter, deze algen worden meegesleurd naar het effluent. Andere mogelijke mechanismen voor N-verwijdering in stabilisatievijvers zijn onder andere volatilatie en nitrificatie-denitrificatie (Lai and Lam 1997).

De bezinkte biomassa kan worden geoogst door het periodiek verwijderen van het slib in de vijvers (vooral de AV en FV). Het slib kan, afhankelijk van de kwaliteit, geherwaardeerd worden als meststof (Zain et al. 2002) en/of energetisch gevaloriseerd worden.

1.3.3 TOEPASSING VAN PASSIEVE SYSTEMEN

Passieve systemen voor rioolwaterzuivering tonen aan dat het mogelijk is om water te zuiveren met heel weinig extra middelen. Deze systemen worden gebouwd op plaatsen waar oppervlakte goedkoop of beschikbaar is want een grote oppervlakte laat toe de intensiteit van het systeem te verminderen waardoor de investering- en werkingskosten sterk worden gedrukt. Uit een economische analyse bleek dat rioolwaterzuivering met behulp van stabilisatievijvers het meest kosteneffectief is indien de oppervlaktekost minder dan US\$ 7.8/m² bedraagt (Arthur 1983). Dit zijn meestal dunbevolkte gebieden, zowel in ontwikkelingslanden als in ontwikkelde landen, van tropische tot subarctische klimaten. In ontwikkelingslanden zijn CW slechts in de beginfase. Veel gebieden hebben er wel de ideale omstandigheden voor CW's (Kivaisi 2001) maar het waterontwikkelingsbeleid had in het verleden een voorkeur voor intensieve systemen (Denny 1997). Een belangrijk nadeel van de besproken passieve systemen is hun gemiddeld lagere verwijdering van CZV, N en P ten opzichte van intensieve systemen. Dit is echter van minder belang in dunbevolkte gebieden.

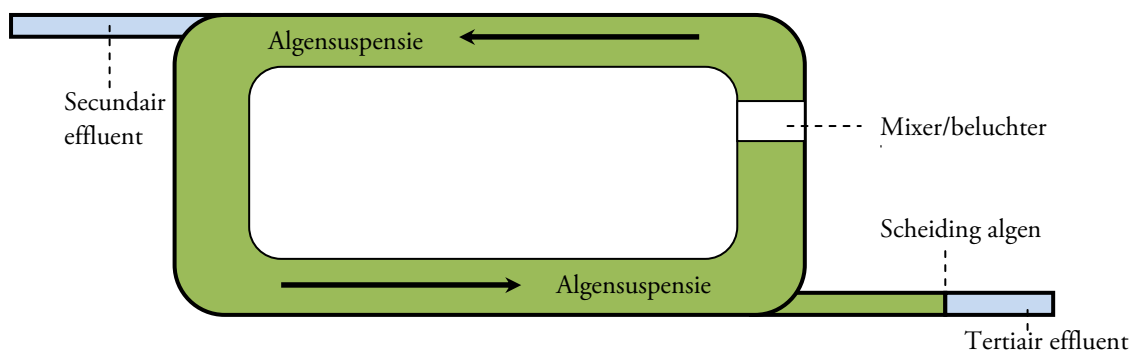
1.4 GESPECIALISEERDE ALGENSYSTEMEN

Algen kunnen ingezet worden voor tertiaire waterbehandeling. Hier is het, in tegenstelling tot bij oxidatievijvers, vooral de bedoeling alle nutriënten uit het water te halen. De verwijdering van N is enkel gebaseerd op incorporatie in de biomassa. P kan naast incorporatie ook worden geprecipiteerd als PO₄-zout door algengeïnduceerde pH-stijging. De technieken zijn niet bij definitie intensief of passief, want dat hangt af van de manier waarop de algen geproduceerd worden. Ze worden in het kader van dit

proefwerk apart toegelicht. Er bestaan 3 voorname types: microalgen in suspensie, geïmmobiliseerde algen en perifyton.

1.4.1 MICROALGEN IN SUSPENSIE

Microalgen en afgeleide producten hebben in de biotechnologie verschillende toepassingen gevonden, waaronder rechtstreekse voedselconsumptie van bijvoorbeeld het geslacht *Spirulina* (Pulz and Gross 2004), de productie van bepaalde additieven zoals bèta caroteen en omega-3 vetzuren (Barrow and Shahidi 2008) en recentelijk de massacultivatie voor biobrandstoffen (Mata et al. 2010). Hiervoor werden tal van reactortypes ontworpen zoals buisreactoren, plaatreactoren, zakreactoren en verticale cilinderreactoren (Richmond 2004). De tertiaire zuivering van huishoudelijk afvalwater door gesuspendeerde algen wordt ook reeds geruime tijd onderzocht (Chevalier and Delanoue 1985). Dit wordt gedaan in *High-Rate Algal Ponds* (HRAP) in eenvoudige kanalen (*Figuur 2*) of goed gemixte tanks. Het betreft een expliciet tertiaire zuivering waardoor een hoge verwijdering van N, P, CZV en TSS noodzakelijk is. Dit kan enkel indien de algen na zuivering intensief gescheiden worden van het water. Verwijdering van de algen uit het tertiaire effluent werd getest door middel van lucht- of zuurstofflotatie (Viviers and Briers 1982), microfiltratie, centrifugering of gestimuleerde sedimentatie door flocculatie (La liberté 1994). Toepassing van dergelijke systemen bestaan op pilotschaal (Picot et al. 1992).



Figuur 2 – Het principe van een High Rate Algal Pond voor tertiaire zuivering van huishoudelijk afvalwater (HRAP).

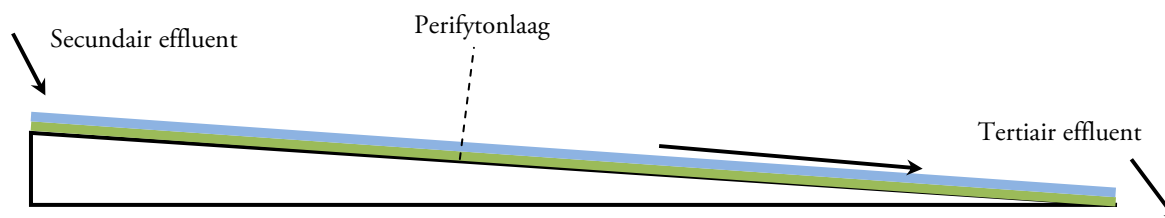
1.4.2 GEÏMMOBILISEERDE ALGEN

In 1985 werd voor het eerst geprobeerd algen te immobiliseren in parels van een bepaalde gelmatrix (Chevalier and Delanoue 1985). Op die manier kan de algenbiomassa door middel van sedimentatie gemakkelijk gescheiden worden van het effluent en kan een heel geconcentreerde algenmassa behouden blijven ondanks de continuïteit van het proces. Deze methode van biomassabehoud is vergelijkbaar met

dat van actief slib (AS). Er werd reeds geëxperimenteerd met verschillende gelmatrices zoals alginaat (Ruiz-Marin and Mendoza-Espinosa 2008), carrageenan (Lau et al. 1997) en chitosan (Aguilar-May and Sanchez-Saavedra 2009). De geproduceerde parels hebben de bijzondere eigenschap dat de productiviteit en de nutriëntopname van de algen gelijkaardig tot beter is dan die van gesuspendeerde algen (Hoffmann 1998). Dit betekent dat gas en nutriëntenuitwisseling geen limiterende factor is. Wel zou er een verandering zijn van het metabolisme (Mallick 2002). Er werd ook reeds onderzoek verricht naar alginaat-geïmmobiliseerde algen in uitgestreken lagen (Kaya et al. 1995). Toepassing op pilotschaal werd in beide configuraties nog niet uitgevoerd.

1.4.3 PERIFYTON

Perifyton kan gedefinieerd worden als een complexe aquatische gemeenschap van organismen die in sterk onderlinge interactie groeien tegen een bepaald substraat. Het omvat zowel de vastgehechte als de geassocieerde losse organismen en zowel algen, bacteriën, schimmels, protozoa, invertebraten en hun larven komen er in voor (zie *hoofdstuk 0, p15*). Het woord 'biofilm' wordt meer gebruikt voor bacteriële gemeenschappen (Azim 2005). Het nut van perifyton in de biotechnologie is hoofdzakelijk te situeren in de aquacultuur. Daar groeit perifyton in vijvers en wordt het beschouwd als een natuurlijke supplementaire voedingsbron om de productie te verhogen (Azim 2005). Eén van de eerste rapporten over het nut van perifyton in de waterzuivering verscheen in 1961 (Bush et al. 1961). Dit werd gedaan in ondiepe kanalen met algen vastgehecht aan een substraat. De *algal turf scrubber* (ATS) van Craggs en medewerkers is een succesvolle vernieuwde versie hiervan (1996a) (*Figuur 3*). Het bedrijf Hydromentia inc. installeerde deze systemen reeds op grote schaal, onder andere in Patterson, California (Craggs et al. 1996b). Gonzalez et al. (2008) onderzocht waterzuivering met perifyton in buisvormige reactoren.



Figuur 3 – Het principe van een ATS. Water stroomt in pulsen over een beperkt geheld (0,5-2°) langwerpige oppervlak waar perifyton zich aan vasthecht. Er wordt geprobeerd een complexe gemeenschap te bekomen door de proliferatie van filamenteuze algen. De oogst gebeurt door een vacuümzuiger of een schraapsysteem.

1.4.4 KEUZE TUSSEN GESPECIALISEERDE ALGENSYSTEMEN

De tertiaire zuivering van algen is een heel oppervlakte-intensief proces en bovendien kunnen de investering- en werkingskosten hoog zijn. Het is niet vanzelfsprekend om een dergelijk systeem competitief te maken met gangbare methodes voor tertiaire waterzuivering. In deze paragraaf wordt een economische vergelijking gemaakt tussen een HRAP (gesuspendeerde algen), geïmmobiliseerde algen en een ATS (perifyton). Hiervoor wordt een relatieve, semikwantitatieve kostenbenadering gebruikt (*Tabel 3*).

Tabel 3 – Een relatieve kostenraming van de verschillende systemen voor tertiaire waterzuivering met algen. De referenties of redeneringen hiervoor worden hieronder besproken.

	HRAP	Immobilisatie	ATS
Investeringskosten			
Oppervlaktekost	3	3	3
Installatiekost	3	3	2
Werkingskosten			
Personeel	1	3	2
Onderhoud	3	2	1
Supplementaire stoffen	0	3	0
Energie			
Mengen	3	3	2
Pompen	1	1	1
Beluchting	2	2	0
Oogsten	3	1	1
Opbrengst van biomassa	-3	?	-3

0: geen kosten. 3: hoge kosten. -3: opbrengst.

- **INVESTERINGSKOSTEN**

De **oppervlaktekost** is groot in alle gevallen, want het is een proces met primaire productie. In de drie gevallen is de maximale productiviteit en nutriëntenverwijdering ongeveer gelijk: 10 – 35g DS/m²·d en > 90% N- en P-verwijdering (Hoffmann 1998; Mallick 2002; Moreno-Garrido 2008).

De **installatiekost** wordt het laagst verondersteld voor waterzuivering met een ATS want in tegenstelling tot waterzuivering met een HRAP en geïmmobiliseerde algen betreft het een eenvoudige horizontale structuur.

- WERKINGSKOSTEN

Wijdverspreid onderzoek naar algen in suspensie gedurende meer dan een halve eeuw heeft voor een enorme kennissprong gezorgd. De groeiomstandigheden en -optima zijn goed gekend voor een enorme variëteit aan algen. Dit leidt tot sterk gecontroleerde omstandigheden, waardoor een HRAP minder **personeel** (zowel arbeiders als ingenieurs) vereist. Perifyton is minder uitgebreid onderzocht en gekend, het eerste echte handboek van perifyton dateert slechts van 2005 (Azim). Bovendien heeft de gecommercialiseerde ATS moeilijkheden om perfecte controle te krijgen op de algengemeenschap en invertebraten waardoor veel personeel vereist is (Craggs 2001). Geïmmobiliseerde algen zijn nog in experimentele fase en vereisen wellicht veel personeel voor controle (Aguilar-May and Sanchez-Saavedra 2009).

De **onderhoudskosten** van de installaties bestaan uit kuis- en reparatiekosten. Hoe complexer een installatie, hoe intensiever het onderhoud meestal is. Een ATS wordt hier het goedkoopst beoordeeld door de relatief eenvoudige installaties, een HRAP het duurst door de ingewikkelde installaties voor de afscheiding van algen.

Voor de productie van gesuspendeerde algen en perifyton zijn geen **supplementaire stoffen** nodig. De productie en instandhouding van geïmmobiliseerde algen vereist wel extra stoffen (de gel als matrixstof, CaCl_2 voor de stabiliteit, etc.) (Chevalier and Delanoue 1985).

Het energiegebruik is een heel belangrijke beoordelingsparameter want ze heeft een grote invloed op de totale operationele kost. Ze is onder te verdelen in 3 belangrijke bijdragen: de **beluchting** voor CO_2 -toevoer, het **mengen, pompen** en het **oogsten**. Bij een HRAP en geïmmobiliseerde algen bevinden de algen zich in een diepe tank waardoor beluchting en menging noodzakelijk zijn om goede interactie van CO_2 , nutriënten en het zonlicht te garanderen. Bij een ATS stroomt het water in een dunne laag over een lang oppervlak waardoor beluchting en menging niet noodzakelijk zijn. De afscheiding van de algen kost het meest energie bij een HRAP. Het perifyton van een ATS en de geïmmobiliseerde algen zijn reeds geconcentreerd waardoor de oogst en verwerking energievriendelijker is.

- OPBRENGST

Tot slot beoordelen we nog de economische waarde die de biomassa heeft. Uit één kilogram DS kan een totaal aan energie van ca. 4kWh gemaakt worden door middel van anaerobe vergisting tot biogas (Verstraete et al. 2010). Bovendien heeft ze potentieel om gebruikt te worden voor veevoeder en meststof (Viviers and Briers 1982). Dit hangt af van de concentratie aan organische en anorganische micropolluenten. Uit de literatuur is niet duidelijk of geïmmobiliseerde algen kunnen geherwaardeerd worden.

1.4.5 BESTE TECHNIEK

Vanuit deze kostenbenadering komt perifyton duidelijk als beste naar voor. Dit werd ook bevestigd door Hoffmann (1998). Het is wel mogelijk dat de andere technieken (gesuspendeerde en geïmmobiliseerde algen) een hoger potentieel krijgen in de toekomst. Verder onderzoek rond gesuspendeerde algen wordt bijvoorbeeld gericht naar het vinden van bepaalde soorten algen of bepaalde technieken die een vermindering van de energievereisten teweegbrengen (Talbot and Delanoue 1993). Geïmmobiliseerde algen kunnen een hoger potentieel krijgen, mits het vinden van een goedkoop alternatief voor de immobilisatiegel en verhoging van de stabiliteit van het proces.

1.5 DE WATERZUIVERING VAN DE TOEKOMST

1.5.1 DUURZAAMHEIDSBENADERING

De voorgaande paragrafen hebben aangetoond dat er een grote variatie bestaat in de manier waarop huishoudelijk afvalwater wordt behandeld. De keuze hangt voornamelijk af van het politiek kader (effluentnormen), de omgevingcondities (klimaat, oppervlaktebeschikbaarheid) en economische ontwikkeling. De effluentnormen zijn het milieukader, de rest is voornamelijk kostgedreven!

Waterzuivering moet op termijn echter ook duurzaam worden. Volgens het Brundlandt rapport betekent dit dat ze moet voldoen aan de menselijke noden van vandaag, zonder de toekomstige generaties te schaden in het voldoen aan hun noden (Burton 1987). De Brundlandt-definitie wordt echter vaak te eenvoudig en antropocentrisch geacht (Carter 2007). Duurzaamheid is een heel complex begrip waarmee omzichtig moet omgesprongen worden. Verschillende methodes werden reeds ontworpen om een beoordeling rond duurzaamheid mogelijk te maken. Eén van deze methodes is de energianalyse (*embodied energy*). Deze gaat uit van de totale energie die nodig is om bepaalde processen of productiemethodes uit te voeren (Odum 2000). Een energianalyse van waterzuivering werd reeds uitgebreid uitgevoerd door Bjorklund et al. (2001).

Holmberg (1998) bedacht een benadering op basis van vier socio-economische principes.

Principe 1 – De hoeveelheid materiaal onttrokken uit de aardkorst mag niet systematisch opstapelen in de biosfeer (bijvoorbeeld CO₂, zwavel, fosfor, metalen, etc.).

Principe 2 – De hoeveelheid materiaal geproduceerd door de maatschappij mag niet systematisch opstapelen in de biosfeer (bijvoorbeeld plastics, DDT, radioactieve gassen, etc.)

Principe 3 – De omstandigheden voor productie en diversiteit van ecosystemen mogen niet systematisch verslechterd worden (bijvoorbeeld door ontbossing, bodemerosie, asfaltering, etc.).

Principe 4 – Het gebruik van grondstoffen moet efficiënt en rechtvaardig zijn, zowel in het heden als in de toekomst. Het is bijvoorbeeld niet duurzaam om fossiel grondwater op te pompen dat slechts tien jaar aan de watervraag van de mens kan voldoen.

Vanuit deze benadering kan verwacht worden dat intensieve systemen voor de zuivering van huishoudelijk afvalwater minder duurzaam zijn dan passieve systemen. In de VS, waar intensieve systemen de regel uitmaken, is de energieconsumptie 2 tot 10 kWh/m³ waterbehandeling (Joh Kang et al. 2009). Voor een huishoudelijk verbruik van 350L/IE-d (EPA 1999) is dat 0,7 tot 3,5 kWh/IE.d. Een hoog energieverbruik betekent veelal een consumptie van veel olie (principe 4 geschaad) en de productie van CO₂ (principe 1 geschaad). Intensieve systemen maken gemiddeld ook meer gebruik van Fe voor PO₄-precipitatie, ethanol voor denitrificatie en tal van bouwmaterialen voor de constructies (Rittmann and McCarty 2001)(principe 1 en 4 geschaad). Het hergebruik van de geoogste biomassa en zijn nutriënten is lager bij processen waar denitrificatie of volatilisatie plaatsvindt want hierbij gaat een deel van het N verloren. Dit komt omdat een laag hergebruik van nutriënten een hogere productie van synthetische meststoffen noodzakelijk maakt en dit vergt veel energie en mineralen (principe 1 en 4 geschaad). Passieve systemen hebben gemiddeld wel een slechtere effluentkwaliteit (principe 3 geschaad want het ontvangend ecosysteem heeft potentieel een lagere biodiversiteit en principe 1 & 2 geschaad want er kunnen meer stoffen opstapelen in de biosfeer). In stabilisatievijvers wordt er ook CH₄ geproduceerd (principe 1 geschaad).

Gronlund et al. (2004) kwamen bij een vergelijking tussen een conventionele AS, een chemische waterzuivering met een CW als nazuivering en stabilisatievijvers tot de conclusie dat de stabilisatievijvers het beste scoren, zowel vanuit de socio-economische benadering als vanuit de emergieanalyse.

1.5.2 LIMITERINGEN

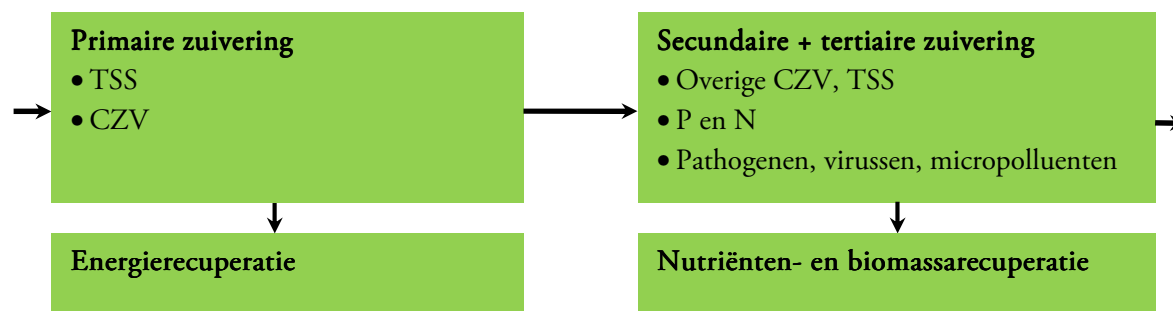
Een knelpunt in de evolutie naar een duurzame waterzuivering is de aanwezigheid van organische en anorganische micropolluenten in de geoogste biomassa. Hierdoor kunnen de nutriënten vaak niet hergebruikt worden op het land of als hoogwaardig product zoals veevoeder (Hosetti and Frost 1995) (principe 1 en 4 geschaad).

Duurzame waterzuivering is heel oppervlakte-intensief en daardoor niet makkelijk in de praktijk te brengen in dichtbevolkte gebieden. Onafhankelijk van het feit dat het moeilijk is om een dergelijk proces economisch haalbaar te maken, is er vaak ook geen oppervlakte beschikbaar voor een dergelijke

waterzuivering. Bovendien heeft, zoals reeds vermeld, het effluent van passieve systemen vaak een te slecht van kwaliteit en dat is net een heel belangrijke maatstaf in dichtbevolkte gebieden.

1.5.3 EEN NIEUW CONCEPT VOOR DUURZAME WATERZUIVERING.

Bij een duurzame waterzuivering rijst de vraag of deze beter gecentraliseerd of gedecentraliseerd wordt. Centralisatie (bijvoorbeeld per stad) is meer arbeid- zuiveringsefficiënt. De nadelen zijn de nood aan installaties voor transport (riolen) wat uiteraard materiaal- en energie-intensief is. Bij een heel gedecentraliseerde waterzuivering (tot op huishoudenniveau) zijn veel aparte installaties nodig (ook materiaalintensief), schommelt het effluent sterk in kwaliteit, is de arbeidsefficiëntie laag en is controle onmogelijk. In dit proefwerk wordt geopteerd voor een gulden middenweg, een waterzuivering op maat van de gemeenschap. Een mogelijke strategie hierbinnen is de combinatie van een sterke primaire zuivering met een secundaire (+tertiaire) nazuivering. De primaire zuivering recupereert het grootste deel van de TSS en CZV onder de vorm van energie. De nazuivering neemt voornamelijk de P en N op die duurzaam kan hergebruikt worden in de landbouw.



***Figuur 4* - Een nieuw scenario voor een duurzame zuivering van huishoudelijk afvalwater.**

In *paragraaf 1.4, p7* werd duidelijk dat de ATS een laag energiegebruik (principe 1 en 4) heeft en een laag materiaalengebruik heeft voor constructie en werking (principe 1 en 4) in vergelijking met andere algensystemen. Bovendien laten algensystemen toe om alle nutriënten te hergebruiken in de geogoste biomassa. De ATS werd ontworpen voor tertiaire zuivering waardoor slechts een klein deel van de nutriënten wordt hergebruikt in het perifyton. Indien de ATS zou gebruikt worden voor een meer secundaire zuivering (+ tertiaire zuivering) zou meer N en P kunnen worden hergebruikt uit het water. Indien de energievereisten voor het pompen en de verwerking (Pizarro et al. 2006) van het perifyton kunnen worden verminderd dan kan dit systeem passen binnen de nieuwe strategie voor nieuwe waterzuivering (*Figuur 4*). In *hoofdstuk 2* worden de eigenschappen van perifyton als dusdanig verder uitgewerkt.

2 PERIFYTON

2.1 DIVERSITEIT

2.1.1 TAXONOMISCH

In *paragraaf 1.4.3, p9* (Perifyton voor tertiaire waterzuivering) werd duidelijk dat perifyton het geheel voorstelt van al de algen, bacteriën, protozoa, invertebraten en schimmels levend in een gemeenschap aan een bepaald dragermateriaal (Azim 2005).

Algen vormen een belangrijke schakel in perifyton. Ze zijn heel divers en kunnen onderverdeeld worden in prokaryoten en eukaryoten. Bij de prokaryoten heb je de cyanobacteriën (Cyanophyta) en een verdere indeling van de eukaryoten gebeurt op basis van de pigmenten (Richmond 2004). Tot deze groep behoren de groenalgen (Chlorophyta), de roodalgen (Rhodophyta), de diatomeeën (Bacillariophyta), de gouden algen (Chrysophyta), de bruinalgen, etc. (Richmond 2004). In zoetwaterperifyton zijn de belangrijkste taxonomische groepen de cyanobacteriën, de groenalgen en de diatomeeën (Azim 2005). De exacte samenstelling van het perifyton (tot op soortenniveau) wordt bepaald door het klimaat (temperatuur, lichtinval en variatie hierin) en de omgevingcondities (turbulentie van het water, substraat, externe begrazing en samenstelling van het water). Met het laatste wordt vooral bedoeld op de pH, het zoutgehalte, de molaire N:P ratio en de concentratie aan Si, N, P, CZV en micropolluenten (Azim 2005).

Bacteriën spelen ook een belangrijke rol in perifyton. Nochtans is er weinig literatuur gekend over de karakterisatie van bacteriën uit perifyton. Enkele determinaties met *fluorescent in situ hybridization* (FISH) werden wel gedaan (Araya et al. 2003) maar in andere studies werden bacteriën in het beste geval kwantitatief beoordeeld door de autotrofe index (AI)(APHA 1985). Deze wordt gegeven door

$$AI = \frac{VDS (mg)}{chl a (mg)} \quad (1)$$

met VDS de vluchtige drogestof en chl a de concentratie aan chlorofyl a. De AI varieert meestal tussen 50 en 200. Hogere waarden wijzen op een heterotrofe dominantie en lagere waarden op een autotrofe dominantie (Azim 2005).

2.1.2 MORFOLOGISCH

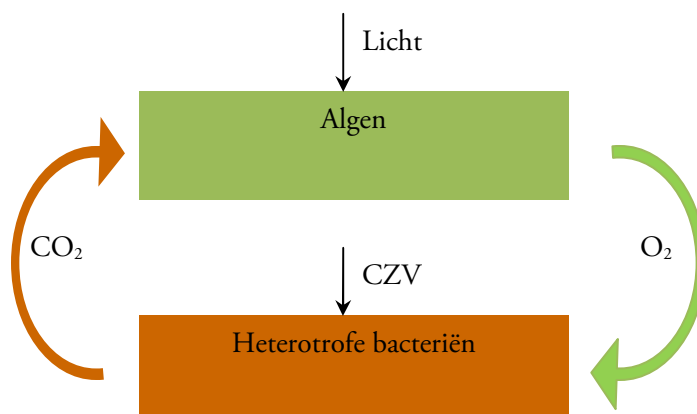
Veel filamenteuze algen gaan in perifyton morfologische veranderingen aan ten opzichte van hun gesuspendeerde soortgenoten. Er ontstaan bijvoorbeeld basale cellen die de aanhechting aan het oppervlak mogelijk maken. Unicellulaire cellen kunnen helemaal transformeren, met plakkerige capsules, filamenten, zuignappen en kussens aan de buitenkant van hun cellen (Azim 2005). Sommige unicellulaire

en filamenteuze algen zijn in staat tot passieve of actieve beweging, andere niet. Beweging kan gebeuren door glijden met slijm, flagella of pseudopoden. De manier waarop is heel sterk verbonden met de taxonomische groep waartoe de algen behoren en heeft ook een grote invloed op de dominantie van algen in perifyton (Stevenson et al. 1996).

2.2 BIOCHEMISCHE EIGENSCHAPPEN

2.2.1 INTERACTIE ALGEN/BACTERIËN

Een belangrijke eigenschap van perifyton is de synergetische gasuitwisseling tussen bacteriën en algen. Dit wordt eenvoudig weergegeven in *Figuur 5*. Hierdoor worden te hoge concentraties aan O_2 (toxisch voor algen) en te lage concentraties aan CO_2 (toxisch voor bacteriën door pH stijging) vermeden.



***Figuur 5* – De biochemische gasinteractie van CO_2 en O_2 tussen algen en heterotrofe bacteriën**

Algen en bacteriën kunnen elkaar echter ook tegenwerken. Bacteriën produceren soms algiciden (Fukami et al. 1997), algen produceren soms bactericiden (Schumacher et al. 2003). Bovendien kan gasuitwisseling uit balans geraken door sterke algengroei. De pH wordt dan volledige gecontroleerd door de CO_2 -concentratie (volgens de reacties $CO_2 + H_2O \leftrightarrow H_2CO_3$ en $H_2CO_3 \leftrightarrow HCO_3^- + H^+$) en stijgt dan tot >10 waardoor bacteriën geïnhibeerd worden.

2.2.2 BIOCHEMISCHE SAMENSTELLING PERIFYTON

Perifyton bestaat uit twee voornamelijk bestanddelen: de celbiomassa en extracellulaire polymerische substanties (EPS). De verhouding tussen die twee kan variëren tussen 10:1 en 1:10 (Applegate and Bryers 1991). EPS kan bestaan uit eiwitten, polysachariden, koolhydraten, uronisch zuur, humeïne zuren (Nielsen et al. 1997). De as-concentratie van perifyton varieert tussen 17 en 96% (Bruggemann 1995; Mridula et al. 2003). De energiewaarde van perifyton varieert ook heel sterk. Waarden tussen 1 en 20 kJ/g

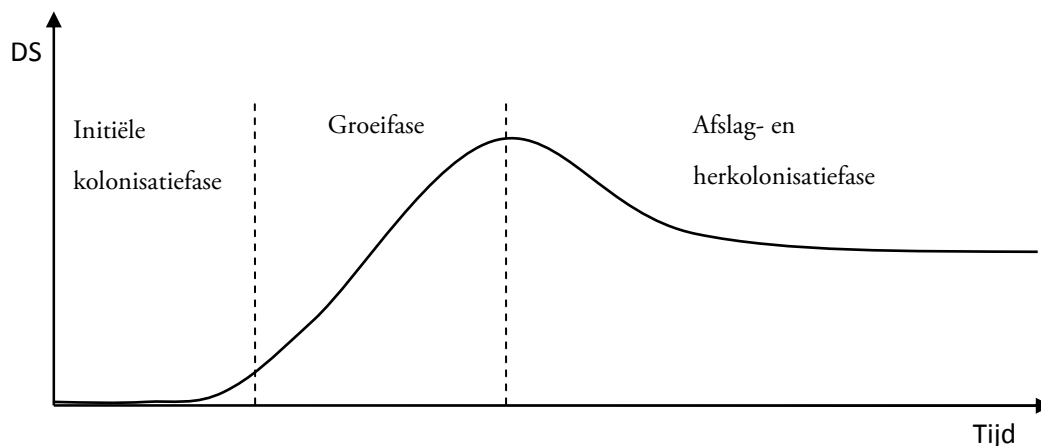
DS werden beschreven (Bruggemann 1995; Azim et al. 2002b). As- en energieinhoud zijn uiteraard heel sterk omgekeerd gecorreleerd.

Hoewel alle omgevingsomstandigheden meespelen in de uiteindelijke samenstelling van het perifyton, bleek dat de waterbeweging een grote rol speelt. Bij lage turbulentie (bijvoorbeeld in een vijver), is de asconcentratie lager en energie inhoud hoger dan voor stromende waterprofielen (Azim et al. 2002a).

Een belangrijke biochemische eigenschap van het perifyton is het N- en P-gehalte. Deze kan grote verschillen vertonen afhankelijk van het dragermateriaal (stenen, planten, sedimenten), de concentratie aan nutriënten in het omringend water en de stroomsnelheid (Kahlert and Pettersson 2002). Stelzer en Lamberti vonden dat het N-gehalte bij stilstaand en stromend water respectievelijk 8,4 – 14 g N/kg DS en 12 – 21g N/kg DS was. Voor het P-gehalte vonden ze respectievelijk 0,029 – 0,112 g P/kg DS en 0,6-4,7 g P/kg DS (Stelzer and Lamberti 2001). In een ATS systeem voor tertiaire zuivering werd 33 g N/kg DS en 20 g P/kg DS gerapporteerd (Craggs et al. 1996b). Dit zijn niet-natuurlijke systemen met een hoge concentratie aan N en P in het omringend afvalwater. Het P-gehalte is heel hoog door chemische neerslag van PO₄-zouten in het perifyton.

2.3 ONTWIKKELING PERIFYTON

De ontwikkeling- en groeifase waarbinnen het perifyton zich bevindt heeft, net zoals de omgevingscondities, een grote invloed op de AI, de morfologie, de totale biomassa, de diversiteit van de algen en bacteriën, etc. In de ontwikkeling volgen achtereenvolgens de initiële kolonisatiefase, de groeifase en de afslag- en herkolonisatiefase (*Figuur 6*).



Figuur 6 - De groeicurve van een perifytongemeenschap. In de afslag- en herkolonisatiefase moet de DS beschouwd worden als het gemiddelde over een groter oppervlak, zie *paragraaf 2.3.2, p18* (Stevenson et al. 1996).

2.3.1 INITIËLE KOLONISATIEFASE & EXPONENTIËLE GROEIFASE

Eén van de meest complexe zaken in de studie naar perifyton is de initiële kolonisatiefase. Waarschijnlijk bestaan er verschillende mechanismen. Het algemeen aanvaard mechanisme van Hoagland et al. (1982) omschrijft de volgende stappen:

- 1 Depositie van organische substanties (aminozuren en mucopolysacchariden) door elektrostatische krachten.
- 2 Vasthechting van bacteriën met slijmerige draden aan de gevormde organische laag. De coating dient ook als voedsel voor de bacteriën.
- 3 Vasthechting van kleine platte diatomeeën aan de matrix van de bacteriën.
- 4 Aanhechting van kleine verticale en later langere verticale diatomeeën aan het geheel.
- 5 Uitgroei van de filamenteuze algen.

Deze theorie werd gestaafd met metingen van de AI, deze bleek hoog te zijn in het begin (stap 1-2), daarna te dalen (stap 3-4-5) en na verloop van tijd terug te stijgen door afbraak van algen in matuur stadium (stap 5). Bovendien kan de trage kolonisatiefase verklaard worden door de trage stappen die gepaard gaan met stap 1 en 2 (*Figuur 6*) (Azim 2005).

2.3.2 AFSLAG & HERKOLONISATIE

Afslag is het proces waarbij perifyton zich geheel of gedeeltelijk verwijderd van het dragermateriaal. Het kan optreden als algen dicht bij het dragermateriaal dood gaan door tekort aan licht of nutriënten. Als gevolg hiervan wordt de aanhechting heel zwak en is er een totale afslag over de hele dikte van het perifyton. In dit geval gebeurt de herkolonisatie heel traag (Stevenson et al. 1996). Indien het verlies van perifyton het gevolg is van begrazing of fysische verstoring dan treedt snelle herkolonisatie op want de onderste laag is nog geheel intact. De onderste laag wordt door deze verstoring regelmatig aan voldoende licht en nutriënten blootgesteld waardoor ze niet dood gaat en afslaat (Azim 2005).

Herkolonisatie kan gebeuren op 2 manieren. De eerste mogelijkheid is zijwaartse herkolonisatie met behulp van onder andere mobiele filamenteuze cyanobacteriën (Donkor et al. 1993). Een tweede mogelijkheid is verticale herkolonisatie. Hoe hoger de concentratie aan gesuspendeerde algen, hoe sneller de immigratie naar het perifyton gebeurt.

Natuurlijk gebeurt afslag en herkolonisatie van biomassa niet op één bepaald moment over de hele oppervlakte van de perifytongemeenschap. Dit verklaart waarom de totale biomassa op termijn een evenwichtssituatie zal vinden (verliesfase in *Figuur 6*).

2.4 DE INVLOED VAN LICHT EN TEMPERATUUR

Een perifytongemeenschap (PG) wordt, zoals vermeld, bepaald door het geheel van het klimaat en nauwe omgevingsfactoren. De invloed van de lichtintensiteit en de temperatuur worden hieronder verder besproken.

2.4.1 LICHTINTENSITEIT

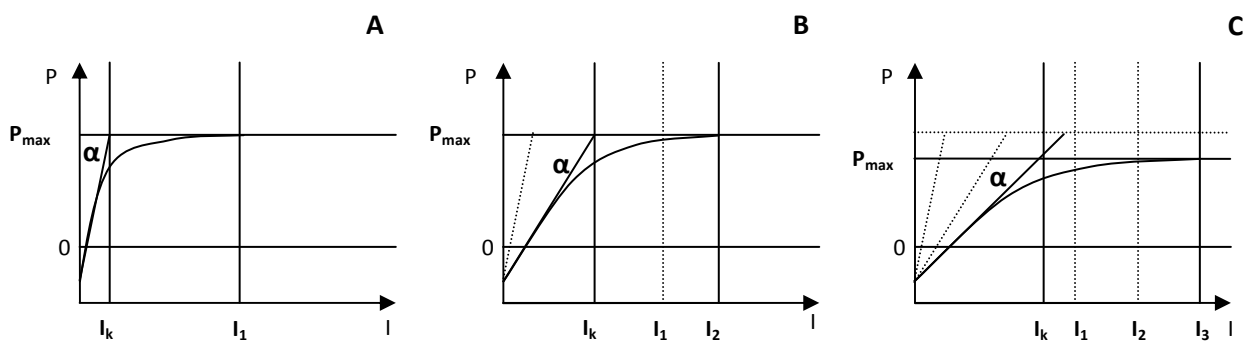
De lichtintensiteit (I) is één van de belangrijkste abiotische factoren met betrekking tot de productiviteit (P) van algen. Voor onderzoek naar algen en planten wordt ze meestal uitgedrukt in μmol fotonen fotosynthetisch actieve straling (PAR)/ $\text{m}^2\cdot\text{s}$ (PPS), in lux of in W/m^2 . Voor de spectrale verdeling van rechtstreeks zonlicht geldt de volgende verhouding: $1\text{W}/\text{m}^2 = 2,12\text{ PPS} = 110\text{ lux}$ (Thimijan and Heins 1983). In het vervolg van dit onderzoek wordt gebruik gemaakt van de PPS.

De P ($\text{g}/\text{m}^2\cdot\text{s}$) in functie van I volgt eerst de monod-kinetiek (*Figuur 7-A*). Alfa (α) is hierbij de maximale fotosynthetische efficiëntie of kwantumopbrengst. Ze wordt gegeven door

$$\alpha = \frac{P_{\max}}{I_k} \quad (2)$$

met I_k de halfsaturatieconstante en P_{\max} de maximaal haalbare productiviteit.

Er geldt: hoe hoger de lichtintensiteit, hoe hoger de productiviteit maar hoe lager de fotosynthetische efficiëntie.



Figuur 7 – De productiviteit – lichtintensiteitscurve (PI) bij algen.

A: normale omstandigheden, B: lichte foto-inhibitie en C: zware foto-inhibitie.

Indien de lichtintensiteit te hoog wordt, treedt beschadiging op van het fotosysteem. Dit proces heet foto-inhibitie. Zonder in te gaan op de biochemische oorzaak (Richmond 2004) van deze beschadiging, zijn twee gradaties duidelijk te onderscheiden. Indien de beschadiging middelmatig is (duur en intensiteit I

matig) dan daalt de α , en stijgt dus de halfsaturatieconstante (*Figuur 7-B*). Bij lange blootstelling en sterke I daalt ook de P_{\max} (*Figuur 7-C*). De mate en de duur waarmee een alg gefotoinhibeerd wordt, verschilt ook naargelang de soort en de aanwezigheid van andere stressfactoren (Richmond 2004).

Bij perifyton ligt de halfsaturatiewaarde (I_k) tussen 30 en 300 PPS (Boston and Hill 1991). Hill beschreef het algemeen optreden van foto-inhibitie bij 500 PPS. Dit betekent dat gedurende een zonnige dag (1000-2000 PPS) foto-inhibitie al snel optreedt en de energie van de zon heel inefficiënt benut wordt

Dit proces mag niet verward worden met foto-acclimatie, waarbij algen hun P/I curve aanpassen onder wijzigend lichtregime (Richmond 2004).

2.4.2 TEMPERATUUR

Algen groei is ook heel temperatuursafhankelijk. Hoe hoger de temperatuur, hoe hoger de productiviteit, waarna een sterke afname volgt bij te hoge temperaturen. De gevoeligheid aan temperatuur wordt veelal weergegeven met Q10 – waarden. Dit is de factor waarmee de productiviteit stijgt indien de temperatuur 10°C stijgt. Deze factor wordt uitgedrukt binnen een bepaald bereik. Butterwick vond Q10-waarden tussen 1,3 en 2,9 voor temperaturen tussen 8 en 17°C, afhankelijk van de soort (Butterwick et al. 2005). De intensiteit van het omgevingslicht speelt eveneens een grote rol in de mate van temperatuursafhankelijkheid (Duarte 1995).

3 ONDERZOEK

Voor dit proefwerk werd verder onderzoek verricht naar de ATS binnen het kader van een duurzame waterzuivering van huishoudelijk afvalwater. De volgende onderzoeksvragen werden vooropgesteld:

1. Leidt een gestructureerd dragermateriaal tot een betere werking van een ATS?

Het dragermateriaal van een ATS is een fijne maas, gespannen over een groot oppervlak. Dit dragermateriaal heeft een hoge specifieke oppervlakte voor aanhechting en weerhoudt een gedeelte van de biomassa bij de oogst zodat snelle herkolonisatie optreedt. Rond dit thema werd onderzocht of een meer driedimensionaal gestructureerd dragermateriaal tot betere prestaties van het perifyton kan leiden (bijvoorbeeld door snellere nutriëntverwijdering, betere structuur, etc.).

2. Kan een ATS gebruikt worden voor een secundaire zuivering van huishoudelijk afvalwater?

Een ATS wordt in de zuivering van huishoudelijk afvalwater enkel gebruikt voor tertiaire zuivering. Er werd onderzocht in welke mate perifyton in staat is tot een meer secundaire zuivering (+ tertiaire zuivering). Belangrijke factoren hierbij zijn de invloed van CZV en nutriënten (zowel de concentratie als voornaamste vorm) op de opnamesnelheid en het nutriëntengehalte van het perifyton.

In de zijlijnen van het onderzoek werd het antwoord gezocht op de volgende vragen:

3. Kunnen doorschijnende materialen onder bepaalde omstandigheden de productiviteit van algen verhogen?

Binnen onderzoeksvraag 1 werden onder andere doorschijnende dragermaterialen onderzocht op hun prestaties omdat deze mogelijk een hogere lichtefficiëntie hebben dan ondoorzichtige dragermaterialen. Vanuit dit idee werd ook getest of de aanwezigheid van verticale doorschijnende platen in een fotobioreactor een positieve invloed kan hebben op de productiviteit van de algen.

4. Kan flowcytometrie gebruikt worden voor een kwantitatieve bepaling van de bacteriële gemeenschap in perifyton?

Bacteriën vormen in perifyton een heel belangrijke schakel. Kennis hiervan (zowel kwantitatief als kwalitatief) kan potentieel leiden tot een beter begrip van de perifytongemeenschap. Nochtans werden bacteriën in perifyton slechts weinig beschreven in de literatuur. Er werd getest of flowcytometrie een betrouwbare, precieze methode kan opleveren ter kwantificering van de bacteriële gemeenschap in perifyton.

DEEL II
MATERIALEN EN
METHODES

1 ANALYSES MET BETREKKING TOT AFVALWATER

1.1 STAALBEWARING

Alle stalen voor ionenchromatografie werden bewaard bij 4°C in het donker. Alle stalen voor Kj-N, CZV, TSS/VSS en turbiditeit werden bewaard bij -20°C in het donker.

1.2 TEMPERATUUR

De temperatuur werd handmatig gemeten met hetzelfde meettoestel voor opgeloste zuurstof. De watertemperatuur in de incubators nam echter vrij snel de omgevingstemperatuur aan (als gevolg van het groot bewegend uitwisselingsoppervlak). De temperatuur van de serre werd continu gemeten met een digitale thermometer (ASCOT).

1.3 OPGELOSTE ZUURSTOF

De opgeloste zuurstof (OZ) werd bepaald aan de hand van een LDO 101-probe gekoppeld aan een HQ40d *flexi single input multiparameter* digitaal meetinstrument (beide Hach Company). Het meetprincipe van deze probe is gebaseerd op luminescentie. Kalibratie was hier niet nodig, want het toestel beschikt over een interne kalibratie.

1.4 pH

De zuurtegraad werd potentiometrisch bepaald met behulp van een Consort SP10B (Consort) pH-elektrode. Dit werd ofwel continu gedaan, door aansluiting op een Consort C532 multimeter analyser of handmatig door aansluiting met een Consort R305. Bij elke handmatige meting werd de pH-meter gekalibreerd met pH-bufferoplossingen van 7 en 10, aangezien dit meestal het bereik was waarbinnen de pH-waarden zich bevonden. Bij continue meting gebeurde de ijking minstens eenmaal per week.

1.5 IONEN

De bepaling van het PO₄⁻, NO₃⁻ en NO₂⁻gehalte werd bewerkstelligd door een Dionex ionenchromatograaf (IC 761 *Compact*, Metrohm) met een Metrosep A Supp 5-150 kolom en een Metrosep A Supp 4/5 *guardkolom*. Het eluens bestond uit 3,2 mM Na₂CO₃, 1,0 mM NaHCO₃ en 5 vol% aceton bij een debiet van 0,7 mL/min. De detector werkt aan de hand van elektrochemische conductiviteit. Maandelijks werden twee standaardreeksen aangemaakt voor respectievelijk lage (0,05 - 10 mg/L) en hoge concentraties (10 - 100 mg/L). De bekomen piekoppervlaktes werden vergeleken met deze van referentieoplossingen om de concentratie in het staal te bepalen. Bij de staalname werden 10 mL

plastipak spuitjes (Plastipak packaging inc) gebruikt. De stalen werden gefiltreerd over een 0,45 µm Chromafil AO-45/25 filter (Macherey Nagel).

1.6 TOTALE EN OPGELOSTE KJELDAHL STIKSTOF

De totale concentratie aan Kjeldahl stikstof (Kj-N) werd bepaald met de Kjeldahl-methode. Al het Kj-N wordt in deze methode omgezet in $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ door reactie met zwavelzuur bij 400°C (kookpunt verhoogd door K_2SO_4 , katalyse met CuSO_4). Na de destructie volgt overdestillatie van ammoniak in basisch milieu. Dit bindt met boraat en kan door zuurbase titratie terug ontbonden worden. Voor de bepaling van opgeloste Kj-N werden de stalen eerst gecentrifugeerd bij 5000g, gedurende 10 minuten.

1.7 TOTALE EN OPGELOSTE CZV

Chemisch zuurstof verbruik (CZV) geeft aan hoeveel zuurstof nodig is om de hoeveelheid organisch materiaal (OM) in een staal af te breken. Het is een maatstaf voor organische verontreiniging. Er werden twee methodes gebruikt.

1.7.1 DICHROMAAT-TITRATIE-METHODE

In de eerste methode reageert al het OM met een 0,25/0,0625 N $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ oplossing in zuur milieu (Ag_2SO_4 als katalysator, HgSO_4 tegen interferentie met Cl). De overmaat $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ werd teruggetitreerd met 0,25/0,0625 N $\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2$ met ferroïne als indicator. Deze techniek werd gebruikt in EXP 1 en 2 (*Resultaten, hoofdstuk 2, p34 en hoofdstuk 3, p 39*).

1.7.2 HACH-LANGE COLOMETRISCHE METHODE

In de tweede methode werd gewerkt met een HI 93754A-LR en HI 93754B-MR (Hanna Instruments) waarbij de aflezing gebeurde met behulp van een Colorometer (DR/890, Hach Company). Deze methode werd gebruikt vanaf EXP 3 (*Resultaten, hoofdstuk 4, p48 en hoofdstuk 6, p60*).

Voor de bepaling van opgeloste CZV werden de stalen voor analyse eerst gecentrifugeerd bij 5000g, gedurende 10 minuten.

1.8 TSS/VSS BEPALING

De TSS/VSS bepaling gebeurde door middel van volgende stappen: centrifugering staal (5000g, 10minuten), decantatie van het supernatans, weging kroesje, overbrenging residu in kroesjes, 12u drogen in droogoven (105°C), afkoeling, weging kroesje, twee uur verassing in moffeloven (600°C), afkoeling, weging kroesje. TSS is dan het verschil tussen het gewicht van het kroesje voor en na de droogoven. VSS is het verschil tussen het gewicht van het kroesje voor en na de moffeloven.

1.9 LICHTINTENSITEIT

De intensiteit van het fotosynthetische actieve licht (PAR: *photosynthetic active radiation*) werd gemeten met een SKP 200 PAR meter (Skye instruments LTD). De lichtintensiteit wordt uitgedrukt in μmol fotonen $\text{PAR}/\text{m}^2\cdot\text{s}$ (PPS).

1.10 TURBIDITEIT

De turbiditeit werd bepaald met een HI93703 turbiditeitsmeter (Hanna Instruments). De turbiditeit wordt uitgedrukt in *nephelometric turbidity units* (NTU). De kalibratie werd gedaan met *formazine turbidity unit* (FTU) – standaarden, bij 0 FTU en 10 FTU.

2 ANALYSES MET BETREKKING TOT PERIFYTON

2.1 STAALBEWARING

Alle stalen van het perifyton werden bewaard bij -20°C , in het donker.

2.2 DROGE STOF/ VLUCHTIGE DROGE STOF/AS

Drogestof (DS) en vluchtige drogestof (VDS) werd bepaald analoog aan de bepaling van TSS en VSS. Centrifugering vooraf is echter niet nodig. Het as werd bepaald door plaatsing van het perifyton in een moffeloven en het verschil te nemen tussen het oorspronkelijk gewicht van het kroesje en het gewicht na de moffeloven.

2.3 TOTALE P-GEHALTE

De analyse van het P-gehalte in de biomassa werd gedaan aan de hand van de Scheel-methode. Eerst werd het staal gedroogd en gewogen ter bepaling van de massa. Hierna volgde verassing in de moffeloven, (omzetting van alle P naar $\text{PO}_4\text{-P}$), oplossing in 7N HNO_3 , filtering over een $0,45 \mu\text{m}$ plooi-filter (Whatman) en verdunning. Daarna werden de Scheel-oplossingen toegevoegd en werd het P spectrofotometrisch bepaald bij 700 nm met een WPA lightwave 2 spectrofotometer (Biochrom).

2.4 TOTALE N-GEHALTE

De totale N-Fractie van perifyton (of biomassa in het algemeen) bestaat normaliter uit organische N dat kan bepaald worden met de Kjeldahl-methode (zie *paragraaf 1.6, p24*). Een perifytonstaal werd gehomogeniseerd, verdund en volumetrisch gesplitst in twee even grote stalen. Hiervan werd het ene staal

gedroogd ter bepaling van de DS en het andere staal geanalyseerd op Kj-N. De verhouding van deze twee resultaten geeft het N-gehalte.

2.5 AUTOTROFE INDEX

De autotrofe index (AI) is een maatstaf voor autotrofe dominantie in het perifyton (zie ook: *Literatuurstudie, paragraaf 2.2, p16*). Deze wordt bepaald door de ratio van VDS (g) op chlorofyl a (mg). Net zoals bij de bepaling van N werd hiervoor een staal volumetrisch in 2 gesplitst (mits homogenisering en verdunning). Chl a-bepaling werd uitgevoerd zoals beschreven door de *American Public Health Association* (APHA 1985). Aanpassing van de procedure werd gedaan als resultaat van eigen optimalisatie op vlak van solventgebruik en materiaaldestructiemethode. Het resultaat van deze optimalisatie wordt weergegeven in *Resultaten, paragraaf 7.3, p68*. De gebruikte sonicator was van het type Labsonic M (B. Braun Biotech International).

2.6 AANHECHTINGSTERKTE

De aanhechtingsterkte van het perifyton op het substraat werd bepaald door water bij verschillende debieten over een zelfgebouwde schuifspanningsreactor te laten stromen. Dit wordt verder toegelicht in *Resultaten, paragraaf 3.3, p41*.

2.7 MICROSCOPIE

De determinatie van de algengemeenschap werd gedaan met behulp van de Zeiss Axioskop 2 plus microscoop (Carl Zeiss inc). De gebruikte lenzen betroffen de Zeiss plan-neofluar lens met 10*, 40* en 100* vergroting (allemaal Carl Zeiss inc). Foto's werden verwerkt met de Axioskop- en imageJ- software.

2.8 FLOWCYTOMETRIE

Flowcytometrie werd gebruikt om de bacteriële gemeenschap in het perifyton te kwantificeren. De procedure hiervoor werd zelf ontworpen, aangezien dit nog niet eerder werd gedaan. Ze wordt verder besproken bij *Resultaten, hoofdstuk 5, p57*.

3 GROEIMEDIA

Voor de verschillende testen werden in totaal 5 groeimedia gebruikt (*Tabel 4*).

Tabel 4 – De samenstelling van alle aangewende groeimedia (A tot E).

Medium A		Medium B		Medium C		Medium E ²	
EXPERIMENT 1 TEST LICHT		TEST LICHT		EXPERIMENT 2		EXPERIMENT 2 EXPERIMENT 3	
Conc. (mg/L)		Conc. (mg/L)		Conc. (mg/L)		Conc. (mg/L)	
Nutriënten							
NaNO ₃	150	NaNO ₃	75	NaNO ₃	150	K ₂ HPO ₄	28,9
KH ₂ PO ₄	15	NaH ₂ PO ₄ ·H ₂ O	5	KH ₂ PO ₄	15	KH ₂ PO ₄	23,4
Si ¹	0,035	Na ₂ SiO ₃ ·9H ₂ O	30	Si ¹	0,035	Si ¹	0,035
Na ₂ CO ₃	0.02	NaCl	24000			Kj-N ²	61,2
						Org. P ²	1,15
						CZV ²	440
Macro-elementen							
FeCl ₃	6	FeCl ₃ ·6H ₂ O	3,15				
CaCl ₂	36	Na ₂ EDTA·2H ₂ O	4,36				
Na ₂ EDTA	1			Zie medium A		Zie medium A	
Citroenzuur	6						
MgSO ₄	75						
Spore-elementen							
H ₃ BO ₃	2,86			H ₃ BO ₃	2,86		
MnCl ₂ ·4H ₂ O	1,81	MnCl ₂ ·4H ₂ O	1,80	MnSO ₄ ·H ₂ O	0,108		
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	0,222	ZnSO ₄ ·7H ₂ O	0,222	ZnCl ₂	0,209		
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0,079	CuSO ₄ ·5H ₂ O	0,098	CuCl ₂ ·2H ₂ O	0,536		
CoCl ₂ ·6H ₂ O	0,050	CoCl ₂ ·6H ₂ O	0,100	CoCl ₂ ·6H ₂ O	0,05	Zie medium C	
NaMoO ₄ ·2H ₂ O	0,391	Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0,063	NaMoO ₄ ·2H ₂ O	0,391		
				CrO ₃	0,193		
				NiCl	0,120		
				PbCl	0,1		

¹Si is Na₂O(SiO)_x.XH₂O in mL

²Groeimedium D komt volledig overeen met groeimedium E maar heeft een concentratie aan organische N, P en CZV van respectievelijk 24,5; 0,46 en 176 mg/L

Voor de sporenelementen en de macro-elementen werden stockoplossingen gebruikt (100 keer geconcentreerd). De nutriënten werden bij aanmaak van het medium steeds afzonderlijk toegevoegd. De precieze samenstelling van het medium werd gegarandeerd door het gebruik van gedestilleerd water als oplosmiddel. Het medium werd, afhankelijk van de proef, op verschillende manieren aangemaakt. In EXP 1 werd het medium bewaard bij 4°C, in een donkere gesloten bidon. In EXP 2 werd het medium net voor

gebruik aangemaakt en geautoclaveerd ter afdoding van alle cellen. In EXP 3 werd er ook een medium net voor gebruik aangemaakt zonder autoclaving. De samenstelling van het OM van medium E wordt weergegeven in *Tabel 5*. De CZV van medium D is steeds 2,5 keer minder geconcentreerd.

Tabel 5 - De organische samenstelling van groeimedium E.

	Conc. (mg/L)		Conc. (mg/L)
Ureum	92	Zetmeel	122
NH ₄ Cl	13	Melkpoeder	116
Na-acetaat.3H ₂ O	132	Gist	52
Special Peptone	17	Soja-olie	29

4 STATISTISCHE BEREKENINGEN

De statistische berekeningen werden uitgevoerd met behulp van SPSS-software. Bij het vergelijken van gemiddelden werd de normaliteit en homoscedasticiteit vooraf nagegaan. De student t-toets werd gebruikt indien het aantal waarnemingen gelijk was voor beide verdelingen. One-way ANOVA werd toegepast indien het aantal waarnemingen niet gelijk was (Bonferroni & Tukey indien homoscedastisch, Dunett T3 indien niet homoscedastisch). Er werd ook één longitudinale tijdsanalyse uitgevoerd met de SAS 9.2-software. Een significantieniveau van 5% werd steeds gehanteerd.

5 EXPERIMENTELE OPSTELLINGEN

De kern van het onderzoek werd gedaan in een perifytonreactor. In de loop van het onderzoek werden een aantal bijkomende opstellingen gebouwd ter ondersteuning. Deze constructies werden zelf ontworpen en worden uitgebreid besproken in de resultaten.

DEEL III
RESULTATEN

1 PERIFYTON-INCUBATOR

1.1 LITERATUUR VERSUS EIGEN ONTWERP

Onderzoek naar perifyton voor waterzuivering werd gedaan in een perifyton-incubator. Deze incubator was veel kleiner dan installaties bij veldexperimenten zoals die bij de *Algal Turf Scrubber* (ATS) al bestaan, maar ze liet toe om het perifyton en de prestaties ervan onder gecontroleerde omstandigheden te karakteriseren. In de literatuur werd een incubator beschreven die speciaal ontworpen werd voor onderzoek naar perifyton (Zippel et al. 2007a). De reactor bestaat uit 4 deelincubators om eenvoudige vergelijkende tests te kunnen uitvoeren. Het geheel van een dergelijke deelincubator wordt beschreven met de term ‘*flow lane*’ (FL). Ze werden gestandaardiseerd in grootte om ook verschillende studies makkelijk met elkaar te kunnen vergelijken (Zippel et al. 2007a). Verschillende onderzoeken werden reeds uitgevoerd met een dergelijke incubator. Voorbeelden zijn de invloed van lichtintensiteit en temperatuur op de groei en bouw van exopolymerische substanties (Di Pippo et al. 2009) en de invloed van bacteriën op de initiële perifytonontwikkeling (Roeselers et al. 2007).

Voor dit onderzoek werd een eigen configuratie van de perifyton-incubator gebouwd.

Enkele aspecten waren gelijkaardig aan de incubator van Zippel et al. (2007):

- Het debiet is aanpasbaar.
- De hellingsgraad kan per FL worden aangepast.
- Het effectief belichte oppervlak per FL is 900 cm².
- De temperatuur kan eenvoudig gemeten worden (hoewel niet automatisch).
- Er wordt een onderwaterpomp gebruikt voor de hercirculatie van het medium
- Het medium stroomt uniform in de reactor door het gebruik van een overloopvat.

Enkele aanpassingen werden doorgevoerd:

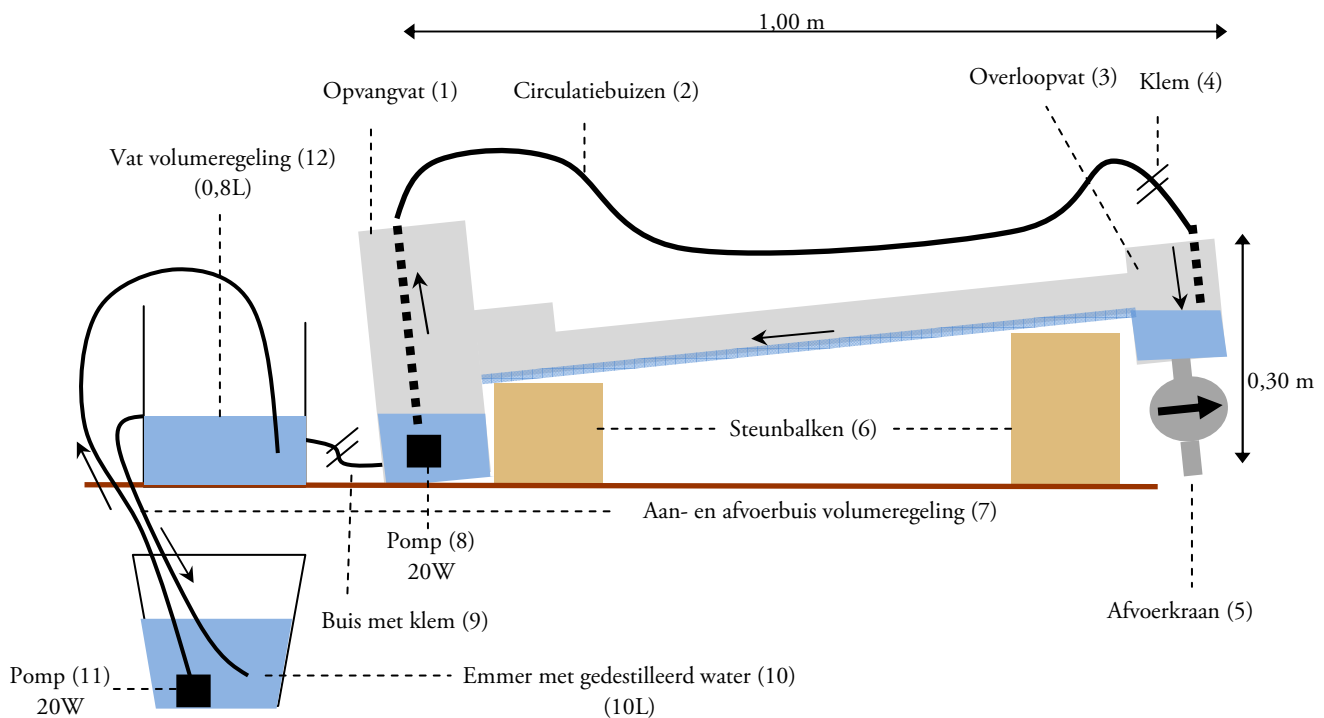
- Licht en temperatuur zijn dezelfde voor alle FL's. De lichtintensiteit kan niet aangepast worden. De regeling van de temperatuur kan enkel door bijsturing van de omgevingstemperatuur.
- Het systeem bezit geen debietmeter. De debietmetingen gebeuren handmatig.
- Er is een automatische en handmatige volumeregelaar ingebracht zodat verdamping van water wordt gecompenseerd.

1.2 WERKING

De werking van de perifyton-incubator is heel eenvoudig en wordt geïllustreerd in *Figuur 8*. Een pomp (8) pompt het water door circulatiebuizen (2) van het opvangvat (1) naar het overloopvat (3). Van daaruit stroomt het terug naar het opvangvat (1). Op de circulatiebuizen werd een klem bevestigd om het

debiet te kunnen verlagen indien nodig (4). De constructie wordt gedragen door steunbalken (6) op een tafel. Omwille van praktische redenen zijn twee supplementaire elementen aangebracht:

- De volumeregelaar { (7),(9),(10),(11) en (12) } dient om het volume in de incubator te behouden, door verdamping te compenseren met toevoeging van gedestilleerd water. Het waterniveau in het vat van de volumeregeling (12) blijft steeds even hoog. Dit gebeurt door gedestilleerd water vanuit een emmer (10) permanent naar het vat (12) te pompen vanwaar een afvoerbuis (7) op een bepaalde (vaste) hoogte in het vat, het water terugbrengt. Vanuit het vat van de volumeregeling (12) stroomt het water naar het opvangvat (1) zodat die laatste op dezelfde hoogte gehouden (principe van communicerende vaten). Het water stroomt enkel in die richting omdat enkel het vloeistofniveau in het opvangvat daalt als gevolg van verdamping in de FL. De klem op de buis (9) dient voor het stopzetten van de stroom bij mediumverversing (= ook daling vloeistofniveau).
- De afvoerkraan (5) onderaan het overloopvat (3) dient voor de debietmetingen (eens het overloopvat leeggelopen is) en voor het eenvoudig leeglaten van de incubator bij mediumverversing.



Figuur 8 – Het zijaanzicht van de perifyton-incubator.

1.3 KARAKTERISATIE

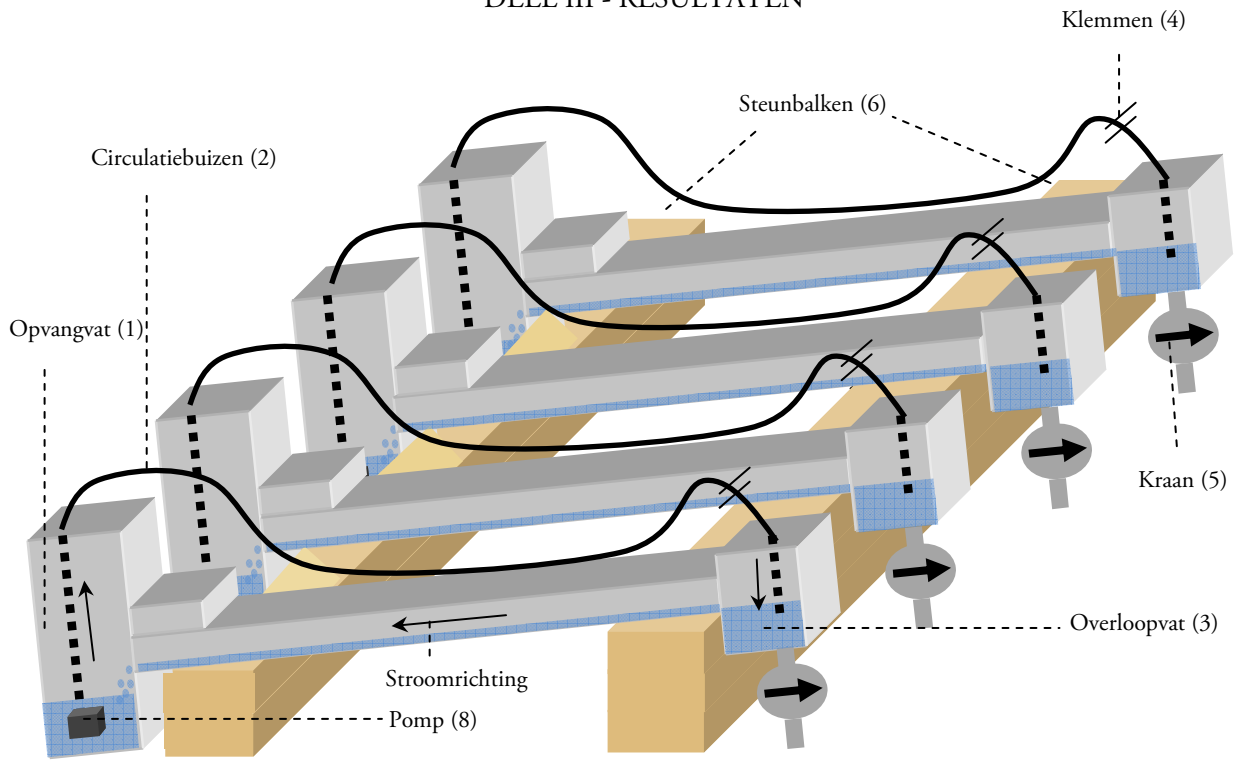
De incubator werd gebouwd in samenwerking met technisch medewerker Eddy Philips van de vakgroep biosysteemtechniek, universiteit Gent. Ze is voornamelijk opgebouwd uit polyvinylchloride (PVC). Door middel van vierkanten buizen, buisverbindingstukken en silicone werd een *flow lane* (FL) bekomen. De circulatiebuizen zijn doorzichtige plasticen buizen, maar werden in het donker gehouden met zilverpapier en donkere doeken om algengroei en een eventueel dalend debiet in de buizen te vermijden.

De pompen waren kleine dompelpompen (Microjet MC450) met een maximaal debiet van 400L/h en een maximale opvoerhoogte van 0,7m. De pompen moesten 0,1 m hoogteverschil overbruggen. Bij een buis met binnendiameter van 8mm en lengte van 1,5m, gaf dit een debiet van 250L/h. Door het verhogen van de opvoerhoogte aan de pomp (een schuifknop), het dichtdraaien van de klemmen en het verdunnen van de buisdiameter werd, naargelang het experiment, een optimaal debiet gecreëerd. De pompprestatie was steeds constant gedurende een test.

Uit voorgaande testen met een vergelijkbare FL-incubator werden hoeken tussen 0,5° en 2° graden gehanteerd. Een ATS werkt met een hoek van ongeveer 0,5° (Craggs et al. 1996b). In deze opstelling werd eveneens een hoek van 0,5° gehanteerd.

De lichtinval op de FL's was min of meer constant. Twee 400W gloeilampen (HPI-T plus, Philips) werden geïnstalleerd boven de gehele constructie. Dit gaf een lichtintensiteit van 150 μmol fotonen/m²·s (PPS) voor de 4 FL's. Dit is in dezelfde grootteorde als in andere studies voor dit soort reactor (25 – 150 PPS). Het lichtregime was 8u donker vs. 16u licht. De incubator was gelegen in een serre waardoor de totale hoeveelheid natuurlijk licht dat inviel op de FL kon variëren. Deze invloed was vooral groot tijdens de zomermaanden.

De temperatuur werd gedeeltelijk gecontroleerd door instandhouding van de serretemperatuur (ramen openzetten en verwarming harder of zachter). De T werd er tussen 15 en 25°C gehouden. In *Figuur 9* wordt de FL-incubator nog verder verduidelijkt.



**Figuur 9 - Een driedimensionale weergave van de perifyton-incubator.
De volumeregelaar is niet weergegeven.**

2 EXPERIMENT 1 - TERTIAIRE ZUIVERING MET VERSCHILLENDE DRAGERMATERIALEN

2.1 PROEFOPZET

In dit experiment werd het potentieel onderzocht van verschillende dragermaterialen voor de tertiaire zuivering van huishoudelijk afvalwater door perifyton.

Een synthetisch secundair effluent werd aangewend. Een modificatie van het algenmedium BG11 werd hiervoor geschikt verklaard door (Zippel et al. 2007b). De exacte samenstelling komt overeen met medium A in *Materialen en methodes, hoofdstuk 3, p27*. In de opstartfase werden er om de twee dagen perifytoninocula geënt in de incubator om het open, natuurlijk milieu waarbinnen een waterzuivering past, te benaderen. De inocula werden gewassen in een zeef om zanddeeltjes en grote organische resten te verwijderen. Ze werden verzameld in diverse aquatische milieus in Gent en omstreken om maximale diversiteit in de FL's te garanderen. Ze werden in het donker bewaard bij 4°C.

De incubatietijd van het afvalwater bedroeg 3 tot 4 dagen. Op regelmatige tijdstippen werd een RUN gedaan. Een RUN wordt in het vervolg van dit proefwerk gebruikt om een intensieve meetperiode aan te duiden na toediening van vers medium. In dit experiment werd de NO₃-N, NO₂-N, PO₄-P, pH en OZ nauwkeurig opgevolgd door elk uur een meting te doen. De proef liep van 18/09/2009 tot 30/11/2009. FL4 was niet nodig voor de navolgende proef (EXP 2), waardoor deze doorliep tot 28/01/2010.

Er werd ook een poging ondernomen om de productiviteit (g DS/m²·d) van het perifyton te kwantificeren. Uit een batchexperiment in een testincubator (dezelfde als in *paragraaf 7.2, p67*) bleek dit heel moeilijk te zijn door de kleine oppervlakte van een perifyton-incubator.

Het debiet in de FL's werd aangepast aan het dragermateriaal dat in de FL lag, opdat de waterfilm voldoende dik was om het volume van het dragermateriaal in te nemen. Een hoger debiet geeft aanleiding tot een dikker waterfilm. Het totaal volume aan water is ook afhankelijk van het dragermateriaal. Het debiet bedroeg 80 L/h in FL1 tot 3 en 160 L/h in FL4. De volumes bedroegen 2,15; 2,15; 3,15 en 3,45L in respectievelijk FL1 tot 4.

2.2 DRAGERMATERIALEN

Een ATS werkt met een effen dragermateriaal waarop een gas is aangebracht. Deze zorgt voor een vergroting van de specifieke oppervlakte waardoor meer aanhechting kan plaatsgrijpen aan het dragermateriaal. Tegelijk wordt de biomassa na oogst gedeeltelijk weerhouden waardoor snelle herkolonisatie mogelijk is. Voor deze test werden 4 verschillende dragermaterialen getest: een gas zoals

bij een ATS (FL1), een perfect plat dragermateriaal (FL2) en twee gestructureerde kunstgrasmatten (FL3 en FL4). Kunstgras 1 en 2 werden verkregen van het bedrijf Namgrass Belgium (Industriepark Nazareth) en hebben er de productnaam 'GreenAscari' en 'GreenBasic'.

Een aantal theoretische voordelen zijn verbonden aan de grasmatten.

- Een dragermateriaal waarbinnen water een tortueuzer pad loopt geeft potentieel een sterkere interactie tussen nutriënten en perifyton. De tortuositeit werd gekarakteriseerd door de verblijftijdsdistributie van 0,2 M NaCl te meten bij de verschillende dragermaterialen. Dit wordt uitgewerkt bij de ondersteunende testen, *paragraaf 7.1, p65*.
- Een hoog dragermateriaal kan potentieel meer steun geven aan een driedimensionale structuur waarin diverse gradiënten en niches ontstaan. Dit kan aanleiding geven tot meer diversiteit, een hogere stabiliteit en betere algemene werking van het perifyton.
- Een grotere specifieke oppervlakte (m^2/m^2) leidt tot een potentieel betere vasthechting van het perifyton. Hierdoor is er een kleinere kans op totale afslag van het perifyton en kan meer perifyton weerhouden worden bij oogst. De specifieke oppervlakte werd berekend voor alle FL's. Voor de kunstgrassen werd dit bijgestaan door de technische fiche van de grasmatten.

In *Tabel 6* wordt het verschil weergegeven tussen de gestructureerde nieuwe dragermaterialen (FL3 en 4) en de referenties (FL1 en 2).

Tabel 6 - De voornaamste eigenschappen van de geselecteerde dragermaterialen in de FL's in EXP 1. De tortuositeit wordt uitgedrukt in secondes. De verklaring hiervoor is terug te vinden in paragraaf 7.1, p65.

	Dragermateriaal	Hoogte (mm)	Spec. opp. (m^2/m^2)	Tortuositeit (s)
FL1	Gaas (mesh: 1mm)	2	2	67
FL2	Geen (vlak oppervlak)	0	1	20
FL3	Kunstgras 1	5	10,5	170
FL4	Kunstgras 2	22	7,1	146

2.3 EXPERIMENTELE OMSTANDIGHEDEN

Het tijdsinterval waarmee de metingen (NO_3-N , NO_2-N , PO_4-P , pH en OZ) werden gedaan, was te laag in het begin (1 per dag). De frequentie werd daarom verhoogd naar drie metingen per dag. Ook dit bleek te laag. Eén meting per uur gedurende minstens één dag leek het meest geschikt.

Bij de aanmaak van het medium werd tijdens de eerste weken onvoldoende rekening gehouden met de trage oplosbaarheid van PO_4 -zouten. KH_2PO_4 werd rechtstreeks toegevoegd aan het medium waardoor de

fosfaten slechts weinig in oplossing werden gebracht en moeilijk detecteerbaar waren. Vanuit dit besef werden de fosfaten navolgend in vooroplossing toegevoegd.

De kolonisatie van FL3 en 4 verliep met vertraging ten opzichte van FL1 en 2.

2.4 WAARNEMINGEN

2.4.1 PERIFYTON

In het eerste experiment (tertiaire zuivering op verschillende dragermaterialen) werd de biodiversiteit niet systematisch onderzocht. Wel werden op een aantal momenten microscopische analyses gedaan. Daaruit bleek dat de biodiversiteit in de FL's redelijk hoog was. In totaal werden 11 geslachten aan algen waargenomen (*Tabel 7*).

Tabel 7 - De totale waargenomen diversiteit aan algen in EXP 1.

	Unicellulair	Kolonie	Filamenteus
Groenalgen	<i>Chlorella, Carteria,</i> <i>Casmarium, chlorococcum</i>	<i>Scenedesmus</i> ¹ , <i>Pediastrum</i>	<i>Cladophora, Mougeotia</i>
Cyanobacteriën			<i>Calothrix, Nostoc</i>
Diatomeeën	<i>Synedra</i> ¹		

¹*Van sommige geslachten werden 2 soorten onderscheiden*

De dominante soorten algen bleven *Carteria* en *Scenedesmus* gedurende het hele experiment, behalve in de FL's met de grasmatten (FL3 en 4). Daar begon op DAG 19 de ontwikkeling van een complexe perifytongemeenschap (PG) met als dominant geslacht de filamenteuze groenalg *Cladophora*. Micro-invertebraten (zoals verschillende raderdieren) waren aanwezig vanaf de start. Macro-invertebraten (voornamelijk muggenlarven) werden enkel waargenomen in FL1 en 2 na RUN 4. In *Tabel 8* wordt geïllustreerd hoe de soortensamenstelling veranderde gedurende het experiment.

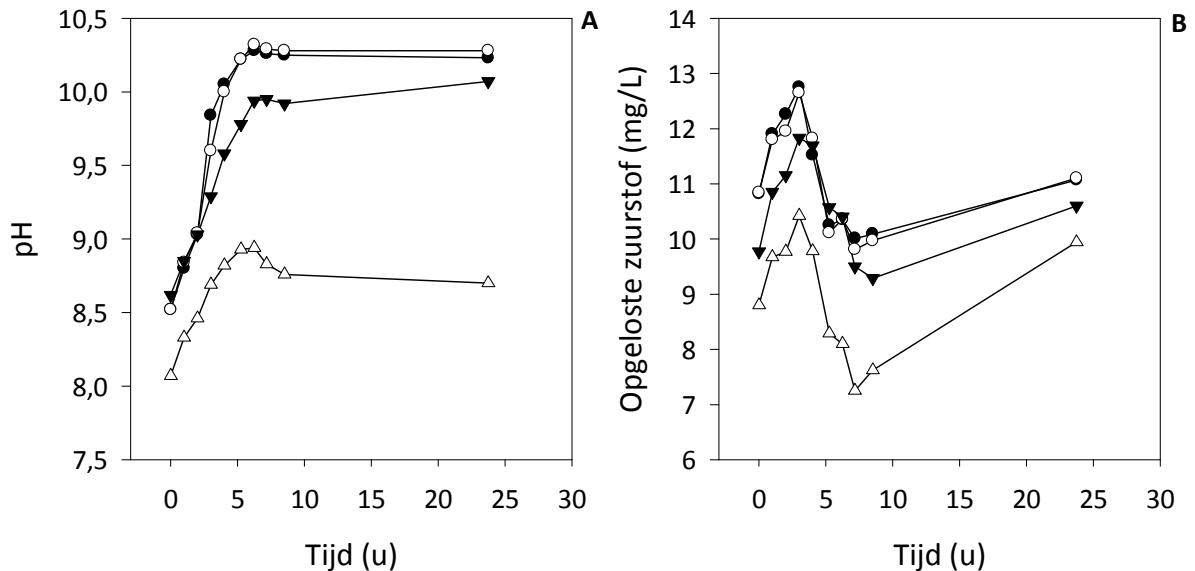
Tabel 8 - De evolutie van de diversiteit in EXP 1.

		FL1		FL2		FL3		FL4	
RUN1	DAG 7	A	/	A	/	A	/	A	/
RUN2	DAG 18	A	/	A	/	A	/	A	/
RUN3	DAG 31	A	/	A	/	B	/	B	/
RUN4	DAG 32	A	/	A	/	B	/	B	/
Na RUN4		A	M	A	M	B	/	B	/

A: een eenvoudige PG op basis van vnl. Calothrix, Scenedesmus en Carteria. B: een complexe gemeenschap met vnl. Cladophora. M: aanwezigheid van macro-invertebraten.

2.4.2 WATERZUIVERING

In *Figuur 10* wordt de evolutie van de pH en OZ weergegeven voor RUN 3. Op dat moment was het periphyton in een matuur stadium in alle FL's. De pH en OZ in FL4 was duidelijk lager. Dit kwam mogelijks door de ontwikkeling van een heterotrofe biofilm (CO₂-productie en O₂-consumptie) in het opvangbekken van FL4.



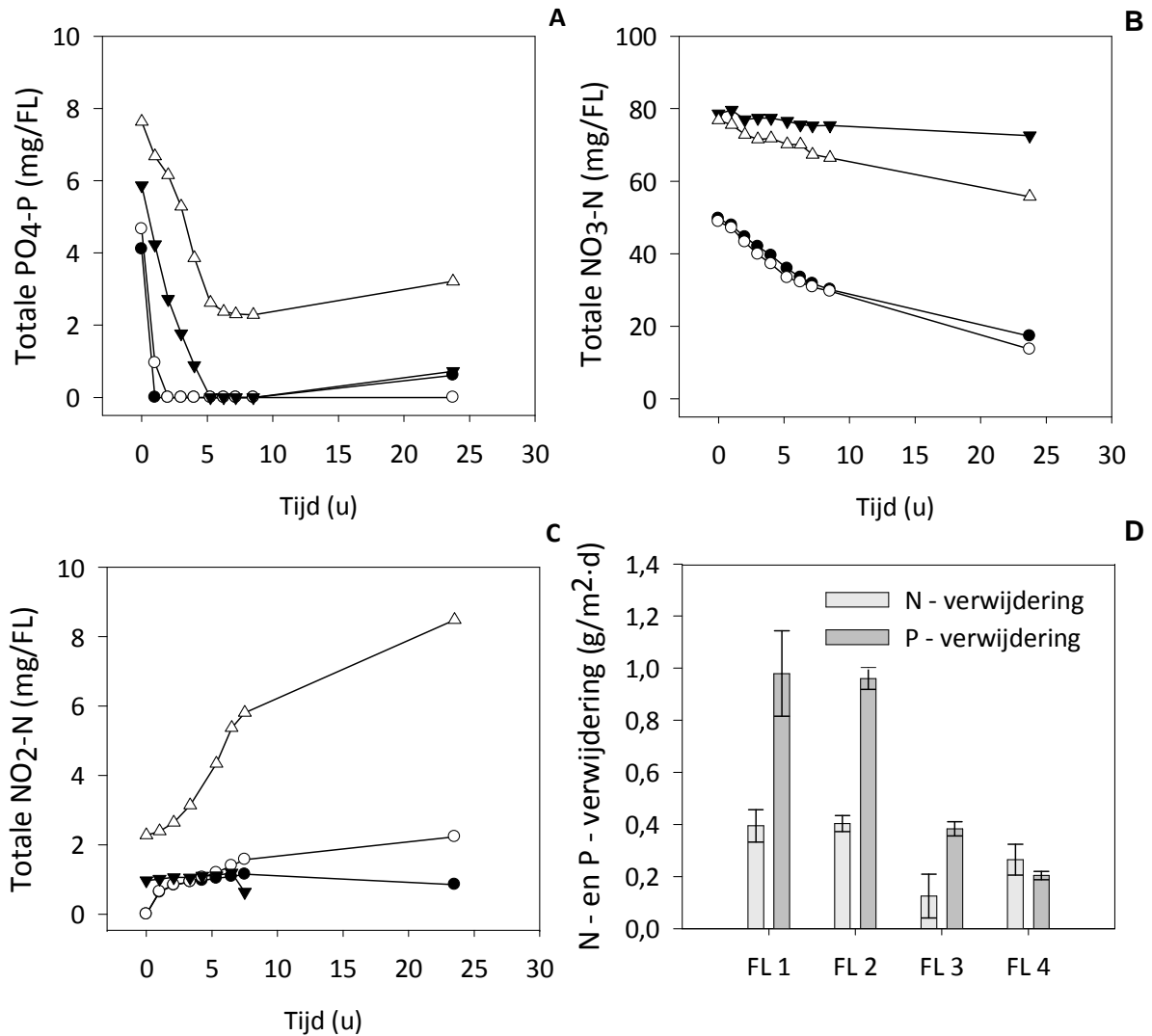
Figuur 10 - De evolutie van de pH en OZ in RUN 3 van EXP 1.
FL 1 (●), FL 2 (○), FL 3 (▼) en FL 4 (Δ).

De evolutie van de totale NO₃-N, NO₂-N en PO₄-P (mg/FL) van RUN3 wordt weergegeven in *Figuur 11-A tot C*. In FL4 was er duidelijk nitrietaccumulatie (*Figuur 11 - C*). Mogelijks was er meer (onvolledige) denitrificatie in FL4 door de lagere O₂-concentratie ten opzichte van de andere FL's.

RUN 3 werd, ter controle, herhaald in RUN 4. In *Figuur 11-D* wordt de gemiddelde totale N- en P-verwijdering (g/m².d) van RUN 3 en RUN 4 weergegeven (n = 2). De N-opname voor FL1 tot 4 bedroeg respectievelijk 395 ± 65; 403 ± 31, 125 ± 84 en 265 ± 59 (n = 2) mg/m².d. De P-opname bedroeg 979 ± 164, 960 ± 41, 383 ± 27 en 204 ± 16 (n = 2) (mg/m².d). Dit duidt in beide gevallen op een significant verschil (p < 0,05) tussen een eenvoudige PG (FL1 en 2) en een complexe PG (FL3 en FL4 met *Cladophora* als dominant algengeslacht).

De molaire N:P ratio van de opname van N en P uit het afvalwater is veel hoger in FL4 dan in de andere FL's (respectievelijk 2,88 in FL4 ten opzichte van 0,89; 0,93 en 0,72 in FL1 tot 3). Dit betekent dus dat voor de verwijdering van één P-atoom respectievelijk 2,88 N-atomen worden verwijderd uit het afvalwater

in FL4. Dit is vermoedelijk te wijten aan de lagere pH in FL4 waardoor minder PO_4 -zouten neersloegen dan in de andere FL's.



Figuur 11 - A, B, C: De evolutie van $\text{PO}_4\text{-P}$, $\text{NO}_3\text{-N}$ en $\text{NO}_2\text{-N}$ in RUN3, EXP 1. FL1 (●), FL2 (○), FL3 (▼) en FL4 (Δ). De aanvankelijke $\text{NO}_3\text{-N}$ en $\text{PO}_4\text{-P}$ in FL3 en 4 is hoger door het groter volume aan medium. **D:** De gemiddelde N- en P- verwijdering ($\text{g/m}^2\cdot\text{d}$) uit het afvalwater voor RUN 3 en 4 ($n = 2$).

3 EXPERIMENT 2 - VERSCHIL TUSSEN SECUNDAIRE EN TERTIAIRE ZUIVERING MET PERIFYTON

3.1 PROEFOPZET

In deze test werd het fundamenteel verschil onderzocht tussen perifyton voor tertiaire zuivering en secundaire zuivering van huishoudelijk afvalwater.

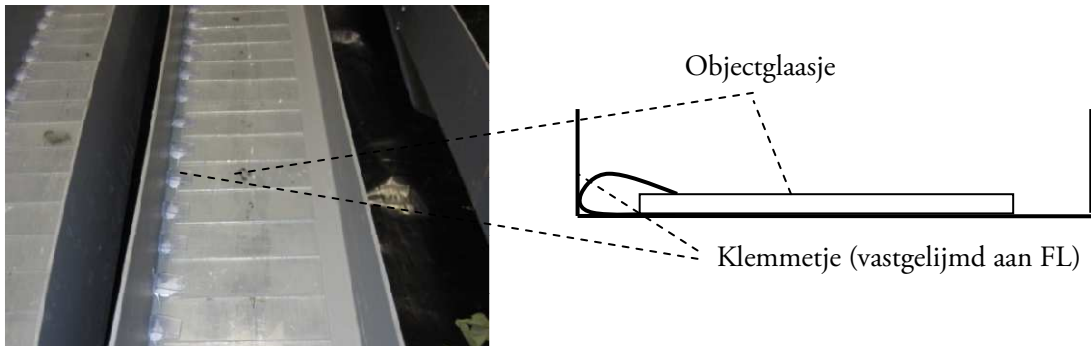
Er werd synthetisch secundair en primair afvalwater aangewend in de reactor (zie volgende paragraaf). De incubatietijd van het medium in de incubator bedroeg 3 tot 4 dagen. Net zoals in de vorige proef werden $PO_4\text{-P}$, $NO_3\text{-N}$, en $NO_2\text{-N}$, de pH en OZ opgevolgd door een regelmatige RUN (DAG 14, 21, 31 en 43). Aangezien het in twee FL's een secundaire zuivering betrof (zie volgende paragraaf), werden ook metingen van de chemische zuurstofvraag (CZV) en Kjeldahl-stikstof (Kj-N) gedaan.

Voorts werd het perifyton zelf gekarakteriseerd: de productiviteit ($g\ DS/m^2\cdot d$), het as-gehalte, de autotrofe index (AI), het N- en P-gehalte, de biodiversiteit en de aanhechtingsterkte aan het dragermateriaal.

Als dragermateriaal voor perifyton werden gewone objectglasjes ($19\ cm^2$) gebruikt omdat deze objectglasjes toelieten de drogestof (DS) te bepalen en hieruit de productiviteit van het perifyton af te leiden. De geschiktheid van de objectglasjes als dragermateriaal voor perifyton werd onderzocht met behulp van een zelfgebouwde reactor, toegelicht in *paragraaf 7.2, p67*. Ze werden gekrast om een zekere verruwing van het oppervlakte te creëren en de vasthechting van perifyton te verhogen. Om te vermijden dat de glasjes zouden afspoelen, werden ze tussen miniklemmen op de FL's aangebracht (*Figuur 12*). Dit bleek uit voorafgaand onderzoek de beste methode om de objectglasjes vast te zetten zonder de massa van de objectglasjes te beïnvloeden (beter als magneetband, reversibele lijmen, etc.). Per FL werden 30 objectglasjes gelegd opdat voldoende DS-metingen konden worden gedaan. Bij elke staalname werden vier glasjes genomen per FL. Drie hiervan dienden voor DS-meting en as-inhoud, één hiervan diende voor zowel N-, P- als AI-bepaling van het perifyton.

Aangezien het ook in deze proef synthetische afvalwaters betreft, werden elke twee dagen inocula toegevoegd om maximale diversiteit aan algen en bacteriën te garanderen. Dezelfde inocula als in EXP 1 werden gebruikt. Deze algen werden echter reeds drie maanden bij $4^\circ C$ bewaard en waren minder actief. Daarom werden ze aangevuld met algeninocula uit andere lopende reactoren. Actief slib uit de waterzuiveringsinstallatie (WZI) van Ossemeersen, Gent werd gebruikt als inoculum voor bacteriën. Dit actief slib bevat zowel nitrificerende als denitrificerende bacteriën. Het werd eveneens bewaard bij $4^\circ C$, in het donker.

Het volume en debiet is exact hetzelfde voor de 3 FL's, namelijk 2,15 L bij 80L/h. De test liep van 8/12/2009 tot 28/01/2010 (DAG 1 - DAG 51).



Figuur 12 - De objectglasjes als dragermateriaal in de FL's in EXP 2. Met behulp van klemmetjes spoelden de objectglasjes niet weg.

3.2 VERSCHILLENDE AFVALWATERS

In FL1 en FL3 werd respectievelijk een synthetisch conventioneel primair en een synthetisch conventioneel secundair huishoudelijk afvalwater gevoed. In FL2 werd een hypothetisch primair afvalwater gevoed waar een heel sterke primaire zuivering aan vooraf ging. Het wordt omschreven met de term 'nieuw primair afvalwater' en past in de nieuwe strategie voor duurzame waterzuivering waarbij een sterke primaire zuivering vooraf gaat aan een secundaire zuivering (zie *Literatuurstudie, paragraaf 1.5.3, p14*). De afvalwaters komen overeen met medium C, D en E, zoals beschreven in *Materialen en methodes, hoofdstuk 3, p27*. Voor het conventioneel secundair huishoudelijk afvalwater werd gebruik gemaakt van de aanpassing van BG 11 (Zippel et al. 2007b), zoals in de voorgaande test. Voor het conventioneel primair afvalwater werd gebruik gemaakt van een aangepaste versie (Nopens 2001) van het synthetisch afvalwater Syntho (Boeije et al. 1999). Voor het nieuw primair afvalwater werd steeds 60% minder OM toegevoegd ten opzichte van conventioneel primair afvalwater. De belangrijkste kenmerken van de drie huishoudelijke afvalwaters worden weergegeven in *Tabel 9*.

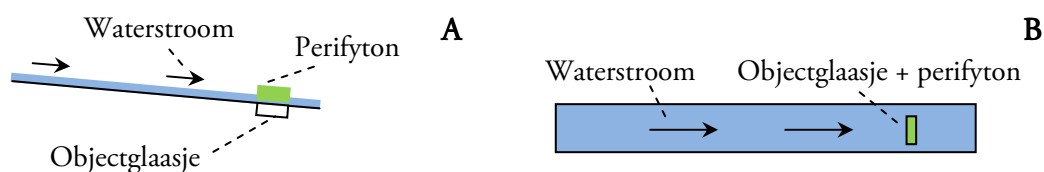
Tabel 9 – De samenstelling (N, P en CZV) van de aangewende afvalwaters in de FL's in EXP 2.

Afvalwater			CZV	Kj-N	NO ₃ -N	Org. P	PO ₄ -P
FL1	Medium C	Conventioneel primair	440	61,2	0	1,15	8,3
FL2	Medium D	Nieuw primair	176	24,6	0	0,45	8,3
FL3	Medium E	Conventioneel secundair	0	0	24,5	0	1,6

Voorts werden een aantal bijkomende wijzigingen doorgevoerd om de proef zo vergelijkbaar mogelijk te maken. De sporenelementen van Syntho werden gebruikt (met aanwezigheid van zware metalen zoals Pb en Ni) voor de drie afvalwaters. Deze werden aangevuld met drie algengroei noodzakelijke sporenelementen (Co, B, Mo) uit BG 11. Voor de rest werden de drie afvalwaters gelijkgesteld op Si, Fe, Mg, Ca, chelerende verbindingen zoals in BG 11. Bijgevolg was het enige verschil tussen de drie afvalwaters de concentratie en het voorkomen van N, P en CZV.

3.3 SCHUIFSPANNINGREACTOR

De sterkte van de aanhechting van het perifyton aan de objectglasjes werd onderzocht aan de hand van zijn weerstand tegen schuifspanning. Het doel was niet om absolute cijfers van schuifspanning (N/m^2) te bekomen maar om een relatieve vergelijking te maken tussen perifyton, opgegroeid op verschillende afvalwaters. Hiervoor werd een schuifspanningreactor gebouwd (*Figuur 13*). In de reactor kunnen verschillende debieten aangebracht worden over een kanaal ($1 \cdot 0,1$ m) bij een hoek van 3° . Op het einde van het kanaal zit er een caviteit waarin een objectglasje kan gelegd worden (perfect aansluitend met het oppervlak). Het objectglasje met perifyton erop werd in de reactor geplaatst waardoor enkel het perifyton uitstak (*Figuur 13-A*). Hoe hoger het debiet, hoe hoger de schuifspanning die inwerkt op het perifyton. Er werden metingen gedaan na RUN 2 en RUN 4. De aangelegde schuifspanningen bedroegen 160L/h, 250L/h en 360L/h, telkens gedurende 10 seconden. Na het opleggen van een schuifspanning werd het percentage oppervlakte dat volledig afgeslagen werd tot op het glas handmatig opgemeten.



Figuur 13 – Het mechanisme van de schuifspanningreactor in EXP 2.

A: zijaanzicht en B: bovenaanzicht

3.4 EXPERIMENTELE OMSTANDIGHEDEN

De objectglasjes die in de FL's lagen, sloten aan de onderkant niet perfect aan op de FL-incubator. Dit zorgde voor waterstroming en groei van perifyton onder de plaatjes, zeker in de beginfase. Voor de DS-bepaling moest daarom niet alleen het objectglasje weggehaald en gewogen worden, ook moest de biomassa eronder verwijderd worden en overgebracht worden op de objectglasjes om een correcte meting te maken.

De aanhechting van de algen op het objectglaasje was beperkt. Hierdoor was er veel perifytonafslag en bestond de totale CZV, N en P in het afvalwater op het einde van een RUN uit algen en bacteriën en in mindere mate uit de CZV, N en P van het afvalwater zelf. Dit bleek uit een stijgende absorptiepiek bij 665 nm (absorptie door chl a). De bepaling van de totale CZV, N en P in de FL's was dus niet relevant. Wel kon de opgeloste CZV, N en P bepaald worden. De opgeloste N en P in het afvalwater is representatief voor de totale N en P van het afvalwater (FL1 en 2: 75,7% van het N is ureum-N en NH₄-N en is volledig oplosbaar). De opgeloste CZV is representatief voor de totale CZV van het afvalwater, want de verwijdering van de opgeloste CZV is de snelheidsbepalende stap.

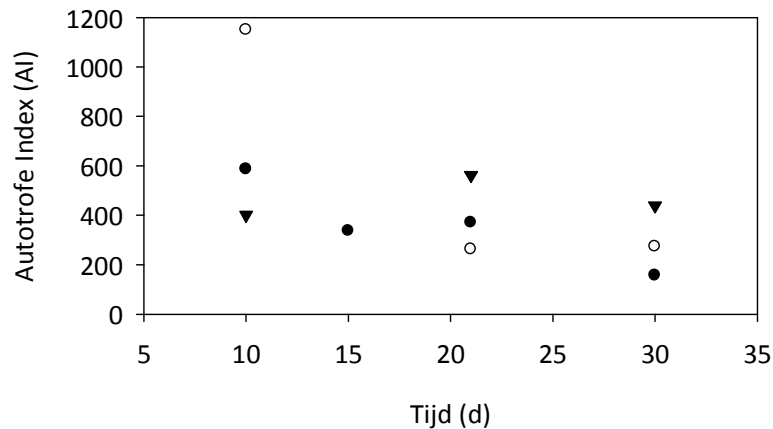
3.5 WAARNEMINGEN

3.5.1 PERIFYTON

- SOORTENSAMENSTELLING

De totale biodiversiteit aan algen in dit experiment was beperkt. Er bleek geen opmerkelijk verschil in soortensamenstelling tussen conventioneel primair, nieuw primair en conventioneel secundair huishoudelijk afvalwater. De dominantie werd steeds ingenomen door Carteria, Scenedesmus en Calothrix. Het dragermateriaal was vermoedelijk te weinig gestructureerd om de uitbouw van een complexe perifytongemeenschap met filamenteuze algen toe te laten.

De AI werd ook bepaald (*vergelijking 1, p 15*). Het drukt de hoeveelheid chl a uit ten opzichte van het de VDS (algen, bacteriën, invertebraten en het residu). Er werd verwacht dat de verschillende afvalwaters (FL1 tot 3) mogelijks een grote invloed kunnen hebben op de verhouding heterotrofen/autotrofen. In *Figuur 14* wordt het resultaat van de metingen weergegeven. In het begin was de AI het laagst voor FL3. Minder CZV in het water betekent immers minder bacteriën. De AI op het einde was het hoogst voor FL3. De afbraak van de algen door micro-invertebraten beïnvloedt dan in sterke mate de heterotrofie, onafhankelijk van de samenstelling van het afvalwater. Opvallend was wel dat de AI heel hoog lag (>>200) en dat deze eerder een dalende trend vertoonde i.p.v. een stijgende zoals verwacht zou worden (zie *Literatuurstudie, paragraaf 2.3.1, p18*). De oorzaak hiervoor kan mogelijks gevonden worden in de langdurige en ontoereikende staalbewaring waardoor een deel van het chl a werd afgebroken naar feofytine.

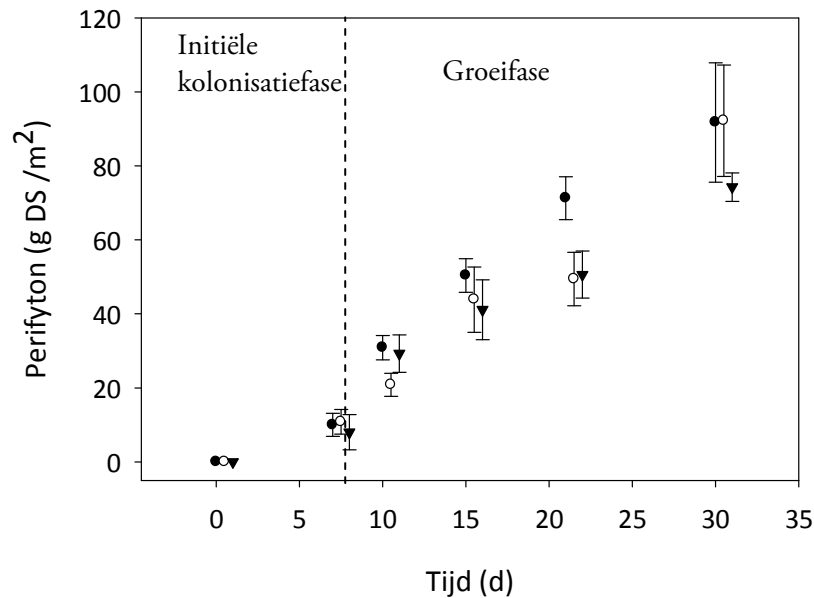


Figuur 14 – De evolutie van de autotrofe index (AI) van perifyton in EXP 2. FL1 (●), FL2 (○) en FL3 (▼).

- DROGE STOF

De toename van DS in functie van de tijd wordt weergegeven in *Figuur 15*. In de grafiek is een initiële kolonisatiefase en een groeifase te herkennen. De respectievelijke maximale productiviteit in FL1,2 en 3 bedroeg $6,97 \pm 1,51$; $4,61 \pm 1,90$ en $7,09 \pm 2,32$ ($n = 3$) $\text{g/m}^2\cdot\text{d}$. De respectievelijke gemiddelde groeisnelheid vanaf DAG 7 (na de initiële fase) bedroeg $3,55 \pm 0,71$; $3,54 \pm 0,67$ en $2,88 \pm 0,27$ ($n = 3$) $\text{g/m}^2\cdot\text{d}$ in FL1, 2 en 3. Door de hoge maat van afslag, is dit waarschijnlijk een sterke onderschatting van de werkelijke waarde. Met behulp van de longitudinale statistische analyse kon geen significant verschil worden waargenomen in de toename van DS bij de verschillende afvalwaters (FL1 tot 3). De gemiddelde productiviteit in FL3 bleek echter lager, waarschijnlijk door een snellere uitputting van nutriënten op het einde van een RUN en lagere CO_2 -concentratie (hogere pH) tijdens een RUN.

De productiviteit werd niet meer gemeten na RUN 3 aangezien het perifyton op sommige plaatsen gehele afslag vertoonde (tot op het objectglaasje). Hierdoor was het gemiddelde van drie objectglaasjes niet meer representatief voor de totale DS (zie ook de verliesfase in *Literatuurstudie, Figuur 6, paragraaf 2.3, p17*)



Figuur 15 - De evolutie van de DS van perifyton (g DS/m²) in EXP 2. De initiële kolonisatiefase en groeifase zijn te onderscheiden. FL1 (●), FL 2 (○) en FL 3 (▼).

- CHEMISCHE SAMENSTELLING

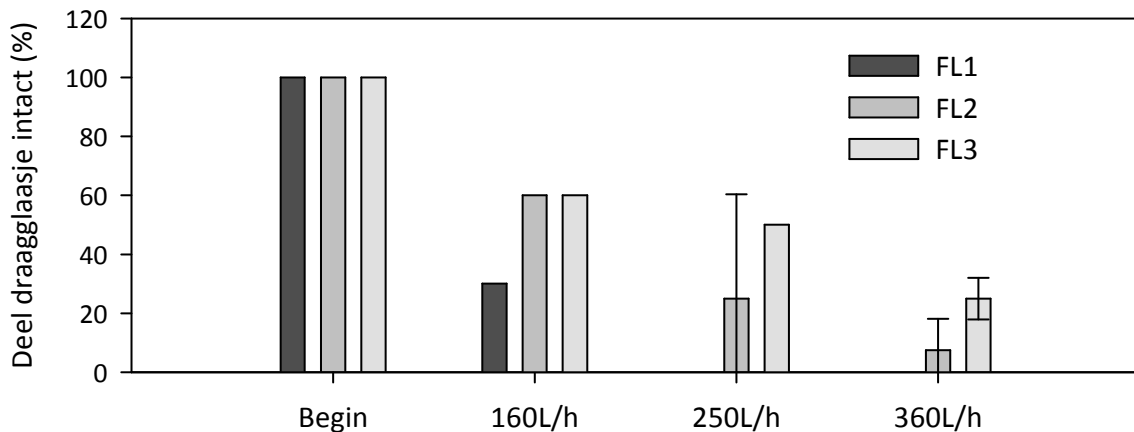
Het N-gehalte van het perifyton bedroeg gemiddeld 59 ± 20 , 44 ± 12 en 33 ± 10 ($n = 4$) g N/kg DS voor respectievelijk FL1, FL2 en FL3. Het P-gehalte bedroeg respectievelijk $3,0 \pm 0,6$; $4,6 \pm 0,6$ en $3,6 \pm 0,9$ ($n = 4$) g P/kg DS.

Het N-gehalte was, hoewel niet significant, lager voor FL3 dan voor FL1 en FL2. De concentratie van N in het afvalwater lijkt dus een invloed te hebben op het N-gehalte in het perifyton. Het N-gehalte vertoonde ook duidelijk een stijgende lijn in functie van de tijd.

Het P-gehalte was, hoewel niet significant, hoger in FL2.

- AANHECHTINGSSTERKTE VAN HET PERIFYTON

Er werden op DAG 22 en DAG 44 testen ondernomen om de aanhechtingssterkte van het perifyton aan de objectglasjes na te gaan. In *Figuur 16* wordt het resultaat van de laatste meting geïllustreerd. FL1 lijkt gevoeliger voor afslag dan FL2 en 3. Tussen FL2 en 3 lijkt er geen echt verschil te zitten. De resultaten van DAG 21 zijn vergelijkbaar. Aangezien het aantal stalen per meting beperkt was tot twee, kon hieruit geen conclusie getrokken worden.



Figuur 16 – De weerstand van het perifyton tegen schuifspanning (n = 2). Drie verschillende debieten werden achtereenvolgens aangelegd (160L/h, 250 L/h en 360 L/h), telkens 10 seconden.

3.5.2 WATERZUIVERING

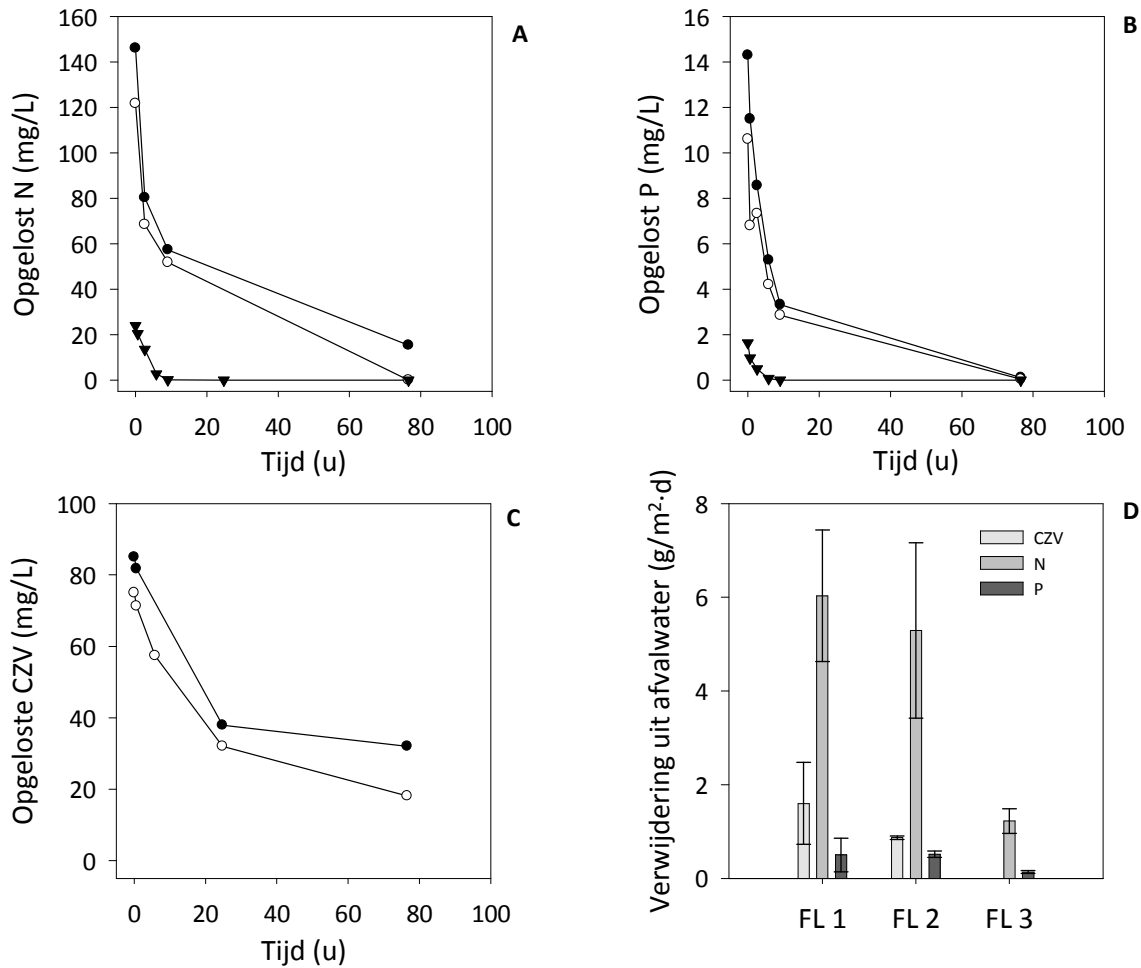
De waterzuivering werd, zoals hierboven beschreven, gekwantificeerd met behulp van drie parameters: de afname van opgelost N (Kj-N in FL1 en 2, NO₃-N in FL3), opgelost P (PO₄-P) en opgeloste CZV (enkel in FL1 en 2) in het afvalwater. Dit wordt weergegeven in *Figuur 17-A tot C*. De waarnemingen hiervan worden bijgestaan door pH en OZ-metingen.

De beoordeling van de waterzuivering gebeurde voor matuur perifyton (RUN 3 en RUN 4). De verwijdering van de opgeloste N uit het afvalwater bedroeg $6,03 \pm 1,40$; $5,29 \pm 1,87$ en $1,22 \pm 0,26$ (n = 2) g N/m²·d in respectievelijk FL1, FL2 en FL3 (zie *Figuur 17-D*). FL3 had, hoewel niet significant, een duidelijk lagere opnamesnelheid van N door het perifyton.

Nitrificatie vond waarschijnlijk in slechts geringe mate plaats in FL1 en 2. Lage concentraties NO₃ werden waargenomen. Denitrificatie vond, hoewel niet aangetoond, waarschijnlijk niet plaats door de hoge concentratie O₂.

De afname van opgelost P is $0,50 \pm 0,36$; $0,51 \pm 0,07$ en $0,13 \pm 0,03$ (n = 2) g P/m²·d in respectievelijk FL1, FL2 en FL3. In FL3 is er een lagere opnamesnelheid van P door het perifyton. Dit verschil is significant (p < 0,05) met FL 2.

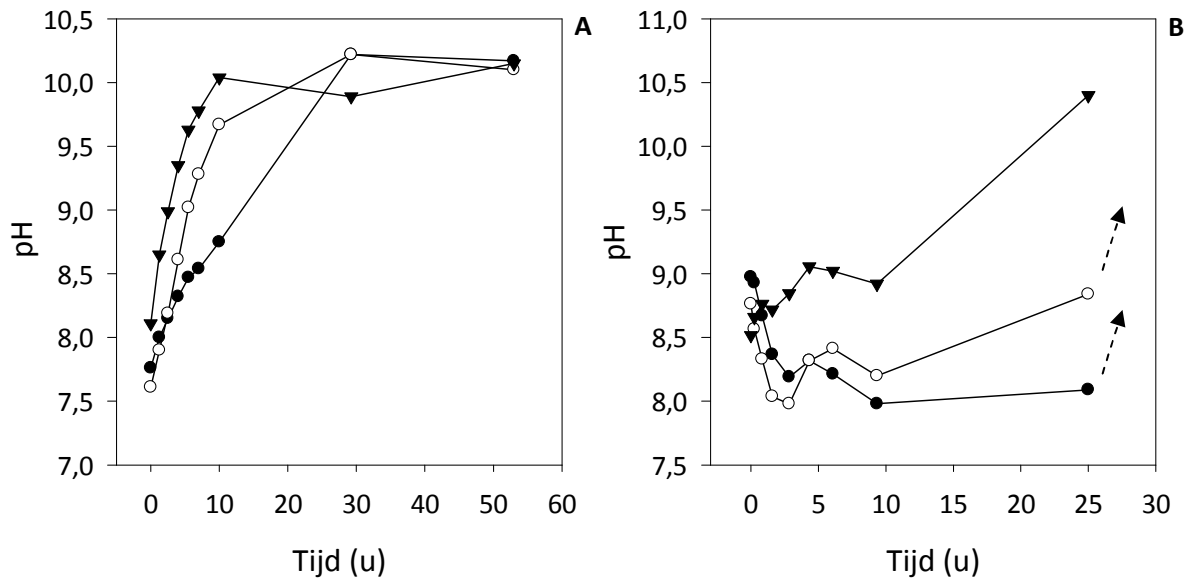
De afname (afbraak) van opgeloste CZV is $1,60 \pm 0,87$ en $0,87 \pm 0,04$ (n = 2) g O₂/m²·d in FL1 en FL2. Er was geen significant verschil in afname tussen FL1 en FL2.



Figuur 17 – A, B en C: De evolutie de opgeloste N-, P- en CZV-concentratie in RUN 3, EXP 2. FL1 (●), FL2 (○), FL3 (▼). D: De gemiddelde verwijdering ($\text{g/m}^2\cdot\text{d}$) van N, P en CZV in RUN 3 en RUN 4, EXP2.

Uit de pH-curves is af te leiden dat de pH het snelst steeg in FL3 na de start van een RUN (Figuur 18-A). Dit illustreert de gasuitwisseling van O_2/CO_2 tussen algen en bacteriën. Doordat bacteriën de CZV afbreken in het water, wordt permanent CO_2 geproduceerd en wordt aldus pH-stijging door opname van CO_2 onderdrukt. In RUN 3 en 4 daalt de pH zelf in FL1 en 2 in de eerste uren na de start van de RUN (Figuur 18-B). Dit komt vermoedelijk door de toenemende afbraak van dode algen door micro-invertebraten met als gevolg meer CO_2 -uitstoot en een lager pH.

De invloed van N-processen zoals ammonificatie ($\text{ureum} \rightarrow \text{NH}_3$) en NH_3 -assimilatie op de pH is moeilijk in te schatten en hangt af van tal van processen. Echter, bij ammonificatie worden protonen opgenomen en dit zou de pH moeten doen stijgen (Perry et al. 2002).



Figuur 18 – A: De evolutie van de pH in de FL's in RUN 1, EXP 2. B: Idem voor RUN 3. De pijlen duiden aan dat de pH verder stijgt tot >10. FL1 (●), FL2 (○), FL3 (▼).

Op het einde van elke RUN was de pH hoger in FL1 en 2 in vergelijking met FL3 (op een later tijdstip dan te zien is in *Figuur 18*). Dit kwam waarschijnlijk omdat in FL1 en 2 de nutriënten trager waren uitgeput en algen langer ongelimiteerd konden doorgroeien (CO_2 opnemen) en dus de pH verhogen. De OZ curve vertoont een gelijkaardig profiel als de pH.

4 EXPERIMENT 3 – SECUNDAIRE ZUIVERING MET VERSCHILLENDE DRAGERMATERIALEN

4.1 PROEFOPZET

Dit experiment lijkt op EXP 1. Het potentieel van verschillende dragermaterialen werd getest, niet voor tertiaire zuivering deze keer, maar voor secundaire zuivering.

Het afvalwater betreft in dit geval het zogenaamd nieuw primair afvalwater van de nieuwe waterzuivering zoals gebruikt in EXP 2 en beschreven als medium D in *Materialen en methodes, hoofdstuk 3, p27*. In totaal werden vijf RUNS gedaan, waarbij systematisch de opgeloste CZV, Kj-N, NO₃-N, NO₂-N en PO₄-P, pH en OZ werd bijgehouden. De turbiditeit werd gemeten als indicatie voor de TSS. De TSS-samenstelling veranderde echter gedurende het experiment, dus deze data moeten met omzichtigheid geïnterpreteerd worden. Vanaf een pH 9,5 werd intensief lucht geblazen in het opvangbekken om de pH te verlagen en de microbiële gemeenschap niet te schaden.

Het perifyton werd gekarakteriseerd op basis van het N- en P-gehalte, de algengemeenschap en de aanwezigheid van macro-invertebraten. Dezelfde werkwijze wat betreft inocula werd gebruikt als in EXP 2. De Algeninocula waren ditmaal integraal afkomstig uit EXP 1 en 2. Vers slib (WZI Ossemeersen, Gent) werd verzameld bij aanvang van het experiment. De proef liep van 01/03 tot 30/04 (DAG 1 tot 60).

Op DAG 26 werden macro-invertebraten heel dominant in FL1 en FL2. Dit had ernstige gevolgen voor de structuur van het perifyton en de turbiditeit van het water. Om deze te bestrijden werden 2 acute insecticiden, Imidacloprid en Permethrin (Permas 250 Combi EZ), uitgetest (microscopische testen op overleving na 12u incubatie bij verschillende concentraties). Permethrin was het meest effectief en het product (met bijhorende samenstelling) werd toegediend aan 1 mL/FL. Dit liet heel snelle heropleving van het perifyton toe. Uiteraard is dit enkel aanvaardbaar in een proefreactor en geenszins bij echte waterzuivering. De insecticiden werden verkregen van Prof. Ir. Guy Smagghe, Universiteit Gent.

In deze test werd 4,5 L afvalwater per FL toegevoegd, wat meer is als in voorgaande experimenten.

4.2 VERSCHILLENDE DRAGERMATERIALEN

De dragermaterialen uit EXP 1 werden niet zomaar overgenomen. In samenwerking met de vakgroep textielkunde (Prof. Dr. Ir. Paul Kiekens, technisch medewerker Stijn Rambour, Universiteit Gent) werd een nieuwe grasmat ontwikkeld dat doorzichtig is en nog hogere sprietten heeft dan grasmat 2 uit EXP 1. De tufting van de grasmat werd gratis gedaan door het bedrijf Bonar (Oostende). Grasmat 1 en 2 werden

ook gebruikt, evenals het gaas. Een overzicht van de nieuwe configuratie in de perifyton-incubator wordt geïllustreerd in *Tabel 10*.

Tabel 10 - De voornaamste eigenschappen van de gekozen dragermaterialen in de FL's van EXP 2.

	Dragermateriaal	Hoogte (mm)	Spec. Opp. (m ² /m ²)	Tortuositeit (s)
FL1	Gaas (mesh: 1mm)	2	2	67
FL2	Kunstgras 1	5	10,5	170
FL3	Kunstgras 2	22	7,05	146
FL4	Kunstgras 3 (doorzichtig)	35	4	? ¹

¹*De Tortuositeit van kunstgras 3 kon niet worden bepaald.*

De beschreven voordelen in EXP 1 (*paragraaf 2.2, p34*) kunnen nu worden uitgebreid:

Vooreerst is het afvalwater niet secundair, maar primair. Er is een TSS-fractie die door de matten mogelijk beter kan worden weggefilterd. Een bijkomend voordeel werd gezocht in de doorzichtigheid van kunstgras 3. Er werd gehoopt dat transport van licht doorheen hogedichtheidpolyethyleen (HDPE) voordelig kan zijn met betrekking tot de productiviteit en nutriëntenopname van de PG.

4.3 WAARNEMINGEN

4.3.1 ALGEMENE AANPAK

In dit experiment is gebleken dat verschillende PG's (op vlak van dominante algengeslachten, nitrificatie, macro-invertebraten) zich kunnen ontwikkelen op exact hetzelfde afvalwater (nieuw primair afvalwater). Aangezien maximale biodiversiteit werd gegarandeerd door een sterke inoculatie van algen en slib, kon dit niet het gevolg zijn van toeval. In elke FL waren immers op elk moment bijna 15 algengeslachten te tellen (zie *Tabel 11*). Enkel de dominantie ervan verschilde. Dit betekent dat het dragermateriaal een belangrijke rol speelde in de ontwikkeling van het perifyton. Dit werd ook reeds vermoed in EXP 1 waar bevonden werd dat *Cladophora* zich enkel ontwikkelde in de gestructureerde grasmatten.

Tabel 11 - De totale waargenomen diversiteit aan algen in EXP 3.

	Unicellulair	Kolonie	Filamenteus
Groenalgen	<i>Chlorella, Closterium,</i> <i>Casmarium¹, Carteria</i>	<i>Scenedesmus¹</i>	<i>Cladophora, Spirogyra,</i> <i>Zygnema, Ulothrix, Mougeotia</i>
Cyanobacteriën		<i>Gloeocapsa</i>	<i>Lyngbya, Calothrix</i>
Diatomeeën	<i>Synedra</i>		

¹*Van sommige geslachten werden 2 soorten onderscheiden*

In de volgende paragraaf worden de biologische eigenschappen van de PG's beschreven. In een navolgend deel worden de waterzuivering en de chemische eigenschappen van het perifyton beschreven. Er werd verwacht dat de PG een grotere invloed had op de waterzuivering en de chemische eigenschappen van het perifyton dan het dragermateriaal (of de FL) op zich. In *paragraaf 4.3.5, p54* wordt dit verband verder verduidelijkt.

4.3.2 PERIFYTON GEMEENSCHAP

In totaal werden drie diversiteitseigenschappen van perifyton onderzocht. Ze worden weergegeven in *Tabel 12*.

Tabel 12 – De opgevolgde biologische eigenschappen van het perifyton in EXP 3.

Eigenschappen perifyton	Indicator	Eenheid
Algendiversiteit	Dominante algengeslachten	/
Macro-invertebraten		Ja/Neen
Nitrificeerders	Maximale NO ₂ + NO ₃ tijdens een RUN	mg/L

De algengemeenschap werd microscopisch bepaald op basis van de dominantste soorten. In de FL's konden drie voorname ontwikkelingsstadia onderscheiden worden. In het laagste ontwikkelingsstadium werd de algengemeenschap gedomineerd door *Scenedesmus* en *Carteria*. In een tweede ontwikkelingsstadium werden, naast *Scenedesmus*, ook de filamenteuze *Calothrix* en kleine niet-geïdentificeerde eencelligen dominant (waarschijnlijk Cyanobacteriën, geassocieerd met *Calothrix*). In het hoogste ontwikkelingsstadium werd de algengemeenschap gedomineerd door grotere filamenteuze algen. In dit ontwikkelingsstadium zijn de filamenteuze algen ook een secundair dragermateriaal voor kleinere filamenteuze en unicellulaire algen. Hierdoor is de totale diversiteit in dit stadium heel hoog. De belangrijkste PG's worden weergegeven in *Tabel 13*.

De diversiteit en de kwantificering van heterotrofe bacteriën werd niet bepaald. Uit EXP 2 bleek namelijk dat de AI hiervoor geen duidelijke resultaten naar voor bracht. Flowcytometrische bepaling van de bacteriële gemeenschap bleek later wel mogelijk, maar werd te laat beschouwd in dit experiment. In een apart hoofdstuk wordt flowcytometrische bepaling van perifyton besproken (*hoofdstuk 5, p57*).

Tijdens de RUNS bleken sommige PG's grote hoeveelheden NO₃ en NO₂ te produceren. De som van de maximale NO₃ en NO₂ op een bepaald tijdstip in een RUN werd gebruikt als kwantitatieve maatstaf voor de activiteit van nitrificerende bacteriën. De aanwezigheid van macro-invertebraten is gebaseerd op visuele waarneming van muggen(larven).

De evolutie van de biologische diversiteit in de verschillende FL's wordt weergegeven in *Tabel 14*.

Tabel 13 – De kenmerken van de belangrijke PG's op basis van algendominantie in EXP 3.

	PG1 (begin)	PG2	PG3	PG4	PG5
Complexiteit	Eenvoudig	Complex			
Filamenteuze geslachten	<i>Calothrix</i>	<i>Zygnema</i>	<i>Cladophora</i>	<i>Lyngbya</i>	<i>Calothrix</i>
Unicellulaire geslachten	<i>Scenedesmus</i> <i>Carteria</i>	/	<i>Spirogyra</i> /	<i>Mougeotia</i> <i>Casmarium</i>	<i>Gloeocapsa</i>
Macrostructuur	Heel zwak valt uit elkaar	Zwak	Heel sterk, draadachtig	sterk, geleiachtig	Zwak

Tabel 14 – De soortensamenstelling van het perifyton bij elke RUN-FL combinatie in EXP 3. Links: de dominante PG. Midden: de maximale NO₃ + NO₂⁻ concentratie (mg/L) tijdens de RUN als indicator voor nitrificerende organismen. Rechts: de aan- of afwezigheid van veel macro-invertebraten.

		FL1			FL2			FL3			FL4		
RUN 1	DAG 3	PG1	1,2	/	PG1	1,2	/	PG1	2,1	/	PG1	2,6	/
RUN 2	DAG 10	PG1	0,7	/	PG1	3,0	/	PG1	4,2	/	PG1	1,9	/
RUN 3	DAG 16	PG1	0,2	/	PG1	1,8	/	PG4	3,6	/	PG1	6,4	/
RUN 4	DAG 30	PG1	1,4	M	PG3	1,7	M	PG4	2,6	M	PG1	6,3	M
RUN 5	DAG 42	PG2	0,1	/	PG3	2,6	/	PG4	5,6	/	PG5	9,3	/

PG1-PG5: zie Tabel 13. M: macro-invertebraten.

4.3.3 CHEMISCHE SAMENSTELLING VAN HET PERIFYTON

De chemische samenstelling van het perifyton werd gekarakteriseerd met behulp van het N- en P-gehalte. In *Tabel 15* wordt deze weergegeven voor elke RUN-FL-combinatie. Staalname van het perifyton gebeurde tijdens, net voor of net na de RUN.

Tabel 15 – Het N- en P-gehalte (g/kg DS) van het perifyton op elke RUN-FL combinatie in EXP 3. Links: het N-gehalte. Rechts: het P-gehalte.

	FL1		FL2		FL3		FL4	
	N	P	N	P	N	P	N	P
RUN 1			105,1	2,3	157,0	4,0		
RUN 2	85,4	2,8	73,5	2,9	105,5	2,6	86,7	1,6
RUN 3	83,4	2,8	70,8	3,0	97,3	4,1	65,6	3,9
RUN 4	71,0	2,7	45,7	2,3	92,5	2,5	81,4	2,2
RUN 5	99,1	4,0	60,8	2,3	69,2	3,2		

4.3.4 WATERZUIVERING

De waterzuivering van het perifyton werd gekarakteriseerd aan de hand van zes parameters. De waterzuiveringparameters werden reeds besproken in de proefopzet maar drie extra parameters werden toegevoegd, namelijk de evenwichtconcentratie van TSS, Kj-N en CZV. Ze worden weergegeven in *Tabel 16*.

Tabel 16 - De opgevolgde eigenschappen met betrekking tot de waterzuivering in EXP 3.

Eigenschappen waterzuivering	Indicator	Eenheid
Verwijdering opgeloste CZV	Opgelost CZV	g/m ² ·d
Verwijdering opgeloste N	Som van NO ₂ -N, NO ₃ -N en Kj – N	g/m ² ·d
Verwijdering opgeloste P	PO ₄ -P	g/m ² ·d
Evenwicht TSS	Gemiddelde turbiditeit vanaf evenwicht	NTU
Evenwicht opgelost Kj-N	Gemiddelde opgeloste Kj-N vanaf evenwicht	g N/L
Evenwicht opgelost CZV	Gemiddelde opgeloste CZV vanaf evenwicht	g O ₂ /L

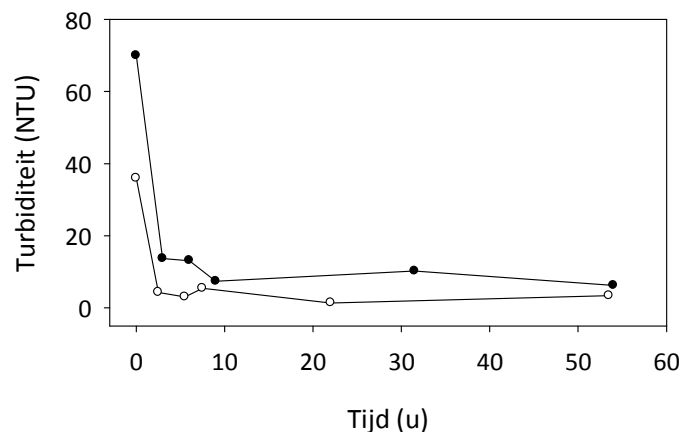
In *Tabel 17* wordt de verwijdering (g/m²·d) van opgeloste N (som van Kj-N, NO₃-N en NO₂-N), opgeloste P (PO₄-P) en opgeloste CZV weergegeven. Deze waarden zijn gebaseerd op de lineaire afname van N, P en CZV in het begin van de RUN.

Tabel 17 - De verwijdering (g/m²-d) van opgeloste N, P en CZV. Links: N-verwijdering. Midden: P-verwijdering. Rechts: CZV-verwijdering.

	FL1			FL2			FL3			FL4		
	N	P	CZV	N	P	CZV	N	P	CZV	N	P	CZV
RUN 1 ¹		0,43			0,40			0,29			0,39	
RUN 2	3,5	0,34	8,7	2,5	0,43	12,1	7,8	0,18	16,7	3,4	0,38	10,2
RUN 3	8,7	0,33	30,7	10,3	0,31	49,9	6,9	0,15	31,2	4,6	0,27	22,1
RUN 4 ¹												
RUN 5	5,6	0,15	0,06	4,5	0,08	71,0	8,7	0,14	66,8		0,057	89,9

¹ Onbrekende waarden door onvoldoende staal (RUN 1) of foutieve proefopzet (RUN 4).

Het TSS van het afvalwater werd heel snel weggefilterd door het perifyton, maar relatief snel na de start van een RUN trad een evenwicht in, waarschijnlijk tussen afslag van perifyton en herfiltratie van het afgeslagen perifyton. Aangezien de TSS van het afvalwater vaak al opgenomen was voor de tweede meting, kon deze afname niet goed bepaald worden (*Figuur 19*). Wel kon de gemiddelde evenwicht-TSS bepaald worden (vanaf de tweede meting van een RUN). Uitschieterende waarden werden hier niet meegerekend, aangezien deze het gevolg zijn van een heel grote plotse algenafslag en niet van een evenwichtsituatie.



Figuur 19 – De turbiditeitsafname in functie van de tijd in RUN 3 (●) en RUN 5 (○), FL2, EXP 3. De turbiditeit streeft naar een evenwicht van afslag en captatie van perifyton.

Uit observatie bleek dat de opgeloste Kj-N (in tegenstelling tot NO_x-N) ook een evenwichtspunt heeft. Dit betekent dat er waarschijnlijk evenveel N-exudaten worden uitgestoten dan er opgenomen worden. Dit evenwicht werd ook waargenomen bij CZV, maar niet bij PO₄-P.

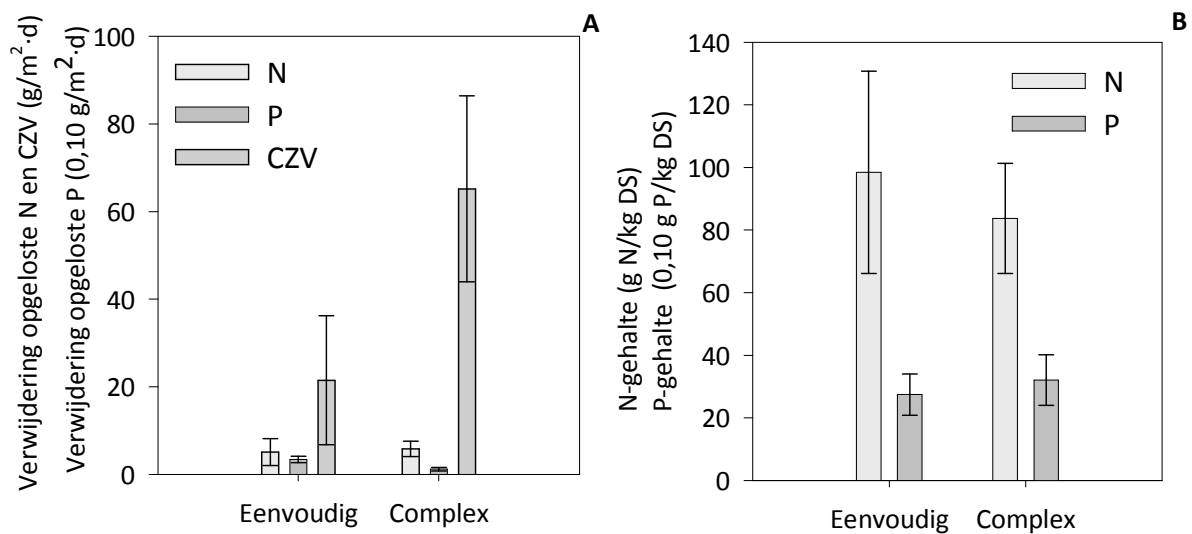
4.3.5 VERBAND TUSSEN PERIFYTON EN WATERZUIVERING

Hierboven werden in totaal vijf gemeenschappen beschreven op basis van biodiversiteit. Op basis van complexiteit kan deze ingedeeld worden in twee groepen, namelijk eenvoudig (PG1) en complex (PG2 tot 5). De karakteristieken van de waterzuivering worden beoordeeld voor deze twee groepen.

- OPNAME OPGELOSTE N, P EN CZV

In *Figuur 20 – A* wordt de opnamesnelheid van opgeloste N, P en CZV geïllustreerd. De opname van N was $5,8 \pm 3,2$ ($n = 7$) en $5,9 \pm 2,0$ ($n = 4$) $\text{g/m}^2\cdot\text{d}$ voor respectievelijk een eenvoudige en complexe gemeenschap. Voor P was dat $0,34 \pm 0,07$ ($n = 11$) en $0,12 \pm 0,04$ ($n = 5$) $\text{g/m}^2\cdot\text{d}$. Voor CZV was dat $13,9 \pm 5,5$ ($n = 5$) en $73,5 \pm 30,4$ ($n = 5$) $\text{g/m}^2\cdot\text{d}$. Dit duidt erop dat de P-opname significant hoger lag voor de eenvoudige gemeenschap en dat de CZV-opname significant hoger lag voor een complexe gemeenschap ($p < 0,05$). Voor de opname van N was er geen significant verschil.

PG4 blijkt een hogere opname van N te verwezenlijken dan de andere complexe gemeenschappen ($7,80 \pm 1,33$ ($n = 2$) tegenover $4,94 \pm 0,56$ ($n = 3$) $\text{g/m}^2\cdot\text{d}$). PG3 (de gemeenschap met *Cladophora*) had voor zowel N als P de laagste opnamesnelheid ($4,45$ en $0,084$ $\text{g/m}^2\cdot\text{d}$).



Figuur 20 – De verwijdering ($\text{g/m}^2\cdot\text{d}$) en het gehalte van N, P en CZV voor respectievelijk een eenvoudige en complexe PG in EXP 3. A: De verwijdering van opgeloste N, P en CZV uit het afvalwater. B: Het N- en P- gehalte van het perifyton.

In *Figuur 20-B* wordt het N- en P-gehalte geïllustreerd van een eenvoudige en een complexe gemeenschap. Er was geen significant verschil tussen het N- en P-gehalte van complexe en eenvoudige gemeenschappen. PG3 echter, leek wel een lager N- en P-gehalte (61 en $2,3$ g/kg DS) te hebben ten

opzichte van het totaal gemiddelde (90 ± 29 en $2,9 \pm 0,7$ ($n = 17$) g/kg DS). Zoals hierboven beschreven, had deze gemeenschap ook de laagste N- en P-verwijdering. Er wordt verwacht dat de hoge N- en P-verwijdering in een eenvoudige gemeenschapsgeedeeltelijk te wijten was aan een hogere groeisnelheid.

- EVENWICHT TSS

Voor een eenvoudige PG bedroeg de evenwichtsturbiditeit (indicator voor TSS) $11,9 \pm 5,6$ ($n = 17$) NTU. Indien macro-invertebraten aanwezig waren bedroeg deze $21,0 \pm 5,8$ ($n = 4$) NTU. Een complexe PG had gemiddeld een evenwichtsturbiditeit van $5,0 \pm 5,7$ NTU ($n = 5$). Zoals reeds visueel zichtbaar was, werd hiermee significant aangetoond ($p < 0,05$) dat eenvoudig periphyton veel gevoeliger was voor afslag dan stevig gebonden complex periphyton. Indien macro-invertebraten aanwezig waren was de evenwichtsturbiditeit significant hoger ($p < 0,05$) dan zonder macro-invertebraten.

In PG3 bedroeg de evenwichtsturbiditeit slechts $3,5 \pm 1,5$ NTU ($n = 3$, maar slechts gemeten voor één RUN), voor PG4 slechts $1,8 \pm 2,3$ NTU ($n = 6$, gemeten in twee RUNS). De fijnmazige structuur van PG3 fungeerde waarschijnlijk als een heel sterke filter en de geleiachtige structuur van PG4 liet waarschijnlijk heel weinig afslag toe.

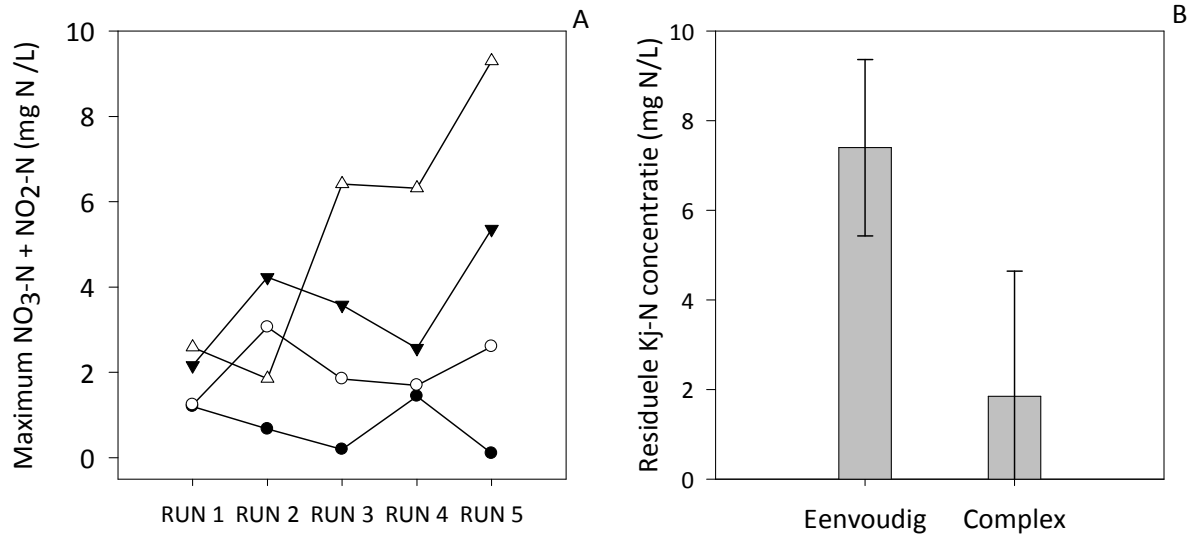
- NITRIFICATIE

Uit analyse van de maximale ($\text{NO}_3 + \text{NO}_2$)-N (een indicator voor nitrificatie in het periphyton) werd geen correlatie gevonden tussen de PG en nitrificatie. Het zou wel kunnen dat bepaalde PG's beter nitrificerende bacteriën behuizen, maar dit kan niet worden bevestigd door een tekort aan metingen.

Er lijkt gemiddeld wel meer nitrificatie naarmate het periphyton ouder is (*Figuur 21- A*). Dit weerspiegelt zich in een verschil tussen RUN 1 (jongst) en RUN 5 (oudst). De toename in functie van de groeitijd kunnen mogelijks verklaard worden door het feit dat nitrificerende organismen relatief traag groeien.

- EVENWICHT Kj-N

In een eenvoudige PG was de evenwichtsconcentratie van Kj-N $7,4 \pm 2,0$ mg/L ($n = 7$). In een complexe PG was dat $1,9 \pm 2,8$ ($n = 5$) mg/L. Dit duidt op een significant verschil tussen beide ($p < 0,05$) (*Figuur 21-B*).



Figuur 21 – Twee belangrijke invloeden rond N in EXP 3. A: Hoe ouder het perifyton, hoe meer nitrificatie. B: De residuele Kj-N concentratie is hoger voor een eenvoudige PG dan een complexe PG. FL1 (●), FL2 (○), FL3 (▼) en FL4 (Δ).

5 FLOWCYTOMETRISCHE KWANTIFICERING VAN DE BACTERIËLE GEMEENSCHAP IN PERIFYTON

Perifyton is een mengsel van bacteriën, algen, invertebraten en organisch residu. Zoals reeds vermeld is de AI de meest voorkomende index die gebruikt wordt als kwantitatieve maatstaf voor de diversiteit van het perifyton. Echter, hieruit valt niets rechtstreeks af te leiden over de bacteriële gemeenschap van het perifyton. Desalniettemin zou kennis hiervan wel nuttig zijn om een beter begrip van de werking van het perifyton te verkrijgen.

In de microbiologie kan de kwantitatieve bepaling van bacteriën uitgevoerd worden met behulp van flowcytometrie. Hoewel dit nooit eerder werd uitgeprobeerd op perifyton, lijkt dit ook hiervoor een mogelijke piste van toepassing aangezien perifyton voor groot deel uit bacteriën bestaat. Er werd een eigen werkwijze opgesteld om perifyton geschikt te maken voor flowcytometrische analyse. De werkwijze vertoont gelijkenissen met de procedure die werd opgesteld voor de flowcytometrische analyse van biofilmen (Williams et al. 1999). De test werd gedaan op het einde van EXP 3 (eind april) en kon dus niet gebruikt worden voor de interpretatie van EXP 1, 2 en 3.

5.1 WERKWIJZE

5.1.1 VERZAMELING VAN REPRESENTATIEVE STALEN

Op drie verschillende plaatsen in een FL werd perifyton opgezogen met een 10 mL spuit. Dit geconcentreerd staal werd geroerd in een grinder. Dit garandeerde een grote homogeniteit van de biomassa. Hieruit werd ± 1 gram natgewicht verzameld in een maatkolf en aangevuld tot 50 mL met medium C, zoals beschreven in *Materialen en methodes, hoofdstuk 3, p27*. Dit medium bevat geen CZV en bacteriën zodat geen interferentie hiervan met de bacteriën van het perifyton kon optreden.

Op de beschreven manier werden zes representatieve stalen gemaakt van het perifyton. Drie hiervan werden genomen uit FL1, de drie andere uit FL3, allemaal na de RUN 5 van EXP 3.

5.1.2 BEWERKING VAN HET STAAL

Het staal is nu een gesuspendeerd mengsel met kleine perifytonvlokken. In de volgende stap moet er voor gezorgd worden dat de bacteriën zoveel mogelijk losgekoppeld worden van de perifytonstructuur. Hiervoor werd het staal gedurende 10 minuten, bij 40°C, in een shaker gebracht. Hierna werd het staal kort gemixt en gesoniceerd met een Labsonic M-sonicator (B. Braun biotech International) gedurende 10 minuten (50 kHz, interval: 0,50). Deze stappen hebben normaal gezien geen significant negatieve gevolgen voor de overleving van de bacteriën (Williams et al. 1999). Om te hoge temperaturen tijdens de

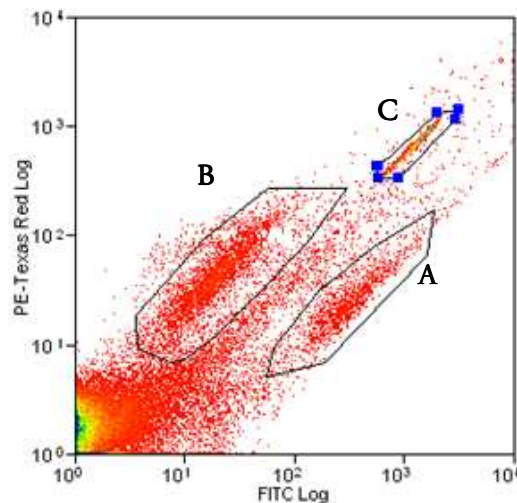
sonicatie te vermijden, werd het staal in een ijsbad geplaatst. Uit dit staal werd 5 mL genomen voor flowcytometrie en van de overige 45 mL werd de DS en VDS bepaald.

5.1.3 FLOWCYTOMETRIE

Het staal (5 mL) werd eerst over een filter (\varnothing 100 μ m) gebracht om verstopping in de flowcytometer te vermijden. Het gefilterd staal werd vervolgens 10 keer verdund met gefilterd (\varnothing 0,2 μ m) Evian water.

Van de bekomen suspensie werd 10 μ L genomen en aangelengd met 950 μ L gefilterd (\varnothing 0,2 μ m) Evian water, 20 μ L 500 mM Na₂EDTA.H₂O oplossing, 10 μ L beads (1064 beads/ μ L), 10 μ L sybr green (SG) oplossing (10 μ L SG in 990 μ L DMSO), 10 μ L propidiumiodide (PI) oplossing (10 μ L PI in 990 μ L DMSO) tot 1 mL analysestaal (dus 100 keer verdunning). Na 15 minuten inwerking van de kleurstoffen in het donker werd het staal geanalyseerd. De stalen werden geëxciteerd met monochromatisch licht van 488nm. De trigger werd gezet bij 0,03% Side Scatter (SS).

PI dringt enkel de dode cellen binnen, SG alle cellen. De fluorescente straling van SG werd gemeten bij de absorptiepiek van Fluoresceïne isothiocyanaat (FITC). De fluorescente straling van PI werd gemeten bij de absorptiepiek van PE texas RED (*Figuur 22*). Hierdoor konden de dode van de levende cellen onderscheiden worden. Elk staal werd 2 maal geanalyseerd om de fout op de flowcytometer zelf te controleren.

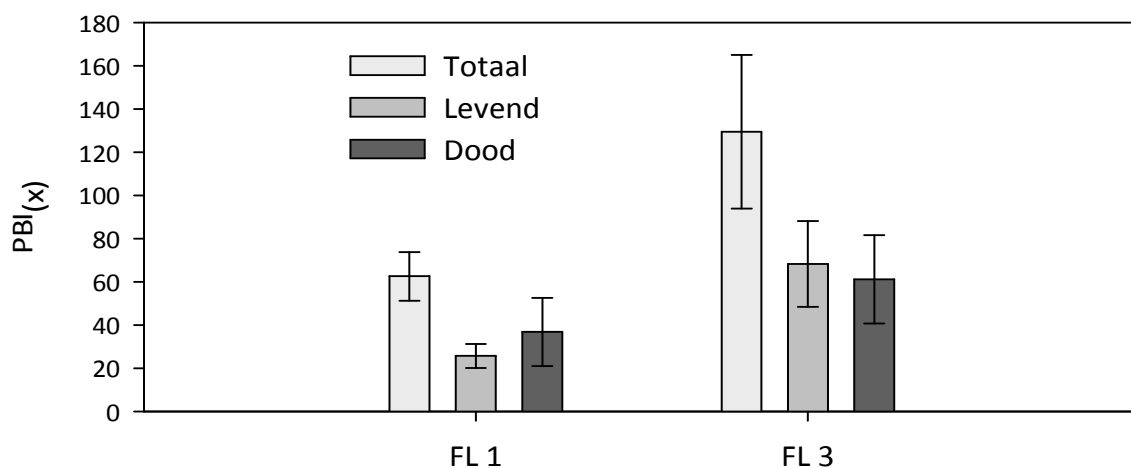


Figuur 22 - Het flowcytometrisch diagram van het perifyton van RUN 4, FL1, EXP 3. Zowel de levende bacteriën (A), de dode bacteriën (B) en de beads (C) zijn duidelijk waar te nemen.

5.2 WAARNEMINGEN

De uitdrukking van deze maatstaf gebeurt het best in # bacteriën per gram VDS want ze moet dienen om een idee te geven over het aantal bacteriën dat er aanwezig is in de levende biomassa, onafhankelijk van het as-gehalte. Uiteraard is uitdrukking in # bacteriën/g VDS behoorlijk onpraktisch, door het enorm hoog bereik waarbinnen deze waarde kan liggen. Er kan geopteerd worden voor een logaritmische maatstaf, maar $\text{LOG}(\# \text{ bacteriën/g VDS})$ is niet normaal verdeeld, waardoor de statistische beoordeling wordt bemoeilijkt. Daarom wordt de waarde best gedeeld door 10^9 . De maatstaf wordt vanaf nu aangeduid met de term 'Perifyton-bacterie-index' OF PBI. $\text{PBI} = (\# \text{ bacteriën/g VDS})/10^9$ of $(\# \text{ bacteriën/ng VDS})$. Indien het enkel levende of dode bacteriën betreft, wordt een subscript toegevoegd aan de index, respectievelijk PBI_L en PBI_D .

De standaardafwijking (σ) op de flowcytometrische analyse was gemiddeld 5,6; 4,4 en 8,1% ($n = 2$) voor respectievelijk de PBI, PBI_L en PBI_D . In *Figuur 23* worden de resultaten weergegeven voor FL1 en FL3 waarvoor de beschreven werkwijze werd uitgevoerd. De PBI, PBI_L en PBI_D voor FL1 bedroeg respectievelijk $62,6 \pm 11,3$; $25,7 \pm 5,6$ en $36,8 \pm 15,8$ ($n = 3$). Voor FL3 bedroegen deze waarden respectievelijk $129,6 \pm 35,6$; $68,3 \pm 19,9$ en $61,2 \pm 20,4$ ($n = 3$). Percentueel is de standaardafwijking hoger voor de PBI_L en PBI_D ten opzichte van de PBI, wat er op kan duiden dat het totaal aantal bacteriën consistent werd gekwantificeerd in de procedure, maar dat een deel van de levende bacteriën doodging waardoor een grotere fout op de levende en dode bacteriën optrad. In FL3 was zowel de PBI, PBI_L als PBI_D significant hoger als in FL1 ($p < 0,05$).



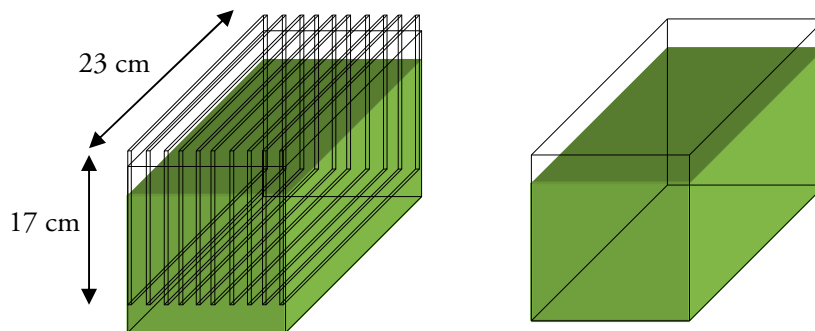
Figuur 23 – De Perifyton-Bacterie-Index (PBI) voor het totaal aan bacteriën, de dode bacteriën (PBI_D) en levende bacteriën (PBI_L), toegepast voor RUN 4, EXP 3.

6 LICHTHERVERDELING MET DOORSCHIJNENDE PLATEN

6.1 PROEFOPZET

In de literatuurstudie werd uitgebreid gerapporteerd over het probleem van foto-inhibitie en lage fotosynthetische efficiëntie bij hoge lichtintensiteiten (*Literatuurstudie, paragraaf 2.4.1, p19*). In dit experiment werd getest of plaatsing van verticale doorschijnende platen het licht beter kan herverdelen over een groter oppervlak, waardoor dit licht een hogere productiviteit kan teweegbrengen.

Twee bakken voor algenkweek (elk 4,5 L) werden naast elkaar en onder 400W gloeilampen (HPI-T plus, Philips) geplaatst. In de ene bak werden verticale doorschijnende platen aangebracht, in de andere bak werd dit niet gedaan (*Figuur 24*). De platen (170 · 230 · 4 mm) werden op 4 mm van elkaar geplaatst opdat voldoende doorstroming verzekerd kon worden.



Figuur 24 – De proefopzet voor de herverdeling van licht met behulp van doorschijnende platen

De bakken werden belucht voor optimale groeicondities en menging van het water. Twee verschillende algen en media werden uitgetest: *Chlorella* en *Phaeodactylum* (zoet- en zoutwater, respectievelijk medium A en B in *Materialen en methodes, hoofdstuk 3, p27*). Aangezien zoutwater neerslag veroorzaakte op de platen boven het vloeistofoppervlak, werd enkel verder gewerkt met zoetwater. Elke dag werd een staal genomen om de CZV van de algen te bepalen. Bij de bak met de platen werden de vastgehechte algen op de platen terug in suspensie gebracht, zodat een representatief staal van de totale biomassa kon genomen worden.

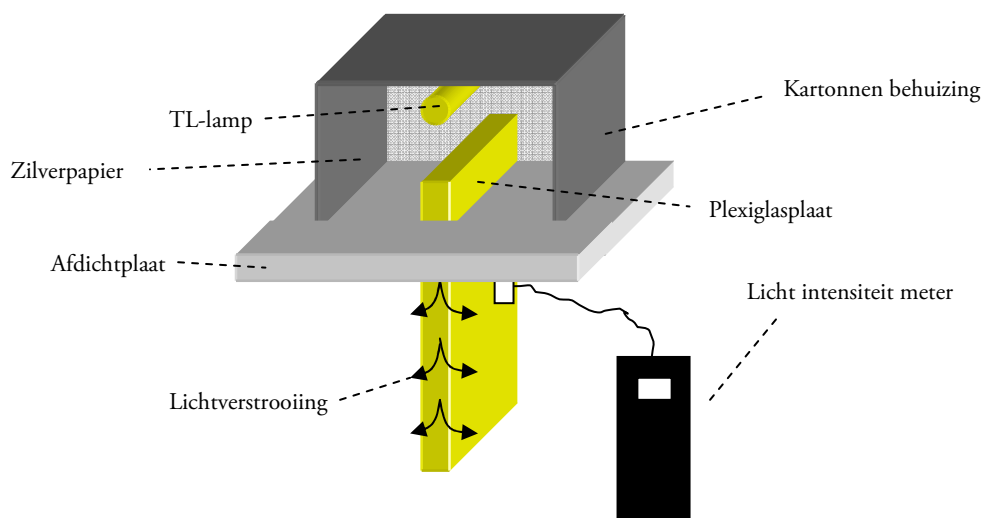
Een test duurde gemiddeld 8 dagen. Het medium werd 1 keer per test vervangen om nutriëntentekort te vermijden. Hierbij werd de helft van de algen weerhouden en in gelijke concentraties terug verdeeld over de twee bakken. Er werd een test ondernomen bij 300 PPS, 600 PPS en 1000 PPS.

6.2 VERSTROOIING VAN LICHT UIT DOORSCHIJNENDE PLATEN

Glas en een aantal plastics zoals PP, HDPE en plexiglas zouden kunnen gebruikt worden als materiaal voor de verticale platen. De materiaalanalyse hiervan was echter beperkt en vanuit praktische overweging (prijs, beschikbaarheid) werd gekozen voor plexiglas. Bovenaan werden de platen gepolijst om een goede lichtinval te verkrijgen en weerkaatsing aan het invaloppervlak te voorkomen. Aan de zijkant werd een verruwing aangebracht om een goede lichtverstrooiing in het water te hebben. De platen werden gemaakt door Stokvis Plastics (Gent).

Er werd een subtest opgesteld om de verruwing van het oppervlak te optimaliseren. In een eerste methode werden diffuse tapes geplakt op de plexiglasplaat (T1 en T2). In een tweede methode werd de plaat langdurig geschuurd (SP). Een onbehandelde (doorzichtige) plexiglasplaat (OP) diende als referentie.

De proefopstelling wordt geïllustreerd in *Figuur 25*. Een 10 W TL-lamp werd boven de verruwde plaat gehangen en werd volledig afgesloten van de omgeving door een kartonnen behuizing rondom en een afdichtplaat onderaan. Aan de binnenkant van de kartonnen behuizing werd zilverpapier aangebracht om lichtinval vanuit alle richtingen in de platen te hebben (door weerkaatsing van het zilverpapier). De lichtintensiteit (PPS) werd vervolgens op 3 cm, 8 cm en 13 cm diepte onder de afdichtplaat gemeten, horizontaal naar de verruwde plaat toe en de lichtpenetratie werd helemaal onderaan gemeten, vertikaal naar de verruwde plaat toe. Dit werd gedaan in een geheel donkere ruimte, zodat de gemeten lichtintensiteit volledig afkomstig was van de verruwde plaat. De dimensies van de plaat waren 17cm · 23cm · 4 mm. De afdichtplaat was 0,5 cm dik en de doorschijnende plaat kwamen 2,5 cm boven en 14 cm onder de afdichtplaat uit.



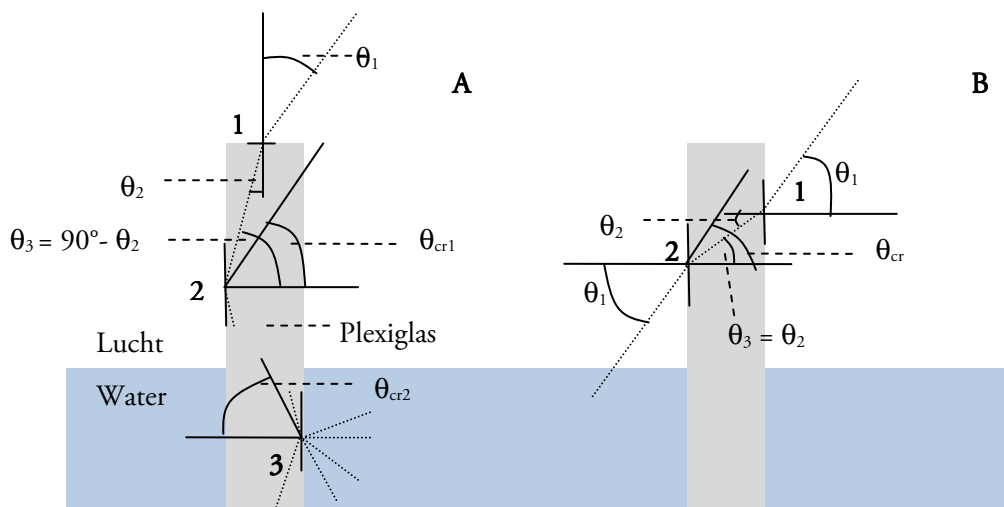
Figuur 25 – De proefopzet voor de meting van de lichtverstrooiing uit een doorschijnende plaat en de lichtpenetratie door een doorschijnende plaat.

6.3 THEORETISCH VOORDEEL VAN DOORSCHIJNENDE PLATEN

De theoretische achtergrond is behoorlijk complex maar wordt hieronder vereenvoudigd uitgelegd aan de hand van *Figuur 26-A en B*.

Indien een lichtstraal (stippenlijn) vanuit een medium met kleine brekingsindex (n_1) aan het scheidingsoppervlak komt van een medium met een grotere brekingsindex (n_2), dan breekt het licht naar een kleinere hoek t.o.v. de normaal. Van lucht ($n = \pm 1$) naar plexiglas ($n = 1,51$) wordt het licht omgebogen van θ_1 naar θ_2 (*punt 1*).

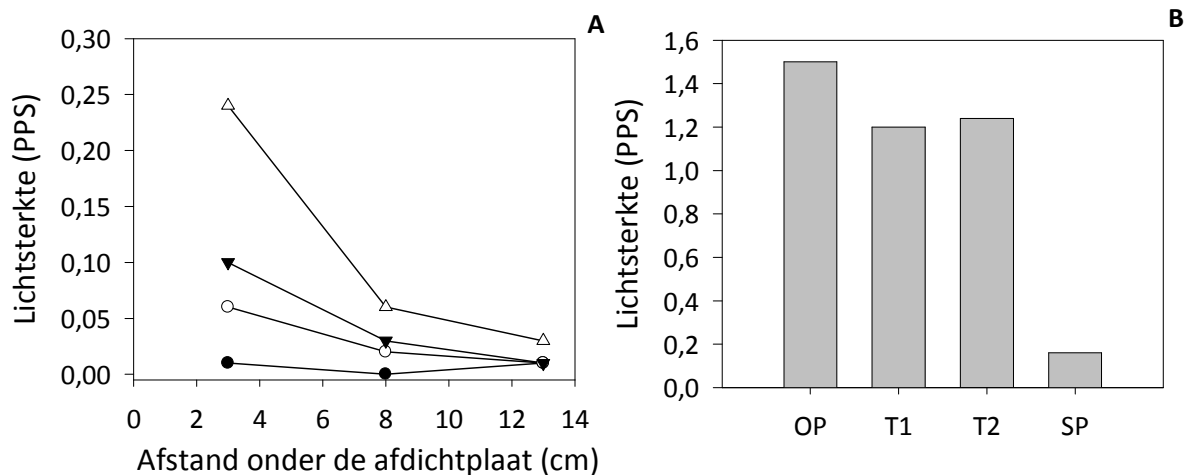
Als het licht daarna vanuit een medium met een grote brekingsindex aan het scheidingsoppervlak van een medium met kleinere brekingsindex komt, dan kunnen 2 fenomenen gebeuren, afhankelijk van de grootte van hoek θ_3 . Indien $\theta_3 < \theta_{cr1}$, dan breekt dit licht terug uit het plexiglas en komt aldus tot een hoek θ_1 uit de plaat (*Figuur 26-B, punt 2*). Indien $\theta_3 > \theta_{cr1}$, dan treedt volledige interne weerkaatsing op en blijft het licht gevangen in het plexiglas (*Figuur 26-A, punt 2*). Indien het licht aan het ruwgemaakte scheidingsoppervlak water-plexiglas komt (*Figuur 26-A, punt 3*), dan is de richting van het oppervlak ten opzichte van de lichtstraal anders (als direct gevolg van de verruwing) en kan θ zowel groter als kleiner zijn als θ_{cr} . Een deel van het licht gaat dan verloren uit de platen (bedoeling van deze test). Bij een geconcentreerde algencultuur penetreert het licht slechts in de bovenste laag van de algencultuur. Indien het volledige volume van de reactor door middel van de platen wordt belicht, dan kan theoretisch de productiviteit hoger zijn.



***Figuur 26* – Het theoretisch gedrag van het licht in een verruwde doorschijnende plaat in contact met water.**

6.4 WAARNEMINGEN

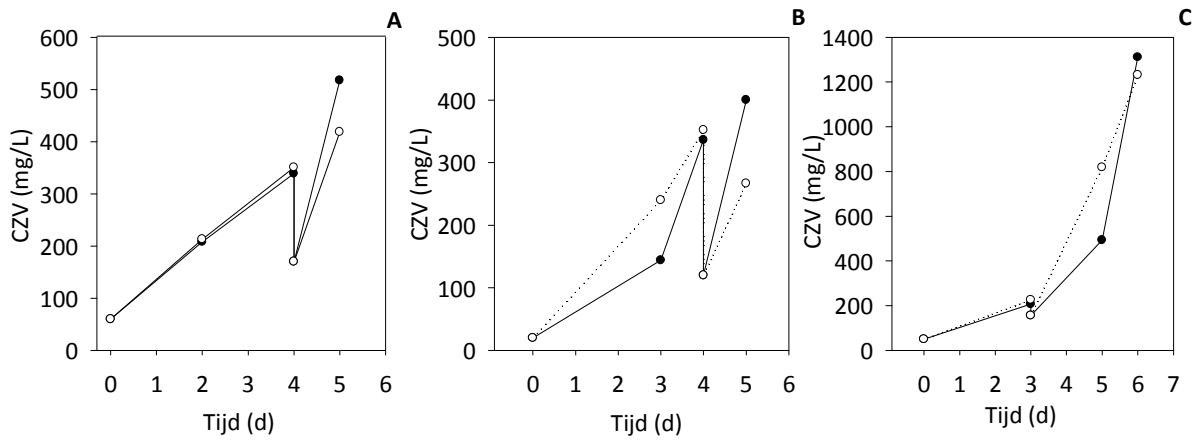
In *Figuur 27* wordt het gedrag van het licht in de drie verruwde platen + referentie verduidelijkt. Hieruit blijkt dat de geschuurde plaat (SP) veruit de meest optimale condities vertoont. Er is weinig licht dat helemaal de onderkant bereikt en de zijwaartse verstrooiing is er het grootst. Alle platen voor de hoofdttest werden bijgevolg geschuurd.



Figuur 27 - Het gedrag van licht in de vier geteste platen. A: De horizontale lichtverstrooiing op 3, 8 en 13 cm onder de afdichtplaat. OP (●), T1 (○), T2 (▼) en SP (Δ). B: De penetratie van licht onderaan de plaat.

De hoofdttest werd slechts eenmaal uitgevoerd bij 300 PPS, 600 PPS en 1000 PPS. Zowel temperatuurscontrole, de beluchting als de verversing van het medium werden niet consistent uitgevoerd voor de verschillende lichtintensiteiten. Wel kon vergeleken worden of bij een bepaalde lichtintensiteit de bak met de doorschijnende platen beter functioneerde dan die zonder platen (hoewel niet statistisch). In *Figuur 28* wordt de toename van CZV getoond voor 300, 600 en 1000 PPS. Deze figuur geeft aan dat, in het begin van elke test, de bak zonder platen beter functioneerde, hoewel dit verschil niet groot is. In het begin is de concentratie aan *Chlorella* nog laag, waardoor het licht invalt over de hele diepte van de bakken. De platen verloren waarschijnlijk een deel van het invallend licht door weerkaatsing aan het invaloppervlak met als gevolg een iets lagere productiviteit. In het tweede deel van de test (na mediumverversing) is de productiviteit bij de drie lichtintensiteiten hoger voor de platen. Het voordeel van lichtherverdeling weegt dan waarschijnlijk op tegen het verlies van licht met als gevolg een hogere productiviteit bij de platen.

DEEL III - RESULTATEN



Figuur 28 – De toename van CZV met of zonder doorschijnende platen. Bak met platen (●) en bak zonder platen (○). Na 3 tot 4 dagen werd het medium verversd en op gelijke concentratie *Chlorella* gebracht. A: 300 PPS. B: 600 PPS. C: 1000 PPS.

7 ONDERSTEUNENDE TESTEN

7.1 VERBLIJFTIJDSDISTRIBUTIE DRAGERMATERIALEN

7.1.1 THEORETISCHE ACHTERGROND

Voor de achtergrond van deze test wordt verwezen naar *hoofdstuk 2, p34*. Het is de bedoeling om de verblijftijdsdistributie van het water over het dragermateriaal te gebruiken als een kwantitatieve benadering van het stroomprofiel van water doorheen een dragermateriaal. Er wordt verondersteld dat een tortueuze pad van het water door het dragermateriaal een hogere interactie van water en nutriënten bewerkstelligd. De tortuositeit τ kan gedefinieerd worden als:

$$\tau = \frac{L}{C} \quad (3)$$

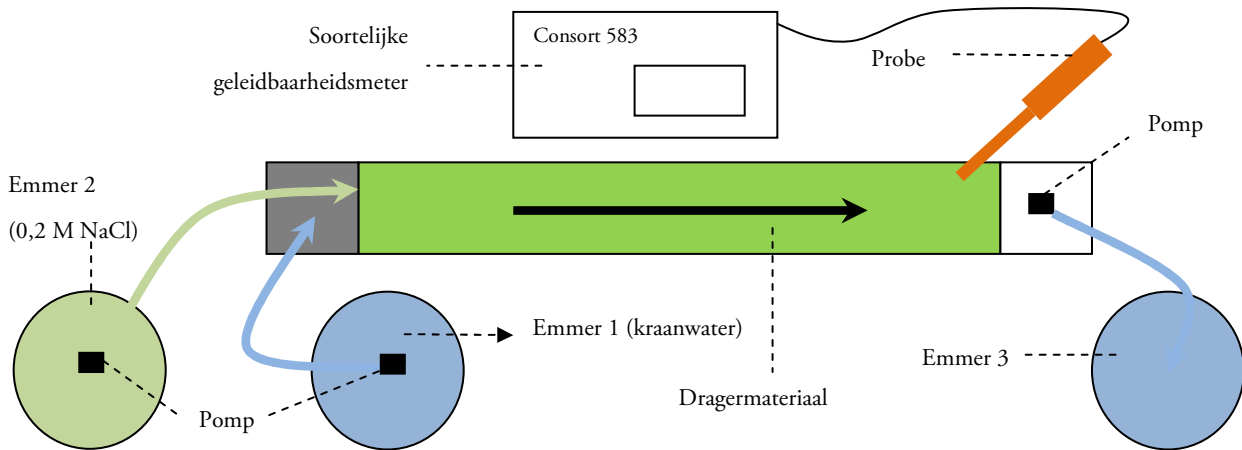
Met L de afgelegde afstand en C de kortstmogelijke afstand tussen begin- en eindpunt (Epstein 1989).

Hoe breder de verblijftijdsdistributie, hoe langer de afgelegde weg en hoe tortueuzer het pad van het water. Hoe symmetrische de verblijftijdsdistributie, hoe minder selectieve stromen er zijn.

7.1.2 PROEFOPZET

Het karakteriseren van de verblijftijdsdistributie werd gedaan aan de hand van een 0,2 M NaCl-oplossing. Dit werd in de FL's zelf uitgevoerd met de dragermaterialen erin en voor dat er periphyton in groeide. Een zoutpuls in het begin van de FL werd gevolgd door soortelijke geleidbaarheidsmeting op het einde van de FL. De proefopzet wordt weergegeven in *Figuur 29*. Kraanwater (500 $\mu\text{S}/\text{cm}$) vloeit vanuit emmer 1 over het dragermateriaal in de FL-incubator. Vanaf $t = 0$ wordt dit water 5 seconden vervangen door de zoutoplossing ($\pm 10000 \mu\text{S}/\text{cm}$), aangevoerd vanuit emmer 2. Op $t = 5$ wordt terug overgeschakeld op het kraanwater van emmer 1. Aan de andere kant van de FL wordt de soortelijke geleidbaarheid σ ($\mu\text{S}/\text{cm}$) gemeten en wordt het water overgepompt naar emmer C.

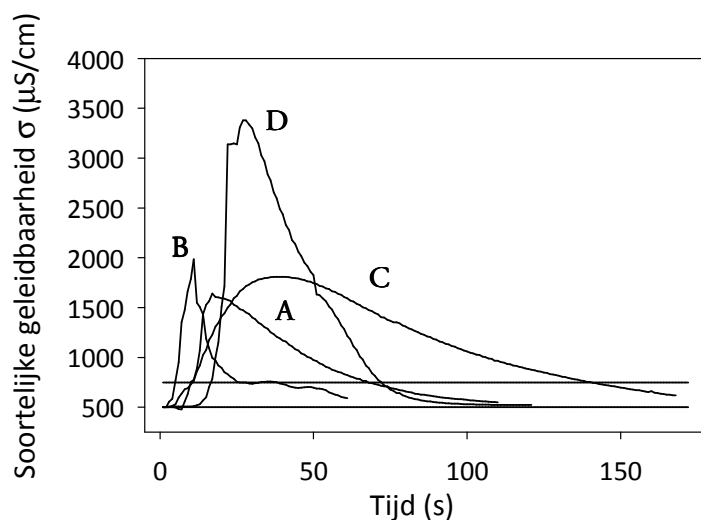
De vier verschillende dragermaterialen van EXP 1 worden getest: het vlakke dragermateriaal, het gaas, grasmat 1 en grasmat 2. Het aangebracht debiet (Q) is aangepast aan het dragermateriaal, zoals beschreven in EXP 1 (*hoofdstuk 2, p34*), namelijk 80L/h voor alle dragermaterialen behalve in grasmat 2 waar het debiet 160 L/h is.



Figuur 29 – De proefopzet voor de bepaling van de verblijftijdsdistributie.

7.1.3 WAARNEMINGEN

Alle distributies vertonen een asymmetrisch stroomprofiel (*Figuur 30*). Dit betekent dat er waarschijnlijk selectieve stromen optreden waarbij een deel van het water over het dragermateriaal stroomt in plaats van door het dragermateriaal. De piekbreedte wordt gedefinieerd als de tijd die nodig is om de σ terug te laten zakken tot $750 \mu\text{S}/\text{cm}$. Het duurt immers te lang voordat de σ helemaal terugvalt tot $500 \mu\text{S}/\text{cm}$. De piekbreedte van grasmatt 2 moet worden verdubbeld omdat het debiet hier 2 keer groter was (ter vergelijking met de andere dragermaterialen). Grasmatt 1 (138s) is het meest tortueus gevolgd door grasmatt 2 (met verdubbeling: 110s), het gas (57s) en het platte oppervlak (23s).



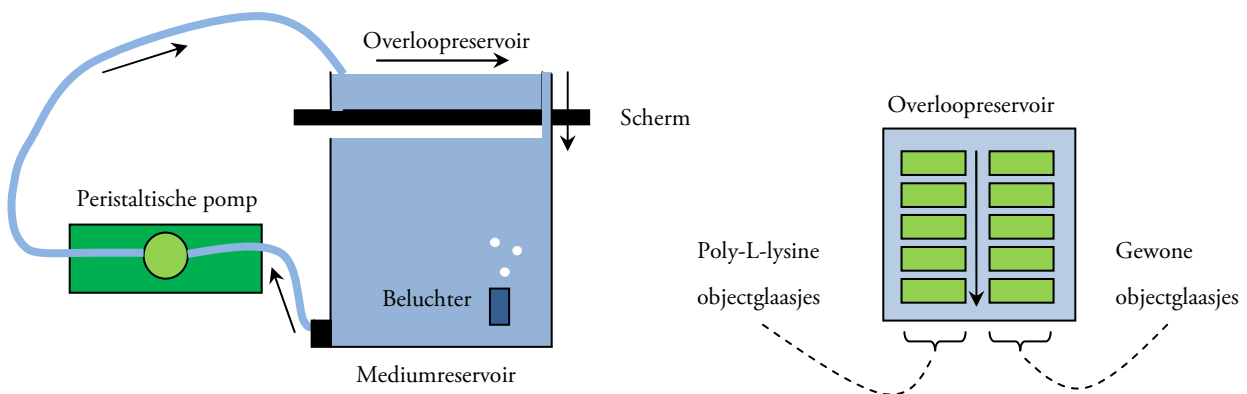
Figuur 30 - De verblijftijdsdistributie voor de verschillende dragermaterialen. gas (A), vlak (B), grasmatt 1 (C) en grasmatt 2 (D)

7.2 POLY-L-LYSINE EN GEWONE OBJECTGLAASJES

7.2.1 PROEFOPZET

Deze test kadert binnen EXP 2 (*hoofdstuk 3, p 39*). Objectglasjes werden er gebruikt als dragermateriaal van perifyton, omdat deze makkelijk toelaten de productiviteit te bepalen (door weging van de objectglasjes voor en na de groei). In deze test werd onderzocht of poly-L-lysine-objectglasjes betere aanhechting van perifyton toelaten dan gewone glazen objectglasjes. Dit werd mogelijk geacht aangezien het kationisch polymeer poly-L-lysine (PLL) aanhechting van negatief geladen deeltjes zoals bacteriën toelaat (Colville et al. 2010). Aangezien de FL-incubator in gebruik was voor EXP 1, werd hiervoor een verkleinde testincubator gebouwd. Het is van groot belang dat ook hier een stromend waterprofiel wordt voorzien want enkel dan bindt perifyton zich goed aan een dragermateriaal.

De testincubator wordt geïllustreerd in *Figuur 31*. In het overloopreservoir groeit het perifyton. Er werden 5 PLL en 5 gewone objectglasjes geplaatst. Van daaruit stroomt het water over naar het donker mediumreservoir (afgesloten door het scherm). Dit reservoir dient voor beluchting en als voldoende grote reserve aan nutriënten zodat het medium minder moeten worden ververst. De pomp (20L/u) pompt het medium terug naar het overloopreservoir. De test liep van 3/11 tot 2/12 (DAG 1 tot 29).



Figuur 31 – Het zij- en bovenaanzicht van de testincubator

De aanhechtingsterkte werd relatief gemeten. Hiervoor werd een schuifspanningreactor gebouwd. Deze werd reeds beschreven in EXP 2 (*paragraaf 3.3, p41*). Voor deze test werden de volgende debieten gehanteerd: 300L/h, 500L/h en 800L/h telkens 10s. De interpretatie van de test werd gedaan op dezelfde manier zoals beschreven in *paragraaf 3.3, p41*.

7.2.2 WAARNEMINGEN

Deze test vertoonde geen significant verschil vertoont tussen PLL en gewone objectglasjes, noch bij visuele waarnemingen voor afslag, noch bij metingen voor lichtdoorlaatbaarheid. Voor EXP 2 worden gewone objectglasjes aangewend voor de proef.

7.3 CHLOROFYLEXTRACTIE

7.3.1 PROEFOPZET

In EXP 2 werd het gehalte aan chl a bepaald om de AI te berekenen (*paragraaf 3.5.1, p42*). In deze subtest wordt de chlorofylextractie geoptimaliseerd voor het perifyton.

Chlorofylextractie kan gedaan worden met tal van solventen (aceton, methanol, ethanol, dimethylformamide, dimethylsulfonide, chloroform, etc.) en tal van mechanische breekmethoden (sonicator, bead beater, grinder, etc.) aangewend. Wat betreft de eigenlijke analyse, zijn zowel fluorometrische, spectrofotometrische en HPLC-gebaseerde technieken mogelijk.

In deze subtest werd gekozen voor spectrofotometrische analyse bij 664, 665 en 750nm. De extractie werd onderzocht voor drie solventen ($\geq 99\%$ dimethylformamide, 90% aceton/10% verzadigd MgCO_3 -oplossing en $\geq 99,9\%$ methanol) en twee destructiemethodes (*bead beater* en sonicator). Dit zijn zes combinaties die elk drievoudig (in totaal 18 stalen dus) werden getest op chl a en feofytine (primaire afbraakproduct van chl a). De stalen werden volumetrisch uit één staal verdeeld. Hierdoor waren alle stalen even groot en werden enkel de massa's bepaald van de pigmenten. Een hoge relatieve chl a-concentratie betekent een goede extractie van het aanwezige chl a of een lage omzetting van het geëxtraheerde chl a naar feofytine gedurende de procedure.

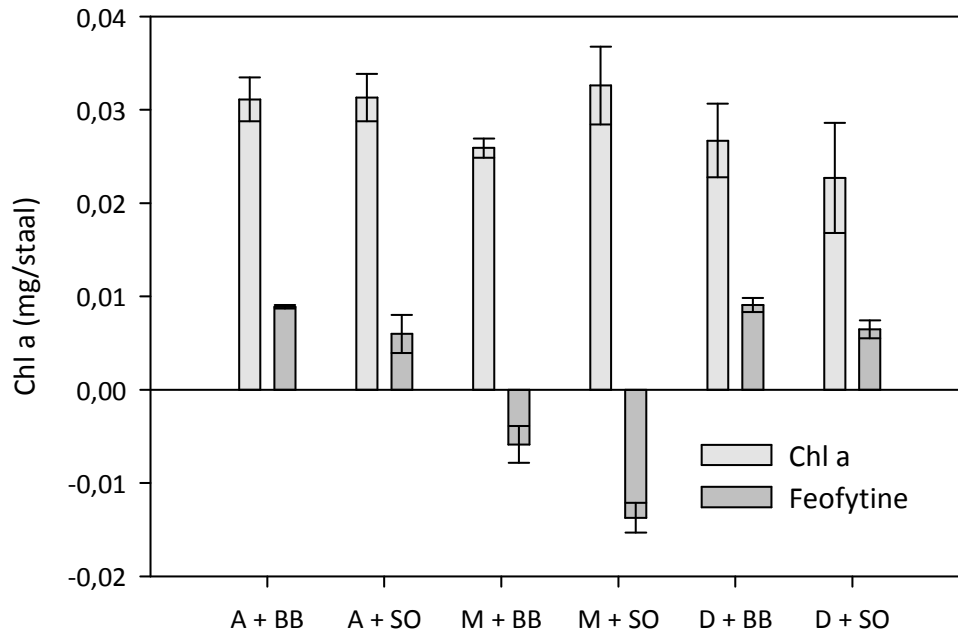
De *beads* van de BB waren glasparels van 4mm diameter. De BB werd 3 * 90 seconden aangezet per staal met een tussenpauze van 10 seconden. De sonicator werd 300s gebruikt bij een amplitude van 0,7 en een interval van 70%. Behalve de solventen en breekmethode's, werd de rest van de extractie uitgevoerd volgens de procedure van de American Public Health Association (APHA 1985).

7.3.2 WAARNEMINGEN

De resultaten van de chlorofylextractie worden weergegeven in *Figuur 32*. Hieruit bleek dat de extractie met methanol niet gelukt is, want negatieve feofytinewaarden werden bekomen. Bovendien waren de pieken van de spectrofotometer heel onnauwkeurig en breed. De reden hiervoor werd niet gevonden.

DEEL III - RESULTATEN

Aceton verkreeg gemiddeld hogere chl a-concentraties dan dimethylformamide. De standaardafwijking was ook kleiner. Echter, hierin was geen significant verschil. Evenmin was er een significant verschil tussen de sonicator en de bead beater. Voor de bepaling van de AI in EXP 2 (*paragraaf 3.5.1, p42*) werd gebruik gemaakt van de sonicator en aceton als destructie- en oplosmiddel.



Figuur 32 - De gemiddelde concentratie van Chl a en Feofytine voor verschillende solventen en destructiethodes (n = 3). Solventen: aceton (A), methanol (M) en dimethylformamide (D). Destructiethodes: bead beater (BB) en sonicator (SO).

DEEL IV
DISCUSSIE

1 METHODES

1.1 AUTOTROFE INDEX

De autotrofe index (AI) wordt door de American Public Health association (APHA) beschouwd als dé methode om iets te leren over de verhouding heterotrofen/autotrofen in perifyton (APHA 1985). In EXP 2 werd deze uitgebreid bepaald. Hieruit kon echter geen relevante informatie gehaald worden. Waarschijnlijk werden de stalen niet optimaal bewaard voor analyse en werd een groot deel van het chlorofyl a omgezet in feofytine tijdens de bewaring. Nochtans heeft deze techniek, zelfs bij correcte determinatie, zijn beperkingen. Dit komt omdat het chl a-gehalte heel sterk afhankelijk is van de groep waartoe de algen behoren en de omgevingsomstandigheden waarin deze zich bevinden (Richmond 2004). Ten tweede zegt deze methode niets over de verhouding tussen organische residu, invertebraten en bacteriën.

1.2 FLOWCYTOMETRIE

Flowcytometrie werd voorgesteld als een techniek die kan dienen om de microbiële gemeenschap van het perifyton te kwantificeren. De werkwijze ter voorbereiding van het analysestaal werd gedeeltelijk gebaseerd op die van flowcytometrische kwantificatie van biofilmen (Williams et al. 1999). Er bleek dat de gebruikte methode precieze resultaten met zich meebracht en dat deze dus een waardevolle maatstaf kan vormen voor de microbiële gemeenschap in perifyton. Het aantal bacteriën per gram VDS (#/g VDS) is een heel groot getal en daarom werd dit gedeeld door 10^9 . Zo werd de toepasselijke Perifyton-Bacterie-Index (of PBI) in het leven geroepen, voor dode en levende bacteriën respectievelijk PBI_D en PBI_L .

De werkelijke waarde van deze nieuwe parameters hangt af van zijn toepassingsgebied. Uiteraard kan gezocht worden naar zijn toepassing in een ATS. De PBI_L kan bijvoorbeeld een indicatie geven over de CZV-opname met behulp van perifyton. De verhouding levende ten opzichte van dode algen kan potentieel een indicatie geven over de algemene gezondheidstoestand van het perifyton en dit kan in verband staan met aanwezigheid van toxische stoffen in het afvalwater of de opkomst van invertebraten. Echter, indien een ATS wordt gekaderd binnen een gedecentraliseerde waterzuivering in het zuiden, is het onrealistisch om overal de nodige expertise en installaties (flowcytometer) te voorzien.

Andere toepassingen kunnen gezocht worden in de analyse van natuurlijke ecosystemen, perifyton in aquacultuur, etc.

2 LICHTHERVERDELING

Algen hebben een lage fotosynthetische efficiëntie bij hoge lichtintensiteit (zie *Literatuurstudie, paragraaf 2.4.1, p19*). Indien de efficiëntie even hoog zou zijn bij hoge lichtintensiteit als bij lage, zou de algenproductiviteit enorm kunnen zijn bij vol zonlicht. Sinds een halve eeuw probeert men daarom deze efficiëntie te verhogen (Burlew 1953). Eén van de minst onderzochte methodes hiervoor is herverdeling van licht over een groter oppervlak zodat de lichtintensiteit over dit oppervlak verlaagd wordt en de totale productiviteit verhoogt. Een aantal strategieën werden hiervoor reeds uitgetoetst, zoals het gebruik van een fresnel lens in combinatie met diffuse glasvezels (Mori 1985) of een fresnel lens in combinatie glazen staven (Pulz et al. 1995), het gebruik van fosforescerende parels en van conische reactoren (Morita et al. 2000). Verschillende van deze technieken bleken een verhoging van de productiviteit te verwezenlijken, maar werden economisch niet rendabel geacht (Richmond 2004).

In dit proefwerk werd een poging ondernomen met een nieuw reactor ontwerp aan de hand van lichtverstrooiing in verticale doorschijnende platen. Hoewel deze test slechts een eerste verkenning was zonder herhaling, werd zoals theoretisch voorspeld een hogere productiviteit waargenomen vanaf een bepaalde dichtheid aan algen (tot 50% stijging in de test bij 600PPS).

Een aantal problemen doken echter op met betrekking tot de platen. Zo werden ze heel makkelijk vuil aan de bovenkant, waardoor deze op heel regelmatige basis moesten worden gekuist om maximale lichtinval te garanderen. Algen hechtten zich ook vast aan de verruwde platen en moesten telkens terug in suspensie gebracht worden om de CZV te kunnen meten (ter bepaling van de productiviteit). Een mogelijke oplossing voor dit laatste probleem is het aanbrengen van een algenafstotende laag bovenop de ruwe laag.

De doorzichtige mat die gebruikt werd in EXP 3 was in eerste instantie ook bedoeld om na te gaan of licht in deze mat dieper kon indringen om de performantie van het perifyton te verhogen. Voor zover bekend werd dit nog nooit geprobeerd. Jammer genoeg waren de mogelijkheden in de productie van de mat beperkt. De vezels waren te dun voor voldoende lichttransport en een aantal toxische stoffen die niet konden weggelaten worden in het productieproces hadden mogelijk ook een toxische werking tijdens het experiment. Hierdoor is het niet duidelijk of doorzichtige matten een meerwaarde kunnen bieden aan de ontwikkeling van perifyton.

3 PERIFYTON-INCUBATOR

3.1 OPBOUW & WERKING

De perifyton-incubator bleek in staat tot onderzoek naar waterzuivering door middel van perifyton. Zowel de eigenschappen van het water als de eigenschappen van het perifyton konden nauwkeurig worden bijgehouden. Indien gestructureerde dragermaterialen (grasmatten) aanwezig waren, was het echter niet mogelijk om de productiviteit te bepalen. Hiervoor was de oppervlakte te klein. De inzet van de automatische volumeregelaar en afvoerkraan bleek ook heel effectief. Enkele veranderingen in de algemene opbouw zouden wel de relevantie van de metingen kunnen verhogen.

1. De lichtintensiteit afkomstig van de lamp was 150 PPS maar door omgevingslicht liep de totale lichtintensiteit soms op tot veel hogere waarden. Het zou beter zijn om de incubator af te sluiten van extern licht om het effect van licht op de pH, OZ en nutriëntenopname nauwkeuriger te karakteriseren.
2. Het opvangbekken en overloopbekken waren groot in verhouding met het water dat in contact stond met het perifyton. Om zeker te zijn dat de waterzuivering in het perifyton gebeurt en niet in het water zelf zou het beter zijn om het volume in deze bekkens te beperken.
3. De waterzuivering gebeurde in batch waardoor de waterzuivering discontinu verliep. Aangezien de incubatietijd van het afvalwater langer was dan de tijd die nodig was om de nutriënten uit het water te halen, werd dit na mediumverversing mogelijks gecompenseerd met een overopname van nutriënten. De mogelijkheid hiertoe werd beschreven in (Richmond 2004). In dat geval was er sterke overschatting van de verwijdering van nutriënten. Het zou beter zijn om met een continu systeem te werken, waarbij permanent afvalwater wordt toe- en afgevoerd. De afvoer van het afvalwater zou dan gecompenseerd kunnen worden door automatische toevoer van vers afvalwater met behulp van communicerende vaten.

3.2 KEUZE AFVALWATERS

In de perifyton-incubator werden 3 synthetische huishoudelijke afvalwaters gebruikt: conventioneel primair, nieuw primair en conventioneel secundair. Synthetische afvalwaters maken het mogelijk de waterzuivering nauwkeurig te karakteriseren. Nieuw primair afvalwater werd zelf samengesteld door de hele CZV-fractie (inclusief ammoniumacetaat en ureum) van conventioneel primair afvalwater met 60% te verlagen. Echter, hierbij werd onvoldoende rekening gehouden met de eigenlijke redenering achter deze verlaging, i.e. een heel sterke primaire zuivering die voornamelijk de TSS-fractie weerhoudt en in mindere mate de opgeloste CZV, N en P (zie *Literatuurstudie, paragraaf 1.5.3, p14*). Een juistere samenstelling

van dit afvalwater zou zijn 120mg/L CZV (voornamelijk opgelost), 50 mg/L Kj-N en 9mg/L PO₄-P in plaats van de gebruikte 200mg/L CZV (de helft opgelost), 25mg/L Kj-N en 9mg/L PO₄-P.

3.3 KEUZE DRAGERMATERIALEN

De keuze van de gestructureerde dragermaterialen was gebaseerd op theoretische voordelen die verbonden konden zijn aan deze dragermaterialen. Grasmatten leken de ideale oplossing om de specifieke oppervlakte van het dragermateriaal en de interactie tussen perifyton en afvalwater te verhogen zonder dat de oogst van perifyton werd bemoeilijkt (het zijn open structuren). In EXP 1 en 3 werd echter vastgesteld dat de kolonisatie van perifyton trager liep op de grasmatten dan op de andere dragermaterialen. Dit was mogelijks het gevolg van uitscheiding van toxische stoffen uit de grasmatten of te dunne vezels voor perifytanaanhechting. Bij verder onderzoek moet hier rekening mee gehouden worden.

De objectglasjes in EXP 2 werden gebruikt om de productiviteit van het perifyton in te schatten. Dit bracht veel perifytonafslag met zich mee waardoor een onderschatting van de reële waarde werd bekomen. Plastieken objectglasjes zijn minder amorf en zouden betere aanhechting van het perifyton kunnen toelaten. Echter, dit gaat enkel voor eenvoudige perifyton gemeenschappen.

3.4 WERKWIJZE

De werkwijze met betrekking tot de perifyton-incubator bestond erin om op regelmatige tijdstippen stalen te nemen, zowel van het perifyton als van de waterkwaliteit. Het perifyton werd echter niet systematisch geoogst. Het zou beter zijn dit wel te doen zodat het perifyton zich steeds in hetzelfde ontwikkelingsstadium bevindt en de waterzuivering meer constant is. Door op regelmatige tijdstippen te oogsten wordt bovendien de natuurlijke rol van invertebraten overgenomen en zal de productiviteit van het perifyton hoger liggen (Craggs et al. 1996b).

4 EXPERIMENTELE BEVINDINGEN MBT PERIFYTON

4.1 SECUNDAIRE VERSUS TERTIAIRE ZUIVERING

EXP 2 (Verschil tussen secundaire en tertiaire zuivering met perifyton) en EXP 3 (Secundaire zuivering met verschillende dragermaterialen) hebben aangetoond dat een zuivering van primair huishoudelijk afvalwater met behulp van perifyton mogelijk is. Deze secundaire zuivering bleek op verschillende niveaus anders te zijn dan een tertiaire zuivering, zowel wat de eigenlijke waterzuivering betreft als de eigenschappen van het perifyton. De bevindingen worden hieronder in enkele punten samengevat. Waarden met betrekking tot de opnamesnelheid van CZV, P en N worden niet vergeleken omdat deze door de proefopzet overschat werden (*zie paragraaf 3.1, p73*).

4.1.1 BIODIVERSITEIT

Uit microscopische analyse in EXP 2 bleek er geen verschil te zijn tussen de algengemeenschap opgegroeid met primair en secundair afvalwater. Bij een vergelijking tussen EXP 1 en EXP 3 werden ook veel dezelfde geslachten waargenomen. Het is echter bekend dat zowel de N-vorm (Kj-N vs NO₃-N) (Berman and Chava 1999), de opgeloste CZV (Richmond 2004) en de molaire N:P ratio een invloed kunnen hebben op de algengemeenschap. Opvallend was dat in een commerciële ATS ook gedeeltelijk dezelfde geslachten voorkwamen zoals *Lyngbya*, *Ulothrix*, *Scenedesmus* (Schumacher and Sekoulov 2002) en *Ulothrix* en *Cladophora* (Craggs et al. 1996b). Wel kwamen er meer diatomeeën voor bij een ATS. Dit komt vermoedelijk door een lage concentratie aan Si in de synthetische afvalwaters gebruikt in deze studie.

De AI in EXP 2 toonde aan dat er meer heterotrofen zijn bij secundair afvalwater. Dit is logisch door de hogere beschikbaarheid aan CZV. Op het einde van EXP 2 werd geen groot verschil meer waargenomen tussen de AI bij secundair afvalwater en primair afvalwater. Vermoedelijk waren op het einde van het experiment meer micro-invertebraten aanwezig waren die zich voedden met algen, onafhankelijk van de samenstelling van het afvalwater. Dit lijkt te kunnen worden bevestigd door de langere pH-daling bij de laatste RUNS van de experimenten. Meer invertebraten produceren meer CO₂ waardoor de pH minder snel stijgt.

4.1.2 CZV EN TSS

In primair afvalwater is er CZV aanwezig. In EXP 2 en 3 werd aangetoond dat dit efficiënt werd opgenomen en afgebroken. De gasuitwisseling tussen algen en bacteriën vertaalde zich daardoor in een tragere pH- en OZ- stijging bij primair afvalwater dan bij secundair afvalwater.

Er is ook TSS aanwezig in primair afvalwater. Uit EXP 3 blijkt dat deze eerst werd weggefilterd en waarschijnlijk pas later werd afgebroken in het perifyton. De TSS werd veel sneller uit het water gehaald dan de opgeloste CZV, P en N.

In EXP 2 en 3 werd opgemerkt dat de opgeloste CZV niet verder daalde: respectievelijk bij $25,6 \pm 5,8$ (n = 6) en ≥ 50 mg /L. Het is niet duidelijk of dit duidt op onafgebroken CZV of op een evenwicht tussen opname van bacteriën en excreties van algen (Rier and Stevenson 2002). Dit effect werd in mindere mate ook waargenomen in secundair afvalwater (waarin oorspronkelijk geen CZV aanwezig was) waardoor een evenwichtsituatie realistisch lijkt.

4.1.3 STIKSTOF

In primair afvalwater is N voor het grootste deel aanwezig onder de vorm van Kj-N (ureum, ammonium, etc.) en niet onder de vorm van $\text{NO}_3\text{-N}$ zoals in secundair afvalwater. Normaal gezien heeft dit weinig invloed op de opname in perifyton (Von Schiller et al. 2007).

In primair afvalwater is de concentratie N wel 2 tot 3 keer hoger dan in secundair afvalwater. Uit EXP 2 bleek dat dit een positieve invloed heeft op de opnamesnelheid van N. Deze is hoger naarmate de N-concentratie hoger is. Dit kan 2 oorzaken hebben. Enerzijds kan er sprake zijn van een hogere productiviteit, anderzijds kan het N-gehalte van het perifyton hoger zijn. Waarschijnlijk spelen beide een rol. Uit EXP 2 bleek dat het N-gehalte van het perifyton bij secundair afvalwater lager was dan bij primair afvalwater, namelijk 33 ± 8 (n = 4) tegenover 48 ± 16 (n = 7) g N/kg DS. In een ATS voor secundaire zuivering was dit 30 g N/kg DS (Craggs et al. 1996b). Bij hoge N-belasting is het N-gehalte in perifyton maximaal tot 80 g N/kg DS (Mulbry et al. 2008).

In EXP 2 en 3 werd bemerkt dat de concentratie Kj-N vanaf een bepaalde concentratie niet verder daalde (≤ 10 mg Kj-N/L). Echter, bij secundair afvalwater (N als $\text{NO}_3\text{-N}$) wordt deze concentratie ook bereikt, zo blijkt uit EXP 2. Er lijkt dus ook hier een evenwicht te zijn tussen de opname en uitstoot van Kj-N. Dit kan het gevolg zijn van mineralisatie van de algen in het perifyton door bacteriën en micro-invertebraten (Tyler et al. 2001).

4.1.4 FOSFOR

P is in primair afvalwater vooral aanwezig onder de vorm van $\text{PO}_4\text{-P}$. Hierin is er geen verschil met secundair afvalwater. Echter, de pH stijgt snel bij tertiaire zuivering (afwezigheid CZV), waardoor $\text{PO}_4\text{-}$ zouten kunnen precipiteren (voor $\text{pH} > 9$) indien voldoende Ca, Mg, Fe of Al aanwezig is (Yigit and Mazlum 2007). Dit bleek ook uit EXP 1 en EXP 3 waar de molaire N:P ratio van de verwijdering uit het afvalwater respectievelijk $1,33 \pm 0,93$ (n = 8) en $22,7 \pm 16,5$ (n = 12) bedroeg. Dit betekent dat voor elke

P-atoom dat wordt opgenomen, respectievelijk 1,33 en 22,7 N-atomen worden opgenomen. Aangezien een normale molaire N:P-ratio in de biomassa van perifyton ongeveer 30:1 bedraagt, moet in EXP 1 (tertiaire zuivering) een groot deel van het PO₄-P zijn neergeslagen als een zout want anders kan er nooit zo snel P worden verwijderd.

Na verloop van tijd steeg de pH ook in het primair afvalwater naar >10 en kon P-precipitatie optreden. In EXP 3 werd dit door middel van intensieve beluchting voorkomen om de microbiële gemeenschap te beschermen tegen pH-stijging. De invloed van ammonificatie en Kj-N-assimilatie op de pH werd niet gekwantificeerd. Ammonificatie neemt echter H⁺-ionen op waardoor de pH waarschijnlijk hoger ligt bij primair afvalwater dan bij secundair afvalwater.

De hogere P-opname bij tertiaire zuivering heeft ook zijn gevolg voor het P-gehalte in het perifyton. Craggs vond een P-gehalte bij tertiaire zuivering tot 20 g P/kg DS (Craggs et al. 1996b). Normale waarden (zonder precipitatie van zouten) voor het P-gehalte in perifyton bedragen 0,5 tot 5 g P/kg DS (Stelzer and Lamberti 2001). In EXP 2 (voor het deel van secundaire zuivering) bedroeg het gemiddelde P-gehalte $4,0 \pm 1,0$ (n = 5) g P/kg DS. In EXP 3 was dat $2,9 \pm 0,7$ (n = 17) g P/kg DS wat in beide gevallen duidt op een P-gehalte zonder PO₄-precipitatie.

4.1.5 AANHECHTINGSTERKTE

In EXP 2 werd een poging nagegaan of de samenstelling van het afvalwater een invloed kon hebben op de aanhechtingsterkte van het perifyton aan het dragermateriaal. De relevantie van deze test was echter beperkt omdat het gebruikte dragermateriaal (objectglaasjes) heel amorf was en er waarschijnlijk geen echte aanhechting was van het perifyton, noch bij secundair afvalwater, noch bij primair afvalwater.

4.2 HET BELANG VAN HET DRAGERMATERIAAL

EXP 1 en 3 waren erop gericht het effect te onderzoeken van het dragermateriaal op de zuivering van huishoudelijk afvalwater. Het rechtstreeks verband tussen het dragermateriaal en de mate/het mechanisme van waterzuivering kon moeilijk worden afgeleid want een groot aantal factoren kon de waterzuivering beïnvloeden. Waarschijnlijk was de waterzuivering in het begin slechter voor gestructureerde dragermaterialen omdat deze de ontwikkeling van een samenhangende laag perifyton bemoeilijkten (meer afslag) en mogelijks toxische stoffen uitscheidten die schadelijk waren bij de nauwe interactie tussen perifyton en dragermateriaal. Deze (mogelijk) toxische stoffen werden echter niet gekarakteriseerd.

4.2.1 DIFFERENTIATIE

Eén week tot één maand na de proefopstart trad differentiatie van de PG op, afhankelijk van het dragermateriaal. Hierbij kwam de bloei van een complexe PG tot stand, met filamenteuze algen die fungeerden als secundair dragermateriaal voor kleinere algen. Opvallend was dat deze gemeenschapsverandering het snelst optrad bij gestructureerde dragermaterialen. Het is nog onduidelijk of het dragermateriaal tot één specifieke gemeenschap kan leiden, want het aantal testen hierover was beperkt tot twee (EXP 1 en 3). Nochtans is het niet geheel onlogisch dat het grote verschil in specifieke oppervlakte en draagstructuur tussen de dragermaterialen een invloed heeft op de algen. Een poging wordt ondernomen om dit te verklaren. In *Figuur 33* worden grasmat 1 en 2 geïllustreerd met hun algenstructuur tijdens RUN 4 in EXP 3. Grasmat 1 heeft een heel hoge specifieke oppervlakte, waardoor vasthechting van grote filamenteuze algen zoals *Cladophora* mogelijk is zonder af te spoelen. Grasmat 2 (FL3) heeft een hoge dragende structuur waardoor deze gebruikt kan worden door de algen om een bladstructuur op te bouwen.



Figuur 33– De macroscopische structuur van het complex perifyton in FL 2 en FL 3, EXP 3.

Er werd waargenomen dat, indien een bepaalde dominante complexe gemeenschap aanwezig was in een FL, deze niet meer wijzigde gedurende de rest van het experiment ondanks een heel regelmatige overenting van algeninocula. Een complexe gemeenschap is blijkbaar minder veranderlijk dan een eenvoudige gemeenschap. Dit komt overeen met de algemene stelling dat biodiversiteit van groot belang is voor de stabiliteit van een systeem (Thebault and Loreau 2005). Ook de bloei van agressieve macro-invertebraten werd minder waargenomen in complexe gemeenschappen. Het is gekend dat filamenteuze groenalgen en geleichtige cyanobacteriën morfologisch beter bestand zijn tegen begrazing door invertebraten dan microalgen (Steinman et al. 1989). Nochtans kunnen de interacties in perifyton heel complex zijn (Holomuzki et al. 2010) en is het niet vanzelfsprekend deze volledig te controleren.

4.2.2 COMPLEXE VS EENVOUDIGE GEMEENSCHAP

Bij de resultaten van EXP 1 en 3 werd een vergelijking gemaakt tussen de performantie van enerzijds een eenvoudige en anderzijds een complexe PG. Hieruit bleek dat, hoewel niet steeds significant, de

nutriëntenopname en het nutriëntengehalte hoger lag voor eenvoudige PG's. Filamenteuze algen groeien ook trager en hebben een lager nutriëntengehalte (Stevenson et al. 1996). De evenwichtsconcentratie aan Kj-N lag wel het laagst voor complexe PG's. Dit komt mogelijks door de nauwe interactie van het water met de filamenteuze algen in de complexe PG's.

De opname van CZV en TSS lag het hoogst bij complexe PG's. Dit is mogelijks te wijten aan de meer driedimensionale verspreiding van heterotrofe bacteriën in de complexe PG's waardoor hun interactie met het water groter is. De evenwichtsconcentratie aan TSS was eveneens het laagst voor de PG's met filamenteuze algen.

Gezien het potentieel belang van nitrificatie in de waterzuivering werd ook nagegaan of dit proces meer of minder aanwezig was in bepaalde PG's. Nitrificatie zou het makkelijkst doorgaan in meer heterotrofe gemeenschappen want er treedt meer competitie op voor $\text{NH}_4\text{-N}$ indien algen aanwezig zijn (Risgaard-Petersen et al. 2004). Dit kon niet worden bevestigd aangezien de dominantie van heterotrofe bacteriën niet werd gemeten in de verschillende PG's.

4.2.3 INTERESSANTE GEMEENSCHAPPEN

In zowel EXP 1 als in EXP 2 werd PG3 teruggevonden. Deze gemeenschap wordt gedomineerd door het geslacht *Cladophora* en had de meest complexe structuur van alle gemeenschappen. Vasthangend aan de *Cladophora* werd een veelheid aan andere filamenteuze geslachten waargenomen waaraan op hun beurt kleinere koloniale of unicellulaire geslachten vasthingen. Dit werd ook reeds vastgesteld door Camacho (2009). *Cladophora* is ook de enige gekende groenalg die (voor de mens onschadelijke) insecticidale stoffen kan uitstoten (Camacho 2009). Hierdoor bestaat de mogelijkheid dat de stabiliteit in samenstelling van deze gemeenschap potentieel hoger is dan in andere complexe gemeenschappen. Door zijn structuur bleek bovendien dat PG3, van alle gemeenschappen, de hoogste CZV -en TSS-opnamesnelheid heeft, het best oogstbaar is en het best ontwaterbaar is. Het enige nadeel is de relatief lage N- en P-verwijdering (het laagst van alle gemeenschappen).

Een andere interessante gemeenschap was PG4. Deze gemeenschap was echter minder divers en bovendien kan *Lyngbya* (het dominante geslacht) neurotoxines uitstoten die behalve hun insecticidale werking ook schadelijke effecten kunnen hebben op vertebraten (Onodera et al. 1997).

5 PRAKTIJK, EEN ALGAL TURF SCRUBBER

5.1 PERIFYTON-INCUBATOR VERSUS ATS

Heel belangrijk bij de interpretatie van experimentele gegevens is het besef dat de waterzuivering in een experimentele incubator gebeurde. In de perifyton-incubator is er een wijziging van de concentraties N, P, CZV en TSS in functie van de tijd. Als gevolg hiervan verloopt de ontwikkeling van het perifyton gelijklopend in de hele FL. In een ATS is dit fundamenteel anders. Hierbij loopt het water slechts eenmaal over een lang gestrekt oppervlak en is er een wijziging van de concentratie N, P, CZV en TSS in functie van de afstand vanaf het begin van dit oppervlak. Dit heeft grote gevolgen voor de biochemische en biologische eigenschappen van het perifyton.

Bovendien werd, zoals reeds vermeld, de N-, P- en CZV- opnamesnelheid overschat door de proefopzet en werd de eigenlijke concentratie aan N, P en CZV van nieuw primair afvalwater niet voldoende realiteitsgetrouw ingeschat.

Om tegemoet te komen aan deze gebreken gebeurt de praktijkstudie daarom gedeeltelijk en beredeneerd aan de hand van literatuurgegevens.

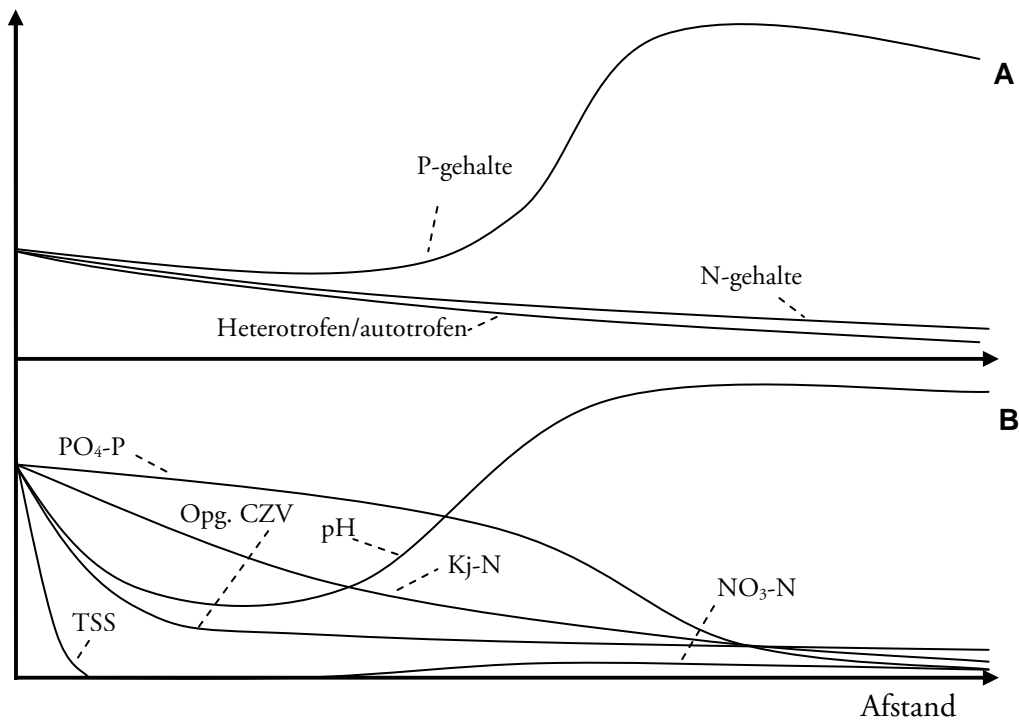
5.2 WERKING VAN DE ATS

In *Figuur 34* wordt geïllustreerd hoe de eigenschappen van het afvalwater en het perifyton evolueren in functie van de afstand vanaf het begin van de ATS.

Stel, we gaan uit van een nieuw primair afvalwater (zie duurzame waterzuivering) met 120mg CZV/L, 50mg N/L en 9 mg P/L. Ongeveer 50% van de CZV bestaat uit C. Dit geeft een molaire C:N:P ratio van 17:12:1 in het afvalwater. Het gehalte aan N en P in een perifyton gemeenschap bedraagt ongeveer 40 g N/kg DS en 3 g P/kg DS (EXP 3). De productie van zuurstof bedraagt ongeveer 1kg O₂/kg DS (uit $6\text{H}_2\text{O} + 6\text{CO}_2 \rightarrow \text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6 + \text{O}_2$). De afbraak van de CZV (van het afvalwater) door heterotrofe bacteriën met O₂ bedraagt 2kg CZV/kg O₂ (omgekeerde reactie maar de bacteriën groeien met een yield van 0,5) of 1 kg C/kg O₂. Bij de opname van 3 g P, wordt dus 40 g N en 1kg C opgenomen indien O₂ als limiterende factor wordt verondersteld voor de afbraak van de CZV. Omgerekend bedraagt de molaire C:N:P ratio van de opname in perifyton maximaal 837:30:1

Vanuit de C:N:P ratio is het duidelijk dat de CZV veel sneller kan opgenomen worden dan N en P. P is de limiterende factor voor zuiver water, want deze is het meest voorhanden. Echter, doordat de CZV snel is opgenomen, zal de pH relatief snel naar hogere waarden stijgen en kan het P alsnog natuurlijk

precipiteren. Er wordt bijgevolg gesteld dat N de limiterende factor is voor zuiver water. Dit betekent dat, als het N uit het water opgenomen is, er verondersteld wordt dat het water proper is.



Figuur 34 – De plaatsafhankelijke veranderingen in een ATS. A: De samenstelling van het afvalwater. B: De eigenschappen van het perifyton.

5.3 ECONOMISCHE ANALYSE VOOR ZUID-AMERIKA & ZUIDOOST AZIË

De economische haalbaarheid van een ATS voor secundaire waterzuivering is afhankelijk van heel veel factoren zoals klimaat, ontwikkelingsniveau, betrouwbaarheid van het proces, herbruikbaarheid van de biomassa, etc. De voorwaarden voor deze economische studie worden gekaderd binnen een duurzame waterzuivering zoals beschreven in *Literatuurstudie, paragraaf 1.5, p12*. Een aantal bijkomende voorwaarden worden gesteld.

- De economische analyse wordt gemaakt voor een gemeenschap van 1000 IE, in rurale gebieden van gemiddeld ontwikkelde landen waar een gematigd tot tropisch klimaat heerst zodat operatie ongeveer 12 maanden per jaar mogelijk is. Verschillende gebieden in Zuid-Amerika en zuidoost Azië komen hiervoor in aanmerking.
- De waterzuivering gebeurt met een *Cladophora*-gemeenschap (PG3). Deze gemeenschap blijft permanent dominant en wordt niet gehinderd door macro-invertebraten. Hierdoor is beperkte ingenieursexpertise nodig.

- De biomassa kan worden hergebruikt in veevoeder, de voedingswaarde van *Cladophora* voor mens en dier is reeds bewezen (Appler and Jauncey 1983). De problematiek van micropolluenten wordt niet in achtung genomen. Ontwatering kan gebeuren met behulp van de zon. De oogst gebeurt met een tractor. Anaerobe digestie voor de productie van biogas is een andere mogelijke aanpak maar deze wordt niet haalbaar geacht in gedecentraliseerde waterzuivering.

De dimensionering van een ATS is vrij eenvoudig en gebeurt op basis van N (zie paragraaf 5.2, p80). Het huishoudelijk watergebruik voor de betrokken gebieden bedraagt ongeveer 70L/IE-d (Hoekstra and Chapagain 2007). De samenstelling van een nieuw primair afvalwater wordt verondersteld (0,05 gN/L). De productiviteit en N-gehalte bedraagt resp. 10 g DS/m²·d en 0,04 g N/g DS. Een veiligheidsfactor van 2 wordt ingerekend om tegemoet te komen aan seizoenale verschillen.

Een veiligheidsreservoir (4m diep) wordt voorzien dat het water 20 dagen moet kunnen bufferen bij operationele disfunctie (tijd nodig voor heropstart).

Een oppervlak wordt voorbehouden om de biomassa te drogen en te ontsmetten. Overdekking lijkt raadzaam ter bescherming tegen regen, begrazing, etc. Wind moet echter door het perifyton kunnen blazen en zonlicht er doorheen kunnen schijnen. Een open doorzichtige structuur is in dit geval ideaal. De benodigde oppervlakte wordt berekend op basis van de waterinhoud van perifyton. Het natgewicht bevat ongeveer 10g water/g DS. Er is 5,0 Mjoule nodig om 1 kg water te verdampen. De inval van zonlicht bedraagt in subtropische gebieden gemiddeld 500 W/m².

$$\text{Oppervlakte} = \text{ATS} + \text{Reservereservoir} + \text{Droging} =$$

$$\frac{1000 \text{ IE} \cdot 70 \frac{\text{L}}{\text{IE} \cdot \text{d}} \cdot 0,05 \frac{\text{gN}}{\text{L}}}{10 \frac{\text{g DS}}{\text{m}^2 \cdot \text{d}} \cdot 0,04 \frac{\text{g N}}{\text{g DS}}} \cdot 2 + \frac{20 \text{d} \cdot 1000 \text{ IE} \cdot 70 \frac{\text{L}}{\text{IE} \cdot \text{d}} \cdot 0,001 \frac{\text{m}^3}{\text{L}}}{4 \text{m}} + \frac{638750 \text{ kg} \frac{\text{NS}}{\text{j}} \cdot 0,90 \frac{\text{kg water}}{\text{kg NS}} \cdot 5,0 \frac{\text{Mjoule}}{\text{kgwater}}}{500 \frac{\text{Joule}}{\text{s}} \cdot 3600 \frac{\text{s}}{\text{u}} \cdot 24 \frac{\text{u}}{\text{d}} \cdot 365 \frac{\text{d}}{\text{j}}}$$

$$= 17500 \text{ m}^2 + 350 \text{ m}^2 + 184 \text{ m}^2 = \pm 1,80 \text{ ha}$$

De benodigde oppervlakte bedraagt in totaal ongeveer 1,80 ha. In *Tabel 18* worden de kosten en baten van een ATS ingeschat. Alle prijsredeneringen worden onder de tabel aangegeven.

Tabel 18 – De investeringskost, de werkingskost en opbrengst van een ATS voor secundaire zuivering van huishoudelijk afvalwater (1000IE).

	\$	\$/jaar	\$/IE·jaar
Investeringskosten^a			
Landkost ^b	0	0	0
Graafwerken voor ATS ^c	3500	175	0,18
Installatie Bufferreservoir ^c	20400	1020	1,02
Installatie droging biomassa ^c	2730	137	0,14
Grasmatten ATS ^d	63600	3180	3,18
Analysetoestellen ^e	900	45	0,05
Oogstmachine ^f	15000	750	0,75
Pomp ^g	30000	1500	1,50
Werkingskosten			
Elektriciteit (pomp) ^h		5800	5,80
Benzine (tractor) ^h		180	0,18
Personeel ⁱ		4800	4,80
Opbrengsten van gedroogd <i>Cladophora</i>^j		-12800	-12,80
Totale kosten		4800	4,80

^aAlle investeringskosten worden afgeschreven op 20 jaar.

^bDe prijs voor landbouw is landafhankelijk maar is verwaarloosbaar in vergelijking met andere kosten.

^cHet perfect vlak en compact maken van het oppervlak is noodzakelijk om het water uniform over het oppervlak te laten stromen. De kostprijs in de VS hiervoor bedraagt gemiddeld 34000\$/ha (Pizarro et al. 2006). Een factor 1/3 (\$11000/ha) wordt aangenomen voor een gemiddeld ontwikkeld land. Voor het bufferreservoir wordt een kost gerekend van 100000\$/ha, op basis van kosten voor een stabilisatievijver in Colombia (Pena et al. 2002). De kost voor het drogen van de biomassa bestaat voornamelijk de doorzichtige doek, bijvoorbeeld PE (2\$/m²) en installatiekost (geschat op 2000\$).

^dDe grasmatten kosten 9\$/m² (Namgrass, 2010), bij schaalvergroting daalt deze prijs. Een factor 1/3 (3\$/m²) wordt aangenomen voor toepassing in de waterzuivering. Installatiekosten worden geschat op 10000\$/ha.

^eElke ATS heeft nood aan minimale procescontrole. Apparatuur hiervoor bedraagt 500\$/ha, gebaseerd op de kost voor procescontrole van een stabilisatievijver (Oswald and Benemann 1995).

^fEr wordt verondersteld dat de oogst grotendeels met een eenvoudige tractor (een groot maaimachine) en sleep kan gedaan worden. De kost hiervan wordt geschat op 15000\$.

^gDe pompkosten worden overgenomen uit (Pizarro et al. 2006) en aangepast op het debiet van de installatie.

^hDe elektriciteitskost schommelt in gemiddeld ontwikkelde landen (Brazilië, Filippijnen, Bangladesh, Vietnam) tussen 0,05 en 0,15\$/kWh (IEA 2009). Deze wordt 0,1\$/kWh verondersteld. Het vermogen wordt berekend adhv de formule $P = \rho \cdot g \cdot H \cdot Q$. Een opvoerhoogte H van 0,5 m wordt verondersteld om het overpompen tussen grachten en de ATS mogelijk te maken. De pompefficiëntie wordt 0,60 verondersteld. Het benzinegebruik van de tractor wordt geschat op 15L/100km. De volledige oppervlakte oogsten vergt een afstand van ± 50 km. Er wordt twee maal per maand geoogst. 1L = ±1\$.

ⁱEr wordt verondersteld dat twee man nodig is om het systeem operationeel te houden (oogst, bijsturing, drogen). Het loon is ruw genomen 200\$/maand (IMF 2009).

^jHet veevoeder wordt geherwaardeerd op basis van gemiddelde veevoederprijzen (mais en sojabonen) (Mongabay 2010). Deze prijs bedraagt ongeveer 200\$/ton veevoeder. Opbrengst *Cladophora* is ongeveer 65 ton DS/jaar (10g DS/m²·d).

De kostprijs wordt berekend op ongeveer 4,8 \$/IE-jaar. Uit schattingen van het IMF (2009) ligt het gemiddeld jaarinkomen in Zuid-Amerika en zuidoost Azië tussen de 2000 en 10000\$/IE-jaar (uitzondering Singapore, Chili, etc.). In rurale gebieden, waarvoor deze waterzuivering werd berekend is dit wel lager. Desalniettemin lijkt een dergelijke waterzuivering economisch haalbaar in gemiddeld ontwikkelde landen. Uit de economische analyse blijkt dat de werkingskosten in grote mate afhangen van het energiegebruik voor het pompen. Een verlaging van het energiegebruik kan de toepassingsmogelijkheid in grote mate bepalen. De totale kosten zullen ook afhangen van de primaire zuivering die vooraf gaat aan de secundaire zuivering.

5.4 ATS IN DE NIEUWE WATERZUIVERING

In de economische analyse werden reeds een aantal voorwaarden gesteld die het mogelijk moeten maken om een ATS duurzaam te maken. Er werd uitgegaan van een volledig hergebruik van perifyton (en dus nutriënten) en de energievereisten werden beperkt tot het pompen van water naar de ATS. De energievereisten werden berekend op 1,3 kWh/m³ wat niet veel minder is als intensieve systemen zoals AS (2-10 kWh/m³) (Joh Kang et al. 2009). Indien de energiekosten omlaag kunnen lijkt dit systeem een heel duurzame waterzuivering mogelijk te maken.

De toepassing van een dergelijke waterzuivering in rurale gebieden van ontwikkelde, westerse landen werd economisch niet geanalyseerd. De ATS als een duurzame methode voor de zuivering van huishoudelijk afvalwater heeft er meerdere beperkingen. De problematiek van micropolluenten is er bijvoorbeeld heel groot waardoor het perifyton niet snel zal hergebruikt worden als hoogwaardig veevoeder en indien het perifyton zou vergist worden, zal het digestaat niet snel gebruikt worden als meststof. Bovendien is de verwerking van biomassa geïndustrialiseerd waardoor het totaal energiegebruik voor de verwerking van perifyton sterk omhoog kan gaan (ontwatering en droging zijn dan brandstof gedreven en niet zongedreven (Pizarro et al. 2006)). Een oplossing van deze problemen kan enkel binnen een sterk politiek kader waar duurzaamheid vooropstaat. Binnen de huidige maatschappelijke context (i.e. mislukte klimaatconferentie in Kopenhagen in 2009, internationale handel van voedsel en kunstmest, etc.) lijkt dit jammer genoeg nog veraf.

DEEL V
BESLUIT

1 BESLUIT

De flowcytometrische kwantificering van de bacteriële gemeenschap in perifyton leek mogelijk. Hoewel niet verder uitgewerkt, kan de hieruit afgeleide Perifyton-Bacterie-Index (PBI) mogelijks een handige maatstaf zijn voor nauwkeurige karakterisatie van perifyton. De toepassing als analytische methode in een ATS is ook potentieel mogelijk maar binnen het idee van gedecentraliseerde waterzuivering is een flowcytometer vermoedelijk een te hoge kost.

De nieuwe configuratie voor lichtherverdeling met behulp van verticale doorschijnende platen leek een positieve invloed te hebben op de productiviteit van *Chlorella*. Dit bevestigt voorgaande onderzoeken hieromtrent. Lichtherverdeling in horizontale matten kon niet worden geoptimaliseerd en eventuele positieve effecten op de productiviteit konden niet worden aangetoond.

De perifyton-incubator bleek effectief voor onderzoek naar waterzuivering met perifyton. Alle belangrijke waterzuiveringparameters en perifytoneigenschappen konden worden opgemeten. De bepaling van de productiviteit van het perifyton was echter niet mogelijk indien gewerkt werd met gestructureerde dragermaterialen. Een bijkomende beperking is het verschil tussen enerzijds het circulatiesysteem in de perifyton-incubator ten opzichte van het eenmalig verloop van het water in een ATS.

Het perifyton bleek in staat tot secundaire zuivering van huishoudelijk afvalwater. Complexe PG's namen heel snel de TSS en CZV op. De hogere concentratie aan N en P in primair afvalwater (in vergelijking met secundair afvalwater) had bovendien een positieve invloed op de opnamesnelheid. Er wordt verwacht dat secundaire zuivering gecombineerd kan worden met tertiaire zuivering in één ATS-installatie op voorwaarde dat de ATS voldoende groot wordt gedimensioneerd.

Gestructureerde dragermaterialen hadden een zekere invloed op de PG, vooral bij de ontwikkeling naar een complexe gemeenschap met filamenteuze algen. Het is niet duidelijk hoe groot deze invloed is en hoe sterk deze de dragermaterialen de groei van bepaalde filamenteuze algen kunnen bevorderen. Verschillende complexe gemeenschappen werden onderscheiden op basis van hun algendominantie. *Cladophora* als dominante algensoort lijkt interessant voor toepassing in de ATS door zijn filterende werking, makkelijke oogstbaarheid en hoge validatie van de biomassa. Hoewel het niet makkelijk is om een PG te controleren, blijkt een *Cladophora*-gemeenschap heel stabiel in samenstelling, mogelijks door zijn complexiteit en natuurlijke resistentie tegen invertebraten.

De duurzaamheid van een ATS voor secundaire zuivering van huishoudelijk afvalwater is sterk afhankelijk van verschillende factoren. Indien de biomassa en de nutriënten kunnen worden geherwaardeerd als veevoeder en de energievereisten voor het pompen, de oogst en ontwatering kunnen worden beperkt dan

vormt dit systeem een duurzaam alternatief in de waterzuivering. Uit een kostenanalyse blijkt een ATS, binnen deze voorwaarden, economisch haalbaar in rurale gemeenschappen in bijvoorbeeld Zuid-Amerika en zuidoost Azië. De toepassing in westerse landen werd economisch niet geanalyseerd maar het systeem lijkt daar in elk geval (nog) niet te passen binnen het kader van duurzame waterzuivering. Enkel een sterke wijziging van de heersende opvattingen omtrent duurzaamheid van de maatschappij kan hierin tegemoet komen.

2 VERDER ONDERZOEK

De PBI voor de kwantificering van de bacteriële gemeenschap was slechts een preliminaire test. De accuraatheid en precisie van de test moet verder onderbouwd en bewezen worden. Onderzoek kan ook gebeuren naar mogelijke toepassingen ervan.

De test met betrekking tot lichtherverdeling in verticale platen vergt een verdere optimalisatie. Een economische analyse van dergelijke systemen is echter een bijkomende vereiste aangezien het systeem heel materiaalintensief is. Doorzichtige dragermaterialen voor perifyton hebben mogelijks ook een hoog potentieel om de productiviteit van perifyton te verhogen. Dit kan in de toekomst verder onderzocht worden.

De economische analyse van een ATS voor duurzame waterzuivering werd gedaan op basis van een aantal aannames die nog verder onderzocht en bekrachtigd moeten worden. Verder onderzoek kan zijn...

- Het verder optimaliseren van een ideaal gestructureerd dragermateriaal ter bevordering van de stabiliteit van het perifyton, bij voorkeur van een *Cladophora*-gemeenschap.
- Bepaalde procesmatige manieren vinden om de stabiliteit van het perifyton te behouden, bijvoorbeeld door regelmatige toevoeging van inocula, een goede oogstmethode, etc.
- De mogelijkheden nagaan van energiebesparing in een ATS voor secundaire waterzuivering.
- Nauwkeurige levenscyclusanalyses (LCA) en economische analyses doen op de vernieuwde ATS systemen en deze vergelijken met andere passieve systemen voor waterzuivering.

DEEL VI
REFERENTIES

- Aguilar-May, B. and Sanchez-Saavedra, M.D. (2009) Growth and removal of nitrogen and phosphorus by free-living and chitosan-immobilized cells of the marine cyanobacterium *Synechococcus elongatus*. *Journal of Applied Phycology* **21**, 353-360.
- APHA (1985) *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*. American Public Health Association.
- Applegate, D.H. and Bryers, J.D. (1991) Effects of carbon and oxygen limitations and calcium concentrations on biofilm removal processes. *Biotechnology and Bioengineering* **37**, 17-25.
- Appler, H.N. and Jauncey, K. (1983) The utilization of a filamentous green-Alga (*Cladophora-Glomerata* (L) Kutzin) as a protein-source in pelleted feeds for sarotherodon (*Tilapia*) Niloticus fingerlings. *Aquaculture* **30**, 21-30.
- Araya, R., Tani, K., Takagi, T., Yamaguchi, N. and Nasu, M. (2003) Bacterial activity and community composition in stream water and biofilm from an urban river determined by fluorescent in situ hybridization and DGGE analysis. *Fems Microbiology Ecology* **43**, 111-119.
- Arthur, J.P. (1983) Notes on the design and operation of waste stabilization ponds in warm climates of developing countries.
- Azim, M.E. (2005) *Periphyton : ecology, exploitation, and management*. Wallingford, UK ; Cambridge, MA: CABI Pub.
- Azim, M.E., Verdegem, M.C.J., Rahman, M.M., Wahab, M.A., van Dam, A.A. and Beveridge, M.C.M. (2002a) Evaluation of polyculture of Indian major carps in periphyton-based ponds. *Aquaculture* **213**, 131-149.
- Azim, M.E., Wahab, M.A., Verdegem, M.C.J., van Dam, A.A., van Rooij, J.M. and Beveridge, M.C.M. (2002b) The effects of artificial substrates on freshwater pond productivity and water quality and the implications for periphyton-based aquaculture. *Aquatic Living Resources* **15**, 231-241.
- Barrow, C.J. and Shahidi, F. (2008) *Marine nutraceuticals and functional foods*. Boca Raton: CRC Press.
- Beeton, A.M. and Edmondso.Wt (1972) Eutrophication problem. *Journal of the Fisheries Research Board of Canada* **29**, 673-&.
- Berman, T. and Chava, S. (1999) Algal growth on organic compounds as nitrogen sources. *Journal of Plankton Research* **21**, 1423-1437.
- Bjorklund, J., Geber, U. and Rydberg, T. (2001) Emergy analysis of municipal wastewater treatment and generation of electricity by digestion of sewage sludge. *Resources Conservation and Recycling* **31**, 293-316.
- Boeije, G., Corstanje, R., Rottiers, A. and Schowanek, D. (1999) Adaptation of the CAS test system and synthetic sewage for biological nutriënt removal - Part I: Development of a new synthetic sewage. *Chemosphere* **38**, 699-709.
- Boston, H.L. and Hill, W.R. (1991) Photosynthesis light relations of stream periphyton communities. *Limnology and Oceanography* **36**, 644-656.
- Bruggemann, J.H. (1995) Parrotfish grazing on coral reefs : a trophic novelty.
- Burlew, J.S. (1953) Current status of the large-scale culture of algae. In *Algal culture from laboratory to pilot plant*. Washington: Carnegie Institution of Washington Publication.
- Burton, I. (1987) Our common future - the world commission on environment and development. *Environment* **29**, 25-29.
- Bush, A.F., Isherwood, A.D. and Rodgi, S. (1961) Dissolved solids removal from waste water by algae.

- Butterwick, C., Heaney, S.I. and Talling, J.F. (2005) Diversity in the influence of temperature on the growth rates of freshwater algae, and its ecological relevance. *Freshwater Biology* **50**, 291-300.
- Camacho, K. (2009) Macroalgal and cyanobacterial chemical defenses in freshwater communities. In *Algal chemical ecology*. New York: Springer.
- Carter, N. (2007) *The Politics of the Environment Ideas Activism*.
- Chevalier, P. and Delanoue, J. (1985) Efficiency of immobilized hyperconcentrated algae for ammonium and ortho-phosphate removal from wastewaters. *Biotechnol Lett* **7**, 395-400.
- Colville, K., Tompkins, N., Rutenberg, A.D. and Jericho, M.H. (2010) Effects of poly(L-lysine) substrates on attached Escherichia Coli bacteria. *Langmuir* **26**, 2639-2644.
- Craggs, R.J. (2001) Wastewater treatment by algal turf scrubbing. *Water Science and Technology* **44**, 427-433.
- Craggs, R.J., Adey, W.H., Jenson, K.R., StJohn, M.S., Green, F.B. and Oswald, W.J. (1996a) Phosphorus removal from wastewater using an algal turf scrubber. *Water Science and Technology* **33**, 191-198.
- Craggs, R.J., Adey, W.H., Jessup, B.K. and Oswald, W.J. (1996b) A controlled stream mesocosm for tertiary treatment of sewage. *Ecological Engineering* **6**, 149-169.
- Denny, P. (1997) Implementation of constructed wetlands in developing countries. *Water Science and Technology* **35**, 27-34.
- Di Pippo, F., Bohn, A., Congestri, R., De Philippis, R. and Albertano, P. (2009) Capsular polysaccharides of cultured phototrophic biofilms. *Biofouling* **25**, 495-504.
- Donkor, V.A., Amewovor, D.H.A.K. and Hader, D.P. (1993) Effects of tropical solar-radiation on the motility of filamentous cyanobacteria. *Fems Microbiology Ecology* **12**, 143-148.
- Duarte, P. (1995) A mechanistic model of the effects of light and temperature on algal primary productivity. *Ecological Modelling* **82**, 151-160.
- EPA (1999) Indoor water use in the united states: EPA.
- Epstein, N. (1989) On tortuosity and the tortuosity factor in flow and diffusion through porous media. *Chemical Engineering Science* **44**, 777-779.
- FAO (1992) Wastewater treatment and use in agriculture: agricultural use of sewage sludge.
- Fukami, K., Nishijima, T. and Ishida, Y. (1997) Stimulative and inhibitory effects of bacteria on the growth of microalgae. *Hydrobiologia* **358**, 185-191.
- Gonzalez, C., Marciniak, J., Villaverde, S., Leon, C., Garcia, P.A. and Munoz, R. (2008) Efficient nutriënt removal from swine manure in a tubular biofilm photo-bioreactor using algae-bacteria consortia. *Water Science and Technology* **58**, 95-102.
- Gronlund, E., Klang, A., Falk, S. and Hanaeus, J. (2004) Sustainability of wastewater treatment with microalgae in cold climate, evaluated with emergy and socio-ecological principles. *Ecological Engineering* **22**, 155-174.
- Helmer, R., Hespanhol, I., United Nations Environment Programme., Water Supply and Sanitation Collaborative Council. and World Health Organization. (1997) *Water pollution control : a guide to the use of water quality management principles*. London ; New York: E & FN Spon.

- Hoagland, K.D., Roemer, S.C. and Rosowski, J.R. (1982) Colonization and community structure of two Periphyton assemblages, with emphasis on the diatoms (bacillariophyceae). *American Journal of Botany* **69**, 188-213.
- Hoekstra, A.Y. and Chapagain, A.K. (2007) Water footprints of nations: Water use by people as a function of their consumption pattern. *Integrated Assessment of Water Resources and Global Change*, 35-48.
- Hoffmann, J.P. (1998) Wastewater treatment with suspended and nonsuspended algae. *J Phycol* **34**, 757-763.
- Holmberg, J. (1998) Socio-ecological principles for a sustainable society. In *Getting down to earth: Practical applications of ecological economics*. pp.225-226.
- Holomuzki, J.R., Feminella, J.W. and Power, M.E. (2010) Biotic interactions in freshwater benthic habitats. *Journal of the North American Benthological Society* **29**, 220-244.
- Hosetti, B.B. and Frost, S. (1995) A review of the sustainable value of effluents and sludges from wastewater stabilization ponds. *Ecological Engineering* **5**, 421-431.
- IEA (2009) *Energy Prices and Taxes*.
- IMF (2009) World Economic Outlook Database.
- Jekel, M. and Reemtsma, T. (2006) *Organic pollutants in the water cycle : properties, occurrence, analysis and environmental relevance of polar compounds*. Weinheim: Wiley-VCH.
- Joh Kang, S., Kevin, P.E., Olmstead, K., Krista, M.T., P.E. and Collins, J. (2009) Energy sustainability and nutriënt removal from municipal wastewater.
- Kadlec, R.H. and Reddy, K.R. (2001) Temperature effects in treatment wetlands. *Water Environment Research* **73**, 543-557.
- Kahlert, M. and Pettersson, K. (2002) The impact of substrate and lake trophy on the biomass and nutriënt status of benthic algae. *Hydrobiologia* **489**, 161-169.
- Kaya, V.M., Delanoue, J. and Picard, G. (1995) A comparative study of 4 systems for tertiary waste water treatment by *Scenedesmus Bicellularis* - New technology for immobilization. *Journal of Applied Phycology* **7**, 85-95.
- Kivaisi, A.K. (2001) The potential for constructed wetlands for wastewater treatment and reuse in developing countries: a review. *Ecological Engineering* **16**, 545-560.
- Lai, P.C.C. and Lam, P.K.S. (1997) Major pathways for nitrogen removal in waste water stabilization ponds. *Water Air and Soil Pollution* **94**, 125-136.
- Lau, P.S., Tam, N.F.Y. and Wong, Y.S. (1997) Wastewater nutriënts (N and P) removal by carrageenan and alginate immobilized *Chlorella vulgaris*. *Environ Technol* **18**, 945-951.
- Légifrance (1994) Arrêté du 22 décembre 1994 fixant les prescriptions techniques relatives aux ouvrages de collecte et de traitement des eaux usées mentionnées aux articles L. 372-1-1 et L. 372-3 du code des communes
- Mallick, N. (2002) Biotechnological potential of immobilized algae for wastewater N, P and metal removal: A review. *Biometals* **15**, 377-390.
- Masi, F. (2009) Water reuse and resources recovery: the role of constructed wetlands in the Ecosan approach. *Desalination* **246**, 27-34.

- Mata, T.M., Martins, A.A. and Caetano, N.S. (2010) Microalgae for biodiesel production and other applications: A review. *Renew Sust Energ Rev* **14**, 217-232.
- Mongabay (2010) www.mongabay.com.
- Moreno-Garrido, I. (2008) Microalgae immobilization: Current techniques and uses. *Bioresource Technology* **99**, 3949-3964.
- Mori, K. (1985) Photoautotrophic bioreactor using visible solar rays condensed by Fresnel lenses and transmitted through optical fibers. *Biotechnol* **15**.
- Morita, M., Watanabe, Y. and Saiki, H. (2000) Investigation of photobioreactor design for enhancing the photosynthetic productivity of microalgae. *Biotechnology and Bioengineering* **69**, 693-698.
- Moshiri, G.A. (1993) *Constructed wetlands for water quality improvement*. Boca Raton: Lewis Publishers.
- Mridula, R.M., Manissery, J.K., Keshavanath, P., Shankar, K.M., Nandeesh, M.C. and Rajesh, K.M. (2003) Water quality, biofilm production and growth of fringe-lipped carp (*Labeo fimbriatus*) in tanks provided with two solid substrates. *Bioresource Technology* **87**, 263-267.
- Mulbry, W., Kondrad, S., Pizarro, C. and Kebede-Westhead, E. (2008) Treatment of dairy manure effluent using freshwater algae: Algal productivity and recovery of manure nutrients using pilot-scale algal turf scrubbers. *Bioresource Technology* **99**, 8137-8142.
- Navid, D. (1984) International cooperation for wetland conservation - the Ramsar Convention. *Transactions of the North American Wildlife and Natural Resources Conference* **49**, 33-41.
- Nielsen, P.H., Jahn, A. and Palmgren, R. (1997) Conceptual model for production and composition of exopolymers in biofilms. *Water Science and Technology* **36**, 11-19.
- Nopens, I., Capalozza, C. & Vanrolleghem, P. (2001) *Stability analysis of a synthetic municipal wastewater*.
- Odum, H.T. (2000) *Handbook of Emergy Evaluation*. Gainesville: Center for Environmental Policy University of Florida.
- Oliveira, S.C. and von Sperling, M. (2008) Elements for setting up discharge standards in developing countries based on actual wastewater treatment plant performance. *Water Science and Technology* **58**, 2001-2008.
- Onodera, H., Oshima, Y., Henriksen, P. and Yasumoto, T. (1997) Confirmation of anatoxin-a(s), in the cyanobacterium *Anabaena lemmermannii*, as the cause of bird kills in Danish lakes. *Toxicon* **35**, 1645-1648.
- Oswald, W.J. and Benemann, J.R. (1995) Systems and Economic Analysis of Microalgae Ponds for Conversion of CO₂ to Biomass. *US Department of Energy*.
- Pena, M.R., Madera, C.A. and Mara, D.D. (2002) Feasibility of waste stabilization pond technology for small municipalities in Colombia. *Water Science and Technology* **45**, 1-8.
- Perry, J.J., Staley, J.T. and Lory, S. (2002) *Microbial life*. Sunderland, Mass.: Sinauer.
- Picot, B., Bahlaoui, A., Moersidik, S., Baleux, B. and Bontoux, J. (1992) Comparison of the purifying efficiency of high-rate algal pond with stabilization pond. *Water Science and Technology* **25**, 197-206.
- Pizarro, C., Mulbry, W., Bliersch, D. and Kangas, P. (2006) An economic assessment of algal turf scrubber technology for treatment of dairy manure effluent. *Ecological Engineering* **26**, 321-327.

- Pulz, O., Gerbsch, N. and Buchholz, R. (1995) Light energy supply in plate-type and light diffusing optical-fiber bioreactors. *Journal of Applied Phycology* **7**, 145-149.
- Pulz, O. and Gross, W. (2004) Valuable products from biotechnology of microalgae. *Appl Microbiol Biot* **65**, 635-648.
- Ragas, A.M.J., Scheren, P.A.G.M., Konterman, H.I., Leuven, R.S.E.W., Vugteveen, P., Lubberding, H.J., Niebeek, G. and Stortelder, P.B.M. (2005) Effluent standards for developing countries: combining the technology- and water quality-based approach. *Water Science and Technology* **52**, 133-144.
- Richmond, A. (2004) *Handbook of microalgal culture : biotechnology and applied phycology*. Oxford, OX, UK ; Ames, Iowa, USA: Blackwell Science.
- Rier, S.T. and Stevenson, R.J. (2002) Effects of light, dissolved organic carbon, and inorganic nutrients on the relationship between algae and heterotrophic bacteria in stream periphyton. *Hydrobiologia* **489**, 179-184.
- Risgaard-Petersen, N., Nicolaisen, M.H., Revsbech, N.P. and Lomstein, B.A. (2004) Competition between ammonia-oxidizing bacteria and benthic microalgae. *Applied and Environmental Microbiology* **70**, 5528-5537.
- Rittmann, B.E. and McCarty, P.L. (2001) *Environmental biotechnology : principles and applications*. Boston: McGraw-Hill.
- Roeselers, G., van Loosdrecht, M.C. and Muyzer, G. (2007) Heterotrophic pioneers facilitate phototrophic biofilm development. *Microb Ecol* **54**, 578-585.
- Rousseau, D.P.L., Vanrolleghem, P.A. and De Pauw, N. (2004) Constructed wetlands in Flanders: a performance analysis. *Ecological Engineering* **23**, 151-163.
- Ruiz-Marin, A. and Mendoza-Espinosa, L.G. (2008) Ammonia removal and biomass characteristics of alginate-immobilized *Scenedesmus Obliquus* cultures treating real wastewater. *Fresen Environ Bull* **17**, 1236-1241.
- Schumacher, G., Blume, T. and Sekoulov, I. (2003) Bacteria reduction and nutrient removal in small wastewater treatment plants by an algal biofilm. *Water Science and Technology* **47**, 195-202.
- Schumacher, G. and Sekoulov, I. (2002) Polishing of secondary effluent by an algal biofilm process. *Water Science and Technology* **46**, 83-90.
- Steinman, A.D., McIntire, C.D., Gregory, S.V. and Lamberti, G.A. (1989) Effects of irradiance and grazing on lotic algal assemblages. *J Phycol* **25**, 478-485.
- Stelzer, R.S. and Lamberti, G.A. (2001) Effects of N : P ratio and total nutrient concentration on stream periphyton community structure, biomass, and elemental composition. *Limnology and Oceanography* **46**, 356-367.
- Stevenson, R.J., Bothwell, M.L. and Lowe, R.L. (1996) *Algal ecology : freshwater benthic ecosystems*. San Diego: Academic Press.
- Talbot, P. and Delanoue, J. (1993) tertiary treatment of waste water with *Phormidium-Bohneri* (Schmidle) under various light and temperature conditions. *Water Research* **27**, 153-159.
- Thebault, E. and Loreau, M. (2005) Trophic interactions and the relationship between species diversity and ecosystem stability. *American Naturalist* **166**, E95-E114.
- Thimijan, R.W. and Heins, R.D. (1983) Photometric, radiometric, and quantum light units of measure - a review of procedures for interconversion. *Hortscience* **18**, 818-822.

- Tyler, A.C., McGlathery, K.J. and Anderson, I.C. (2001) Macroalgae mediation of dissolved organic nitrogen fluxes in a temperate coastal lagoon. *Estuarine Coastal and Shelf Science* **53**, 155-168.
- Verstraete, W., Zamalloa, C., Albrecht, J. and Vulsteke, E. (2010) The techno-economical potential of renewable energy through the anaerobic digestion of microalgae. Gent: Ugent.
- Viviers, J.M.P. and Briers, J.H. (1982) Harvesting of algae grown on raw sewage. *Water Sa* **8**, 178-186.
- VLAREM-II (1995) *Besluit van de Vlaamse regering houdende algemene en sectorale bepalingen inzake milieuhygiëne*. Vlaamse regering.
- Von Schiller, D., Marti, E., Riera, J.L. and Sabater, F. (2007) Effects of nutrients and light on periphyton biomass and nitrogen uptake in Mediterranean streams with contrasting land uses. *Freshwater Biology* **52**, 891-906.
- Vymazal, J. (2005) Horizontal sub-surface flow and hybrid constructed wetlands systems for wastewater treatment. *Ecological Engineering* **25**, 478-490.
- Vymazal, J. (2009) The use constructed wetlands with horizontal sub-surface flow for various types of wastewater. *Ecological Engineering* **35**, 1-17.
- Williams, I., Paul, F., Lloyd, D., Jepras, R., Critchley, I., Newman, M., Warrack, J., Giokarini, T., Hayes, A.J., Randerson, P.F. and Venables, W.A. (1999) Flow cytometry and other techniques show that *Staphylococcus aureus* undergoes significant physiological changes in the early stages of surface-attached culture. *Microbiology-Uk* **145**, 1325-1333.
- Yigit, N.O. and Mazlum, S. (2007) Phosphate recovery potential from wastewater by chemical precipitation at batch conditions. *Environ Technol* **28**, 83-93.
- Zain, S.M., Basri, H., Suja, F. and Jaafar, O. (2002) Land application technique for the treatment and disposal of sewage sludge. *Water Science and Technology* **46**, 303-308.
- Zippel, B., Rijstenbil, J. and Neu, T.R. (2007a) A flow-lane incubator for studying freshwater and marine phototrophic biofilms. *J Microbiol Methods* **70**, 336-345.
- Zippel, B., Rijstenbil, J. and Neu, T.R. (2007b) A flow-lane incubator for studying freshwater and marine phototrophic biofilms. *Journal of Microbiological Methods* **70**, 336-345.

DEEL VII
BIJLAGES

1 LIJST MET FIGUREN

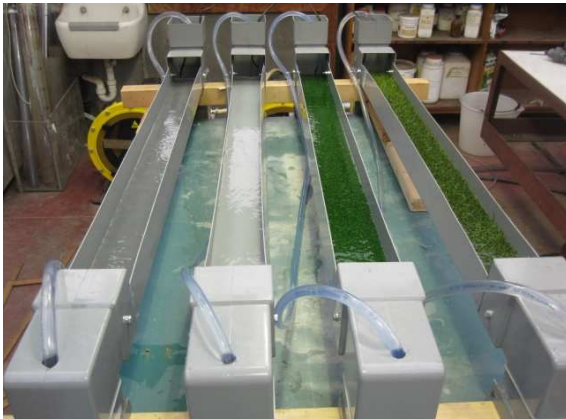
<i>Figuur 1</i> - Een algemeen schema voor de zuivering van huishoudelijk afvalwater.....	4
<i>Figuur 2</i> – Het principe van een High Rate Algal Pond (HRAP).....	8
<i>Figuur 3</i> – Het principe van een ATS.....	9
<i>Figuur 4</i> - Een nieuw scenario voor een duurzame zuivering van huishoudelijk afvalwater.....	14
<i>Figuur 5</i> – De biochemische gasinteractie van C en O tussen algen en heterotrofe bacteriën	16
<i>Figuur 6</i> - De groeicurve van een perifytongemeenschap.	17
<i>Figuur 7</i> – De productiviteit – lichtintensiteitscurve (PI) bij algen.	19
<i>Figuur 8</i> – Het zijaanzicht van de perifyton-incubator.....	31
<i>Figuur 9</i> - Een driedimensionale weergave van de perifyton-incubator.	33
<i>Figuur 10</i> - De evolutie van de pH en OZ in RUN 3 van EXP1	37
<i>Figuur 11</i> - A, B, C: De evolutie van NO ₃ -N, PO ₄ -P en NO ₂ -N in RUN3, EXP1 en de gemiddelde N- en P- verwijdering (g/m ² ·d) uit het afvalwater voor RUN 3 en 4.	38
<i>Figuur 12</i> - De objectglasjes als dragermateriaal in de FL's in EXP2.....	40
<i>Figuur 13</i> – Het mechanisme van de schuifspanningreactor in EXP2.	41
<i>Figuur 14</i> – De evolutie van de autotrofe index (AI) van perifyton in EXP2.....	43
<i>Figuur 15</i> - De evolutie van de DS van perifyton (g DS/m ²) in EXP2.	44
<i>Figuur 16</i> – De weerstand van het perifyton tegen schuifspanning bij drie verschillende debieten.	45
<i>Figuur 17</i> – A, B en C: De evolutie de opgeloste N-, P- en CZV-concentratie in RUN 3, EXP2. D: De gemiddelde verwijdering (g/m ² ·d) van N, P en CZV in RUN 3 en RUN 4.	46
<i>Figuur 18</i> – A: De evolutie van de pH in de FL's in RUN 1, EXP2. B: RUN 3..	47
<i>Figuur 19</i> – De turbiditeitsafname in functie van de tijd in RUN 3 en RUN 5, FL2, EXP 3.....	53
<i>Figuur 20</i> – De verwijdering (g/m ² ·d) en het gehalte van N, P en CZV voor respectievelijk een eenvoudige en complexe PG in EXP3.....	54
<i>Figuur 21</i> – Twee invloeden mbt N in EXP3. A: Hoe ouder het perifyton, hoe meer nitrificatie. B: De residuele Kj-N concentratie is hoger voor een eenvoudige PG dan een complexe PG.....	56
<i>Figuur 22</i> - Het flowcytometrisch diagram van het perifyton van RUN 4, FL1, EXP3.	58
<i>Figuur 23</i> – De Perifyton-Bacterie-Index voor alle bacteriën (PBI), de dode bacteriën (PBI _D) en de levende bacteriën (PBI _L), toegepast in RUN4, EXP3.	59
<i>Figuur 24</i> – De proefopzet voor de herverdeling van licht met behulp van doorschijnende platen	60
<i>Figuur 25</i> – De proefopzet voor de meting van de lichtverstrooiing uit een doorschijnende plaat en de lichtpenetratie door een doorschijnende plaat.....	61
<i>Figuur 26</i> – Het theoretisch gedrag van het licht in een verruwde doorschijnende plaat	62
<i>Figuur 27</i> - Het gedrag van licht in de vier geteste platen.	63
<i>Figuur 28</i> – De toename van CZV met of zonder doorschijnende platen.	64
<i>Figuur 29</i> – Het bovenaanzicht van de proefopzet voor de bepaling van de verblijftijdsdistributie.	66

<i>Figuur 30</i> - De verblijftijdsdistributie van de verschillende dragermaterialen.	66
<i>Figuur 31</i> – Het zij- en bovenaanzicht van de testincubator	67
<i>Figuur 32</i> - De gemiddelde concentratie van Chl a en Feofytine voor verschillende solventen en destructiemethodes.....	69
<i>Figuur 33</i> – De macroscopische structuur van complex perifyton in FL 2 en FL 3, EXP3.	78
<i>Figuur 34</i> – De plaatsafhankelijke veranderingen van het afvalwater en het perifyton in een ATS.....	81

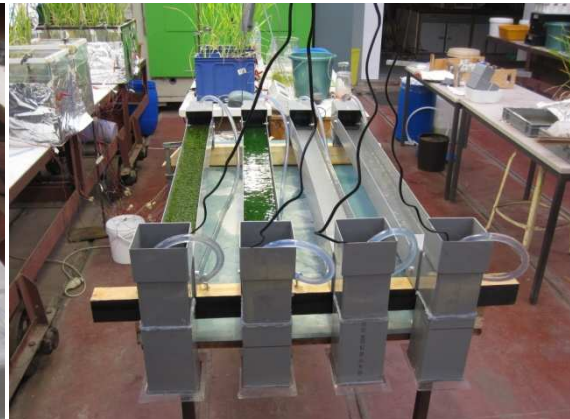
2 LIJST MET TABELLEN

<i>Tabel 1</i> - De gemiddelde samenstelling van een huishoudelijk afvalwater	2
<i>Tabel 2</i> – De lozingsnormen voor huishoudelijk afvalwater in België en Frankrijk.	3
<i>Tabel 3</i> – Een relatieve kostenraming van de verschillende systemen voor tertiaire waterzuivering met algen.	10
<i>Tabel 4</i> – De samenstelling van alle aangewende groeimedia.	27
<i>Tabel 5</i> - De organische samenstelling van groeimedium E.	28
<i>Tabel 6</i> - De voornaamste eigenschappen van de geselecteerde dragermaterialen in de FL's in EXP1.	35
<i>Tabel 7</i> - De waargenomen diversiteit aan algen in EXP 1.	36
<i>Tabel 8</i> - De evolutie van de diversiteit in EXP 1.	36
<i>Tabel 9</i> – De samenstelling van de aangewende afvalwaters in de FL's in EXP 2.....	40
<i>Tabel 10</i> - De voornaamste eigenschappen van de geselecteerde dragermaterialen in de FL's in EXP2.	49
<i>Tabel 11</i> - De waargenomen diversiteit aan algen in EXP 3.....	49
<i>Tabel 12</i> – De opgevolgde biologische eigenschappen van het perifyton in EXP 3.....	50
<i>Tabel 13</i> – De kenmerken van de belangrijke perifytongemeenschappen (PG) op basis van de algendominantie in EXP 3.	51
<i>Tabel 14</i> – De biologische samenstelling van het perifyton bij elke RUN-FL combinatie in EXP3.	51
<i>Tabel 15</i> – Het N- en P-gehalte (g/kg DS) van het perifyton bij elke RUN-FL combinatie in EXP3.	52
<i>Tabel 16</i> - De opgevolgde eigenschappen met betrekking tot de waterzuivering in EXP3.	52
<i>Tabel 17</i> - De verwijdering (g/m ² -d) van opgeloste N, P en CZV in EXP3.....	53
<i>Tabel 18</i> – De investeringskost, de werkingskost en opbrengst van een ATS voor secundaire zuivering in Zuid-Amerika of zuidoost Azië voor een gemeenschap van 1000IE.	83

3 FOTO'S VAN EXPERIMENTELE OPSTELLINGEN



20/09/2009, EXP 1, Het vooraanzicht van de perifyton-incubator bij opstart.



20/09/2009, EXP 1, Het achteraanzicht van de perifyton-incubator bij opstart.



20/10/2009, EXP 1, De volumeregelaar van de perifyton-incubator, niet aangesloten.



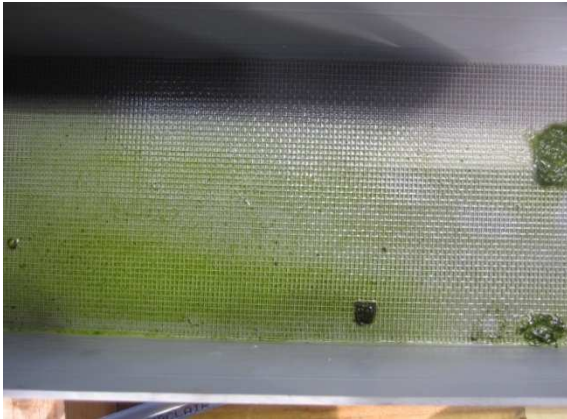
15/10/2009, EXP 1, Het zijaanzicht van de perifyton-incubator.



20/10/2009, EXP 1, Een ontwikkeld perifyton in de perifyton-incubator.



25/10/2009, EXP 1, Een subtest met de testincubator in een poging om de DS-toename te kwantificeren.



25/09/2009, EXP 1, De primaire ontwikkelingsfase van perifyton op de gaas in FL 1.



25/09/2009, EXP 1, De primaire ontwikkelingsfase van perifyton op een volledig plat oppervlak in FL 2.



25/09/2009, EXP 1, De structuur van grasmat 1 in FL 3.



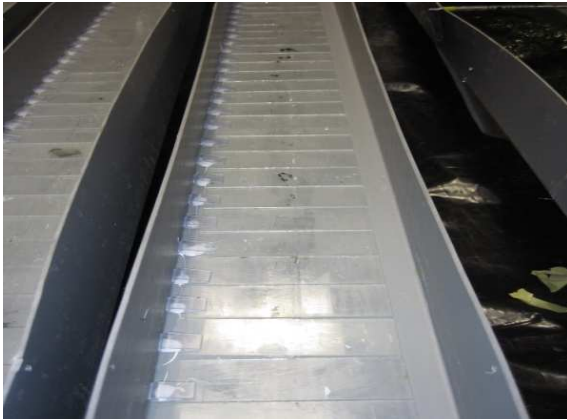
25/09/2009, EXP 1, De structuur van grasmat 2 in FL4.



30/01/2010, EXP 1, Het bovenaanzicht van de *Cladophora* gemeenschap op grasmat 2 in FL 4.



30/01/2010, EXP 1, Het zijaanzicht van de *Cladophora* mengcultuur op grasmat 2 in FL 4.



05/12/2009, EXP 2, De objectglasjes als dragermateriaal vastgeklemd met miniklemmen (links).



27/12/2009, EXP 2, Het ontwikkeld perifyton op de objectglasjes in FL1, FL2 en FL3.



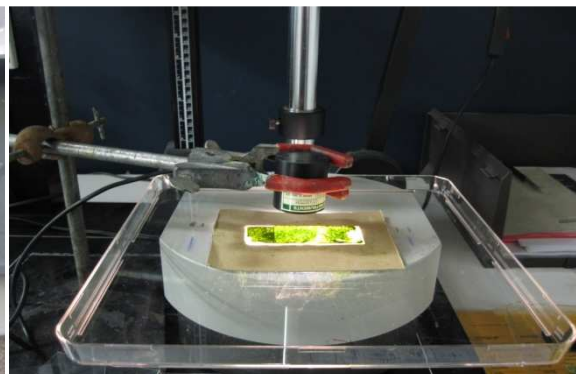
27/12/2009, EXP 2, Een close-up van het ontwikkeld perifyton op de objectglasjes in FL2.



5/01/2010, EXP 2, De schuifspanningsreactor ter bepaling van de aanhechtingssterkte van het perifyton



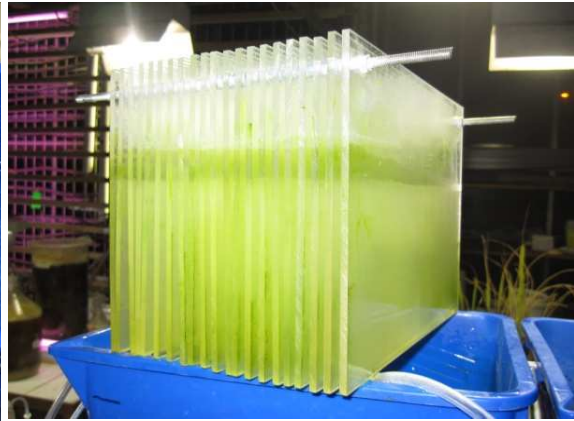
5/01/2010, EXP 2, Een objectglasje met perifyton ingesloten in de caviteit van de schuifspanningsreactor



5/01/2010, EXP 2, Een objectglasje met perifyton onder sterk licht.



16/12/2010, De proefopstelling voor lichtherverdeling met verticale platen.



22/12/2010, De aanhechting van *Chlorella* aan het oppervlakte van de platen.



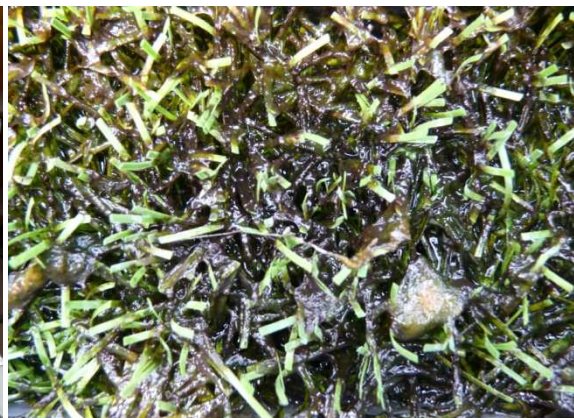
28/11/2009, De proefopstelling ter selectie van een ideale plaat voor lichtherverdeling.



28/11/2009, De proefopstelling in het donker, bij bepaling van de lichtuitval.



15/03/2010, EXP 3, Een ontwikkeld perifyton op de dragermaterialen met in rechts de doorzichtige grasmatt in FL4.



09/03/2010, EXP 3, De moeizame ontwikkeling van perifyton op grasmatt 2 in FL 3.



09/03/2010, EXP 3, Een ontwikkelde eenvoudige perifytongemeenschap op de gaas in FL 1.



09/03/2010, EXP 3, Een ontwikkelde eenvoudige perifytongemeenschap op grasmat 1 in FL 2.



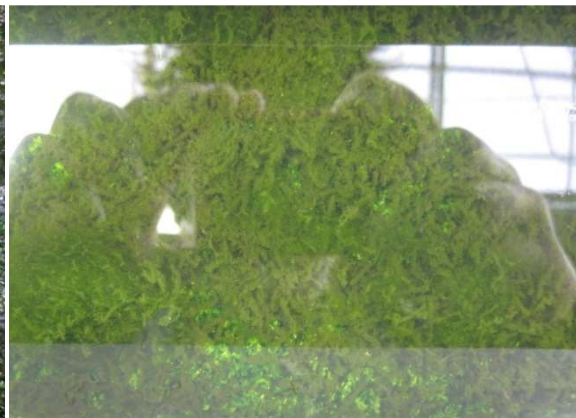
05/04/2010, EXP 3, Een ontwikkelde complexe bladvormige *Lyngbya*-gemeenschap op grasmat 2 in FL 3.



05/04/2010, EXP 3, De opkomst van een *Cladophora*-gemeenschap op grasmat 1 in FL 2.



28/03/2010, EXP 3, De kolonisatie van muggenlarven en muggen op grasmat 1 in FL 2.

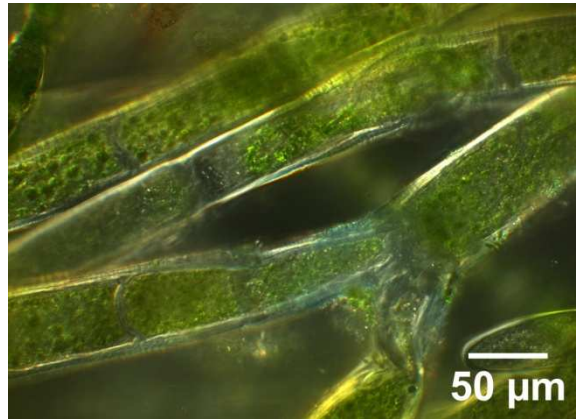


28/03/2010, EXP 3, Een ontbonden perifyton als gevolg van macro-invertebraten op grasmat 1 in FL 2.

4 FOTO'S MICROSCOPIE



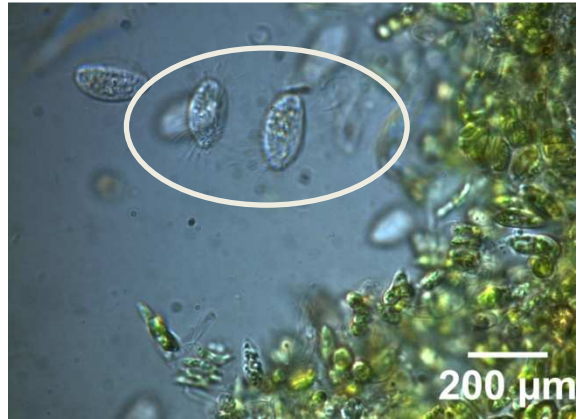
30/09/2009, EXP 1, FL1
Scenedesmus, Carteria



20/10/2009, EXP 1, FL3
Cladophora



10/01/2010, EXP 1, FL4
Nostoc



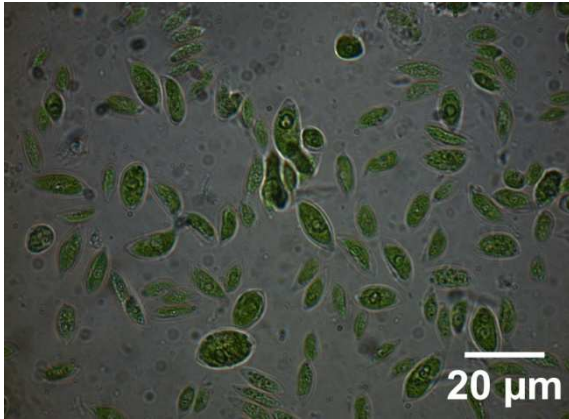
05/11/2009, EXP 1, FL1
Kleine ongeïdentificeerde micro-invertebraten



10/04/2010, EXP 1, FL3
Raderdier

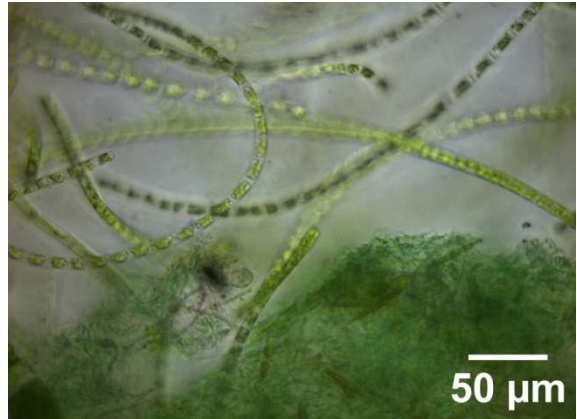


20/11/2009, EXP 1, FL4
Ongeïdentificeerd micro-invertebraat



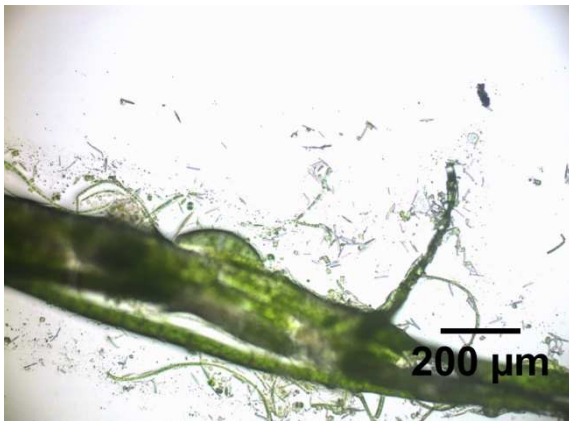
10/03/2010, EXP 3, FL1, PG1

Scenedesmus, Carteria



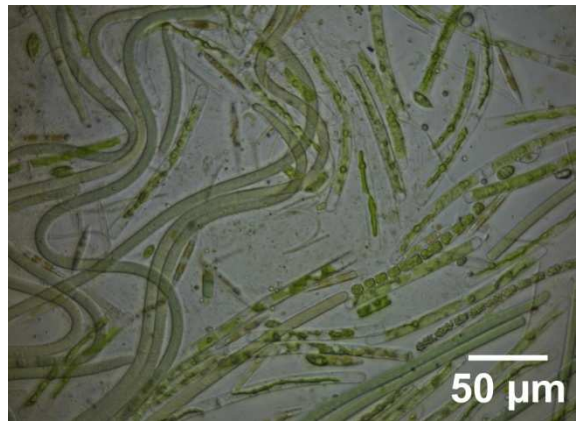
08/04/2010, EXP 3, FL1, PG1

Zygnema, Calothrix



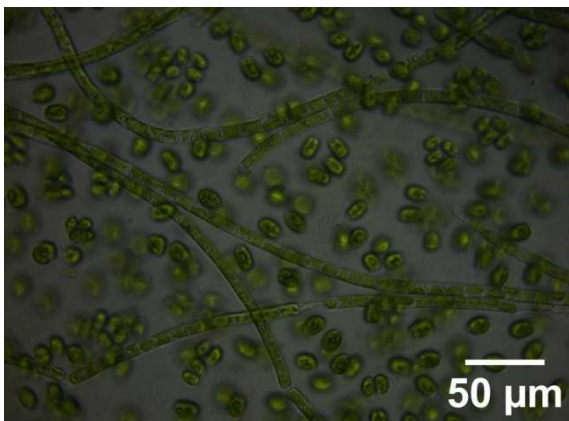
08/04/2010, EXP 3, FL2, PG3.

Cladophora en andere



10/04/2010, EXP 3, FL3, PG4.

Lyngbya, Ulothrix, Closterium



08/04/2010, EXP 3, FL2, PG5.

Zygnema, Gloeocapsa



01/04/2010, EXP 3, FL1

Enkele micro-invertebraten