

Insectenfrass: verwerkingsmethodes, biologische en chemische risico's, en het gebruik ervan als bodemverbeteraar

Auteurs:

- David Deruytter
Insect Research Center – Inagro
- Ann De Volder
SusCroPP & IP&P – KU Leuven
- Lotte Frooninckx
Expertisecentrum duurzame biomassa en chemie – Thomas More
- Thomas Quanten
Expertisecentrum duurzame biomassa en chemie – Thomas More

Contact:

- Expertisecentrum duurzame biomassa en chemie – Thomas More
Sabine Van Miert
Mail: Sabine.vanmiert@thomasmore.be
- SusCroPP -KU Leuven
Johan Ceusters
Mail: johan.ceusters@kuleuven.be
- Insect Research Center – Inagro
David Deruytter
Mail: david.deruytter@inagro.be

Contents

Hoofdstuk I: huidige productie en afzetmogelijkheden van het restsubstraat alsook kengetallen van verwerking via vergisting en compostering	5
I.1 Inleiding.....	5
I.2 Materialen en methoden	5
I.3 Resultaten	6
I.3.1 Productiehoeveelheid	6
I.3.2 Waarvoor wordt frass gebruikt?	6
I.3.3 Hoe wordt frass getransporteerd?	7
I.3.4 Impact van EU regelgeving?.....	7
I.4 Besluit.....	7
Hoofdstuk II: Alternatieve verwerkingstechnieken voor frass en hun milieu impact	8
II.1 Inleiding.....	8
II.2 Thermisch verhitten/drogen.....	8
II.3 Biogas product	10
II.4 Composteren.....	10
II.4.1 Zwarte soldatenvlieg frass - test 1	11
II.4.2 Meelwormenfrass - test 1.....	13
II.4.3 Zwarte soldatenvlieg frass - test 2	15
II.4.4 Meelwormenfrass test 2	15
II.4.5 Milieu impact compostering	16
II.5 Pelletiseren	16
II.6 Milieu impact	17
II.7 Besluit.....	17
II.8 Bijlagen.....	18
Hoofdstuk III: Microbiologische veiligheid van het restsubstraat van insectenkweek voor en na hygiënisatie	19
III.1 Inleiding.....	19
III.2 Materiaal en methoden	20
III.2.1 Frass stalen.....	20
III.2.2 Analyses	21
III.2.3 Statistische analyse	23
III.3 Resultaten	23
III.3.1 Resultaten voor frass van de kweek van zwarte soldatenvlieglarven (<i>Hermetia illucens</i>)	23

III.3.2	Resultaten voor frass van de kweek van gele meelwormen (<i>Tenebrio molitor</i>)	27
III.3.3	Conformiteit EU-wetgeving	30
III.4	Discussie en besluit	33
III.5	Referenties	34
Hoofdstuk IV: De aanwezigheid van insecten(delen) in het restsubstraat.....		35
IV.1	Inleiding.....	35
IV.2	Materiaal en methoden	36
IV.3	Resultaten	37
IV.3.1	Gewichtspercentage insecten in frass	37
IV.4	Volumepercentage insecten in frass.....	38
IV.5	Discussie en besluit	40
IV.6	Bijlagen.....	41
Hoofdstuk V: De toxicologische analyse van het restsubstraat.....		44
V.1	Inleiding.....	44
V.2	Materiaal en methoden	44
V.3	Resultaten	45
V.3.1	Zware metalen	45
V.3.2	Organische analyses.....	45
V.4	Discussie en besluit	47
Hoofdstuk VI: De fysicochemische samenstelling van de restsubstraten		48
VI.1	Inleiding.....	48
VI.2	Materiaal en methoden	48
VI.3	Resultaten	50
VI.3.1	Algemene parameters.....	50
VI.3.2	Anorganische parameters.....	54
VI.4	Discussie en besluit	56
VI.4.1	Droge en organische stof	56
VI.4.2	Stikstof-, fosfor- en kaliuminhoud (NPK)	57
VI.4.3	Micronutriënten.....	57
VI.4.4	Besluit.....	58
VI.5	Referenties.....	58
Hoofdstuk VII: De behandelde restsubstraten toegepast in de plantenteelt om de productie te verhogen onder optimale of stress omstandigheden		59
VII.1	Inleiding.....	59
VII.2	Materiaal en methoden	60

VII.2.1	Frass stalen.....	60
VII.2.2	Groene boon (<i>Phaseolus vulgaris</i> L.).....	61
VII.2.3	Methode plantengroei experimenten	61
VII.2.4	NPK-oplossingen	64
VII.2.5	Generatieve en vegetatieve groeiparameters.....	64
VII.2.6	Statistische dataverwerking.....	65
VII.3	Resultaten	66
VII.3.1	Plantexperiment 1: vers en thermisch gedroogd ZSVL-frass en GM-frass (2 en 10%) en NPK's, normale groeicondities.....	66
VII.3.2	Plantexperiment 2: vers en thermisch gedroogd ZSVL-frass (0.5 tot 4%) normale groeicondities en vers en thermisch gedroogd ZSVL-frass 2%, droogtestress.....	78
VII.3.3	Plantexperiment 3: pellets ZSVL-frass en GM-frass (2%) normale groeicondities en droogtestress	90
VII.4	Discussie en besluit.....	101
VII.4.1	Kieming	101
VII.4.2	Vegetatieve groeiparameters	101
VII.4.3	Generatieve groeiparameters.....	102
VII.4.4	Algemene conclusie	103
VII.5	Referenties.....	104

Hoofdstuk I: huidige productie en afzetmogelijkheden van het restsubstraat alsook kengetallen van verwerking via vergisting en compostering

Auteur: David Deruytter (Insect Research Center, Inagro)

I.1 Inleiding

Binnen het ValoReSect project werd een enquête opgesteld om na te gaan hoeveel frass er geproduceerd wordt, wat er nu mee gebeurt, hoe deze wordt getransporteerd en tenslotte hoe de EU wetgeving het bedrijf beïnvloedt. Belangrijk, deze enquête werd opgesteld en verzonden in 2021 en bijgevolg dus voor de huidige Europese frass wetgeving.

I.2 Materialen en methoden

De enquête bestond uit 19 vragen en was beschikbaar in het Nederlands en het Engels. Er werd voor een Europese aanpak gekozen om meer antwoorden te kunnen verzamelen gezien het geringe aantal Vlaamse insectenkwekers. De enquête werd opgesteld in Microsoft Teams en verspreid via mail naar gekende kwekers en via IPIFF (EU sector organisatie).

- 1) Land van productie?
- 2) Welke insecten worden gekweekt op uw bedrijf?
- 3) Hoeveel frass produceerde uw bedrijf in 2021?
- 4) Hoeveel frass verwacht u te produceren over 2 jaar (2023)?
- 5) Welke toepassing is er momenteel voor het frass van uw bedrijf?
- 6) Indien het frass nu direct als meststof wordt gebruikt, dan gaat het naar:
- 7) Denkt u dat dit in de nabije toekomst (2023) zal veranderen voor uw bedrijf? Indien geweten naar waar, gelieve in te vullen bij 'andere'.
- 8) Indien er nog bijkomende informatie kan gegeven worden rond het gebruik van uw frass, gelieve dit hieronder aan te vullen.
- 9) Wordt het frass intern gebruikt of getransporteerd naar een externe firma
- 10) Indien extern verwerkt, hoe gebeurt het transport:
- 11) Voor het transport van frass zijn heel wat documenten nodig, bent u hiervan op de hoogte?
- 12) De huidige transportregels zijn:
- 13) Met welke documenten moet uw bedrijf in orde zijn?
- 14) De benodigde documenten waren:
- 15) Indien er nog bijkomende informatie kan gegeven worden rond het transport van uw frass, gelieve dit hieronder aan te vullen.
- 16) Binnenkort verandert de Europese wetgeving rond frass, was u hiervan op de hoogte?

Een project van:



Met steun van:

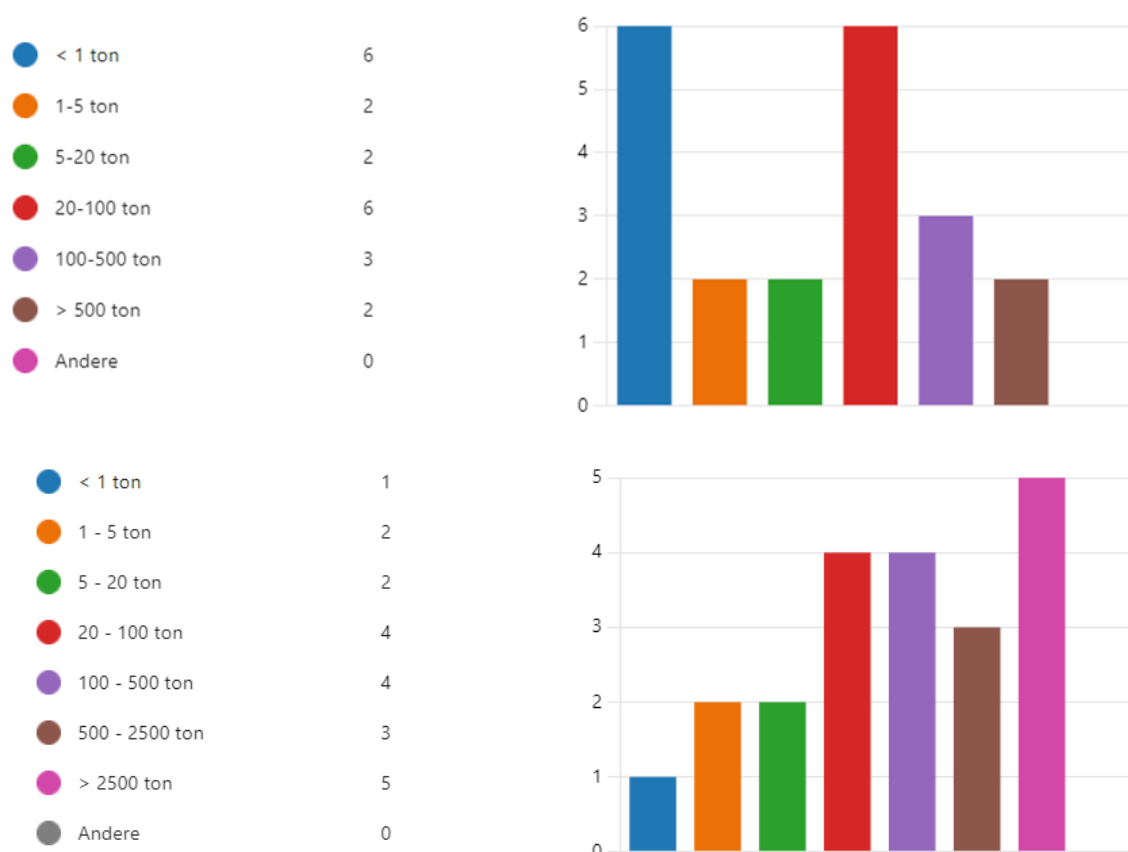


- 17) Een hygiënisatiestap (frass verhitten tot een kerntemperatuur van 70 °C gedurende 1 uur) zal binnenkort verplicht zijn in de volledige Europese Unie. Is dit een probleem voor uw bedrijf?
- 18) In de toekomst mag er maximaal 3% (op gewicht) en 5% (op volume) insecten aanwezig zijn in het frass. Is dit een probleem voor uw bedrijf?
- 19) Frass zal gebruikt mogen worden in de biologische landbouw. Opent dit perspectieven?

I.3 Resultaten

I.3.1 Productiehoeveelheid

Van alle resultaten kwamen er drie antwoorden uit België en negen uit de buurlanden (Nederland (3), Frankrijk (5) en Duitsland (1)). Er namen 11 meelwormkwekers (MWK) deel en 10 zwarte soldatenvlieg kwekers. Ongeveer 30% van de respondenten produceerde minder dan één ton frass in 2021 (microkweek) en 30% tussen 20 en 100 ton (SME). Slechts twee bedrijven produceerden meer dan 500 ton frass (Figuur 1). De totale hoeveelheid frass geproduceerd in 2021 ligt tussen 1400 en 7200 ton (minimum en maximum van de range). In twee jaar tijd werd een vertienvoudiging van dit volume verwacht naar een jaarlijkse productie tussen 14500 en 72500 ton en acht bedrijven verwachtten een productie boven 500 ton.



Figuur 1. Frass productie per jaar in 2021 (boven) en verwachtingen in 2023 (onder).

I.3.2 Waarvoor wordt frass gebruikt?

Het geproduceerde frass werd hoofdzakelijk gebruikt als meststof (20/21): meer dan de helft van de bedrijven gebruiken het onbehandeld en een derde na verhitting. Composteren en anaerobe

Een project van:



Met steun van:



fermentatie werden beide toegepast bij 20% van de bedrijven. Een derde van de bedrijven had ook meer dan één eindconsument voor hun frass (bv. als meststof en biogas). Wanneer het frass gebruikt werd als meststof dan was dit in een derde van de gevallen op eigen gronden. Opmerkelijk ook evenveel frass ging naar voeding/voeder gewassen als naar sierteelt (7/21).

I.3.3 Hoe wordt frass getransporteerd?

Slecht negen bedrijven transporteerden hun frass en geen enkel bedrijf internationaal. Van deze bedrijven is er slechts één bedrijf dat zelf het transport voorziet. De andere acht bedrijven maakten gebruik van ingehuurd transport of inzameling door een verwerkingsbedrijf (compost, biogas, meststoffenfabrikant,...). Het is dan ook niet verwonderlijk dat slechts vier bedrijven “zeker” en vier “bijna zeker” waren dat ze alle regels correct kenden. Met een NPS (Net Promotor Score) van -74 voor de helderheid van de regels en -63 voor de beschikbaarheid van benodigde documenten (NPR range van -100 tot 100) is het duidelijk dat de regels beter kunnen worden gecommuniceerd en eenvoudiger beschikbaar kunnen worden gemaakt.

I.3.4 Impact van EU regelgeving?

In 2021 waren meer dan drie op vier bedrijven op de hoogte van de aankomende veranderingen rond het frass regelgeving. Rond de verplichte hygiënisatiestap waren de stemmen gelijk verdeeld tussen de bedrijven waarvoor dit geen impact zou hebben op de huidige werking (7/21) en de bedrijven die een grote economische impact zouden ondervinden (7/21). In tegenstelling tot de hittebehandeling gaven slechts twee bedrijven aan dat de regel rond het maximum aantal toegelaten insecten in het frass een extra investeringen zou vergen. Hierbij is er wel een belangrijke kanttekening, zeven bedrijven hadden geen idee van de hoeveelheid insecten in hun frass of hoe dit te bepalen. Tenslotte was er bijna unaniem optimisme rond het toekomstig gebruik van frass in de biologische landbouw (20/21).

I.4 Besluit

Het is duidelijk dat de sector verwacht snel te groeien (10x in 2 jaar) en frass hierbij een belangrijke bron van inkomsten of kosten zal worden. Het leeuwendeel van het frass gaat naar de landbouw als meststof en hierbij wordt in de toekomst gekeken naar de biologische landbouw, zeker wanneer huidige, eigen gronden, niet meer zullen volstaan. Het transport gebeurt voornamelijk door gespecialiseerde firma's want de huidige regelgeving is zeker niet duidelijk voor de producenten. Tenslotte zijn er zorgen rond de nieuwe Europese regelgeving, en met name dan de verplichting om het frass te verhitten (70 °C, 1 uur).

Hoofdstuk II: Alternatieve verwerkingstechnieken voor frass en hun milieu impact

Auteur: David Deruytter (Insect Research Center, Inagro)

II.1 Inleiding

Het kweken van insecten voor humane- of diervoeding is een sector die snel groeit in Europa. De hoeveelheid mest, of beter gekend als frass, zal evenredig groeien met de sector. De Europese regels stellen dat frass een mengsel is van de uitwerpselen van insecten, overgebleven voeder en dode insecten(delen). Het aandeel van dit laatste niet meer mag zijn dan 5% op volumebasis en 3% op massabasis. Echter, het is ook verplicht om het frass te hygiëniseren door deze te verhitten tot minimaal 70 °C gedurende minimaal 1 uur (kern). Binnen ValoReSect werd dan ook gekeken naar welke duurzame mogelijkheden hiervoor bestaan.

II.2 Thermisch verhitten/drogen

Het verhitten van frass is de meest voor de hand liggende techniek om deze te hygiëniseren. Echter, tenzij dit kan gebeuren met restwarmte, is dit een dure en geen duurzame manier. Het kan echter de enige manier zijn die voorhanden is voor het bedrijf om aan de wettelijke voorwaarden te voldoen. Het zwarte soldatenvlieg frass (ZSVF) werd door de kweker vers en droog geleverd (de details van het droogproces zijn niet gekend). Meelwormenfrass (MWF) is reeds droog dus werd er geen verdere droging uitgevoerd door de kweker. Het effect van drogen kon dus echter enkel bestudeerd worden op ZSVF.

De analyses op het natte en droge ZSVF werden uitgevoerd door Bodemkundige Dienst van België vzw en de volgende parameters werden bepaald en samengevat in Tabel 1:

Droge stof (DS), organische stof (OS), dichtheid, geleidbaarheid, pH, massafractie steentjes, massafractie onzuiverheden, kiemremming (fytotoxiciteit), kiemkrachtige zaden, zuurstofconsumptie (oxitorp), rijpheidsgraad, rijpheidspiektemperatuur, vochtgehalte na knijptest, totale massa stikstof, ammoniakale stikstof (NH_4^+), nitraat stikstof (NO_3^-), fosfor (P_2O_5), kalium (K_2O), magnesium (MgO), calcium (CaO), natrium (Na_2O), chloride (Cl^-) en zwavel (SO_3^{2-}).

Na drogen stijgt uiteraard het droge stof gehalte, maar enkele andere parameters veranderen ook. De pH daalt sterk van licht alkalisch naar neutraal of licht zuur en de fytotoxiciteit neemt toe. Alle gemeten anorganische parameters (N, P, K, enz.) stijgen in vergelijking met het verse frass (op droge stof basis), dit is wel verwonderlijk en momenteel hebben we hier geen verklaring voor.

Een project van:



Met steun van:



Tabel 1. De gemeten parameters van het verse en droge zwarte soldatenvlieg frass voor de 3 staalnameronden.

	Eenheid	Staalname 1		Staalname 2		Staalname 3	
		Vers	Droog	Vers	Droog	Vers	Droog
<i>Frass behandeling</i>							
Algemeen							
<i>Droge stof (DS)</i>	m% op VM	57.2	80.6	55.4	85.3	45.2	84.4
<i>Organische stof (OS)</i>	m% op DS	87.4	88.1	84.8	87.9	88.5	85.3
<i>Densiteit</i>	kg L ⁻¹ op VM	0.393	0.376	0.339	0.372	0.41	0.38
<i>Geleidbaarheid</i>	μS cm ⁻¹	5800	8800	4000	8700	5100	8300
<i>pH</i>		7.8	5.4	7.5	6	7.8	6.6
<i>Steentjes (> 5 mm)</i>	m% op VM	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05
<i>Onzuiverheden (> 2 mm)</i>	m% op VM	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1
<i>Onzuiverheden op DS (> 2mm)</i>	m% on DM	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05
Composteringseigenschappen							
<i>Fytotoxiciteit</i>	%	100	100	70.4	84.8	24	100
<i>Kiemkrachtige zaden</i>	(1000 mL) ⁻¹	absent	absent	absent	absent	absent	absent
<i>Zuurstofconsumptie (oxitop)</i>	mmol O ₂ kg ⁻¹ DM h ⁻¹	45	54	36	23.7	35	10.1
<i>Rijpheidsklasse</i>	(1-5)	2	5	1	2	2	2
<i>Rijpheidspiektemperatuur</i>	°C	56.4	18.5	64.47	55.4	51	52.6
<i>Vochtigheid na knijptest</i>	m%	60	55	61	57	71	67
Anorganische analyse							
<i>Totale stikstof</i>	m% op DS	3.36	3.81	3.30	3.35	3.36	3.64
<i>NO₃⁻</i>	mg N L ⁻¹ (VM)	<3.0	<3.0	<3.0	<3.0	<3.0	<3.0
<i>NH₄⁺</i>	mg N L ⁻¹ (VM)	2800	3000	1700	3300	1600	3000
<i>Chloride (Cl⁻)</i>	mg L ⁻¹	1700	2700	1070	2800	1970	2300
<i>Fosfor (P₂O₅)</i>	m% op VM	3.30	3.85	2.55	3.17	3.47	4.38
<i>Kalium (K₂O)</i>	m% op VM	2.92	3.85	3.54	3.63	3.25	4.27
<i>Magnesium (MgO)</i>	m% op VM	0.79	0.99	0.65	0.87	0.97	1.21
<i>Calcium (CaO)</i>	m% op VM	0.09	0.22	0.13	0.36	0.13	0.88
<i>Natrium (Na₂O)</i>	m% op VM	0.63	0.87	0.65	0.74	1.13	0.77
<i>Zwavel (SO₃)</i>	m% op VM	0.87	1.02	0.90	1.16	1.26	1.34

De milieu impact van thermisch drogen is niet gering. Om 1 ton frass op te warmen van 20 naar 70 °C is 58 kWh of 26 kWh nodig indien de soortelijke warmte gelijk is aan water of hout, respectievelijk (de soortelijke warmte van frass is ongekend maar zal waarschijnlijk tussen deze waarden liggen). Echter om frass te drogen zoals in bovenstaande tabel van gemiddeld 52.6 m% DS naar 83.4 m% DS is 194 kWh nodig. Frass opwarmen om te hygiëniseren is dus energie-intensief, maar het drogen vergt veel meer energie. De CO₂ uitstoot per kWh varieert sterk naargelang de bron (gas, elektriciteit van zonnepanelen, elektriciteit van en gascentrale, stookolie, etc.), maar in België wordt gerekend met 0.198 kg CO₂/kWh voor gas en 0.23 kg CO₂/kWh voor elektriciteit. Indien dus geen groene energie wordt gebruikt zal het verwarmen tussen 5.1 en 13 kg CO₂ uitstoten en ZSVF drogen zorgt voor een extra 38 a 45 kg CO₂ per ton.

II.3 Biogas product

Het biogas potentieel werd bepaald voor zowel ZSVF als MWF in een semi-continue vergister van 32 L van het propstroomtype gedurende 112 dagen. Het volledig verslag van deze casestudy kan worden nagelezen in de bijlagen. De chemische samenstelling (frass vs digestaat) veranderde sterk na vergisting (Tabel 2). Het aandeel organische stof daalt met ongeveer 15% (op drooggewicht) en de pH stijgt naar een stabiele 8.15. De bemestingswaarde stijgt ook gezien de toename van N, P en K. Tenslotte stijgt ook het zoutgehalte (Na_2O) sterk waardoor ook dit moet in rekening worden gebracht gezien het nadelig kan zijn.

Tabel 2. De gemeten chemische parameters voor verse frass en na anaerobe vergisting (digestaat)

	Eenheid	Meelwormenfrass		Zwarte soldatenvlieg frass	
		vers	digestaat	vers	digestaat
Algemeen					
<i>Droge stof</i>	m% op VM	89.00	13.68	45.2	16.86
<i>Organische stof</i>	m% op DS	92.13	76.39	88.5	74.29
<i>Geleidbaarheid</i>	$\mu\text{S cm}^{-1}$	3600	2840	5100	2575
<i>pH</i>		6.10	8.15	7.8	8.14
Anorganische analyses					
<i>Stikstof (N)</i>	m% op DS	3.11	6.73	3.36	5.36
<i>Fosfor (P_2O_5)</i>	m% op DS	3.15	5.18	3.47	4.48
<i>Kalium (K_2O)</i>	m% op DS	2.58	4.71	3.25	4.80
<i>Magnesium (MgO)</i>	m% op DS	0.84	1.78	0.97	1.50
<i>Calcium (CaO)</i>	m% op DS	0.48	1.49	0.13	1.58
<i>Natrium (Na_2O)</i>	m% op DS	0.33	1.78	1.13	2.37
<i>Zwavel (SO_3)</i>	m% op DS	0.80	1.69	1.26	1.89

Het anaeroob vergisten van frass kan voordelig zijn om de milieu impact te minimaliseren gezien er hierbij energie (warmte + elektriciteit) wordt opgewekt. De lange-termijnstest wijst wel uit dat het niet mogelijk is om een vergister voor langere periodes te voeden met 100% frass (zowel meelworm als zwarte soldatenvlieg frass). Hierdoor is het op dit moment, met de huidige kennis, niet mogelijk een (mini)vergister te plaatsen bij een insectenkweker zonder extra input. Daarnaast is het ook noodzakelijk om het frass aan te lengen met water gezien het te hoge droge en organische stof gehalte. Gedeeltelijke inmenging lukt wel en dit wordt in de praktijk ook al toegepast door diverse bedrijven in de sector. Een deel van de opgewekte energie/warmteontwikkeling moet echt worden gebruikt om het digestaat op te verhiten (1 uur, 70 °C) om aan de wettelijke vereisten te voldoen.

II.4 Composteren

Composteren is een mogelijk alternatief om het frass te hygiëniseren daar hierbij temperaturen boven de 70 °C kunnen bereikt worden, zeker gedurende de eerste thermofiele fase. Deze warmte wordt opgewekt door de afbraak van organisch materiaal door micro-organismen (in CO_2 , water, restgassen en energie) en er is dus theoretisch geen externe energie nodig om het frass te hygiëniseren.

In ValoReSect werd gekeken naar het composteren van kleine hoeveelheden dat mogelijk zou moeten zijn voor de gemiddelde landbouwer en dus niet naar het hoogtechnologisch composteren bij

professionelen (d.i. geforceerde beluchting). Dit wil zeggen met het materiaal dat beschikbaar is op het bedrijf:

- Overdekte sleuvsilo om het frass hoop te plaatsen
- Regenwater
- Tractor of andere met de mogelijkheid van een schep om het frass te keren

Er werd enkel gekeken naar de thermofiele fase, niet naar de rijpingsfase gezien de focus lag op het bereiken van minimaal 70 °C gedurende 1 uur. Ten slotte was de intentie om het frass zo zuiver mogelijk te houden en inmenging met andere substraten dus te vermijden.

Voor de start van de experimenten werd goedkeuring verkregen van Vlaco, FAVV en VLM. Daarnaast werd Inagro ook geregistreerd bij het FOD volksgezondheid voor het gebruik van dierlijke bijproducten voor onderzoek en diagnose (registratienummer: BE7050219).

II.4.1 Zwarte soldatenvlieg frass - test 1

II.4.1.1 Proefopzet

Concreet werd verse frass van de zwarte soldatenvlieg of meelworm gebruikt (ongeveer 5 ton). Hiervan werd het vochtgehalte bepaald door middel van een Sartorius infrarood vochtanalyse op minimaal 3 substalen. Regenwater werd gebruikt om het frass te bevochtigen tot een vochtgehalte van 50%. Er werd 2 ton grove houtsnippers aan het frass toegevoegd om de structuur te verbeteren om zo de zuurstofpenetratie te verhogen. Er werd voor hout gekozen omdat verwacht werd dat dit maar beperkt zou 'deelnemen' aan het proces en nadien, na uitzeven, hergebruikt kan worden. Het resulterende, zuivere eindproduct is dan gecomposteerd frass. De volledige massa werd 3x goed gemengd door gebruik te maken van voederdoseerbak met een vermaler (merk Robert). Er werd een driehoekige composthoop gemaakt van ongeveer 2 meter hoog, 2 meter breed en 4 meter lang (Figuur 2). Deze hoop werd voorzien van 30 sensoren (Trix-8) die de temperatuur elke 5 minuten registreerden. De sensoren werden doorheen de hoop geplaatst op verschillende hoogtes en dieptes om een volledig beeld te krijgen. De composthoop werd elke 2 tot 3 dagen gekeerd om het substraat te homogeniseren en om extra te beluchten. Na 5 dagen werd extra hout (2 ton) en water toegevoegd alsook een semi-doorlaatbaar doek om de warmte beter te isoleren.



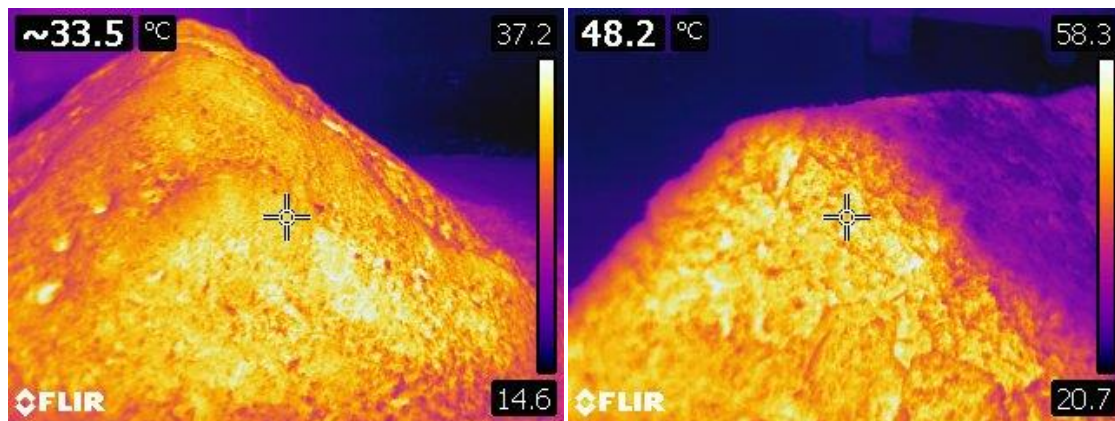
Figuur 2. Foto van de composthoop na opzet, de witte draden zijn verbonden met de temperatuursensoren.

Een project van:

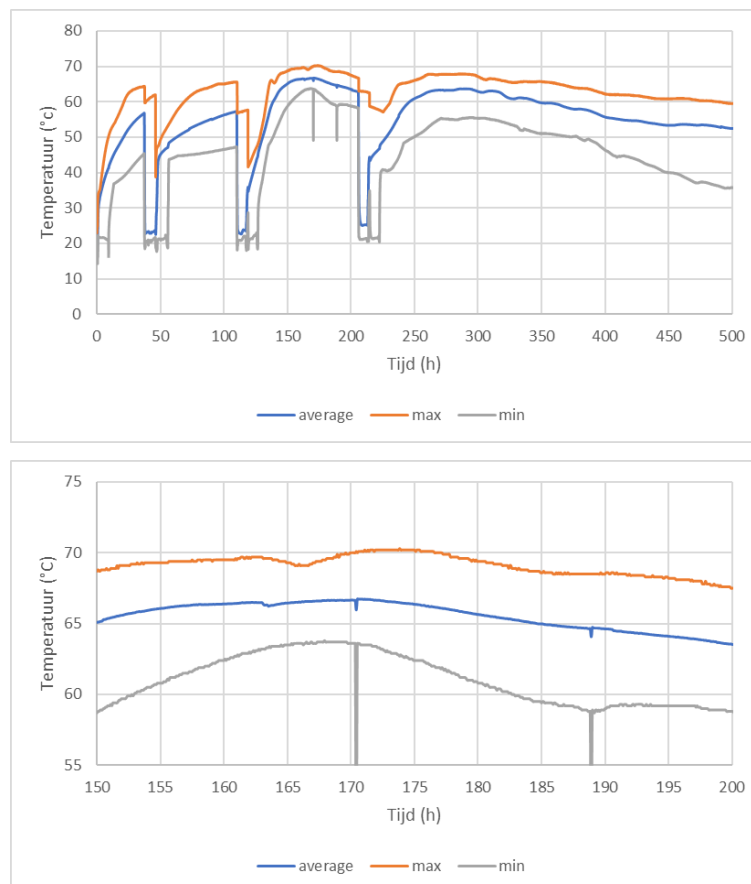
Met steun van:

II.4.1.2 Resultaten

De verse frass van Protix was al warm bij aankomst met een temperatuur rond 50-55 °C zonder toevoeging van water of houtsnippers. Na het toedienen van deze snippers steeg de temperatuur snel opnieuw tot een gemiddelde van 58 °C, echter na de 2^{de} toevoeging werd een significante verbetering geobserveerd met een gemiddelde temperatuur van 67 °C en een maximum temperatuur boven 70 °C (Figuur 3) en dit bij een buitentemperatuur van 14.4 °C (temperatuur Ukkel, Oktober 2022). Uit de infrarood beelden bleek ook dat de temperatuur vrij homogeen verspreid is maar de pieken wel geïsoleerd zijn (Figuur 4). Na de 3^{de} kering was de temperatuur langzaam aan het zakken.



Figuur 3. Infrarood beelden van de composthoop. Links de onverstoorde hoop net voor de eerste kering en rechts tijdens de eerste kering waarbij de hoop doormidden werd gesneden.



Figuur 4. De temperatuursdata (minimum, maximum en gemiddelde) gedurende de volledige looptijd van de composteringsproef (boven) en een detail hiervan (onder).

Een project van:



Met steun van:



De meeste gemeten fysicochemische parameters van het verse en gecomposteerde frass zijn gelijk (Tabel 3). Er zijn slechts 3 uitzonderingen: de fytotoxiciteit daalt van 70% naar 10%, de zuurstofvraag daalt van 36 naar 15 mmol O₂·kg⁻¹ DS·h⁻¹ en de ammoniak concentratie daalt van 1700 naar 1370 mg N·L⁻¹ VM.

Tabel 3. De fysicochemische parameters van het verse en gecomposteerde zwarte soldatenvlieg frass.

	Eenheid	Vers	Compost
Algemeen			
<i>Droge stof (DS)</i>	m% VM	55.4	55.5
<i>Organische stof</i>	m% DS	84.8	86.5
<i>Densiteit</i>	kg L ⁻¹ VM	0.339	0.349
<i>Geleidbaarheid</i>	μS cm ⁻¹	4000	4100
<i>pH</i>		7.5	7.4
<i>Steentjes(> 5 mm)</i>	m% VM	<0.05	<0.05
<i>Onzuiverheden (> 2 mm)</i>	m% VM	<0.1	<0.1
<i>Onzuiverheden op DS (> 2mm)</i>	m% DS	<0.05	<0.05
Composteringseigenschappen			
<i>Fytotoxiciteit (kiemremming)</i>	%	70.4	10
<i>Kiemkrachtige zaden</i>	(1000 mL) ⁻¹	afwezig	afwezig
<i>Zuurstofverbruikt (oxitop)</i>	mmol O ₂ kg ⁻¹ DS h ⁻¹	36	15
<i>Rijpheidsgraad</i>	(1-5)	1	1
<i>Rijpheidspiektemperatuur</i>	°C	64.5	67.5
<i>Vochtgehalte na knijptest</i>	%	61	62
Anorganische analyses			
<i>Totale stikstof inhoud (N)</i>	% DS	3.30	3.03
<i>NO₃⁻</i>	mg N L ⁻¹ VM	<3.0	<3.0
<i>NH₄⁺</i>	mg N L ⁻¹ VM	1700	1370
<i>Chloride (Cl⁻)</i>	mg L ⁻¹ VM	1070	1150
<i>Fosfor (P₂O₅)</i>	% DS	2.55	2.77
<i>Kalium (K₂O)</i>	% DS	3.54	3.64
<i>Magnesium (MgO)</i>	% DS	0.65	0.92
<i>Calcium (CaO)</i>	% DS	0.13	0.56
<i>Natrium (Na₂O)</i>	% DS	0.65	0.58
<i>Zwavel (SO₃)</i>	% DS	0.90	0.97

II.4.2 Meelwormenfrass - test 1

II.4.2.1 Proefopzet

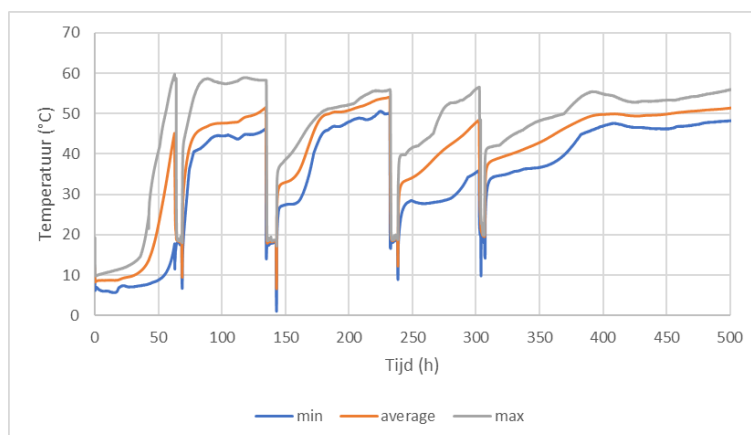
De test voor MWF werd identiek opgezet als voor zwarte soldatenvlieg frass - test 1, maar direct met voldoende houtsnippers en het semi-doorlaatbare deken. De buitentemperatuur was echter een stuk lager (4.2°C Ukkel, December 2022) en zelfs rond het vriespunt bij aanvang van de test.

II.4.2.2 Resultaten

De temperatuur klom vlot naar gemiddeld 50-55 °C maar niet hoger en de maximum temperatuur brak het plafond van 60 °C niet gedurende de testperiode (Figuur 5). Het frass werd ook hard met grote brokken en schimmelvorming. Dit was niet voordelig voor de beluchting of tijdens het keren van de composthoop. Buiten een veel lagere droge stofinhoud van het gecomposteerde frass (door het toevoegen van water), zijn er geen grote chemische verschillen tussen vers en gecomposteerd MWF (Tabel 4).

Een project van:

Met steun van:



Figuur 5. De temperatuursdata (minimum, maximum en gemiddelde) gedurende de volledige looptijd van de composteringsproef.

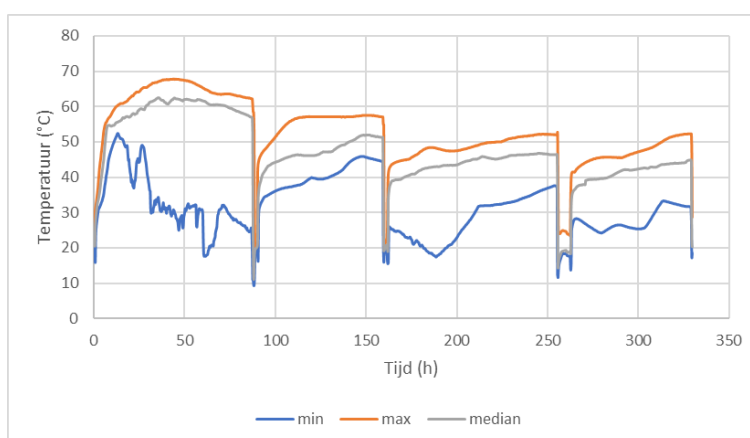
Tabel 4. De fysicochemische parameters van verse en gecomposteerde meelwormenfrass.

	Eenheid	Vers	Compost
Algemeen			
<i>Droge stof (DS)</i>	m% VM	84	53.2
<i>Organische stof</i>	m% DS	90.4762	86.4662
<i>Densiteit</i>	kg L ⁻¹ VM	0.319	0.352
<i>Geleidbaarheid</i>	μS cm ⁻¹	4000	4000
<i>pH</i>		6.8	7.6
<i>Steentjes (> 5 mm)</i>	m% VM	<0.05	<0.05
<i>Onzuiverheden (> 2 mm)</i>	m% VM	<0.1	<0.1
<i>Onzuiverheden op DS (> 2mm)</i>	m% DS	<0.05	<0.05
Composteringseigenschappen			
<i>Fytotoxiciteit (kiemremming)</i>	%	100	12
<i>Kiemkrachtige zaden</i>	(1000 mL) ⁻¹	absent	absent
<i>Zuurstofverbruikt (oxitop)</i>	mmol O ₂ kg ⁻¹ DS h ⁻¹	37	41
<i>Rijpheidsgraad</i>	(1-5)	1	2
<i>Rijpheidspiektemperatuur</i>	°C	60.9	59.6
<i>Vochtgehalte na knijptest</i>	%	70	67
Anorganische analyses			
<i>Totale stikstof inhoud (N)</i>	% DS	3.66667	4.54887
<i>NO₃⁻</i>	mg N L ⁻¹ VM	16.8	<3.0
<i>NH₄⁺</i>	mg N L ⁻¹ VM	1700	1900
<i>Chloride (Cl⁻)</i>	mg L ⁻¹ VM	290	860
<i>Fosfor (P₂O₅)</i>	% DS	4.28571	3.7594
<i>Kalium (K₂O)</i>	% DS	3.21429	3.51504
<i>Magnesium (MgO)</i>	% DS	1.17857	1.01504
<i>Calcium (CaO)</i>	% DS	0.42857	2.33083
<i>Natrium (Na₂O)</i>	% DS	0.09405	0.41353
<i>Zwavel (SO₃)</i>	% DS	0.71429	0.92105

II.4.3 Zwarte soldatenvlieg frass - test 2

De test was qua opzet identiek aan de eerste zwarte soldatenvlieg frass test, maar het frass zelf was niet identiek. Het droge stofgehalte was lager (45.2% vs 55.4%). Hierdoor was het niet nodig of wenselijk om extra water toe te voegen. Het aantal levende larven was ook hoger waardoor de berg de eerste dag de neiging had om te zakken. Tot slot was de rijpheidspiektemperatuur veel lager (51 °C vs 64.5 °C).

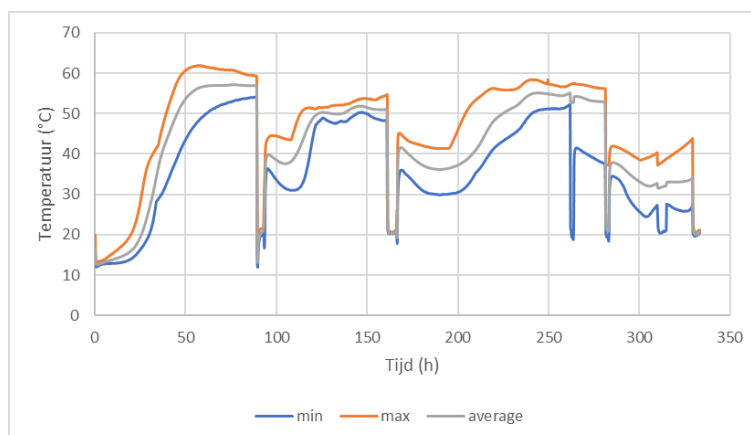
De resultaten reflecteren ook deels deze verschillen. Meer sensoren maten een lagere temperatuur omdat ze naar buiten werden geduwd door de larven, daarom werd hier de mediaan van de temperatuurswaarden genomen en niet het gemiddelde (zie Figuur 6). Toch bleek dat de mediaan en maximum temperatuur (die al bereikt werd na 48 uur) een stuk lager te zijn dan in de eerste test. Ook de gewenste 70 °C werd niet behaald (Figuur 6). Er werd geen chemische analyse uitgevoerd op de compost waardoor de vergelijking hier niet kan gebeuren.



Figuur 6. De temperatuursdata (minimum, maximum en gemiddelde) gedurende de volledige looptijd van de compostingsproef.

II.4.4 Meelwormenfrass test 2

Deze test werd opnieuw uitgevoerd zoals de vorige maar met meer houtsnippers (2/3) om zo de beluchting te verbeteren. Echter, zoals in het eerste experiment was ook hier de temperatuursontwikkeling ondermaats. De maximum temperatuur piekte enkele uren boven 60 °C, maar de gemiddelde temperatuur bleef hangen op 57 °C (Figuur 7). Omdat het, net zoals vorige test met MWF, niet relevant was voor de praktijk (geen 70 °C voor 1 uur) zijn er hier geen chemische analyses op verricht.



Figuur 7. De temperatuursdata (minimum, maximum en gemiddelde) gedurende de volledige looptijd van de composteringsproef.

II.4.5 Milieu impact compostering

II.4.5.1 Zwarte soldatenvlieg frass

Niettegenstaande er slechts 1 sensor de gewenste temperatuur van 70 °C heeft bereikt, en dus de hygiënestandaard niet hebben behaald zijn er wel mogelijkheden voor het composteren van ZSVF. De gemiddelde temperatuur gaat snel en sterk omhoog en blijft ook een hele tijd hoog. Ook het eindproduct was mooi fijn. Echter het lijkt niet verder opportuun om houtsnippers te gebruiken. Zeker wanneer water moet worden toegevoegd, kan beter worden gezocht naar een vochtig restproduct om tijd en kosten te besparen. Verder onderzoek is nodig om na te gaan hoe, op een consequente manier, de temperatuur hoog genoeg te brengen en zo aan de hygiënestandaarden te voldoen. Het lijkt echter niet eenvoudig om dit te doen op kleine (landbouwer) schaal (zoals de intentie was in dit project), maar zal toch eerder op een professionele schaal moeten worden uitgevoerd.

II.4.5.2 Meelwormenfrass

Er zijn 2 sterkte argumenten tegen het toekomstig composteren van (puur) MWF. Enerzijds blijkt uit beide testen dat de gemeten temperatuur niet in de buurt komt van de gewenste temperatuur. Daarnaast is het meelwormmest van nature een droog product (84-89% droge stof), compostering vereist echter microbiële activiteit en dus een hoger vochtgehalte ($\pm 50\%$) waardoor dus veel water moet worden toegevoegd. Naast het gebruik van kostbaar water wordt ook het volume/gewicht van de compost groter waardoor transport (indien nodig) duurder en de milieu impact groter wordt. Daarnaast is het door de hydrofobe eigenschappen van MWF niet eenvoudig om dit te mengen. Tijdens de compostering was het ook duidelijk dat de geteste methode niet resulteert in een mooie compost maar wel in een beschimmelde brokkelige berg frass die moeilijk verder te verwerken is.

II.5 Pelletiseren

Het pelletiseren van frass kan enkel gebeuren wanneer het frass droog genoeg is (> 80 % droge stof), dit wil zeggen dat MWF direct kan worden gebruikt, maar ZSVF eerst gedroogd moet worden met de daarbij horende nadelen. Zoals verwacht, waren er geen grote consistente veranderingen in de samenstelling waargenomen tussen het droge en gepelletiseerd frass (Tabel 5 en Tabel 6). Niettegenstaande er geen veranderingen waren, kan het toch nuttig zijn om het frass te pelletiseren. Dit is voornamelijk omdat dit het gebruik ervan veel eenvoudiger maakt in de landbouw. Veel landbouwmachines zijn aangepast voor het verspreiden van korrels in het kader van bemesting en/of plaagbestrijding, hierdoor kunnen pellets (bijna) direct gebruikt worden. Het zanderig karakter van puur MWF maakt dit onmogelijk alsook het vochtig en plakkerig karakter van ZSVF.

Tabel 5. De fysicochemische parameters van verse, droge en gepelletiseerde zwarte soldatenvlieg frass

ZSVF	Eenheid	Staalname 1			Staalname 2		
		Vers	Droog	Pellet	Vers	Droog	Pellet
<i>Algemeen</i>							
Droge stof (DS)	m% VM	57	81	86	55	85	85
Organische stof	m% DS	87.4	88.1	83.7	84.8	87.9	87.8
<i>Anorganische analyses</i>							
Stikstof (N)	m% DS	3.36	3.81	4.24	3.30	3.35	3.34
Fosfor (P ₂ O ₅)	m% DS	3.30	3.85	3.37	2.55	3.17	3.16
Kalium (K ₂ O)	m% DS	2.92	3.85	3.72	3.54	3.63	3.63

Tabel 6. De (chemische) parameters van verse en gepelletiseerde meelwormenfrass

MWF	Eenheid	Staalname 1		Staalname 2	
		Vers	Pellets	Vers	Pellets
<i>Algemeen</i>					
Droge stof (DS)	m% VM	88	88	84	86.8
Organische stof	m% DS	93.2	90.9	90.5	88.7
<i>Anorganische analyses</i>					
Stikstof (N)	m% DS	3.14	3.35	3.67	3.77
Fosfor (P ₂ O ₅)	m% DS	3.75	3.86	4.29	4.03
Kalium (K ₂ O)	m% DS	2.39	2.95	3.21	3.46

II.6 Milieu impact

Het impact neutraal produceren van pellets kan enkel wanneer dit op de site zelf gebeurt en door middel van hernieuwbare energie. Een ton droog materiaal pelletiseren heeft 95 KWh aan energie nodig, wat dus een impact kan hebben op het milieu. Om dit proces duurzaam te maken zou men gebruik kunnen maken van zonnepanelen, waarbij men ongeveer 3 tot 4 ton kan pelletiseren met de jaaropbrengst van 1 paneel. Daarnaast deelde Samagro mee dat het pelletiseren van MWF wel gepaard gaat met een grote productie van (fijn) stof waar ook mee rekening moet worden gehouden.

II.7 Besluit

Er zijn diverse mogelijkheden getest om na te gaan wat mogelijk is om frass duurzaam te hygiëniseren. Voor MWF kan het thermisch verhitten een optie zijn omdat het al droog is, op die manier zou men snel kunnen voldoen aan de Europese voorwaarden. Hierbij wordt ook geen extra water geïntroduceerd waardoor het transport nadien eenvoudig en goedkoper blijft. Het frass kan zonder voorbereiding worden gepelletiseerd wat de productie en het transport goedkoper en duurzamer maakt. Pelletiseren vereenvoudigt ook het gebruik in de landbouw gezien bestaande landbouwtoestellen hier al reeds voor zijn uitgerust. Enkel de ontwikkeling van stof tijdens de productie moet nog verder worden opgelost. Het 'puur' composteren van MWF is geen haalbare optie. Er moet te veel water worden toegevoegd aan dit hydrofoob product en door het zanderig karakter is ook de passieve aeratie een probleem. Dit zorgt voor schimmelvorming en een te lage maximumtemperatuur. Als beperkt bijproduct in compostering kan het wel werken, zeker als er droog materiaal moet toegevoegd worden. Tenslotte kan het gebruikt worden door de biogas industrie. Het

heeft een goed potentieel, echter opnieuw niet als enig ingrediënt. In dit project werd de mogelijkheid niet onderzocht, maar het gebruiken van MWF pellets als input voor biomassa verbrandingsovens zou ook onderzocht kunnen worden.

Het thermisch verhitten van ZSVF is een pak energie intensiever en er wordt bij voorkeur dan ook gezocht naar samenwerking, bijvoorbeeld met een verbrandingsoven, om warmte overschot te gebruiken. Het is namelijk niet direct het opwarmen dat veel energie vergt, maar wel de verdamping van het overtollige water. Voor het gebruik als meststof is het 'nat' gebruik van ZSVF niet aan te raden en pelletiseren van 'vers' ZSVF is ook niet mogelijk. De bestaande landbouwtoestellen zijn momenteel niet aangepast aan deze substantie. In tegenstelling tot MWF, lijken er wel meer mogelijkheden voor het composteren van ZSVF gezien het al aanwezige vocht en het structuur rijkere materiaal. Dit proces moet zeker verder worden geoptimaliseerd, maar kan, in theorie, resulteren in een hygiënische frass zonder input van externe energie. Net zoals MWF kan het gebruikt worden in de biogas industrie, maar niet als enig ingrediënt.

11.8 Bijlagen

Verslag simulatieproef anaerobe vergisting- BSF FRASS

Verslag simulatieproef anaerobe vergisting- MW FRASS

Een project van:



Met steun van:



Hoofdstuk III: Microbiologische veiligheid van het restsubstraat van insectenkweek voor en na hygiëniseren

Auteur: Ann De Volder (SusCroPP - KU Leuven)

III.1 Inleiding

Het kweken van insecten voor food, feed en biogebaseerde grondstoffen vormt in België een relatief nieuwe sector. Valoriseren van het restsubstraat van de kweek (frass), bestaande uit niet-geconsumeerd substraat, insectendelen en -uitwerpselen, is één van de uitdagingen waar de sector voor staat. Frass zou potentieel hebben als grondstof voor de productie van bodemverbeteraars of meststoffen. Volgens de wetgeving wordt het restsubstraat beschouwd als dierlijk bijproduct categorie 2 materiaal en moet het een hygiëniseringsstap ondergaan om als grondstof in aanmerking te komen. In Vlaanderen zijn enkel composteer- en vergistingsinstallaties hiervoor erkend. In de daar toegepaste processen wordt het restsubstraat vaak samen met andere biomassa verwerkt, hetgeen de toegevoegde waarde ervan reduceert. Alternatieve technieken zoals thermisch drogen, pelletiseren of pyrolyse laten verwerking zonder inmenging toe maar zijn momenteel niet erkend voor categorie 2 materiaal. Er is nog onvoldoende kennis over de impact van de hygiëniserings technieken op de biologische veiligheid en fysicochemische eigenschappen van het verwerkte restsubstraat en over de economische rendabiliteit van de alternatieve verwerkingsprocessen. Om valorisatieketens (samenwerkingen tussen kwekers, verwerkers, gebruikers ...) te kunnen vormen is kennis rond, de kwaliteit en de economische meerwaarde van het verwerkte restsubstraat essentieel.

Op het tijdstip van het uitschrijven van het VLAIO TETRA HBC.2021.0103 project was er in de Europese wetgeving nog geen standaard voor het 'in de markt brengen' van insectenfrass, ook was frass zelf nog niet gedefinieerd. Verordening (EU) No 142/2011 (25/02/2011), tot vaststelling van gezondheidsvoorschriften inzake niet voor menselijke consumptie bestemde dierlijke bijproducten en afgeleide producten, werd destijds gebruikt als referentie voor de microbiologische criteria voor frass afkomstig van insectenkweek.

In de meer recente Verordening (EU) No 2021/1925 (05/11/2021), betreft de vereisten voor het op de markt brengen van bepaalde insectenproducten, wordt frass gedefinieerd als mix van insect uitwerpselen, delen van dode insecten en voedingssubstraat. De vereisten voor het 'in de markt brengen' ervan worden gelijkgesteld met deze voor verwerkte mest. Een vergelijking van de microbiologische criteria voor het restsubstraat van insectenkweek uit beide wettelijke bepalingen wordt gegeven in Tabel 7 (EUR-Lex, 2023).

In deeltaak 2.1 van het TETRA ValoReSect project werd conformiteit aan de EU-wetgeving betreffende microbiologische veiligheid nagegaan voor het restsubstraat van de kweek van larven van de zwarte soldatenvlieg (*Hermetia illucens*, HI) en gele meelwormen (*Tenebrio molitor*, TM). Microbiologische parameters van frass werden bepaald na referentie hittebehandeling (70 °C - 60 minuten) maar ook voor onbehandeld frass en na alternatieve hygiëniseren door middel van pelletiseren en composteren.

Een project van:



Met steun van:



Tabel 7. Europese wetgeving betreffende de microbiologische kwaliteit van frass afkomstig van insectenkweek.

Staalname	Species	Stalen	Testportie		Vereisten	
			gram	c	m	M
Verordening (EU) No 142/2011 (25/02/2011)						
Onmiddellijk na behandeling	<i>Clostridium perfringens</i>		1			afwezig
Tijdens opslag of bij het uit opslag nemen	<i>Salmonella</i>	5	25	0	0	0
	Enterobacteriaceae	5	1	2	10	300
Verordening (EU) No 2021/1925 (05/11/2021)						
Onmiddellijk na behandeling	<i>Escherichia coli</i>	5	1	5	0	1000
	of Enterococcaceae	5	1	5	0	1000
Tijdens opslag of bij het uit opslag nemen	<i>Salmonella</i>	5	25			afwezig

c: aantal stalen waarvoor het aantal bacteriën mag liggen tussen m en M, stalen zijn aanvaardbaar als het aantal bacteriën in de overige stalen \leq m

m: drempelwaarde aantal bacteriën, resultaat voldoende indien voldaan in alle stalen

M: maximumwaarde aantal bacteriën, resultaat onvoldoende indien \geq M in 1 of meer stalen

Stalen moeten een hittebehandeling ondergaan van minstens 70 °C gedurende minstens 60 minuten waarna ze moeten voldoen aan de criteria. Ook is een behandeling voor het reduceren van sporevormende bacteriën en toxinevorming vereist, indien deze werden geïdentificeerd als relevant risico.

III.2 Materiaal en methoden

III.2.1 Frass stalen

Tijdens het project werd op drie tijdstippen frass bemonsterd (batchen 1, 2 en 3). Frass van de kweek van zwarte soldatenvlieglarven (*Hermetia illucens*, code HI) werd aangeleverd door Protix (Drongen, Nederland). Frass van de kweek van gele meelwormen (*Tenebrio molitor*, code TM) werd aangeleverd door Nusect (Deerlijk, België). Een overzicht van de stalen, staalcodes en corresponderende behandelingen wordt gegeven in Tabel 8. Voor details over de herkomst van de restsubstraten, het transporten en de verwerking wordt verwezen naar het rapport van deeltaak L1.2. Wel dient nog vermeld te worden dat de stalen HI1-2 pellets en HI1 compost werden gemaakt van het door Protix gedroogd frass. Voor de aanmaak van de overige stalen thermisch gedroogd frass, pellets en compost werd onbehandeld frass gebruikt. Staal TM3 C werd niet aangeleverd omwille van problemen met het composteren. Stalen HI3 P en TM3 P werden evenmin geleverd. Deelstalen voor microbiologische analyse werden bewaard bij 4 °C.

Tabel 8. Overzicht van de stalen frass uit de kweek van zwarte soldatenvlieglarven (HI) en gele meelwormen (TM).

Batch	Frass code	Species	Behandeling
1	HI1 F	<i>Hermetia illucens</i>	onbehandeld
	HI1 D		gedroogd (Protix)
	HI1 TD		thermisch gedroogd (70 °C - 60 min.)
	HI1 P		gepelletiseerd
	HI1 C		gecomposteerd
1	TM1 F	<i>Tenebrio molitor</i>	onbehandeld
	TM1 TD		thermisch gedroogd (70 °C - 60 min.)
	TM1 P		gepelletiseerd
	TM1 C		gecomposteerd
2	HI2 F	<i>Hermetia illucens</i>	onbehandeld
	HI2 D		gedroogd (Protix)
	HI2 TD		thermisch gedroogd (70 °C - 60 min.)
	HI2 P		gepelletiseerd
	HI2 C*		gecomposteerd
2	TM2 F	<i>Tenebrio molitor</i>	onbehandeld
	TM2 TD		thermisch gedroogd (70 °C - 60 min.)
	TM2 P		gepelletiseerd
	TM2 C		gecomposteerd
3	HI3 F	<i>Hermetia illucens</i>	onbehandeld
	HI3 D		gedroogd (Protix)
	HI3 TD		thermisch gedroogd (70 °C - 60 min.)
	HI3 P*		gepelletiseerd
	HI3 C		gecomposteerd
3	TM3 F	<i>Tenebrio molitor</i>	onbehandeld
	TM3 TD		thermisch gedroogd (70 °C - 60 min.)
	TM3 P*		gepelletiseerd
	TM3 C*		gecomposteerd

*: stalen werden niet geleverd

III.2.2 Analyses

Microbiologische analyses werden uitgevoerd op de (on)behandelde restsubstraten. Voor de frass-stalen van batch 1 werden, conform Verordening (EU) No 142/2011, de aantallen Enterobacteriaceae en *Clostridium perfringens* bepaald. Voor de stalen van de tweede en derde batch werd, conform Verordening (EU) No 2021/1925, gekeken naar de aantallen *Escherichia coli* en Enterococcaceae. Daarnaast werd voor alle (on)behandelde frass-stalen het totaal aeroob kiemgetal (TAK) en het aantal aerobe endosporen bepaald, werd de aan/afwezigheid van *Salmonella spp.* in 25 g staal gecontroleerd en de wateractiviteit gemeten.

III.2.2.1 Bepaling wateractiviteit

De wateractiviteit (a_w) werd in drievoud bepaald met een a_w -meter (LabMaster a_w , Novasina, Lachen, Zwitserland), na het bereiken van een constante a_w en temperatuur (20 °C) gedurende minstens 5 minuten.

III.2.2.2 Microbiologische analyse

Bepaling van het totaal aerob kiemgetal, de aantallen Enterobacteriaceae, *Escherichia coli*, aerobe endosporen, Enterococcaceae en *Clostridium perfringens* in het frass stalen werd in vijfvoud uitgevoerd volgens ISO-standaard methoden beschreven door Dijk et al., 2015. Voor elk van de vijf replica's werd, vertrekkende van 5 g frass-staal, een primaire verdunning (1/10) gemaakt in steriele pepton fysiologische zoutoplossing (PFZ, 0.85% NaCl, 0.1% pepton), gevolgd door homogenisatie in een Stomacher® gedurende 1 minuut. Uit deze primaire verdunning werd een 10-voudige verdunningsreeks gemaakt in PFZ. 1 ml van deze decimale verdunningsreeks werd op het juiste voedingsmedium gebracht volgens de gietplaatmethode (in tweevoud). De platen werden omgekeerd geïncubeerd. Voor de bepaling van het totale aantal *C. perfringens* (vegetatieve cellen en endosporen) werd de incubatie onder anaerobe condities uitgevoerd. Na de incubatieperiode werd het aantal kolonies geteld en het kiemgetal berekend, uitgedrukt in log kolonievormende eenheden per gram (log kve/g). Om het aantal aerobe endosporen te bepalen werd de primaire verdunning, vóór het maken van de verdunningsreeks, onderworpen aan een hiteschok (80 °C - 10 min.) om de vegetatieve cellen te doden en de endosporen te activeren.

De aan/afwezigheid van *Salmonella spp.* in 25 g frass werd bepaald volgens het korte RAPID'*Salmonella* agar protocol, gevalideerd door 'the AOAC Research Institute' (gecertificeerde NF-validatie volgens de ISO 16140 standaard). Voor elk van de vijf replica's werd 25 g frass verdund in 225 ml gebufferd peptonwater aangevuld met een selectieve RAPID'*Salmonella* capsule. Deze oplossing werd geïncubeerd bij 41.5 °C gedurende 16 tot 22 uur voor selectieve aanrijking. Daarna werd, in tweevoud, 10 µl van de aangerijkte oplossing, volgens de strijkplaatmethode, gebracht op RAPID'*Salmonella* agar, gevolgd door incubatie bij 37°C gedurende 24 uur.

Een overzicht van de microbiologische bepalingen, voedingsmedia, incubatietemperatuur en incubatietijd wordt gegeven in Tabel 9.

Tabel 9. Microbiologische analyse: kiemgetallen, voedingsmedia, uitplaatmethode en incubatieparameters.

Bepaling	Voedingsmedium	Methode	Incubatie Temp. (°C)	Tijd (uur)
Totaal Aerob Kiemgetal	Plate Count agar (Biokar Diagnostics)	gietplaat	30	72
Enterobacteriaceae	Violet Red Bile Glucose agar (Biokar Diagnostics)	gietplaat	37	24
Aerobe endosporen	Plate Count agar (Biokar Diagnostics)	gietplaat	37	24
<i>Escherichia coli</i>	Tryptone bile x-glucuronide agar (VWR)	gietplaat	44	24
Enterococcaceae*	Kanamycin esculin azide agar (Millipore)	gietplaat	37	48
<i>Clostridium perfringens</i>	Tryptose sulphite cycloserine agar (Biokar Diagnostics)	gietplaat	37**	24
<i>Salmonella spp.</i>	RAPID' <i>Salmonella</i> agar (BioRad Laboratories)	strijkplaat	37	24

*Kanamycin esculin azide agar detecteert enkel enterokokken, de gerapporteerde waarde is dus mogelijk een onderschatting van het totale aantal Enterococcaceae

**anaerobe incubatie

Een project van:



Met steun van:



III.2.3 Statistische analyse

Statistische analyse werd uitgevoerd met het JMP Pro 16.0.0 softwarepakket. Normaliteit en homoscedasticiteit van de data werden gecontroleerd met respectievelijk de Shapiro-Wilk en O'Brien-test. Een one-way Anova test werd uitgevoerd voor het bepalen van statistisch significante verschillen tussen de gemiddelden van twee of meer onafhankelijke groepen, significante verschillen werden aangetoond door middel van een Tukey Honest Significant Difference Post-Hoc test. Voor alle testen werd een significantieniveau van 5 % ($p = 0.05$) gebruikt

III.3 Resultaten

III.3.1 Resultaten voor frass van de kweek van zwarte soldatenvlieglarven (*Hermetia illucens*)

De analyseresultaten van de bepaling van de wateractiviteit, het totaal aeroob kiemgetal, de aantallen Enterobacteriaceae en aerobe endosporen in de stalen frass van de kweek van larven van de zwarte soldatenvlieg (ZSVL) van batchen 1, 2 en 3, worden weergegeven in Tabel 10.

Tabel 10. Resultaten van de bepaling van de wateractiviteit en kiemgetallen TAK, Enterobacteriaceae en aerobe endosporen (log kve/g) voor onbehandelde en behandelde stalen frass van de kweek van zwarte soldatenvlieglarven. Waarden zijn gemiddelde en standaardafwijking van 5 herhalingen. De waarden in de grijze balk zijn gemiddelde en standaardafwijking van de 3 batchen, tenzij anders vermeld door aanduiding met *.

Behandeling	Frass code	Wateractiviteit	Kiemgetal (log kve/g)		
		a_w	TAK	Enterobacteriaceae	aerobe endosporen
onbehandeld	HI1 F	0.95 ± 0.00	8.0 ± 0.1 ^c	5.3 ± 0.1 ^b	6.2 ± 0.2 ^b
	HI2 F	0.96 ± 0.00	8.4 ± 0.0 ^b	4.0 ± 0.1 ^c	6.8 ± 0.1 ^a
	HI3 F	0.97 ± 0.00	8.8 ± 0.3 ^a	6.0 ± 0.1 ^a	6.1 ± 0.0 ^b
gedroogd (Protix)	HI1 D	0.67 ± 0.00	7.2 ± 0.7	< 1.0 ± 0.0	*
	HI2 D	0.66 ± 0.00	7.1 ± 0.0	< 1.0 ± 0.0	6.9 ± 0.1
	HI3 D	0.64 ± 0.00	7.7 ± 0.2	< 1.0 ± 0.0	7.2 ± 0.1
thermisch gedroogd (70 °C - 1 u)	HI1 TD	0.95 ± 0.00	6.9 ± 0.1 ^b	< 1.0 ± 0.0	6.2 ± 0.1 ^a
	HI2 TD	0.94 ± 0.00	7.3 ± 0.1 ^a	< 1.0 ± 0.0	6.4 ± 0.1 ^a
	HI3 TD	0.95 ± 0.00	6.9 ± 0.2 ^b	1.1 ± 0.2	5.5 ± 0.2 ^b
gepelletiseerd	HI1 P	0.62 ± 0.00	7.8 ± 0.0 ^a	1.5 ± 0.7 ^a	7.2 ± 0.1 ^a
	HI2 P	0.62 ± 0.00	6.4 ± 0.2 ^b	< 1.0 ± 0.0 ^b	6.0 ± 0.1 ^b
gecomposteerd	HI1 C**	0.96 ± 0.00	9.5 ± 0.1 ^b	< 1.0 ± 0.0 ^c	7.3 ± 0.1 ^b
	HI2 C	0.96 ± 0.00	8.8 ± 0.1 ^c	6.8 ± 0.1 ^b	7.1 ± 0.1 ^b
	HI3 C	0.97 ± 0.00	10.1 ± 0.0 ^a	7.2 ± 0.2 ^a	8.2 ± 0.1 ^a
	HI F	0.96 ± 0.01	8.4 ± 0.4	5.1 ± 0.9	6.3 ± 0.3
	HI D	0.66 ± 0.01	7.3 ± 0.5	< 1.0 ± 0.0	7.0 ± 0.2
	HI TD	0.95 ± 0.01	7.0 ± 0.2	1.0 ± 0.1	6.0 ± 0.4
	HI P	0.62 ± 0.00	7.1 ± 0.8	1.2 ± 0.5	6.6 ± 0.7
	HI C	0.96 ± 0.01	9.5 ± 0.5	4.9 ± 3.0	7.6 ± 0.5

*: analyse niet uitgevoerd; 1,2,3: batch nummer; **: HI1 C gemaakt van HI1 D

HI: *Hermetia illucens*; F: vers; D: droog; TD: thermisch gedroogd; P: pellets; C: compost

a-c: resultaten per kolom en per behandeling (F, D, TD, P of C) met dezelfde letter in superscript zijn niet significant verschillend ($p \geq 0.05$); geen letters indien geen significante verschillen

De wateractiviteit (a_w) is een maat voor de hoeveelheid water beschikbaar voor microbiële groei, waarden liggen tussen 0 en 1 (zuiver water). Bij een $a_w < 0.6$ wordt groei van micro-organismen onmogelijk en wordt een product als microbiologisch stabiel beschouwd. De gemiddelde a_w waarde voor de onbehandelde stalen ZSVL-frass bedroeg 0.96 ± 0.01 , er waren geen significante verschillen tussen de drie batchen. De gemeten a_w -waarde is in overeenstemming met eerder gerapporteerde waarden tussen 0.83 en 0.98 door Van Looveren et al., 2021 en Wynants et al., 2019.

Drogen door Protix verminderde de wateractiviteit significant tot een gemiddelde waarde van 0.66 ± 0.01 , iets hoger dan de limiet voor microbiële groei. Thermisch drogen van onbehandeld frass door Thomas More daarentegen had geen invloed op de wateractiviteit.

Pelletisering van het door Protix gedrooghet frass veranderde de a_w waarde niet significant.

Composteren van het door Protix gedrooghet frass van batch 1 (HI1 D) verhoogde de a_w -waarde significant met 0.3 eenheden tot 0.93 voor HI1 C, vergelijkbaar met de a_w -waarde van het onbehandelhet frass (HI1 F). De stijging van de wateractiviteit is een gevolg van toevoeging van water tijdens het composteringsproces. Het vochtgehalte van staal HI1 D was 19%, voor het gecomposteerde staal HI1 C was de waarde 30%. Composteren van het onbehandelhet frass had geen invloed op de wateractiviteit.

Het onbehandelde restsubstraat van de kweek van zwarte soldatenvlieglarven had een hoge microbiële belading. Het totaal aeroob kiemgetal (TAK) bedroeg voor de drie geanalyseerde batchen gemiddeld 8.4 ± 0.4 log kve/g, het aantal Enterobacteriaceae 5.1 ± 0.9 log kve/g en het aantal aerobe endosporen 6.3 ± 0.3 log kve/g. Batch 3 had een statistisch significant hoger kiemgetal TAK en Enterobacteriaceae in vergelijking met batchen 1 en 2. De grootteorde van het verschil bedroeg respectievelijk maximaal 0.8 en 2 logeenheden voor TAK en Enterobacteriaceae. De belading met aerobe endosporen was vergelijkbaar voor batch 1 en 3 en statistisch hoger voor de tweede batch. De gemeten waarden voor TAK in onbehandeld ZSVL-frass zijn iets lager dan TAK-waarden tussen 8.5 en 10.2 log kve/g gerapporteerd door Wynants et al. (2019) en 9.2 log kve/g door Van Looveren et al. (2022). Zij vonden ook hogere aantallen Enterobacteriaceae, respectievelijk tussen 5.7 en 9.5 log kve/g en rapporteerden gehalten aerobe endosporen tussen 4.2 en 7.0 log kve/g.

Hygiëniseratie door droging had weinig invloed op zowel het TAK als op het aantal aerobe endosporen. De gemiddelde reductie van het TAK bedroeg 1.1 logeenheid voor de door Protix gedroogde stalen (D). De referentie hittebehandeling uitgevoerd door Thomas More (TD) reduceerde het TAK met gemiddeld 1.3 logeenheid. De verandering in het gemiddeld aantal aerobe endosporen was voor beide behandelingen minder dan 1 logeenheid. Deze reducties zijn echter microbiologisch gezien niet betekenisvol. Hittebehandeling reduceerde het aantal Enterobacteriaceae in ZSVL-frass significant tot onder de detectielimiet van 1 log kve/g, met uitzondering van staal HI3. Na de referentiebehandeling werd in twee van de vijf uitgevoerde herhalingen voor HI3 TD nog 1.3 log kve/g Enterobacteriaceae gevonden.

Pelletisering had geen invloed op de microbiële belading van het frass stalen, de gemiddelde verandering in kiemgetallen bedroeg minder dan 0.2 logeenheden.

Composteren van het door Protix gedroogde ZSVL-frass van batch 1 resulteerde in een toename van het TAK met 2.3 logeenheden. Composteren van het onbehandelde ZSVL-frass van batchen 2 en 3 verhoogde het TAK met gemiddeld 1 logeenheid, het aantal Enterobacteriaceae steeg met 2 logeenheden, het aantal aerobe sporen nam met 1.2 logeenheden toe. De toenames waren statistisch significant en resulteren uit de stimulatie van de microbiologische activiteit tijdens het composteringsproces. Vanuit microbiologisch oogpunt is het belang echter beperkt en eigen aan het composteringsproces.

Een project van:



Met steun van:



De analyseresultaten van de bepaling van de aantallen *E. coli* en enterokokken en van aan/afwezigheid van *Salmonella* in de stalen frass van de kweek van larven van de zwarte soldatenvlieg van batchen 1, 2 en 3 worden weergegeven in Tabel 11. Voor de stalen (on)behandeld ZSVL - frass van de eerste batch werd conform de 'oude' EU-wetgeving, nog geen bepaling van *E. coli* en enterokokken uitgevoerd. *Clostridium perfringens* werd niet gedetecteerd in deze stalen.

Tabel 11. Resultaten van de bepaling van de kiemgetallen *E. coli* en Enterococcaceae (log kve/g) en van bepaling aan-/afwezigheid *Salmonella* voor onbehandelde en behandelde stalen frass van de kweek van zwarte soldatenvlieglarven. Waarden zijn gemiddelde en standaardafwijking van 5 herhalingen. De waarden in de grijze balk zijn gemiddelde en standaardafwijking van de 3 batchen, tenzij anders vermeld door aanduiding met *.

Behandeling	Frass code	Kiemgetal (log kve/g)				aan-/afwezigheid	
		<i>Escherichia coli</i>		Enterococcaceae		<i>Salmonella</i>	
		x/5 ≥ 3		x/5 ≥ 3		x ND	
onbehandeld	HI1 F	*	*	*	*	ND in 25 g	5
	HI2 F	3.1 ± 0.3 ^b	2	5.7 ± 0.5 ^b	5	ND in 25 g	5
	HI3 F	4.6 ± 0.2 ^a	5	6.4 ± 0.4 ^a	5	ND in 25 g	5
gedroogd (Protix)	HI1 D	*	*	*	*	ND in 25 g	5
	HI2 D	< 1.0 ± 0.0	0	< 1.0 ± 0.0	0	ND in 25 g	5
	HI3 D	< 1.0 ± 0.0	0	< 1.0 ± 0.0	0	ND in 25 g	5
thermisch gedroogd (70 °C – 1 u)	HI1 TD	*	*	*	*	ND in 25 g	5
	HI2 TD	< 1.0 ± 0.0	0	2.6 ± 0.2 ^b	0	ND in 25 g	5
	HI3 TD	< 1.0 ± 0.0	0	4.8 ± 0.4 ^a	5	ND in 25 g	5
gepelletiseerd	HI1 P	< 1.0 ± 0.0	0	1.9 ± 1.2	0	ND in 25 g	5
	HI2 P	< 1.0 ± 0.0	0	< 1.0 ± 0.1	0	ND in 25 g	5
gecomposteerd	HI1 C	*	*	*	*	ND in 25 g	5
	HI2 C	2.4 ± 0.6	1	6.3 ± 0.4 ^b	5	ND in 25 g	5
	HI3 C	2.6 ± 0.2	0	6.9 ± 0.2 ^a	5	ND in 25 g	5
	HI V	3.8 ± 0.8		6.1 ± 0.5		ND in 25 g	
	HI D	< 1.0 ± 0.0		< 1.0 ± 0.0		ND in 25 g	
	HI TD	< 1.0 ± 0.0		3.7 ± 1.2		ND in 25 g	
	HI P	< 1.0 ± 0.0		1.3 ± 0.6		ND in 25 g	
	HI C	2.5 ± 0.4		6.6 ± 0.4		ND in 25 g	

*: analyse niet uitgevoerd; 1,2,3: batch nummer; ND: niet gedetecteerd

HI: *Hermetia illucens*; F: vers; D: droog; TD: thermisch gedroogd; P: pellets; C: compost

x/5 ≥ 3: aantal herhalingen op 5 waarvoor kiemgetal ≥ 3 log kve/g

x ND: aantal herhalingen op 5 waarvoor *Salmonella* niet werd gedetecteerd in 25 g staal

a-b: resultaten per kolom en per behandeling (F, D, TD, P of C) met dezelfde letter in superscript zijn niet significant verschillend (p ≥ 0.05); geen letters indien geen significante verschillen

Voor het onbehandelde restsubstraat afkomstig van de kweek van zwarte soldatenvlieglarven werd voor batchen 2 en 3 een gemiddeld kiemgetal *Escherichia coli* van 3.8 ± 0.8 log kve/g gevonden, het aantal enterokokken bedroeg 6.1 ± 0.5 log kve/g. De HI3 F stalen hadden een significant hoger kiemgetal voor *E. coli* en voor enterokokken in vergelijking met de HI2 F stalen (respectievelijk 4.3 en 3.1 log kve/g voor *E. coli*, 6.4 en 5.7 kve/g voor enterokokken). *Salmonella* werd niet gedetecteerd in 25 g ZSVL-frass, dit gold voor de 5 uitgevoerde replica's van alle onbehandelde en behandelde stalen van de drie batchen.

Drogen door verhitting reduceerde het aantal *E. coli* significant tot een waarde beneden de detectielimiet van 1 log kve/g. Voor enterokokken werd reductie beneden detectielimiet enkel bereikt met de door Protix uitgevoerde behandeling (HI2 D en HI3 D).

Een project van:



Met steun van:

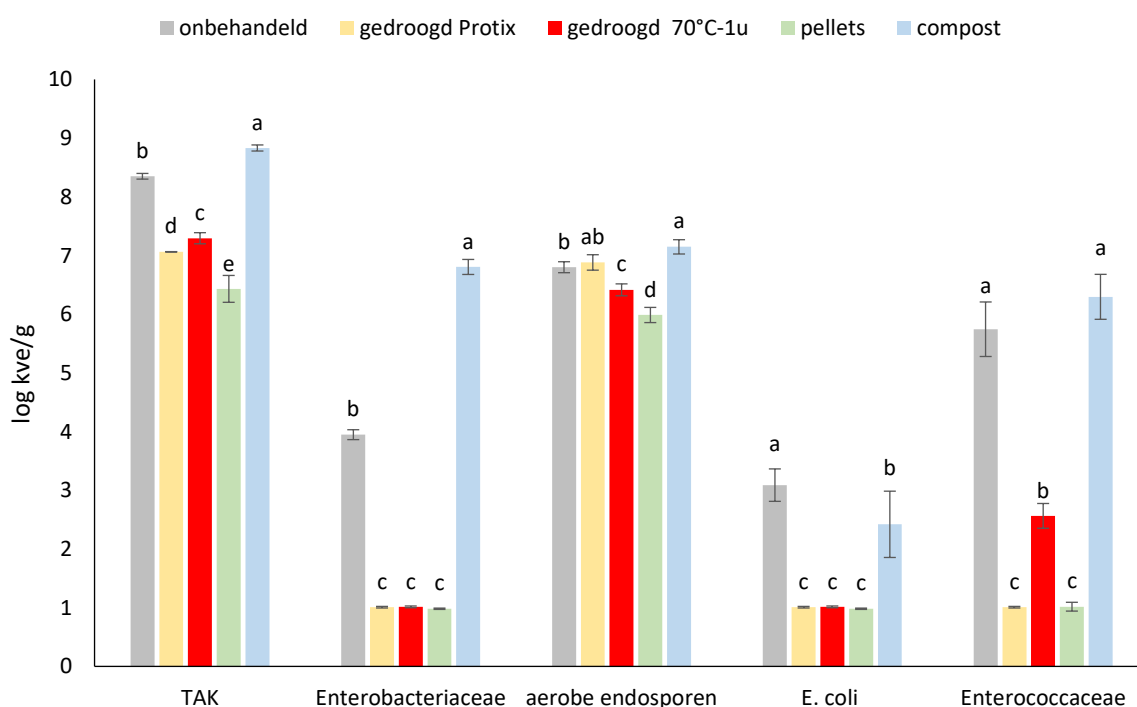


Thermisch drogen (70 °C – 1 u) verminderde het aantal enterokokken met 3.2 logeenheden voor HI2 TD en resulteerde in een significant lager gemiddeld kiemgetal van 2.6 ± 0.2 log kve/g, met waarden < 3 log kve/g voor de vijf replica's. De gemiddelde reductie voor HI3 TD was significant maar beperkter (1.7 logeenheden), dit resulteerde in een kiemgetal voor enterokokken van 4.8 ± 0.4 log kve/g, de waarde was ≥ 3 log kve/g voor de 5 replica's.

Na pelletisering bleven de kiemgetallen voor *E. coli* en enterokokken < 1 log kve/g, behalve voor staal HI1 P waar, voor 1 van de 5 uitgevoerde replica's, het aantal enterokokken 2.7 log kve/g bedroeg.

Composteren van het door Protix gedroogde ZSVL-frass van batch 1 veroorzaakte geen toename van het aantal *E. coli*. Omdat voor HI1 D een kiemgetal Enterobacteriaceae < 1 log kve/g werd gevonden mag worden aangenomen dat ook het aantal *E. coli* beneden de detectielimiet was. Dit bleef onveranderd na composteren, het kiemgetal voor *E. coli* was < 1 log kve/g voor staal HI1 C. In tegenstelling tot het aantal Enterobacteriaceae werd door composteren van onbehandeld ZSVL-frass van batchen 2 en 3 het kiemgetal *E. coli* significant gereduceerd met gemiddeld met 1.4 logeenheden. Voor HI2 C en HI3 C werden gemiddelde kiemgetallen *E. coli* van respectievelijk 2.4 ± 0.6 en 2.6 ± 0.2 kve/g gevonden. Hierbij moet wel opgemerkt worden dat voor HI2 C de waarde van 1 van de 5 replica's groter was dan 3 log kve/g terwijl voor alle replica's van HI3 C het kiemgetal < 3 log kve/g was. De invloed van composteren op het aantal enterokokken was beperkt, gemiddeld bedroeg de toename 0.5 logeenheden.

De resultaten van de microbiologische analyses voor de stalen frass van de kweek van zwarte soldatenvlieglarven van de tweede batch worden geïllustreerd in Figuur 8. Resultaten voor *Salmonella* worden niet getoond, *Salmonella* werd niet gedetecteerd in de stalen ZSVL-frass van batch 2.



Figuur 8. Resultaten van de microbiële analyses voor frass van de kweek van zwarte soldatenvlieglarven van batch 2; onbehandeld (grijs), gedroogd door Protix (oranje), referentie hittebehandeld (rood), gepelletiseerd (groen) en gecomposteerd (blauw). a-d: kiemgetallen per species soort met dezelfde letter zijn statistisch niet significant verschillend ($p \geq 0.05$).

III.3.2 Resultaten voor frass van de kweek van gele meelwormen (*Tenebrio molitor*)

De analyseresultaten voor bepaling van de wateractiviteit, het totaal aeroob kiemgetal, het aantal Enterobacteriaceae en aerobe endosporen in de stalen frass van de kweek van gele meelwormen (GM) worden weergegeven in Tabel 12.

De gemiddelde wateractiviteit voor de stalen onbehandeld frass van de kweek van gele meelwormen bedroeg 0.65 ± 0.13 . Deze a_w -waarde is significant lager dan de gemiddelde waarde van 0.96 ± 0.01 die werd gemeten voor ZSVL-frass en is iets hoger dan de $a_w < 0.6$ waarbij microbiële groei onmogelijk is. Onbehandeld frass van de kweek van gele meelwormen is microbiologisch meer stabiel dan onbehandeld frass van de kweek van zwarte soldatenvlieglarven. Voor de drie batchen onbehandeld GM-frass waren er wel verschillen in wateractiviteit. De a_w -waarde van batch 2 bedroeg 0.83 ± 0.02 en was significant hoger dan de waarden van 0.56 ± 0.01 en 0.58 ± 0.06 voor batchen 1 en 3 respectievelijk.

Door thermisch drogen verlaagde de wateractiviteit van het onbehandelde GM-frass significant met gemiddeld 0.3 eenheden tot een waarde van 0.35 ± 0.14 . Pelletiseren had weinig invloed op de wateractiviteit. Composterende verhoogde de a_w waarde significant met 0.3 eenheden tot een gemiddelde van 0.96 ± 0.00 log kve/g, door toevoeging van water tijdens het composteringsproces.

Tabel 12. Resultaten van de bepaling van de wateractiviteit en kiemgetallen TAK, Enterobacteriaceae en aerobe endosporen (log kve/g) voor onbehandelde en behandelde stalen frass van de kweek van gele meelwormen. Waarden zijn gemiddelde en standaardafwijking van 5 herhalingen. De waarden in de grijze balk zijn gemiddelde en standaardafwijking van de 3 batchen, tenzij anders vermeld door aanduiding met *.

Behandeling	Frass code	Wateractiviteit		Kiemgetal (log kve/g)	
		a_w	TAK	Enterobacteriaceae	aerobe endosporen
onbehandeld	TM1 F	0.56 ± 0.01^b	8.3 ± 0.1^b	5.9 ± 0.2^a	3.5 ± 0.2^b
	TM2 F	0.83 ± 0.02^a	8.8 ± 0.2^a	5.1 ± 0.2^b	5.4 ± 0.1^a
	TM3 F	0.58 ± 0.06^b	8.1 ± 0.4^b	5.1 ± 0.1^b	6.1 ± 1.0^a
thermisch gedroogd (70 °C – 1 u)	TM1 TD	0.27 ± 0.01^b	7.1 ± 0.1^a	4.9 ± 0.2^a	3.7 ± 0.0^b
	TM2 TD	0.55 ± 0.00^a	6.7 ± 0.3^b	2.7 ± 0.4^c	5.2 ± 0.0^a
	TM3 TD	0.24 ± 0.00^c	6.5 ± 0.1^b	4.0 ± 0.1^b	4.0 ± 0.3^b
gepelletiseerd	TM1 P	0.64 ± 0.00^b	7.3 ± 0.1	2.3 ± 1.2	6.1 ± 0.1^a
	TM2 P	0.70 ± 0.00^a	6.8 ± 1.2	2.0 ± 1.3	4.8 ± 0.0^b
gecomposteerd	TM1 C	0.96 ± 0.00	10.3 ± 0.2^a	6.4 ± 0.3^a	7.2 ± 0.1^b
	TM2 C	0.96 ± 0.00	9.1 ± 0.1^b	4.0 ± 0.2^b	8.2 ± 0.0^a
	TM F	0.65 ± 0.13	8.4 ± 0.4	5.3 ± 0.4	4.9 ± 1.3
	TM TD	0.35 ± 0.14	6.8 ± 0.3	3.9 ± 1.0	4.3 ± 0.7
	TM P	0.67 ± 0.03	7.1 ± 0.7	2.1 ± 1.2	5.5 ± 0.7
	TM C	0.96 ± 0.00	9.7 ± 0.6	4.9 ± 1.2	7.7 ± 0.6

1,2,3: batch nummer

TM: *Tenebrio molitor*; F: vers; TD: thermisch gedroogd; P: pellets; C: compost

a-c: resultaten per kolom en per behandeling (F, D, TD, P of C) met dezelfde letter in superscript zijn niet significant verschillend ($p \geq 0.05$); geen letters indien geen significante verschillen

Het onbehandelde restsubstraat afkomstig van de kweek van gele meelwormen had een hoge microbiële belading. Het totaal aeroob kiemgetal (TAK) bedroeg voor de drie geanalyseerde batchen gemiddeld 8.4 ± 0.4 log kve/g, het aantal Enterobacteriaceae 5.3 ± 0.3 log kve/g en het aantal aerobe endosporen 4.9 ± 1.3 log kve/g. Batch 2 had een significant hoger totaal aeroob kiemgetal, terwijl de aantallen Enterobacteriaceae significant hoger waren voor de eerste batch. Het aantal aerobe endosporen was in deze eerste batch dan weer significant lager in vergelijking met de aantallen voor de tweede en derde batch.

De gemiddelde kiemgetallen TAK en Enterobacteriaceae voor onbehandeld ZSVL-frass en GM-frass waren vergelijkbaar, het aantal aerobe endosporen in ZSVL-frass was gemiddeld 1.5 logeenheden hoger. De gemeten waarden voor de aantallen Enterobacteriaceae in onbehandeld GM-frass zijn in overeenstemming met waarden tussen 4.7 en 6.5 log kve/g gerapporteerd in een studie door (OVAM, 2022).

Thermisch drogen ($70\text{ °C} - 1\text{ u}$) verlaagde de kiemgetallen TAK en aerobe endosporen respectievelijk met gemiddeld 1.6 en 0.6 logeenheden, TAK-reductie was statistisch significant voor alle stalen, reductie van aerobe endosporen enkel voor thermisch gedroogd GM-frass van batch 2 (TM2 TD). Deze reducties zijn echter microbiologisch gezien niet betekenisvol.

In tegenstelling tot de waargenomen reductie van het aantal Enterobacteriaceae tot een waarde < 1 log kve/g na thermisch drogen van ZSVL-frass, was reductie bij behandeling van GM-frass beperkt tot 1.5 logeenheden, met een resulterende gemiddelde waarde van 3.9 ± 0.1 log kve/g en enkel statistisch significant voor het staal van de tweede batch. Het hogere vochtgehalte en de hogere wateractiviteit van ZSVL-frass in vergelijking met GM-frass verhoogden mogelijk het kiemreducerend effect van het droogproces. De hogere a_w -waarde van 0.83 voor TM2 F in vergelijking met de waardes van 0.56 en 0.58 voor respectievelijk TM1 F en TM2F verklaren mogelijk de hogere reductie van Enterobacteriaceae tijdens het thermisch drogen.

De invloed van pelletisering op de microbiële belading van de stalen gele MWF was verschillend voor de stalen van de eerste en tweede batch. Het TAK nam na pelletiseren lichtjes af in vergelijking met de waarde voor het onbehandelhet frass, de daling was meer uitgesproken voor staal TM2 P. Terwijl het aantal aerobe endosporen gelijk bleef voor het staal van de tweede batch verhoogde pelletisering het aantal voor het staal van de eerste batch significant met 2.6 logeenheden. Het aantal Enterobacteriaceae daarentegen daalde door pelletisering significant met gemiddeld 3.4 logeenheden voor beide stalen.

Composteren van onbehandeld GM-frass van batchen 1 en 2 verhoogde het TAK gemiddeld met 1.1 logeenheid, de toename was statistisch significant voor staal TM1 C. Het aantal Enterobacteriaceae steeg met 0.5 log kve/g voor het staal van de eerste batch (TM1 C) en daalde met 1.2 loge kve/g voor het staal van de tweede batch (TM2 C), de veranderingen waren niet statistisch significant en ook microbiologisch gezien niet betekenisvol. Het aantal aerobe sporen steeg met gemiddeld 3.3 log kve/g, de toename was statistisch significant voor beide stalen.

De analyseresultaten van de bepaling van de aantallen *E. coli* en enterokokken en van aan/afwezigheid van *Salmonella* in de stalen frass van de kweek van gele meelwormen van batchen 1, 2 en 3 worden weergegeven in Tabel 13. Voor de stalen (on)behandeld GM-frass van de eerste batch werd conform de 'oude' EU-wetgeving, geen bepaling van *E. coli* en enterokokken uitgevoerd. *Clostridium perfringens* werd niet gedetecteerd in deze stalen

Tabel 13. Resultaten bepaling kiemgetallen *E. coli* en Enterococcaceae (log kve/g) en bepaling aan-/afwezigheid *Salmonella* voor onbehandelde en behandelde stalen frass van de kweek van gele meelwormen. Waarden zijn gemiddelde en standaardafwijking van 5 herhalingen. De waarden in de grijze balk zijn gemiddelde en standaardafwijking van de resultaten van 3 batchen, tenzij anders vermeld door aanduiding met *.

Behandeling	Frass code	Kiemgetal (log kve/g)				aan-/afwezigheid	
		<i>Escherichia coli</i>		Enterococcaceae		<i>Salmonella</i>	
		x/5 ≥ 3		x/5 ≥ 3		x ND	
onbehandeld	TM1 F	*	*	*	*	ND in 25 g	5
	TM2 F	2.9 ± 0.3 ^a	2	5.3 ± 0.3 ^b	5	ND in 25 g	5
	TM3 F	< 1.0 ± 0.0 ^b	0	6.5 ± 0.5 ^a	5	ND in 25 g	5
thermisch gedroogd (70 °C – 1 u)	TM1 TD	*	*	*	*	ND in 25 g	5
	TM2 TD	1.5 ± 0.7	0	3.8 ± 0.5 ^b	5	ND in 25 g	5
	TM3 TD	< 1.0 ± 0.0	0	4.7 ± 0.4 ^a	5	ND in 25 g	5
gepelletiseerd	TM1 P	< 1.0 ± 0.0	0	2.6 ± 0.4	0	ND in 25 g	5
	TM2 P	1.5 ± 1.2	1	2.7 ± 0.5	2	ND in 25 g	5
gecomposteerd	TM1 C	*	*	*	*	ND in 25 g	5
	TM2 C	2.6 ± 0.7	1	5.5 ± 0.1	5	ND in 25 g	5
	TM F	1.9 ± 1.0		5.9 ± 0.8		ND in 25 g	
	TM TD	1.2 ± 0.5		4.2 ± 0.7		ND in 25 g	
	TM P	1.4 ± 1.0		2.7 ± 0.4		ND in 25 g	
	TM C	2.6 ± 0.7		5.5 ± 0.1		ND in 25 g	

*: analyse niet uitgevoerd; 1,2,3: batch nummer

TM: *Tenebrio molitor*; F: vers; TD: thermisch gedroogd; P: pellets; C: compost; ND: niet gedetecteerd

x/5 ≥ 3: aantal herhalingen op 5 waarvoor kiemgetal ≥ 3 log kve/g

x ND: aantal herhalingen op 5 waarvoor *Salmonella* niet werd gedetecteerd in 25 g staal

a-b: resultaten per kolom en per behandeling (F, D, TD, P of C) met dezelfde letter in superscript zijn niet significant verschillend (p ≥ 0.05); geen letters indien geen significante verschillen

Voor het onbehandelde restsubstraat afkomstig van de kweek van gele meelwormen werd voor batchen 2 en 3 een gemiddeld kiemgetal voor *Escherichia coli* van 1.9 ± 1.0 log kve/g gemeten, het aantal enterokokken bedroeg 5.9 ± 0.8 log kve/g. Voor TM2 F was het kiemgetal *E. coli* 2.9 ± 0.3 log kve/g terwijl voor TM3 F een waarde < de detectielimiet werd gevonden. Het staal van de derde batch had echter een statistisch significant hogere belading met enterokokken. De kiemgetallen bedroegen respectievelijk 5.3 ± 0.3 en 6.5 ± 0.5 log kve/g voor de stalen van batch 2 en 3.

Vergeleken met de verse stalen ZSVL-frass had het verse GM-frass een significant lager aantal *E. coli* en een vergelijkbaar aantal enterokokken. *Salmonella* werd niet gedetecteerd in 25 g GM-frass, dit gold voor de 5 uitgevoerde replica's van alle onbehandelde en behandelde stalen van de drie batchen.

Thermisch drogen reduceerde het gemiddeld kiemgetal *E. coli* van 2.9 ± 0.3 log kve/g voor het onbehandelhet frass (TM2 F) naar een waarde van 1.5 ± 0.7 log kve/g voor TM2 TD, drie van de vijf replica's hadden een waarde < 1.0 terwijl voor de overige 1.5 en 2.6 log kve/g werd gevonden.

Het kiemgetal *E. coli* voor het onbehandelde GM-frass van de derde batch was < 1 log kve/g en bleef zoals verwacht beneden de detectielimiet na thermisch drogen.

Reductie van het kiemgetal enterokokken na thermisch drogen was statistisch significant en bedroeg gemiddeld 1.7 logeenheden wat resulteerde in een gemiddeld kiemgetal van 4.2 ± 0.7 log kve/g. De vijf replica's voor beide stalen TM2 TD en TM3 TD hadden een kiemgetal ≥ 3 log kve/g.

Een project van:

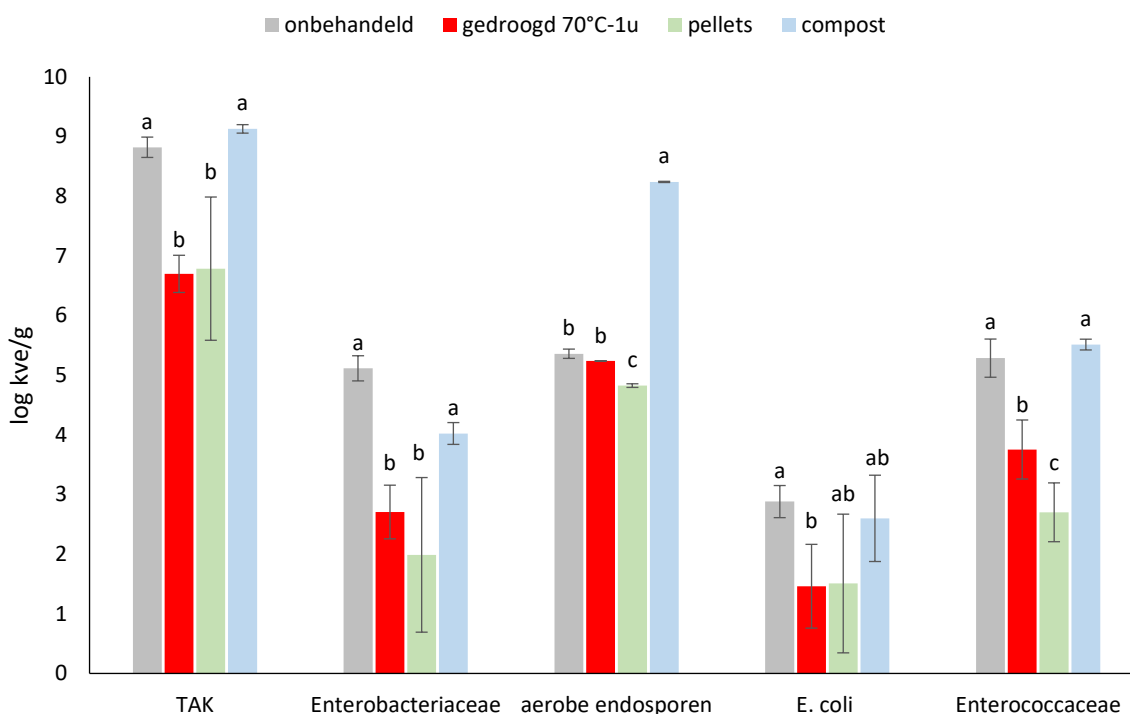


Met steun van:



Voor pelletisering en compostering zijn er enkel resultaten voor de stalen van de tweede batch. Het aantal *E. coli* bleef na beide behandelingen lager dan 3 log kve/g. Het aantal enterokokken veranderde niet door compostering terwijl door pelletisering het aantal significant afnam met 2.6 logeenheden tot een gemiddelde waarde van 2.7 log kve/g waarbij echter voor 2 van de 5 replica's een waarde ≥ 3 log kve/g werd gevonden.

De resultaten van de microbiologische analyses voor de stalen gele MWF van de tweede batch worden geïllustreerd in Figuur 9. Resultaten voor *Salmonella* worden niet getoond, *Salmonella* werd niet gedetecteerd in de stalen GM-frass van batch 2.



Figuur 9. Resultaten van de microbiële analyses voor frass van de kweek van gele meelwormen van batch 2; onbehandeld (grijs), referentie hittebehandeld (rood), gepelletiseerd (groen) en gecomposteerd (blauw). a-c: kiemgetallen per species soort met dezelfde letter zijn statistisch niet significant verschillend ($p \geq 0.05$).

III.3.3 Conformiteit EU-wetgeving

Volgens Verordening (EU) No 142/2011 mag, voor het restproduct van de kweek van insecten na behandeling, het aantal Enterobacteriaceae voor 2 van de vijf geteste replica's liggen tussen 1 en 3 log kve/g, mits het kiemgetal voor de 3 andere replica's kleiner is dan 1 log kve/g. *Clostridium perfringens* mag niet gedetecteerd worden en *Salmonella* moet afwezig zijn in 25 g staal voor 5 replica's.

Verordening (EU) No 2021/1925 stelt dat voor het restproduct van de kweek van insecten, na behandeling (referentie 70 °C – 1 u), het aantal *E. coli* **OF** het aantal Enterococcaceae voor 5 replica's kleiner moet zijn dan 3 log kve/g. *Salmonella* moet afwezig zijn in 25 g staal voor 5 replica's. Conformiteit met de criteria van Verordening (EU) No 2021/1925 wordt voor de geteste stalen frass van de kweek van zwarte soldatenvlieglarven weergegeven in Tabel 14.

Tabel 14. Overzicht van de conformiteit met de EU-wetgeving betreffende de microbiologische veiligheid voor frass van de kweek van zwarte soldatenvlieglarven (*Hermetia illucens*), onbehandeld en na drogen, pelletiseren en composteren.

Behandeling	Frass code	<i>Escherichia coli</i>	Enterococcaceae	<i>Salmonella</i>
onbehandeld	HI1 F	*	*	
	HI2 F			
	HI3 F			
gedroogd (Protix)	HI1 D		*	
	HI2 D			
	HI3 D			
thermisch gedroogd (70 °C – 1 u)	HI1 TD		*	
	HI2 TD			
	HI3 TD			
gepelletiseerd	HI1 P			
	HI2 P			
gecomposteerd	HI1 C		*	
	HI2 C			
	HI3 C			
conform criteria Verordening (EU) No 2021/1925				
NIET conform criterium <i>E. coli</i> Verordening (EU) No 2021/1925				
NIET conform criterium Enterococcaceae Verordening (EU) No 2021/1925				

* analyse niet uitgevoerd; 1,2,3: batch nummer

HI: *Hermetia illucens*; F: vers; D: droog; TD: thermisch gedroogd; P: pellets; C: compost

Alle geanalyseerde stalen ZSVL-frass, zowel onbehandeld als verwerkt, voldeden aan het criterium voor *Salmonella*, de pathogeen was afwezig in 25 g voor de vijf geteste replica's per staal. *Salmonella* werd niet gedetecteerd in de onbehandelde frass-stalen en er gebeurde ook geen contaminatie met de pathogeen tijdens het drogen, pelletiseren of composteren.

Het onbehandelde ZSVL-frass van de tweede en derde batch (HI2 F en HI3 F) voldeden niet aan de criteria voor zowel *E. coli* als Enterococcaceae. Voor het staal van batch 2 was het kiemgetal te hoog voor 2 van de 5 replica's, voor het staal van de derde batch was dit zo voor de 5 replica's. De waarden voor Enterococcaceae waren voor de vijf replica's van deze beide stalen ≥ 3 log kve/g.

Voor het onbehandelde ZSVL-frass van batch 1 werd geen bepaling van *E. coli* of enterokokken uitgevoerd. Het aantal Enterobacteriaceae bedroeg 5.3 ± 0.1 log kve/g en uitgaande van een gelijkaardige verhouding Enterobacteriaceae/*E. coli* in de drie stalen ZSVL-frass kan verondersteld worden dat ook dit staal niet voldeed aan het criterium voor *E. coli*. Ook op basis van het criterium voor Enterobacteriaceae in Verordening (EU) No 142/2011 zou dit staal niet voldoen.

De thermisch behandelde ZSVL-frass stalen, zowel de door Protix gedroogde stalen (HI D) als de door Thoms More gedroogde stalen (HI TD), voldeden aan de wettelijke criteria. Hierbij moet wel opgemerkt worden dat het kiemgetal enterokokken in het staal van de derde batch (HI3 TD) voor de vijf replica's ≥ 3 log kve/g was.

De pellets (HI P) en het compoststaal (HI1 C) die werden aangemaakt vertrekkende van het door Protix gedroogde ZSVL-frass (HI D) voldeden aan de criteria voor zowel *E. coli* als Enterococcaceae, er was dus geen bacteriële groei of contaminatie tijdens het behandelingsproces.

De compoststalen (HI2 C en HI3 C) gemaakt van het onbehandelde ZSVL-frass voldeden geen van beide aan het criterium voor Enterococcaceae. HI2 C voldeed ook niet aan het *E. coli*-criterium, de waarde van 1 van de 5 replica's was ≥ 3 log kve/g maar HI3 C was wel conform.

Samengevat betekent dit dat, zoals verwacht werd, het onbehandelde restsubstraat van de kweek van zwarte soldatenvlieglarven niet voldeed aan de EU-wetgeving betreffende microbiologische veiligheid. Na drogen en pelletiseren was het ZSVL-frass wel conform de wettelijke bepalingen, echter niet altijd na composteren.

Tabel 15 toont conformiteit met criteria van Verordening (EU) No 2021/1925 rond microbiologische veiligheid voor de geteste stalen frass van de kweek van gele meelwormen.

Tabel 15. Overzicht van de conformiteit met de EU-wetgeving betreffende de microbiologische veiligheid voor frass van de kweek van gele meelwormen (*Tenebrio molitor*), onbehandeld en na drogen, pelletiseren en composteren.

Behandeling	Frass code	<i>Escherichia coli</i>	Enterococcaceae	<i>Salmonella</i>
onbehandeld	TM1 F	*	*	
	TM2 F			
	TM3 F			
thermisch gedroogd (70 °C - 1 u)	TM1 TD	*	*	
	TM2 TD			
	TM3 TD			
gepelletiseerd	TM1 P			
	TM2 P			
gecomposteerd	TM1 C	*	*	
	TM2 C			
conform criteria Verordening (EU) No 2021/1925				
NIET conform criterium <i>E. coli</i> Verordening (EU) No 2021/1925				
NIET conform criterium Enterococcaceae Verordening (EU) No 2021/1925				

* analyse niet uitgevoerd; 1,2,3: batch nummer

TM: *Tenebrio molitor*; F: vers; TD: thermisch gedroogd; P: pellets; C: compost

De stalen onbehandeld GM-frass van de tweede en derde batch (TM2 F en TM3 F) voldeden niet aan het criterium voor Enterococcaceae. TM2 F voldeed evenmin aan het criterium voor *E. coli*, 2 van de 5 replica's hadden een kiemgetal ≥ 3 log kve/g. In tegenstelling hiermee was de pathogeen niet aanwezig in staal TM3 F. Op basis van het criterium voor Enterobacteriaceae in Verordening (EU) No 142/2011 zou het onbehandelde GM-frass van de eerste batch niet voldoen. Omdat voor dit staal echter geen specifieke bepaling van *E. coli* werd uitgevoerd kan met betrekking tot deze pathogeen geen uitspraak worden gedaan voor TM1 F.

Na thermisch drogen voldeden de drie stalen gele meelwormenfrass stalen aan het wettelijke criterium voor *E. coli*, indien aanwezig in het onbehandelhet frass werd de pathogeen door de behandeling gereduceerd tot aantallen < 3 log kve/g. In tegenstelling hiermee bleven de kiemgetallen Enterococcaceae voor alle replica's ≥ 3 log kve/g.

Enkel de pellets van de eerste batch voldeden aan de criteria voor *E. coli* en Enterococcaceae.

Voor compostering zijn er alleen resultaten voor het GM-frass staal van de tweede batch (TM2 C). Het staal was niet conform het criterium voor *E. coli* (1 replica had een te hoge waarde van 3.8 log kve/g) noch conform het criterium voor Enterococcaceae (alle replica's ≥ 3 log kve/g).

Samengevat betekent dit dat het onbehandelde restsubstraat van de kweek van gele meelwormen niet voldeed aan de EU-wetgeving betreffende microbiologische veiligheid. Na thermisch drogen was het GM-frass wel conform de wettelijke bepalingen, echter niet altijd na pelletiseren of composteren.

III.4 Discussie en besluit

Onbehandeld restsubstraat van de kweek van zwarte soldatenvlieglarven en van gele meelwormen heeft een hoge microbiële belading met zowel vegetatieve cellen als endosporen. Het totaal aerob kiemgetal, de aantallen Enterobacteriaceae, aerobe sporen en Enterococcaceae liggen voor beïthet frass soorten in dezelfde grootteorde, de belading met *E. coli* is wel lager voor GM-frass. Het risico op aanwezigheid van *Salmonella* lijkt beperkt, de pathogeen werd in geen van beide soorten frass gedetecteerd.

Omwille van een hoger vochtgehalte en een veel hogere wateractiviteit is ZSVL-frass echter een microbiologisch minder stabiel product dan GM-frass, micro-organismen zullen kunnen groeien in ZSVL-frass terwijl de groei in GM-frass nagenoeg onmogelijk is. Dit impliceert een langere houdbaarheid voor GM-frass en dus een minder dringende noodzaak aan voorbehandeling.

Volgens EU-wetgeving moet het restsubstraat van insectenkweek, vooraleer het kan aangewend worden als grondstof voor productie van bodemverbeteraar of meststoffen, een hyënisatiebehandeling ondergaan om mogelijk aanwezige pathogene micro-organismen (*E. coli*, Enterococcaceae en *Salmonella*) te reduceren of elimineren.

De voorgeschreven referentiebehandeling (1 uur verhitten bij een temperatuur van 70 °C) zorgt voor een efficiënte reductie van *E. coli* in ZSVL- en GM-frass tot aantallen < 3 log kve/g. Reductie van Enterococcaceae daarentegen is vaak onvoldoende. Omdat Verordening (EU) No 2021/1925 echter stelt dat het kiemgetal *E. coli* **OF** het kiemgetal Enterococcaceae in 5 replica's kleiner moet zijn dan 3 log kve/g, mag geconcludeerd worden dat na de referentie hittebehandeling ZSVL-frass en GM-frass voldoen aan deze wettelijke criteria. Omdat *Salmonella* niet werd gedetecteerd in de onbehandelde frass-stalen kan echter niet met zekerheid gezegd worden dat de referentiebehandeling deze pathogeen, indien aanwezig, volledig zal elimineren. Hiervoor is verder onderzoek nodig, bijvoorbeeld door gebruik te maken van challenge-testen. Thermisch drogen verlaagt ook het vochtgehalte en/of de wateractiviteit van het frass stalen, zodoende heeft het eindproduct een hogere microbiologische stabiliteit.

Frass van de kweek van zwarte soldatenvlieglarven heeft een hoog vochtgehalte en moet gedroogd worden vóór het pelletiseren. Indien het gedrooghet frass voldoet aan de wettelijke criteria zal dit ook gelden voor de hieruit bereide pellets, het pelleteerproces zelf genereert geen microbiële groei of contaminatie. Frass van de kweek van gele meelwormen heeft een veel lager vochtgehalte en kan zodoende rechtstreeks worden gepelletiseerd. Door pelletiseren verlagen de aantallen van de meeste micro-organismen, echter niet altijd voldoende om te voldoen aan de wettelijke vereisten. Het pelleteerproces dient dus verder geoptimaliseerd te worden voor frass van de kweek van gele meelwormen.

Composteren van onbehandeld ZSVL-frass en GM-frass verhoogt de microbiële belading, dit impliceert dat indien de onbehandelde stalen niet voldoen aan de wettelijke criteria, hetzelfde kan gezegd worden van de stalen na compostering. Compostering heeft wel een matig reducerend effect op de belading met *E. coli*, wellicht door het oplopen van de temperatuur gedurende het composteringsproces. Gecomposteerd restsubstraat van de kweek van zwarte soldatenvliegen of gele meelwormen is microbiologisch minder veilig en minder stabiel dan het onbehandelhet frass.

Een project van:



Met steun van:



III.5 Referenties

Dijk, R., van den Berg, D., Beumer, R., de Boer, E., Dijkstra, A., Mout, L., Stegeman, H., Uyttendaele, M., & in 't Veld, S. (2015). *Microbiologie van voedingsmiddelen: Methoden, principes en criteria* (5th ed.). Mybusinessmedia b.v.

EUR-Lex. (2022). *EUR-Lex: Access to European Union law - Regulation (EC)*. <https://eur-lex.europa.eu/>

OVAM. (2022). *ONDERZOEK "FRASS" RESTSUBSTRAAT VAN INSECTENKWEEK (BESTEKNUMMER 8278)*.

Van Looveren, N., Vandeweyer, D., & Campenhout, L. Van. (2022). Impact of Heat Treatment on the Microbiological Quality of Frass Originating from Black Soldier Fly Larvae. *Insects*, 13(22), 1–15. <https://doi.org/https://doi.org/10.3390/insects13010022>

Van Looveren, N., Vandeweyer, D., van Schelt, J., & Van Campenhout, L. (2021). Occurrence of *Clostridium perfringens* vegetative cells and spores throughout an industrial production process of black soldier fly larvae (*Hermetia illucens*). *Journal of Insects as Food and Feed*, 2011(142), 1–10. <https://doi.org/10.3920/jiff2021.0073>

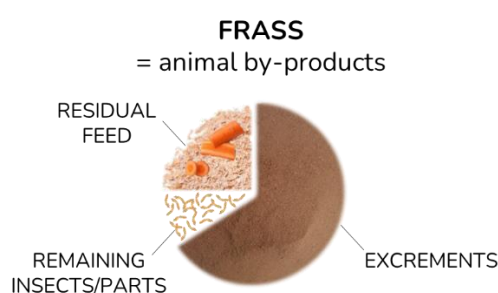
Wynants, E., Froominckx, L., Crauwels, S., Verreth, C., De Smet, J., Sandrock, C., Wohlfahrt, J., Van Schelt, J., Depraetere, S., Lievens, B., Van Miert, S., Claes, J., & Van Campenhout, L. (2019). Assessing the Microbiota of Black Soldier Fly Larvae (*Hermetia illucens*) Reared on Organic Waste Streams on Four Different Locations at Laboratory and Large Scale. *Microbial Ecology*, 77(4), 913–930. <https://doi.org/10.1007/s00248-018-1286-x>

Hoofdstuk IV: De aanwezigheid van insecten(delen) in het restsubstraat

Auteur: Lotte Frooninckx (Expertisecentrum duurzame biomassa en chemie - Thomas More)

IV.1 Inleiding

Het kweken van insecten voor food, feed en biogebaseerde grondstoffen vormt in België een relatief nieuwe sector met heel wat uitdagingen. Een van deze uitdagingen is het valoriseren van het restsubstraat (frass) dat ontstaat bij de kweek van insecten. Net als andere landbouwhuisdieren, produceren insecten uitwerpselen. Naast uitwerpselen van insecten bevat het restsubstraat vaak ook resten van voeder die niet opgegeten werden en resten van insecten zoals vervellingen, ledematen of soms ook kleinere insecten die bijvoorbeeld mee afgezeefd werden (Figuur 10).



Figuur 10. Naast uitwerpselen van insecten bevat het restsubstraat van insecten (frass) vaak ook resten van voeder die niet opgegeten werden en resten van insecten zoals vervellingen, ledematen of soms ook kleinere insecten die bijvoorbeeld mee afgezeefd werden.

Heel wat studies tonen aan dat dit restsubstraat potentieel heeft als grondstof voor de productie van bodemverbeteraar of meststoffen en er interesse is vanuit deze sector om dit te valoriseren (Poveda, 2021). Recent werd de dierlijke bijproducten wetgeving aangepast¹ en werd een definitie voor frass (in deze verordening vertaalt als insectenmest) toegevoegd als volgt:

“insectenmest: mengsel van uitwerpselen van gekweekte insecten, de voedingsbodem, delen van gekweekte insecten en dode eieren, met een maximumgehalte van 5 volumeprocent en 3 gewichtsprocent dode gekweekte insecten.”

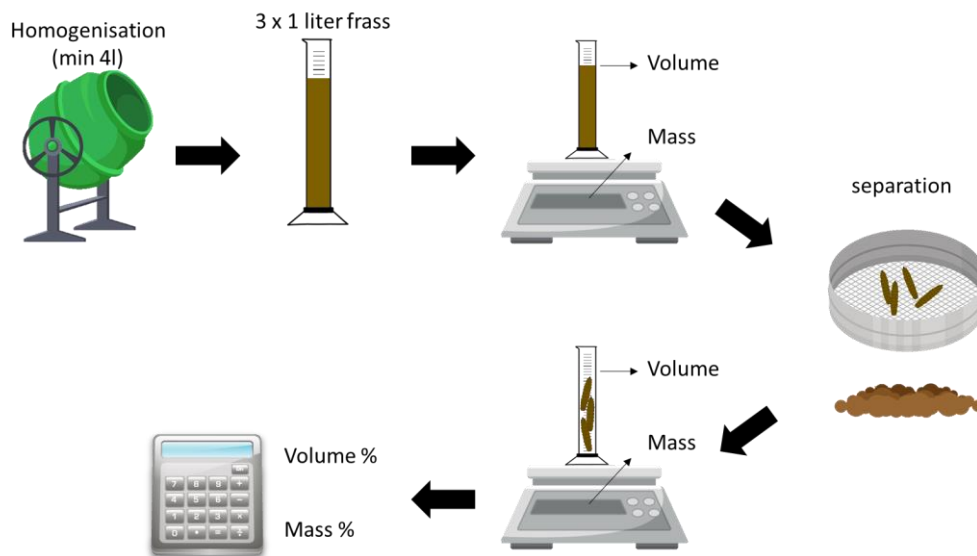
In het TETRA ValoReSect project wordt aan de hand van verschillende casestudies gekeken naar de wettelijke vereisten, financiële en praktische haalbaarheid om het restsubstraat van insecten tot duurzame grondstof voor de productie van bodemverbeteraar of meststoffen te verwerken. De kwekers in Vlaanderen zijn voornamelijk actief in de kweek van meelwormen en zwarte soldatenvliegen. Hierdoor ligt de focus binnen dit project op het restsubstraat van deze twee insectensoorten. In deze taak wordt nagegaan of het restsubstraat dat gebruikt werd voor deze casestudies voldoet aan de maximum toegelaten gehalten insecten.

¹ verordening (EU) 2021/1925 tot wijziging van bepaalde bijlagen bij Verordening (EU) nr. 142/2011 wat betreft de vereisten voor het op de markt brengen van bepaalde insectenproducten. Verordening (EU) Nr. 142/2011 bevat uitvoeringsmaatregelen voor de volks- en diergezondheidsvoorschriften voor dierlijke bijproducten en afgeleide producten van Verordening (EG) nr. 1069/2009

IV.2 Materiaal en methoden

Tijdens het project werd er 3 maal een staalname gedaan van verse frass afkomstig van meelwormen (*Tenebrio molitor*) en zwarte soldatenvlieg (*Hermetia illucens*). Van deze stalen werd telkens 10 liter gebruikt voor de bepaling van de aanwezigheid van (resten van) insecten.

Voor het scheiden van de (resten van) insecten uit het frass en de volumebepaling werd gebruik gemaakt van de protocollen 'protocol voor scheiding insecten uit restsubstraat' en 'protocol voor volumebepaling insecten via onderdompelmethode' (zie bijlage). Figuur 11 geeft de werkwijze weer. Kort samengevat werd 10 liter staal gehomogeniseerd m.b.v. een menger (Vakona menger FM60). Vervolgens werd een 1000 ml maatcilinder met gekend gewicht gevuld met 1000 ml staal (frass+ (resten van) insecten), waarna het gewicht bepaald werd. Vervolgens werden de (resten van) insecten gescheiden van het frassen m.b.v. een labozeef (labozeef EML 315) met daarop een zeeftoren bevestigd met draadzeven van maat 3,5; 2,5; 2; 1 en 0,5 voor *Tenebrio molitor* en 3,55; 2,5; 2 en 1,7 voor zwarte soldatenvlieg. Indien bij een bepaalde fractie de (resten van) insecten niet goed gescheiden werden van het frass werd dit manueel gedaan. Het gewicht en het volume van de (resten van) insecten werd bepaald waarna de resten (poten en vervellingen) manueel verwijderd werden en het gewicht en volume van de zuivere insecten bepaald werd. Vervolgens werd een gekende hoeveelheid water toegevoegd aan de insecten waardoor eveneens het volume van de insecten bepaald kon worden een de hand van de onderdompelmethode.

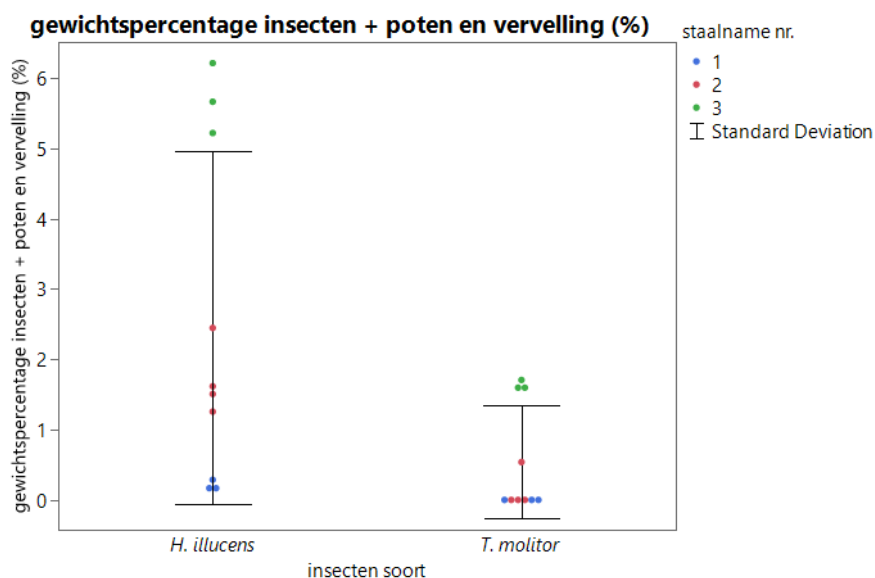


Figuur 11. De werkwijze voor de bepaling van het volume en gewichtspercentage insecten in frass

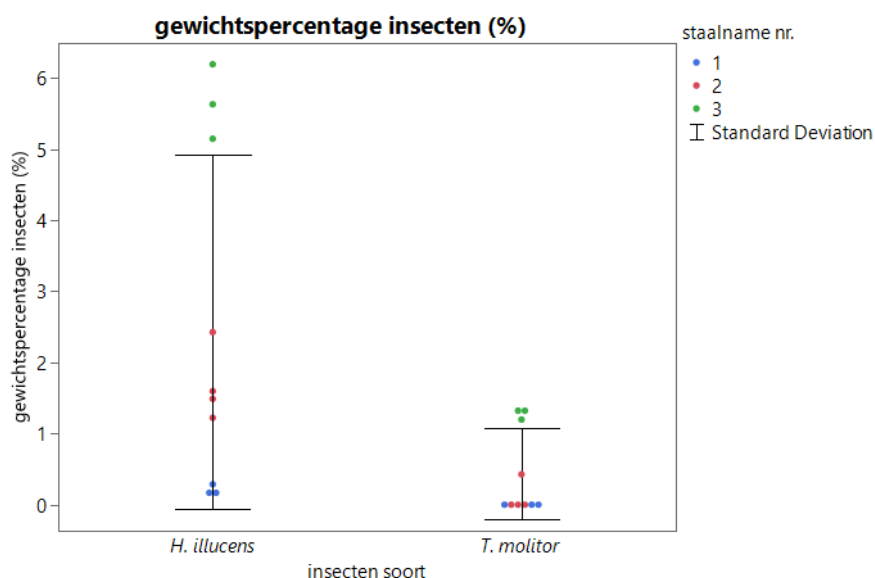
IV.3 Resultaten

IV.3.1 Gewichtspercentage insecten in frass

In totaal werd er van 3 staalnames van vers frass afkomstig van meelwormen (*Tenebrio molitor*) en zwarte soldatenvlieg (*Hermetia illucens*) en gewichts- en volumepercentage insecten bepaald. Het gewichtspercentage insecten werd bepaald zowel met als zonder de aanwezigheid van insectenpoten en vervelling (Figuur 12 en Figuur 13).



Figuur 12. Gemeten gewichtspercentage insecten inclusief poten en vervellingen in *H. illucens* en *T. molitor* frass



Figuur 13. Gemeten gewichtspercentage insecten in *H. illucens* en *T. molitor* frass

Voor de drie staalnames was het gemiddelde gewichtspercentage insecten voor *H. illucens* 2.45% inclusief poten en vervellingen en 2.43% zonder de poten en vervellingen. Voor *T. molitor* was dit 0.54% inclusief poten en vervellingen en 0.43% zonder de poten en vervellingen.

Het gewichtspercentage insecten verschilde significant tussen de verschillende staalnames (ANOVA, $p < 0.0001$). De geanalyseerde stalen van het *T. molitor* frass voldeden allemaal aan het maximum

toegelaten gewichtsperscentage van 3%. Voor *H. illucens* voldeden de eerste en tweede staalname aan het maximum toegelaten gewichtsperscentage. Met 5.66 % gewichtsperscentage insecten was dit niet het geval voor het frass van de derde staalname van het *H. illucens* frass (Tabel 16).

Tabel 16. Gemeten gewichtsperscentages insecten voor de 3 staalnames van *H. illucens* en *T. molitor* frass

staalname	<i>H. illucens</i>						<i>T. molitor</i>					
	Totale massa* (%)			Insectenmassa** (%)			Totale massa* (%)			Insectenmassa** (%)		
	μ	σ	N	μ	σ	N	μ	σ	N	μ	σ	N
1	0,21	0,07	3	0,21	0,07	3	0,00	0,00	3	0,00	0,00	3
2	1,43	0,15	3	1,41	0,17	3	0,00	0,00	3	0,00	0,00	3
3	5,70	0,50	3	5,66	0,52	3	1,61	0,03	3	1,28	0,07	3

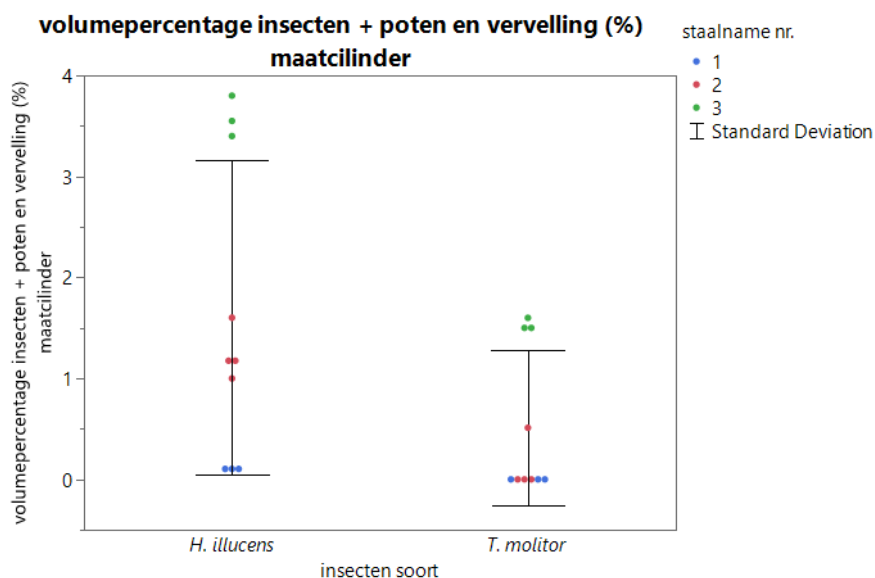
*: insecten, insectenpoten en vervelling; **: enkel insecten

μ : gemiddelde; σ : standard deviatie; N: aantal herhalingen

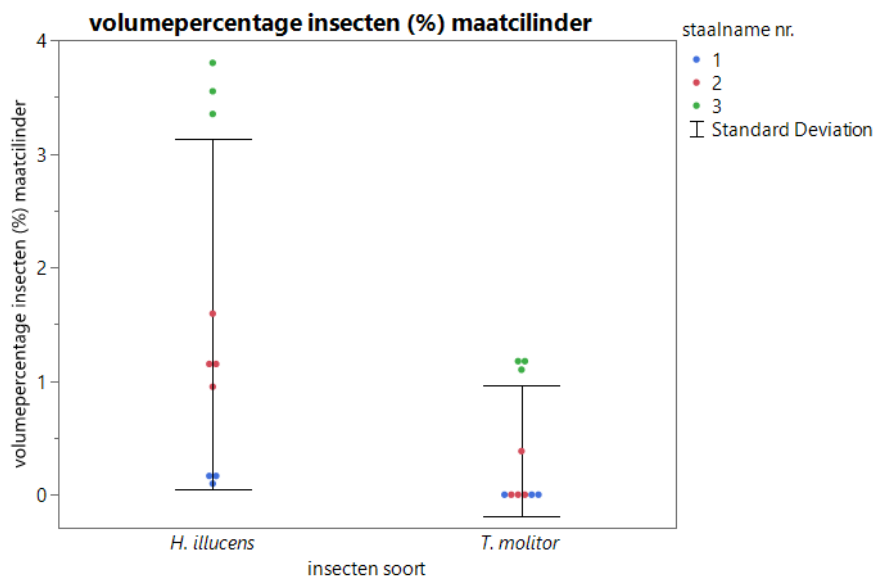
	Onder 3 massapercent dode insecten(delen)
	Boven 3 massapercent dode insecten(delen)

IV.4 Volumepercentage insecten in frass

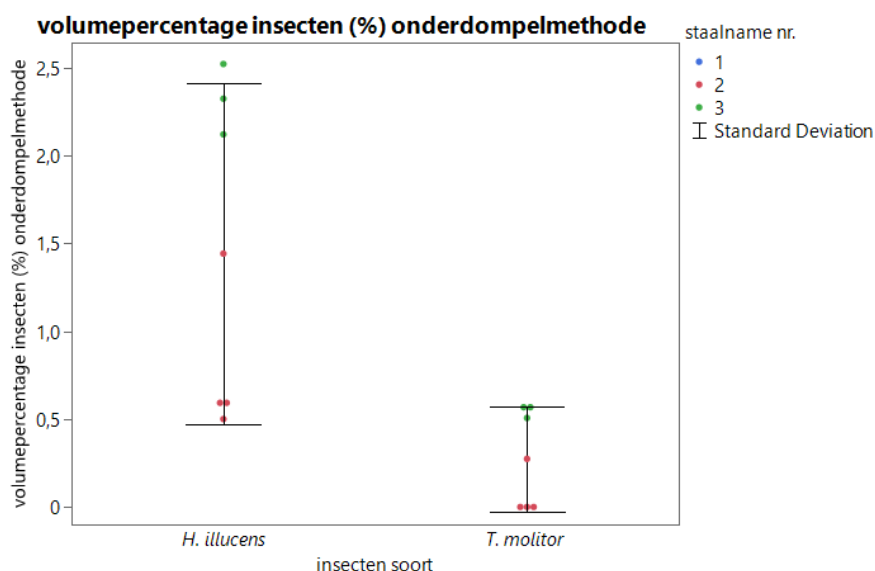
Het volumepercentage insecten werd gemeten volgens twee technieken en werd bepaald zowel met als zonder de aanwezigheid van insectenpoten en vervellingen (Figuur 14, Figuur 15 en Figuur 16).



Figuur 14. Gemeten volumeperscentage insecten inclusief poten en vervellingen volgens de maatcilinder techniek in *H. illucens* en *T. molitor* frass



Figuur 15. Gemeten volumepercentage insecten volgens de maatcilinder techniek in *H. illucens* en *T. molitor* frass



Figuur 16. Gemeten volumepercentage insecten volgens de onderdompelmethode in *H. illucens* en *T. molitor* frass

Voor de drie staalnames was het gemiddelde volumepercentage insecten voor *H. illucens* volgens de maatcilinder techniek 1.60% inclusief poten en vervellingen en 1.59% zonder de poten en vervellingen. Voor de onderdompelmethode was het gemiddelde volumepercentage insecten voor *H. illucens* 1.44% zonder de poten en vervellingen. Voor *T. molitor* was het gemiddelde volumepercentage insecten voor de drie staalnames samen volgens de maatcilinder techniek 0.51% inclusief poten en vervellingen en 0.38% zonder de poten en vervellingen. Voor de onderdompelmethode was het gemiddelde volumepercentage insecten voor *T. molitor* 0.27% zonder de poten en vervellingen.

Het volumepercentage insecten verschilde significant tussen de verschillende staalnames (ANOVA, $p < 0.0001$). De geanalyseerde stalen van het *H. illucens* en *T. molitor* frass voldeden allemaal aan het maximum toegelaten volumepercentage van 5% (Tabel 17 en Tabel 18).

Tabel 17. Gemeten volumepercentages insecten voor de 3 staalnames van *H. illucens* frass

staalname	<i>H. illucens</i>								
	Maatcilinder methode						Onderdoppelmethode		
	Totaal volume* (%)			Insectenvolume** (%)			Insectenvolume** (%)		
	μ	σ	N	μ	σ	N	μ	σ	N
1	0,10	0,03	3	0,13	0,03	3	0,00	0,00	3
2	1,12	0,10	3	1,08	0,12	3	0,56	0,05	3
3	3,58	0,20	3	3,57	0,23	3	2,32	0,20	3

*: insecten, insectenpoten en vervelling; **: enkel insecten

 μ : gemiddelde; σ : standard deviatie; N: aantal herhalingen Onder 5 volumepercentage dode insecten(delen) Boven 5 volumepercentage dode insecten(delen)Tabel 18. Gemeten volumepercentages insecten voor de 3 staalnames van *T. molitor* frass

Staalname	<i>T. molitor</i>								
	Maatcilinder methode						Onderdoppelmethode		
	Totaal volume* (%)			Insectenvolume** (%)			Insectenvolume** (%)		
	μ	σ	N	μ	σ	N	μ	σ	N
1	0,00	0,00	3	0,00	0,00	3	0,00	0,00	3
2	0,00	0,00	3	0,00	0,00	3	0,00	0,00	3
3	1,53	0,06	3	1,15	0,05	3	0,55	0,04	3

*: insecten, insectenpoten en vervelling; **: enkel insecten

 μ : gemiddelde; σ : standard deviatie; N: aantal herhalingen Onder 5 volumepercentage dode insecten(delen) Boven 5 volumepercentage dode insecten(delen)

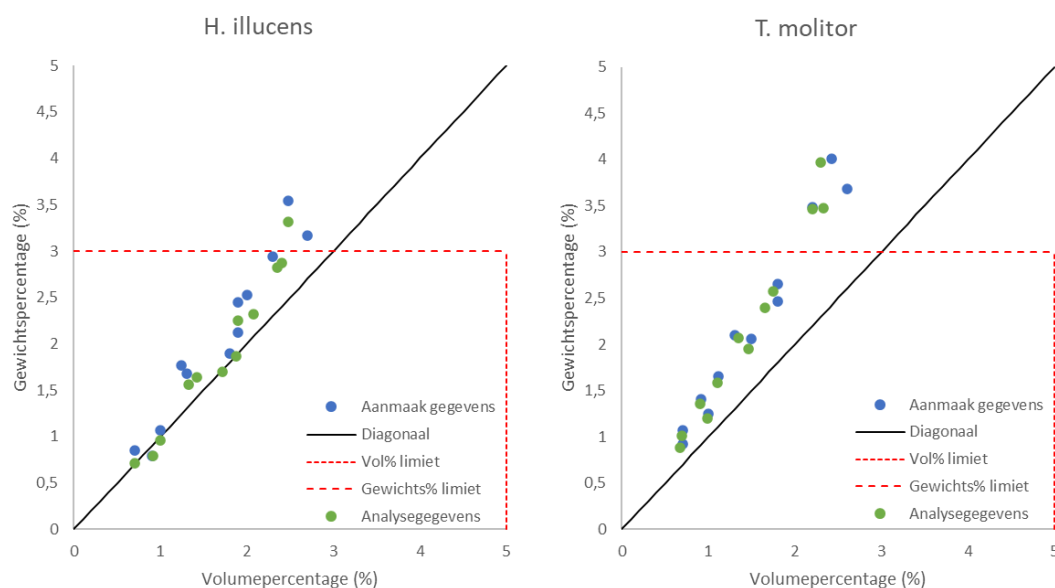
IV.5 Discussie en besluit

Tijdens het project werd er 3 maal een staalname gedaan van verse frass afkomstig van meelwormen (*Tenebrio molitor*) en zwarte soldatenvlieg (*Hermetia illucens*).

De geanalyseerde stalen van het *T. molitor* frass voldeden allemaal aan het maximum toegelaten gewichtspercentage van 3%. Voor *H. illucens* voldeden de eerste en tweede staalname aan het maximum toegelaten gewichtspercentage. Met 5.66 % gewichtspercentage insecten was dit net niet het geval voor het frass van de derde staalname van het *H. illucens* frass.

De geanalyseerde stalen van het *H. illucens* en *T. molitor* frass voldeden allemaal aan het maximum toegelaten volumepercentage van 5%.

Deze resultaten zijn in lijn met eerdere metingen die in kader van het OVAM project bestek nr 8655 werden uitgevoerd. Hier werd eveneens gevonden dat het gewichtspercentage eerder overschreden wordt dan het maximum toegelaten volumepercentage.



Figuur 17. Verhouding massapercentage ten opzichte van volumepercentage voor *H. illucens* en *T. molitor* frass stalen uit OVAM bestek 8655.

IV.6 Bijlagen

Bijlage 1: protocol voor scheiding insecten uit restsubstraat.

1. Benodigheden

Materialen:

- Minimaal 4 liter frass
- Trechter met diameter van 50 mm
- Maatcilinder van 1000 ml met een diameter van 60 mm en een hoogte van 440 mm
- Maatcilinder van 50 ml
- Analytische balans met een nauwkeurigheid van 0.01 g
- Zeven met een diameter van minstens 300 mm en maaswijdte van 20 mm tot 500 μ m
- Indien beschikbaar: zeefmachine met zeefpan waarop de zeven bevestigd kunnen worden
- Opvangbakken waarin het materiaal dat op de zeven blijft liggen kan opgevangen worden (bijvoorbeeld plastic bak van 40*60*7.5 cm)

Producten: nvt

2. Werkwijze

- a. Neem een volle emmer staal (minstens 4 L) van het insectenrestsubstraat. Homogeniseer het monster door het op te mengen.
- b. Weeg een maatcilinder van 1 L tot op 1 g nauwkeurig. Noteer het gewicht. Vul de maatcilinder van 1 L met het verse restsubstraat tot aan de maatstreep.

Een project van:

Met steun van:

Tik 3 maal met de gevulde maatcilinder verticaal op een hard oppervlak. Vul nog bij tot aan de maatstreep indien nodig.

- c. Weeg de maatcilinder met restsubstraat tot op 0.01 g nauwkeurig. Noteer het gewicht.
- d. Breng het staal geleidelijk over op de zeven van grootte naar kleine maaswijdte
- e. Breng het materiaal dat overblijft op de zeef over in een opvangbak (gelabeld met de maaswijdte)
- f. Bekijk in elke opvangbak of je insecten ziet (insect = minstens thorax), verzamel deze in een opvangbakje gelabeld 'insecten'
- g. Weeg de maatcilinder van 50 ml tot op 0.01 g nauwkeuring
- h. Breng de insecten over in de 50 ml maatcilinder. Klop geregeld 3 maal op de zijkant van de maatcilinder tot het volume niet meer veranderd. Bepaal het volume tot op de nauwkeurigheid van de maatcilinder
- i. Weeg de maatcilinder gevuld met insecten tot op 0.01g nauwkeurig

3. Berekeningen

Totaalgewicht 'frass' wordt berekende door het gewicht van de maatcilinder af te trekken van het gewicht van de maatcilinder gevuld met frass:

$$m_{frass}(g) = m_{tot}(g) - m_{cilinder}(g)$$

Met m_{frass} = massa frass in gram, m_{tot} = massa van het frassgevlude maatcilinder in gram en $m_{cilinder}$ = massa van de lege maatcilinder in gram

Totaalgewicht 'insecten' wordt berekende door de massa van de insectegevlude maatcilinder te verminderen met de massa van de maatcilinder:

$$m_{insecten}(g) = m_{tot}(g) - m_{cilinder}(g)$$

Met $m_{insecten}$ = de instectenmassa in gram, m_{tot} = massa van de insectengevlude maatcilinder in gram en $m_{cilinder}$ = de massa van de lege maatcilinder in gram.

Het **massapercentage insecten** wordt berekend met volgende formule:

$$\text{Massapercentage insecten (\%)} = \frac{m_{insecten}(g)}{m_{frass}(g)} \cdot 100$$

Het **volumepercentage insecten** wordt berekend met volgende formule:

$$\text{Volumepercentage insecten (\%)} = \frac{V_{insect}}{V_{frass}} \cdot 100$$

Met V_{insect} het volume insecten in milliliter en V_{frass} het totale volume frass in milliliter.

4. Referenties

Bestek ovam 8278

Bijlage 2: protocol voor volumebepaling insecten via onderdompelmethode

1. Beschrijving

De onderdompelmethode of 'water displacement method' is een eenvoudige methode om het volume van onregelmatige, poreuze materialen te bepalen. Een materiaal dat toegevoegd wordt aan water verplaatst of vervangt een gelijk volume van dat water. Het volume dat verplaatst/vervangen wordt is gelijk aan het volume van het materiaal. Het is belangrijk dat het materiaal volledig ondergedompeld is voor een juiste meting.

2. Benodigdheden

Materialen:

- Weegschaal tot op 0.01g nauwkeurig
- maatcilinder van 50 ml

Producten

- Water

3. Werkwijze

- Bepaal het gewicht van een 50 ml maatcilinder tot op 0.01 g nauwkeurig
- Voeg de insecten toe aan de 50 ml maatcilinder
- Bepaal het gewicht van de (dode)insecten en de maatcilinder samen tot op 0.01 g nauwkeurig. Noteer het gewicht.
- Vul de maatcilinder volledig met water tot aan de 50 ml maatstreep.
- Bepaal het gewicht van het water met de (dode)insecten en de maatcilinder samen tot op 0.01 g nauwkeurig. Noteer het gewicht.

4. Berekeningen

Volume insecten wordt berekend met volgende formule:

$$V_{insecten}(mL) = 50 - V_{water}(mL)$$

met $V_{insecten}$ = volume insecten in milliliter en V_{water} = het toegevoegde volume water in milliliter.

Hierbij wordt V_{water} als volgt betekend:

$$V_{water}(mL) = \frac{m_{totaal}(g) - m_{cilinder}(g)}{\rho_{water}(g \cdot mL^{-1})}$$

Met m_{totaal} = de massa van de maatcilinder gevuld met water en insecten in gram, $m_{cilinder}$ = de massa van de maatcilinder gevuld met insecten en ρ_{water} = de dichtheid van water in gram per milliliter.

Dichtheid insecten wordt berekend met volgende formule:

$$\rho_{insecten}(g \cdot L^{-1}) = \frac{m_{insecten}(g)}{V_{insecten}(L)}$$

met $\rho_{insecten}$ = de dichtheid van de insecten in gram per liter, $m_{insecten}$ = massa van de insecten in gram en $V_{insecten}$ = het volume aan insecten in liter.

Hoofdstuk V: De toxicologische analyse van het restsubstraat

Auteurs: Lotte Frooninckx en Thomas Quanten (Expertisecentrum duurzame biomassa en chemie – Thomas More)

V.1 Inleiding

Het kweken van insecten voor food, feed en biogebaseerde grondstoffen vormt in België een relatief nieuwe sector met heel wat uitdagingen. Een van deze uitdagingen is het valoriseren van het restsubstraat (frass) dat ontstaat bij de kweek van insecten.

Heel wat studies tonen aan dat dit restsubstraat potentieel heeft als grondstof voor de productie van bodemverbeteraar of meststoffen en er interesse is vanuit deze sector om dit te valoriseren (Poveda, 2021). Echter om in Vlaanderen gebruikt te mogen worden als grondstoffen, bestemd voor gebruik als meststof of bodemverbeterend middel, moet frass voldoen aan een aantal samenstellingsvoorwaarden. Deze worden opgenomen in het Vlarema. In Vlarema 6 zijn de samenstellingsvoorwaarden voor grondstoffen, bestemd voor gebruik als meststof of bodemverbeterend middel opgenomen in bijlage 2.3.1.A. en bijlage 2.3.1.B.

V.2 Materiaal en methoden

Tijdens het project werd er 3 maal een staalname gedaan van frass afkomstig van meelwormen (*Tenebrio molitor*) en zwarte soldatenvlieg (*Hermetia illucens*). Het frass werd verder behandeld (thermisch drogen, pelletiseren, composteren en vergisten), maar de toxicologische analyses werden enkel uitgevoerd op het verse frass en uitgedrukt in massapercentage op droge stof (%DS). De redenering is dat verdere behandelingen op een hygiënische manier gebeuren en niet bijdragen aan de toxische belasting van het staal. De volgende parameters werden bepaald door de Bodemkundige Dienst van België vzw:

- Zware metalen
arseen (As), cadmium (Cd), chroom (Cr), koper (Cu), lood (Pb), nikkel (Ni), zink (Zn) en kwik (Hg).
- Mineraaloliën
C10-C40, C10-C20 en C20-C40
- Polycyclische aromatische koolwaterstoffen (PAK's)
acenaftteen, acenaftyleen, benzo(a)antraceen, benzo(a)pyreen, benzo(g,h,i)peryleen, benzo(b)fluoranteen, benzo(k)fluoranteen, chryseen, dibenzo(a,h)antraceen, fenantreen, fluoranteen, fluoreen, indeno(1,2,3-cd)pyreen, naftaleen en pyreen
- Matig vluchtige organische halogeenverbindingen
1,2,3,4-tetrachlorobenzeen, 1,2,4,5-/1,2,3,5-tetrachlorobenzeen, pentachlorobenzeen en hexachlorobenzeen
- Polychloorbifenylen (PCB's)
2,4,4'-trichloorbifenyl (PCB 28), 2,2',5,5'-tetrachloorbifenyl (PCB 52), 2,2',4,5,5'-pentachloorbifenyl (PCB 101), 2,3',4,4',5-pentachloorbifenyl (PCB 118), 2,2',3,4,4',5'-hexachloorbifenyl (PCB 138), 2,2',4,4',5,5'-hexachloorbifenyl (PCB 153), 2,2',3,4,4',5,5'-heptachloorbifenyl (PCB 180)

V.3 Resultaten

De analyseresultaten van *T. molitor* en *H. illucens* frass zijn samengevat in Tabel 19 (zware metalen), Tabel 20 (mineraaloliën), Tabel 21 (polycyclische koolwaterstoffen), Tabel 22 (matig vluchtige organische halogeenverbindingen) en Tabel 23 (polychloorbifenylyl).

V.3.1 Zware metalen

Tabel 19. De gemeten **zware metalen** in het frass van *T. molitor* en *H. illucens* over de drie staalnames samen met de grenswaarden uitgedrukt in mg per kg droge stof (mg/kg DS). De geanalyseerde elementen zijn arseen (As), cadmium (Cd), chroom (Cr), koper (Cu), lood (Pb), nikkel (Ni), zink (Zn) en kwik (Hg).

Insectensoort Staalname	<i>T. molitor</i>			<i>H. illucens</i>			Grenswaarden
	1	2	3	1	2	3	
As (mg/kg DS)	<2,0	<2,0	<2,0	<2,0	<2,0	<2,0	≤20
Cd (mg/kg DS)	<0,20	<0,20	<0,20	<0,20	<0,20	<0,20	≤6
Cr (mg/kg DS)	<5,0	<5,0	<5,0	<5,0	10,3	<5,0	≤150
Cu (mg/kg DS)	7,7	15	16	12,4	15	13,6	≤800
Pb (mg/kg DS)	<10,0	<10,0	<10,0	<10,0	<10,0	<10,0	≤300
Ni (mg/kg DS)	<3,0	<3,0	<3,0	<3,0	5,2	<3,0	≤100
Zn (mg/kg DS)	93	161	135	70	81	88	≤1500
Hg (mg/kg DS)	<0,070	<0,070	<0,070	<0,070	<0,070	<0,070	≤1

V.3.2 Organische analyses

Tabel 20. De gemeten **mineraaloliën** in het frass van *T. molitor* en *H. illucens* over de drie staalnames samen met de grenswaarden uitgedrukt in mg per kg droge stof (mg/kg DS).

Insectensoort Staalname	<i>T. molitor</i>			<i>H. illucens</i>			Grenswaarden
	1	2	3	1	2	3	
C10-C40 (mg/kg DS)	<1000	<1000	<1000	<1000	<1000	<1000	/
C10-C20 (mg/kg DS)	130	<100	<100	120	220	<100	≤560
C20-C40 (mg/kg DS)	<1000	<1000	<1000	<1000	<1000	<1000	≤5600

Tabel 21. De gemeten polycyclische koolwaterstoffen (PAK's) in het frass van *T. molitor* en *H. illucens* over de drie staalnames samen met de grenswaarden uitgedrukt in mg per kg droge stof (mg/kg DS).

Insectensoort Staalname	<i>T. molitor</i>			<i>H. illucens</i>			Grenswaarden
	1	2	3	1	2	3	
acenaftteen (mg/kg DS)	<1,00	<1,00	<1,00	<1,00	<1,00	<1,00	≤10
acenaftyleen (mg/kg DS)	<1,00	<1,00	<1,00	<1,00	<1,00	<1,00	≤10
benzo(a)antraceen (mg/kg DS)	<0,50	<0,50	<0,50	<0,50	<0,50	<0,50	≤5
benzo(a)pyreen (mg/kg DS)	<0,30	<0,30	<0,30	<0,30	<0,30	<0,30	≤3
benzo(g,h,i)peryleen (mg/kg DS)	<0,30	<0,30	<0,30	<0,30	<0,30	<0,30	≤3
benzo(b)fluoranteen (mg/kg DS)	<0,50	<0,50	<0,50	<0,50	<0,50	<0,50	≤5
benzo(k)fluoranteen (mg/kg DS)	<1,00	<1,00	<1,00	<1,00	<1,00	<1,00	≤10
chryseen (mg/kg DS)	<0,50	<0,50	<0,50	<0,50	<0,50	<0,50	≤5
dibenzo(a,h)antraceen (mg/kg DS)	<0,30	<0,30	<0,30	<0,30	<0,30	<0,30	≤3
fenantreen (mg/kg DS)	<0,50	<0,50	<0,50	<0,50	<0,50	<0,50	≤5
fluoranteen (mg/kg DS)	<1,00	<1,00	<1,00	<1,00	<1,00	<1,00	≤10
fluoreen (mg/kg DS)	<1,00	<1,00	<1,00	<1,00	<1,00	<1,00	≤10
indeno(1,2,3-cd)pyreen (mg/kg DS)	<1,00	<1,00	<1,00	<1,00	<1,00	<1,00	≤10
naftaleen (mg/kg DS)	<0,50	<0,50	<0,50	<0,50	<0,50	<0,50	≤5
pyreen (mg/kg DS)	<0,30	<0,30	<0,30	<0,30	<0,30	<0,30	≤3

Tabel 22. De gemeten matig vluchtige organische halogeenverbindingen in het frass van *T. molitor* en *H. illucens* over de drie staalnames samen met de grenswaarden uitgedrukt in mg per kg droge stof (mg/kg DS).

Insectensoort Staalname	<i>T. molitor</i>			<i>H. illucens</i>			Grenswaarden
	1	2	3	1	2	3	
1,2,3,4-tetrachloorbenzeen (mg/kg DS)	<0,200	<0,200	<0,200	<0,200	<0,200	<0,200	≤2
1,2,4,5-/1,2,3,5-tetrachloorbenzeen (mg/kg DS)	<0,40	<0,40	<0,40	<0,40	<0,40	<0,40	≤4
Pentachloorbenzeen (mg/kg DS)	<0,15	<0,15	<0,15	<0,15	<0,15	<0,15	≤1,5
Hexachloorbenzeen (mg/kg DS)	<0,050	<0,050	<0,050	<0,050	<0,050	<0,050	≤0,5

Tabel 23. De gemeten polychloorbifenyl (PCB's) in het frass van *T. molitor* en *H. illucens* over de drie staalnames samen met de grenswaarden uitgedrukt in mg per kg droge stof (mg/kg DS).

Insectensoort Staalname	<i>T. molitor</i>			<i>H. illucens</i>			Grenswaarden
	1	2	3	1	2	3	
2,4,4'-trichloorbifenyl (PCB 28) (mg/kg DS)	<0,025	<0,025	<0,025	<0,025	<0,025	<0,025	/
2,2',5,5'-tetrachloorbifenyl (PCB 52) (mg/kg DS)	<0,025	<0,025	<0,025	<0,025	<0,025	<0,025	/
2,2',4,5,5'-pentachloor-bifenyl (PCB 101) (mg/kg DS)	<0,025	<0,025	<0,025	<0,025	<0,025	<0,025	/
2,3',4,4',5-pentachloor-bifenyl (PCB 118) (mg/kg DS)	<0,025	<0,025	<0,025	<0,025	<0,025	<0,025	/
2,2',3,4,4',5'-hexachloor- bifenyl (PCB 138) (mg/kg DS)	<0,025	<0,025	<0,025	<0,025	<0,025	<0,025	/
2,2',4,4',5,5'-hexachloor- bifenyl (PCB 153) (mg/kg DS)	<0,025	<0,025	<0,025	<0,025	<0,025	<0,025	/
2,2',3,4,4',5,5'-heptachloor- bifenyl (PCB 180) (mg/kg DS)	<0,025	<0,025	<0,025	<0,025	<0,025	<0,025	/
SOM PCB's (mg/kg DS)	<0,025	<0,025	<0,025	<0,025	<0,025	<0,025	≤0,6

V.4 Discussie en besluit

Het verse frass van zowel *T. molitor* (TMF) als *H. illucens* (HIF) bevat meetbare sporen van koper en zink die nog steeds ver onder de grenswaarden liggen, maar verder werden er geen zware metalen gemeten boven de detectiegrens (zie Tabel 19).

De korte keten mineraaloliën (C10-C20) zijn gedetecteerd in zowel TMF als HIF, maar steeds binnen acceptabele grenzen. De hoeveelheden aan lange keten mineraaloliën (C20-C40) lagen steeds onder de detectielimieten (zie Tabel 20).

Zowel de PAK's (zie Tabel 21), de matig vluchtige organische halogeenverbindingen (zie Tabel 22) en de PCB's (zie Tabel 23) in TMF en HIF lagen altijd onder de detectielimieten.

In conclusie is de toxicologische belasting van TMF en HIF verwaarloosbaar en ver onder de grenswaarden.

Hoofdstuk VI: De fysicochemische samenstelling van de restsubstraten

Auteurs: Lotte Frooninckx en Thomas Quanten (Expertisecentrum duurzame biomassa en chemie – Thomas More)

VI.1 Inleiding

Het kweken van insecten voor food, feed en biogebaseerde grondstoffen vormt in België een relatief nieuwe sector met heel wat uitdagingen. Een van deze uitdagingen is het valoriseren van het restsubstraat (frass) dat ontstaat bij de kweek van insecten.

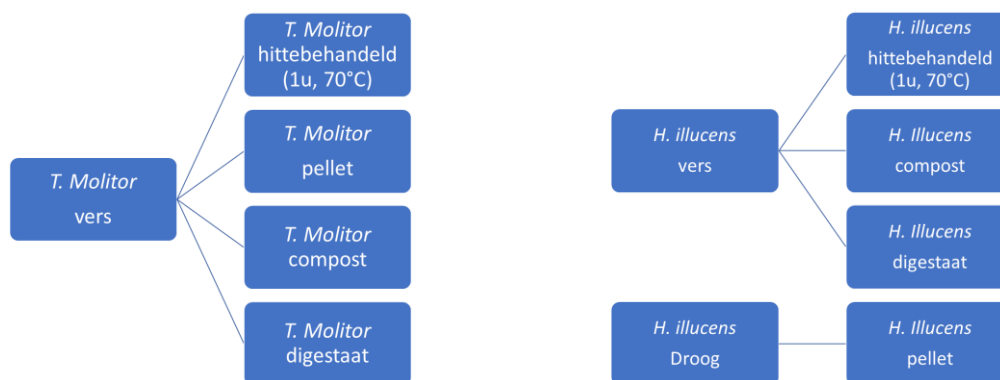
Heel wat studies tonen aan dat dit restsubstraat potentieel heeft als grondstof voor de productie van bodemverbeteraar of meststoffen en er interesse is vanuit deze sector om dit te valoriseren (Poveda, 2021). Vaak worden deze studies uitgevoerd op vers frass. Echter om frass te mogen vermarkten in Europa moet dit een verplichte hygiëniseringsstap ondergaan, nl. 1u op 70 °C².

Zulke verhittingsstap zou nefaste gevolgen kunnen hebben voor het potentieel van frass als grondstof voor de productie van bodemverbeteraar of meststoffen. Daarom werd in het project ValoReSect onderzocht wat de impact is van verschillende verwerkingstechnieken op frass afkomstig van meelwormen (*Tenebrio molitor*) en zwarte soldatenvlieg (*Hermetia illucens*). Hiervoor werd gebruik gemaakt van pelletisatie, compostering en vergisting die vergeleken werden met een hittebehandeling van 1u op 70 °C. Buiten de hittebehandeling zijn dit verwerkingstechnieken die momenteel reeds toegepast worden voor de verwerking van dierlijke bijproducten. In dit rapport worden de analyses van de fysicochemische parameters van de verse en verwerkte frass-stalen besproken.

VI.2 Materiaal en methoden

Tijdens het project werd er 3 maal een staalname gedaan van frass afkomstig van meelwormen (*Tenebrio molitor*) en zwarte soldatenvlieg (*Hermetia illucens*). Deze stalen ondergingen vervolgens een verwerkingsstap volgens de verschillende processen. Zo werden er in totaal per staalnamenronde 11 frass stalen bekomen (5x meelworm en 6x zwarte soldatenvlieg) die vergeleken konden worden (zie Figuur 18).

² verordening (EU) 2021/1925 tot wijziging van bepaalde bijlagen bij Verordening (EU) nr. 142/2011 wat betreft de vereisten voor het op de markt brengen van bepaalde insectenproducten. Verordening (EU) Nr. 142/2011 bevat uitvoeringsmaatregelen voor de volks- en diergezondheidsvoorschriften voor dierlijke bijproducten en afgeleide producten van Verordening (EG) nr. 1069/2009



Figuur 18. Verschillende frass stalen bekomen en geanalyseerd in dit project. Voor *T. molitor* frass kon verse frass gebruikt worden voor de pelletisatie, compostering, vergisting en hittebehandeling. Voor *H. illucens* frass kon verse frass gebruikt worden voor de compostering, vergisting en hittebehandeling. *H. illucens* frass moest eerst gedroogd worden alvorens het gepelletiseerd kon worden. Hiervoor werd gedroogd frass gesampled.

Analyses werden uitgevoerd door de Bodemkundige Dienst van België vzw. Volgende analyses werden uitgevoerd:

- Algemene parameters (* gemeten voor beperkte analyses):
droge stof (DS), organische droge stof (OS)*, pH en geleidbaarheid (EC) van een waterig extract, dichtheid, massafractie steentjes, massafractie onzuiverheden, kiemremming (fytotoxiciteit), kiemkrachtige zaden, zuurstofconsumptie (oxitop), rijpheidsgraad en vochtgehalte na knijptest*
- Anorganische parameters (* gemeten voor beperkte analyses):
totale massafractie stikstof, ammoniakale stikstof (NH₄⁺), nitraat stikstof (NO₃⁻), fosfor (P₂O₅)*, kalium (K₂O)*, magnesium (MgO), calcium (CaO), natrium (Na₂O), chloride (Cl), Zwavel (SO₃²⁻)*

Niet alle stalen werden volledig geanalyseerd omdat verwacht werd dat bepaalde parameters niet beïnvloed zouden worden door de verwerkingsstap. Tabel 24 geeft een overzicht van de analyses die werden uitgevoerd op welke stalen.

Tabel 24. De analyses uitgevoerd op de verschillende stalen

insect	verwerking	algemene parameters	anorganische analyses
<i>T. molitor</i>	vers	X	X
<i>H. illucens</i>	vers	X	X
<i>H. illucens</i>	droog	X	X
<i>T. molitor</i>	hittebehandeld		
<i>H. illucens</i>	hittebehandeld		
<i>T. molitor</i>	pellet	X*	X*
<i>H. illucens</i>	pellet	X*	X*
<i>T. molitor</i>	compost	X	X
<i>H. illucens</i>	compost	X	X
<i>T. molitor</i>	digestaat	X	X
<i>H. illucens</i>	digestaat	X	X

VI.3 Resultaten

VI.3.1 Algemene parameters

De resultaten van de analyses van de algemene parameters zijn weergegeven in Tabel 25 en Tabel 27 voor *T. molitor* en Tabel 26 en Tabel 28 voor *H. illucens*.

Tabel 25. Het droge stof gehalte (DS) in massafractie van de verse materie (%VM), het organische droge stof gehalte (OS) in massafractie van de droge stof (%DS), pH en geleidbaarheid (EC) van een 1:5 volumeverhouding frass:water extract, densiteit in kg/L van de *T. molitor* frass stalen.

Staalnummeronde	Insect	Verwerking	DS (%VM)	OS (%DS)	Densiteit (kg/l)	EC ($\mu\text{S}/\text{cm}$ @ 25°C)	pH
1	<i>T. molitor</i>	vers	88	82	0,338	3300	6,3
2	<i>T. molitor</i>	vers	84	76	0,319	4000	6,8
3	<i>T. molitor</i>	vers	89	82	0,367	3600	6,1
1	<i>T. molitor</i>	pellet	88	80			
2	<i>T. molitor</i>	pellet	86	77			
3	<i>T. molitor</i>	pellet*					
3	<i>T. molitor</i>	digestaat	13,7	76,4		28400	8,15
1	<i>T. molitor</i>	compost	67,1	54	0,326	3000	7,8
2	<i>T. molitor</i>	compost	53,2	46	0,352	4000	7,6
3	<i>T. molitor</i>	compost**					

* De pelletisatie van staalname 3 is niet doorgegaan waardoor er ook geen data van beschikbaar is.

** Compostering van staalname 3 heeft geleid tot rotting en anaerobe vergisting in plaats van composteren en er is niet verder gewerkt met deze materie.

Een project van:



Met steun van:



Tabel 26. Het droge stof gehalte (DS) in massafractie van de verse materie (%VM), het organische droge stof gehalte (OS) in massafractie van de droge stof (%DS), pH en geleidbaarheid (EC) van een 1:5 volumeverhouding frass:water extract, densiteit in kg/L van de *H. illucens* frass stalen.

Staalnamernonde	Insect	Verwerking	DS (%VM)	OS (%DS)	Densiteit (kg/l)	EC (µS/cm @ 25°C)	pH
1	<i>H. illucens</i>	vers	57,2	50	0,393	5800	7,8
2	<i>H. illucens</i>	vers	55,4	47	0,339	4000	7,5
3	<i>H. illucens</i>	vers	45,2	40	0,410	5100	7,8
1	<i>H. illucens</i>	droog	80,6	71	0,376	8800	5,4
2	<i>H. illucens</i>	droog	85,3	75	0,372	8700	6
3	<i>H. illucens</i>	droog	84,4	72	0,380	8300	6,6
1	<i>H. illucens</i>	pellet	86,0	72			
2	<i>H. illucens</i>	pellet	85,4	75			
3	<i>H. illucens</i>	pellet*					
3	<i>H. illucens</i>	digestaat	16,9	74,3		25750	8,14
1	<i>H. illucens</i>	compost	70,2	57	0,357	3600	8,9
2	<i>H. illucens</i>	compost	55,5	43	0,349	4100	7,4
3	<i>H. illucens</i>	compost**					

* De pelletisatie van staalname 3 is niet doorgedaan waardoor er ook geen data van beschikbaar is.

** Compostering van staalname 3 heeft geleid tot rotting en anaerobe vergisting in plaats van composteren en er is niet verder gewerkt met deze materie.

Een project van:



Met steun van:



Tabel 27. De massafractie aan steentjes en onzuiverheden, kiemremming (fytotoxiciteit), aantal kiemkrachtige zaden, zuurstofconsumptie (oxitop), rijpheidsgraad en -klasse, en het vochtgehalte na knijptest na knijptest voor de *T. molitor* frass stalen.

Staalnummeronde	Insect	Verwerking	Steentjes >5mm (%VM)	Onzuiverheden >2mm (%DS)	Onzuiverheden >2mm (%VM)	Kiemremming (Fytotoxiciteit) (%VM)	Kiemkrachtige zaden (n/1000 ml)	Zuurstofconsumptie (Oxitop) (mmol O ₂ /kg)	Rijpheidsgraad (klasse)	Rijpheidsgraad (temp) °C	Vochtgehalte na knijptest (%VM)
1	<i>T. molitor</i>	vers	<0,05	<0,1	<0,05	26,5	afwezig	50	4	40,0	65
2	<i>T. molitor</i>	vers	<0,05	<0,1	<0,05	100	afwezig	37	1	60,9	70
3	<i>T. molitor</i>	vers	<0,05	<0,1	<0,05	100	Afwezig	15	1	64,4	65
1	<i>T. molitor</i>	pellet									
2	<i>T. molitor</i>	pellet									
3	<i>T. molitor</i>	pellet*									
3	<i>T. molitor</i>	digestaat									
1	<i>T. molitor</i>	compost	0,11	<0,1	<0,05	19,4	afwezig	24,3	2	59,5	48,4
2	<i>T. molitor</i>	compost	<0,05	<0,1	<0,05	12	afwezig	41	2	59,6	67
3	<i>T. molitor</i>	compost**									

* De pelletisatie van staalname 3 is niet doorgegaan waardoor er ook geen data van beschikbaar is.

** Compostering van staalname 3 heeft geleid tot rotting en anaerobe vergisting in plaats van composteren en er is niet verder gewerkt met deze materie.

Een project van:



Met steun van:



Tabel 28. De massafractie aan steentjes en onzuiverheden, kiemremming (fytotoxiciteit), aantal kiemkrachtige zaden, zuurstofconsumptie (oxitop), rijpheidsgraad en -klasse, en het vochtgehalte na knijptest voor de *H. illucens* frass stalen.

Staalnummeronde	Insect	Verwerking	Steentjes >5mm (%VM)	Onzuiverheden >2mm (%DS)	Onzuiverheden >2mm (%VM)	Kiemremming (Fytotoxiciteit) (%VM)	Kiemkrachtige zaden (n/1000 ml)	Zuurstofconsumptie (Oxitop) (mmol O ₂ /kg)	Rijpheidsgraad (klasse)	Rijpheidsgraad (temp) °C	Vochtgehalte na knijptest (%VM)
1	<i>H. illucens</i>	vers	<0,05	<0,1	<0,05	100	afwezig	45	2	56,4	60
2	<i>H. illucens</i>	vers	<0,05	<0,1	<0,05	70,4	afwezig	36	1	64,4	61
3	<i>H. illucens</i>	vers	<0,05	<0,1	<0,05	24,0	afwezig	35	2	51,0	71
1	<i>H. illucens</i>	droog	<0,05	<0,1	<0,05	100	afwezig	54	5	18,5	55
2	<i>H. illucens</i>	droog	<0,05	<0,1	<0,05	84,8	afwezig	23,7	2	55,4	57
3	<i>H. illucens</i>	droog	<0,05	<0,1	<0,05	100	afwezig	10,1	2	52,6	67
1	<i>H. illucens</i>	pellet									
2	<i>H. illucens</i>	pellet									
3	<i>H. illucens</i>	pellet*									
3	<i>H. illucens</i>	digestaat									
1	<i>H. illucens</i>	compost	<0,05	<0,1	<0,05	100	afwezig	31	1	67	42,9
2	<i>H. illucens</i>	compost	<0,05	<0,1	<0,05	10	afwezig	15	1	67,5	62
3	<i>H. illucens</i>	compost**									

* De pelletisatie van staalname 3 is niet doorgedaan waardoor er ook geen data van beschikbaar is.

** Compostering van staalname 3 heeft geleid tot rotting en anaerobe vergisting in plaats van composteren en er is niet verder gewerkt met deze materie.

Een project van:



Met steun van:



VI.3.2 Anorganische parameters

De resultaten van de analyses van de anorganische parameters zijn weergegeven in Tabel 29 voor *T. molitor* en Tabel 30 voor *H. illucens*

Tabel 29. De totale massafractie stikstof (N) in massafractie van verse massa (%VM), stikstof afkomstig van nitraat (NO₃⁻) in mg N/L, ammoniakale stikstof (NH₄⁺) in mg N/L, chloride (Cl⁻) in mg/L, totale fosfor concentratie (P₂O₅) in %VM, totale kaliumconcentratie (K) in %VM, totale magnesiumconcentratie (MgO) in %VM, de totale calciumconcentratie (CaO) in %VM, totale natriumconcentratie (Na₂O) in %VM en de totale zwavelconcentratie (SO₃²⁻) in %VM van de *T. molitor* frass stalen

staalnummer	insect	verwerking	N (%VM)	NO ₃ ⁻ (mg N/L)	NH ₄ ⁺ (mg N/L)	Cl ⁻ (mg/L)	P ₂ O ₅ (%VM)	K ₂ O (%VM)	MgO (%VM)	CaO (%VM)	Na ₂ O (%VM)	SO ₃ ²⁻ (%VM)
1	<i>T. molitor</i>	vers	2,76	11,6	690	140	3,3	2,2	0,81	0,23	<0.050	0,47
2	<i>T. molitor</i>	vers	3,08	16,8	1700	290	3,6	2,7	0,99	0,36	0,079	0,6
3	<i>T. molitor</i>	vers	2,77	19,0	750	970	2,8	2,3	0,75	0,43	0,29	0,71
1	<i>T. molitor</i>	pellet	2,95				3,4	2,6				
2	<i>T. molitor</i>	pellet	3,27				3,5	3				
3	<i>T. molitor</i>	Pellet*										
3	<i>T. molitor</i>	digestaat	6,73				5,18	4,71	1,78	1,75	1,78	1,69
1	<i>T. molitor</i>	compost	1,72	<3,0	910	1370	1,72	2,02	0,78	1,16	0,51	0,65
2	<i>T. molitor</i>	compost	2,42	<3,0	1900	860	2	1,87	0,54	1,24	0,22	0,49
3	<i>T. molitor</i>	Compost**										

* De pelletisatie van staalname 3 is niet doorgegaan waardoor er ook geen data van beschikbaar is.

** Compostering van staalname 3 heeft geleid tot rotting en anaerobe vergisting in plaats van composteren en er is niet verder gewerkt met deze materie.

Een project van:



Met steun van:



Tabel 30. De totale massafractie stikstof (N) in massafractie van verse massa (%VM), stikstof afkomstig van nitraat (NO₃⁻) in mg N/L, ammoniakale stikstof (NH₄⁺) in mg N/L, chloride (Cl⁻) in mg/L, totale fosfor concentratie (P₂O₅) in %VM, totale kaliumconcentratie (K) in %VM, totale magnesiumconcentratie (MgO) in %VM, de totale calciumconcentratie (CaO) in %VM, totale natriumconcentratie (Na₂O) in %VM en de totale zwavelconcentratie (SO₃²⁻) in %VM van de *H. illucens* frass stalen.

staalnummer	insect	verwerking	N (%VM)	NO ₃ ⁻ (mg N/L)	NH ₄ ⁺ (mg N/L)	Cl ⁻ (mg/L)	P ₂ O ₅ (%VM)	K ₂ O (%VM)	MgO (%VM)	CaO (%VM)	Na ₂ O (%VM)	SO ₃ ²⁻ (%VM)
1	<i>H. illucens</i>	vers	1,92	<3,0	2800	1700	1,89	1,67	0,45	0,051	0,36	0,5
2	<i>H. illucens</i>	vers	1,83	<3,0	1700	1070	1,41	1,96	0,39	0,073	0,36	0,5
3	<i>H. illucens</i>	vers	1,52	<3,0	1600	1970	1,57	1,47	0,44	0,058	0,51	0,57
1	<i>H. illucens</i>	pellet	3,65				2,9	3,2				
2	<i>H. illucens</i>	pellet	2,85				2,7	3,1				
3	<i>H. illucens</i>	pellet*										
1	<i>H. illucens</i>	droog	3,07	<3,0	3000	2700	3,1	3,1	0,8	0,18	0,7	0,82
2	<i>H. illucens</i>	droog	2,86	<3,0	3300	2800	2,7	3,1	0,74	0,31	0,63	0,99
3	<i>H. illucens</i>	droog	3,07	<3,0	3000	23000	3,7	3,6	1,02	0,74	0,65	1,13
3	<i>H. illucens</i>	digestaat	5,63				4,48	4,80	1,50	1,58	2,37	1,89
1	<i>H. illucens</i>	compost	2,39	<3,0	1900	2000	1,88	1,35	0,42	4,4	0,46	0,59
2	<i>H. illucens</i>	compost	1,68	<3,0	1370	1150	1,54	2,02	0,51	0,31	0,32	0,54
3	<i>H. illucens</i>	compost**										

* De pelletisatie van staalname 3 is niet doorgegaan waardoor er ook geen data van beschikbaar is

** Compostering van staalname 3 heeft geleid tot rotting en anaerobe vergisting in plaats van composteren en er is niet verder gewerkt met deze materie.

Een project van:



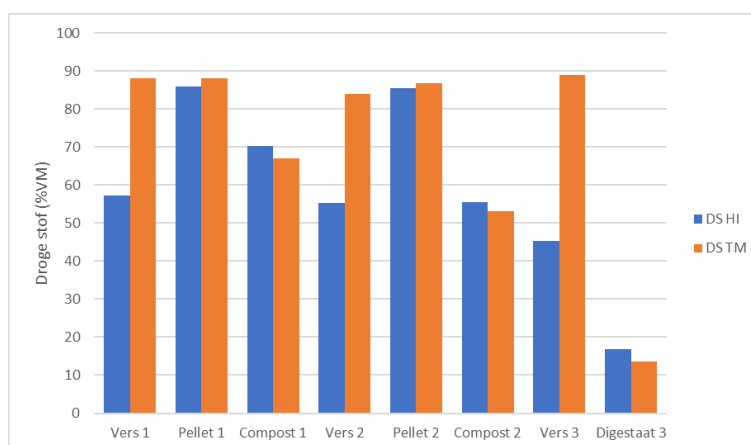
Met steun van:



VI.4 Discussie en besluit

VI.4.1 Droge en organische stof

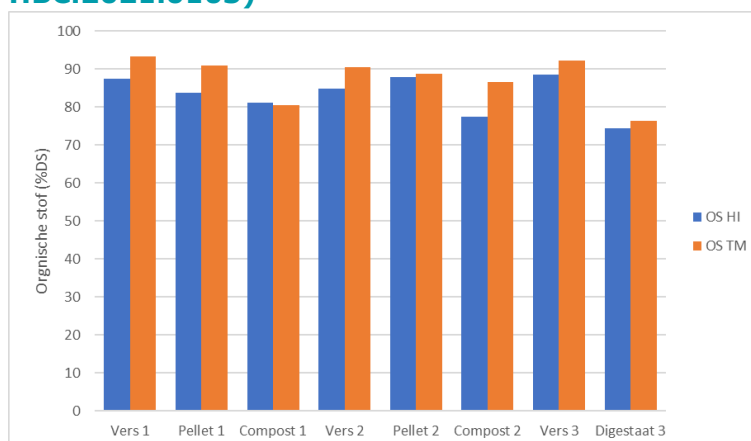
Figuur 19 toont een significant verschil in droge stofinhoud (DS) van het verse frass van *H. illucens* (HI) en *T. molitor* (TM) over de drie staalnames. Het is algemeen geweten dat HI frass (HIF) significant vochtiger is dan TM frass (TMF). Natuurlijk is het DS niet langer verschillend na pelletiseren, composteren en vergisten aangezien hier de waterinhoud onder controle wordt gehouden door droging en/of gecontroleerde toevoeging van water. Variatie over de drie batches (vergelijk “vers 1”, “vers 2” en “vers 3” van TM of HI in Figuur 19) zijn waarschijnlijk te wijten aan variatie in de kweekcondities en/of -substraat, maar dit onderzoeken valt niet binnen de scope van het huidige project.



Figuur 19. De droge stofinhoud (DS) uitgedrukt in massapercentage van verse materie (%VM) van vers frass, gepelletiseerd frass en gecomposteerd frass over de drie staalnames (zie nummer). Compostering van de derde staalname is gefaald en daarom niet opgenomen in de grafiek. Door technische problemen is de derde batch niet gepelletiseerd.

De organische stofinhoud (OS) is getoond in Figuur 20 voor zowel HIF als TMF. TMF heeft een hogere OS in vergelijking met HIF. Pelletiseren lijkt geen invloed te hebben op de OS, maar composteren consumeert, zoals verwacht, een deel van de organische stof. Deze daling is meer uitgesproken voor TMF dan voor HIF ook al composteert TMF significant moeilijker dan HIF. De sterkere daling in OS bij TMF compostering kan veroorzaakt zijn door de geobserveerde schimmelvorming en anaerobe vergisting.

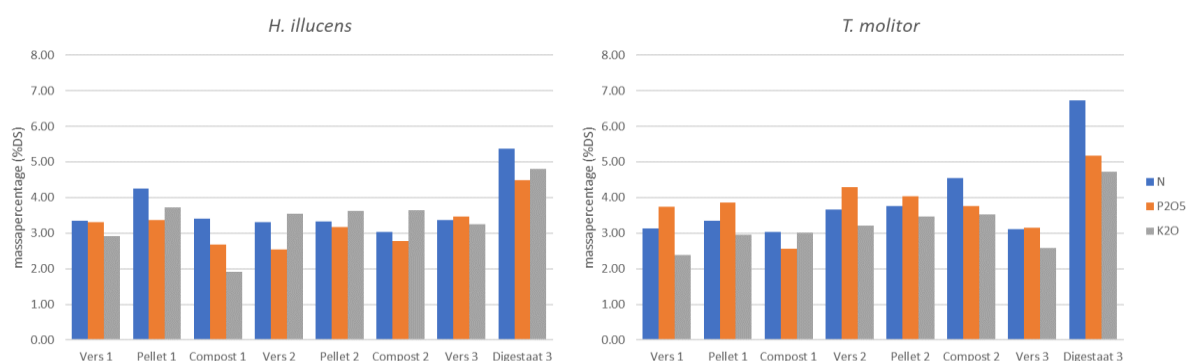
De sterkste daling wordt veroorzaakt door de anaerobe vergisting van zowel TMF als HIF ondanks de moeilijke vergisting. De sterke daling kan verklaard worden (1) door de langere looptijd van de vergisting vergeleken met composteren (122 dagen vs. 60 dagen), (2) omdat vergisting initieel vlotter verliep dan het composteren, of (3) vergisten consumeert meer OS dan composteren.



Figuur 20. De organische stofinhoud (OS) op basis van droge stof (%DS) van frass (vers, pellet of gecomposteerd) van *H. illucens* (HI) en *T. molitor* (TM) over de drie staalnames (zie nummer). Compostering van de derde staalname is gefaald en daarom niet opgenomen in de grafiek. Door technische problemen is de derde batch niet gepelletiseerd.

VI.4.2 Stikstof-, fosfor- en kaliuminhoud (NPK)

De totale elementaire stikstofinhoud uitgedrukt in %DS N, de totale kaliuminhoud uitgedrukt in %DS K₂O en de totale fosforinhoud uitgedrukt in %DS P₂O₅ zijn samengevat Figuur 21.



Figuur 21. De totale elementaire stikstofinhoud uitgedrukt in %DS N (blauw), de totale kaliuminhoud uitgedrukt in %DS K₂O (grijs) en de totale fosforinhoud uitgedrukt in %DS P₂O₅ (oranje) van *H. illucens* en *T. molitor* frass.

De NPK-inhoud van vers, gepelletiseerd en gecomposteerd TMF en HIF zijn gelijkaardig en vergelijkbaar met de waarden van vee- en kippenmest (Huntley, Barker en Stratton. 1997). Het digestaat van TMF en HIF is duidelijk rijker in NPK waarvoor twee plausibele verklaringen zijn: (1) door de dalend OS (zie Figuur 20) na vergisting neemt de relatieve NPK-concentratie toe of (2) om de moeizame vergisting gaande te houden, werd het digestaat regelmatig aangereikt met vers inoculum dat mogelijk rijk was in NPK.

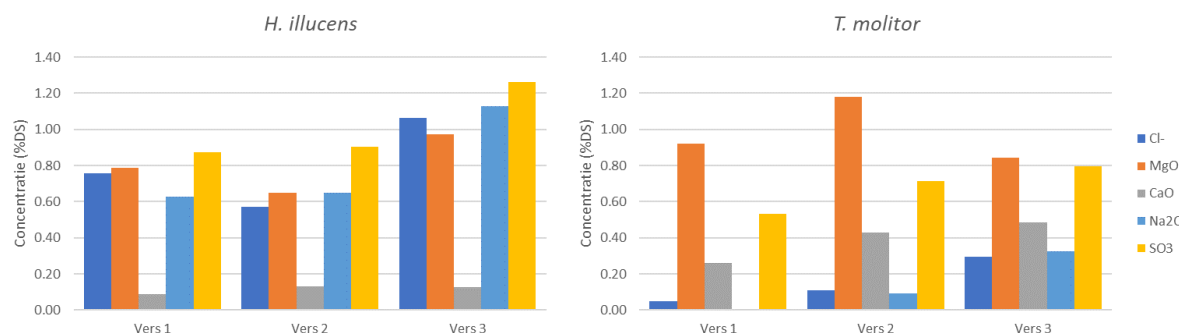
VI.4.3 Micronutriënten

De geanalyseerde micronutriënten Ca (CaO), chloride (Cl⁻), magnesium (MgO), natrium (Na₂O) en zwavel (SO₃²⁻) worden getoond in Figuur 22. TMF is beduidend armer in de meeste micronutriënten dan HIF, maar bezit wel meer magnesium en calcium. De kleine variaties over de drie staalnames zijn waarschijnlijk veroorzaakt door variaties in kweekcondities, maar werd niet verder bestudeert in dit project.

De verschillen tussen HIF en TMF kunnen zowel gezocht worden in de biologische verschillen tussen HIF en TMF, maar uiteraard ook in variaties in de kweekcondities. Echter, dit verder uitpluizen valt niet binnen de scope van dit project en is mogelijk een interessante materie voor een vervolgproject.

Een project van:

Met steun van:



Figuur 22. De micronutriënten chloride (Cl⁻), magnesium (MgO), calcium (CaO), natrium (Na₂O) en zwavel (SO₃²⁻) in *H. illucens* en *T. molitor* frass uitgedrukt op basis van droge stof (%DS).

VI.4.4 Besluit

Macronutritioneel (NPK) zijn TMF en HIF gelijkaardig en vergelijkbaar met vee- en kippenmest (Huntley, Barker en Stratton. 1997). De micronutritionele inhoud is beduidend rijker voor HIF dan voor TMF. Dit verschil is waarschijnlijk niet enkel het gevolg van biologische variaties, maar ook van de verschillende kweekcondities.

Concreeet, toont deze data aan dat insectenfrass een evenwaardig alternatief kan zijn voor vee- en kippenmest gebaseerd op de macronutritionele waarden. Frass is gekend voor zijn diverse biologische en chemische samenstelling wat kan resulteren in biostimulant effect (Mannaa, et al. 2023, Schmitt en de Vries 2020), stress- en pestresistentie (Poveda 2021).

VI.5 Referenties

Huntley, E. E., Allen V. Barker, en M. L. Stratton. *Composition and uses of organic fertilizers*. Vol. 668, in *Agricultural Uses of By-Products and Wastes*, 120-139. American Chemical Society, 1997.

Mannaa, M., A. Mansour, I. Park, D. W. Lee, en Y. S. Seo. „Insect-based agri-food waste valorization: Agricultural applications and roles of insect gut microbiota.” *Environmental Science and Ecotechnology*, 2023: 100287.

Poveda, J. „Insect frass in the development of sustainable. A review.” *Agronomy for Sustainable Development* 41, nr. 1 (2021): 5.

Schmitt, E., en W. de Vries. „Potential benefits of using *Hermetia illucens* frass as a soil amendment on food production and for environmental impact reduction.” *Current Opinion in Green and Sustainable Chemistry* 25 (2020): 100335.

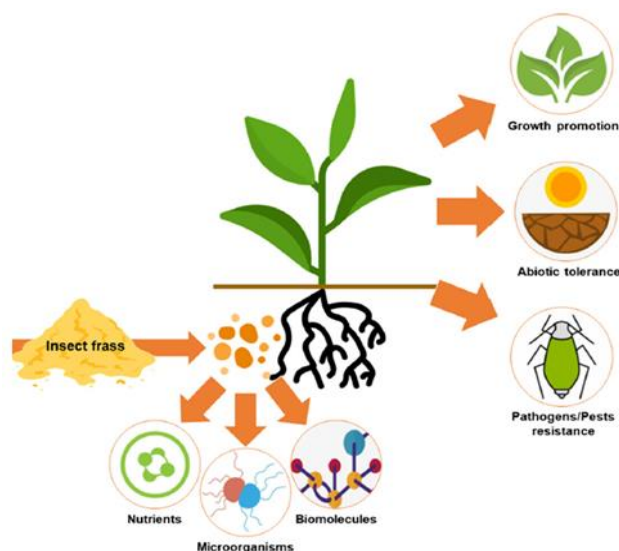
Hoofdstuk VII: De behandelde restsubstraten toegepast in de plantenteelt om de productie te verhogen onder optimale of stress omstandigheden

Auteur: Ann De Volder (SusCroPP - KU Leuven)

VII.1 Inleiding

Het kweken van insecten voor voeding, voeder en biogebaseerde grondstoffen vormt in België een relatief nieuwe sector. Valoriseren van het restsubstraat van de kweek (frass), bestaande uit niet-geconsumeerd substraat, insectendelen en -uitwerpselen, is één van de uitdagingen waar de sector voor staat. Frass zou potentieel hebben als grondstof voor de productie van bodemverbeteraar of meststoffen maar moet hiervoor eerst een hygiëniseringsstap ondergaan (thermisch drogen, pelletiseren, pyrolyse, ...). Dergelijke behandelingen hebben mogelijk een impact op de biologische en fysicochemische eigenschappen van het restsubstraat die de basis vormen voor potentieel gebruik in plantenteelt en voor de economische meerwaarde van het verwerkte restsubstraat.

Het restsubstraat van insectenkweek heeft een hoog gehalte organische koolstof en bevat macro- en micronutriënten, die rechtstreeks beschikbaar zijn als voedingsstoffen zowel voor de plant zelf als voor bodem micro-organismen. Deze gaan op hun beurt gestimuleerd worden om organisch materiaal af te breken, stikstof te fixeren en/of fosfaat beschikbaar te stellen voor opname door de plant (Barragán-Fonseca et al., 2022). Frass heeft ook een diverse microbiële belasting, zowel met (voedsel)pathogenen, die mogelijk een gevaar vormen bij gebruik van frass in de plantenteelt, als met species die een stimulerend effect kunnen uitoefenen op zowel het bodemmicrobioom als de plant.



Figuur 23. Potentiële effecten van het gebruik van insectenfrass op plantengroei, figuur aangepast uit Poveda et al. 2020.

Zo rapporteerden (Poveda, 2021) de positieve invloed op de groei van bieten van in meelwormenfrass aanwezige micro-organismen. Fuhrmann et al., (2022) schreven de geobserveerde verhoogde microbiële bodemactiviteit en opbrengst van klaver, na toevoeging van zwarte soldatenvlieglarven frass, toe aan de in het frass aanwezige micro-organismen. De positieve effecten waren niet zichtbaar als het frass vóór toediening niet-thermisch werd gesteriliseerd.

Een project van:

Met steun van:

Verscheidende studies suggereren ook een activatie van plantafweer tegen plagen en pathogenen (via insectresten en chitine) en verhoogde tolerantie tegen abiotische stress (droogte, zout) na inmengen van frass in de bodem (Bloukounon-Goubalan et al., 2021; Poveda, 2021). De potentiële effecten op plantengroei bij gebruik van frass in plantenteelt worden geïllustreerd in Figuur 23.

Door het uitvoeren van plantenproeven onder gecontroleerde omstandigheden kan het potentieel van behandelde rests substraten als stimulator van plantengroei en -ontwikkeling onderzocht worden. Vergelijking van de ontwikkeling van controle-planten met planten die frass of conventionele anorganische meststoffen toegediend krijgen, laat toe het nutritioneel potentieel van het rests substraat in te schatten. Eenzelfde experiment onder droogtestress, waarbij de planten een beperkte hoeveelheid water krijgen, belicht de potentiële waarde van het rests substraat als mogelijke biostimulant. Op basis van de groeiproefresultaten kan de waarde van de behandelde rests substraten als grondstof voor bodemverbeteraar of meststof worden ingeschat.

VII.2 Materiaal en methoden

VII.2.1 Frass stalen

Frass van de kweek van zwarte soldatenvlieglarven (ZSVL-frass, *Hermetia illucens*, code HI) werd aangeleverd door Protix; frass van de kweek van gele meelwormen (GM-frass, *Tenebrio molitor*, code TM) door Nussect. Een overzicht van de gebruikte stalen, insectensoort, staalcodes, corresponderende voorbehandelingen en plantproeven wordt gegeven in Tabel 31. Stalen werden bewaard bij 4 °C. HI-pellets werden gemaakt van het door Protix gedroogde frass. Voor de aanmaak van de overige stalen thermisch gedroogd HI en TM-frass, pellets en compost werd onbehandeld frass gebruikt.

Tabel 31. Overzicht stalen frass van insectenkweek, code, insectensoort, behandeling en corresponderende plantengroei experimenten.

Frass code	Insect species	Frass voorbehandeling	Plantproef
HI F	<i>Hermetia illucens</i>	onbehandeld	1 - 2
HI D		gedroogd (Protix)	*
HI TD		thermisch gedroogd (70 °C - 60 min.)	1 - 2
HI P		gepelletiseerd	3
TM F	<i>Tenebrio Molitor</i>	onbehandeld	1 - 2
TM TD		thermisch gedroogd (70 °C - 60 min.)	1 - 2
TM P		gepelletiseerd	3

F: vers; D: droog; TD: thermisch gedroogd; P: pellets

De fysicochemische eigenschappen van de frass stalen werden bepaald door de Bodemkundige Dienst van België, de resultaten voor het droge stofgehalte en de NPK-nutriënten (N stikstof, P fosfor, K kalium) worden weergegeven in Tabel 32.

Het droge stofgehalte van het verse ZSVL-frass bedroeg 57%, het verse GM-frass bevatte veel minder water, het droge stofgehalte bedroeg 88%. Na thermisch drogen hadden beide frass-soorten een vergelijkbaar droge stofgehalte van 94-95%, ook na pelletiseren waren de waardes vergelijkbaar en bedroegen ze 86-88%. De verhouding voor de nutriënten N-P-K was voor frass van de kweek van zwarte soldatenvlieglarven 1-1-0.9, voor frass van de kweek van gele meelwormen was de verhouding 1-1.2-0.8, het bevatte dus relatief iets meer fosfor en iets minder kalium.

Tabel 32. Nutriëntgehalte frass stalen

Frass Code	N totaal (g/kg)	P ₂ O ₅ totaal (g/kg)	K ₂ O totaal (g/kg)	droge stof (%)
HI F	19	19	17	57
HI TD	31	31	27	94
HI P	37	29	32	86
TM F	28	33	22	88
TM TD	30	36	24	95
TM P	30	34	26	88

HI: *Hermetia illucens*; TM: *Tenebrio molitor*; F: vers; TD: thermisch gedroogd; P: pellets

De microbiologische kwaliteit van het frass stalen werd bepaald in Activiteit 2 Analyse van de biologische risico's, Taak 2.1 Microbiële belading (zie Hoofdstuk III:). Omdat de resultaten van deze analyses niet beschikbaar waren vóór de start van de eerste plantproef werd zowel onbehandeld als thermisch gedroogd frass gebruikt, onafhankelijk van het al of niet conform zijn met de EU-wetgeving betreffende de microbiologische veiligheid

VII.2.2 Groene boon (*Phaseolus vulgaris* L.)

Phaseolus vulgaris L. (gewone of groene boon) is een eenjarige plant die behoort tot de familie van de vlinderbloemigen (Fabaceae). In de plantengroei experimenten werd de *P. vulgaris* cultivar. 'Castandel' gebruikt; zaden werden aangekocht bij AVEVE®. De groene boon is een tweezaadlobbige plant. Na het kiemen van de zaden worden de twee eerste, enkelvoudige, hartvormige bladeren, gevormd aan de jonge scheut boven de zaadlobben. Tijdens de verdere groei verlegt en verdikt de stengel, er worden zijscheuten en bladeren, bestaande uit drie spitse deelblaadjes, gevormd. Vervolgens verschijnen er trosjes bloemknoppen en later kleine witte zelf-bestuivende bloemen. Na de bevruchting ontwikkelen de peulen waarin zich de vruchten (bonen) bevinden. Groene bonen worden geoogst als peulen voor de vruchten rijpen.

VII.2.3 Methode plantengroei experimenten

Er werden achtereenvolgens drie plantengroei proeven uitgevoerd waarbij een analoge werkwijze werd gebruikt, de details worden verder besproken. Controle-planten en NPK-planten (planten die anorganische NPK-meststof kregen toegediend) werden opgekweekt in individuele kweekpotjes gevuld met universele kwekerspotgrond DCM®. Onbehandeld en thermisch gedroogd frass werd in bulk, in verschillende gewichtspercentages (0.5 tot 10%), vermengd met universele potgrond en deze mix werd gebruikt voor het opkweken van frass-planten. Frass pellets daarentegen werden, volgens gewichtspercentage, homogeen verdeeld over individuele kweekpotjes. In elk kweekpotje werd 200 g potgrond of potgrond/frass mengsel afgewogen.

P. vulgaris zaden werden voor het zaaien 1 uur geweekt in gedemineraliseerd water. Er werden twee zaden op een diepte van 3-4 cm gezaaid per kweekpotje. Na twee weken werd één van beide jonge zaailingen verwijderd om, onafhankelijk van de kieming, een vergelijkbaar aantal planten te genereren voor de opvolging van de groeiparameters. Het kweken van de planten gebeurde in een groeikamer onder gecontroleerde condities, volgens een dag/nacht regime. De planten kregen gedurende 12 uur licht (intensiteit 200 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$) bij een temperatuur van 23 °C, dit werd gevolgd door een donkere periode van 12 uur bij een temperatuur van 18 °C. De relatieve luchtvochtigheid bedroeg 70%. Driemaal per week kregen alle planten eenzelfde hoeveelheid water, de groei werd opgevolgd gedurende 9 weken.

Een project van:

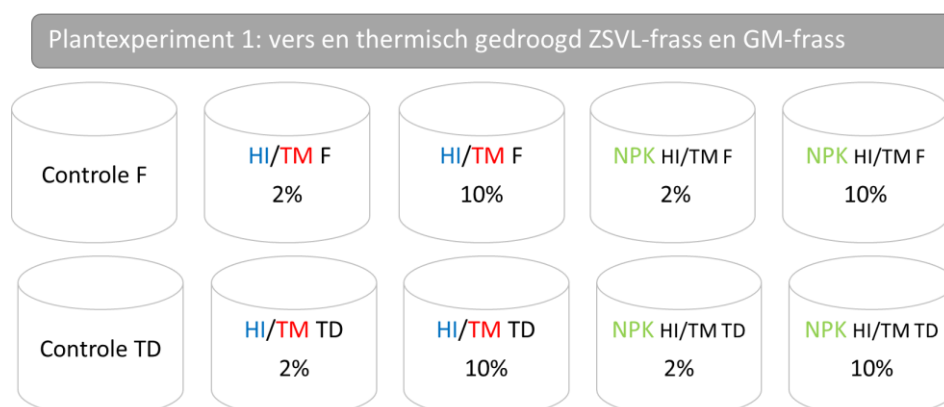


Met steun van:



VII.2.3.1 Plantexperiment 1: vers en thermisch gedroogd ZSVL-frass en GM-frass (2 en 10%) en NPK's, normale groeicondities

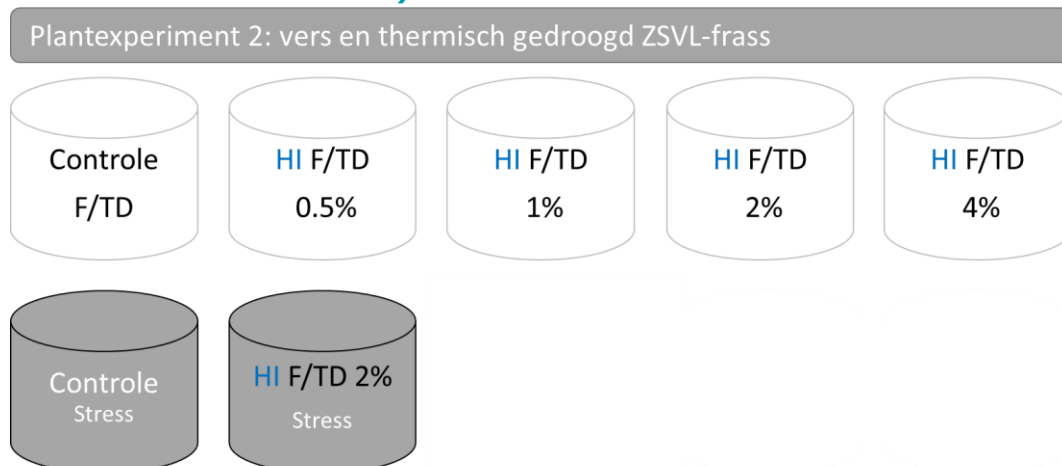
In de eerste plantengroei proef werd vers (F) en thermisch gedroogd (TD) restsubstraat van de kweek van zwarte soldatenvlieglarven (HI) en gele meelwormen (TM) gebruikt. Frass werd in een gewichtspercentage van 2 of 10% (natte stof) gemengd met potgrond voor het kweken van frassplanten. Per frass-soort (HI en TM) en per type voorbehandeling (F en TD) werden controle-planten gekweekt in potgrond. Per frass-soort en per type voorbehandeling werden per toevoegingspercentage (2 en 10%) ook NPK-planten meegenomen. Ze werden gekweekt in potgrond en kregen, verspreid over de totale groeiperiode van 9 weken, anorganische NPK-meststof toegediend. De totaal toegediende hoeveelheid N, P en K was gelijk aan de totale hoeveelheid van deze componenten in de overeenkomstige stalen frass/potgrond mix. Per behandeling werden telkens 7 replica's ingezet. De proefopzet van het eerste plantexperiment wordt schematisch weergegeven in Figuur 24. De 140 kweekpotten werden random verspreid in de groeikamer. Bonenplanten groeiden onder normale condities en kregen driemaal per week water. Aan de NPK-planten werd éénmaal per week NPK-oplossing in plaats van water toegediend.



Figuur 24. Schema plantexperiment 1 voor F, vers en TD, thermisch gedroogd ZSVL-frass (HI, blauw) of GM-frass (TM, rood); NPK-meststof (groen); 1 potje staat voor 7 herhalingen per frass-soort, controle (grijs) 14 herhalingen.

VII.2.3.2 Plantexperiment 2: vers en thermisch gedroogd ZSVL-frass (0.5 tot 4%), normale groeicondities en vers en thermisch gedroogd ZSVL-frass 2%, droogtestress

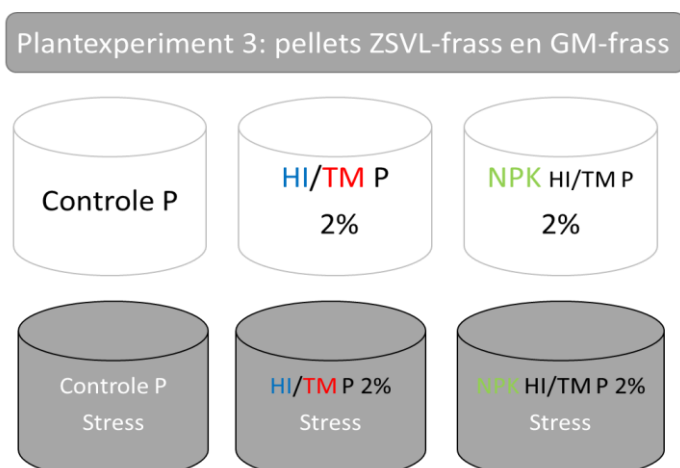
In het tweede plantengroei experiment werd vers (F) en thermisch gedroogd (TD) restsubstraat van de kweek van zwarte soldatenvlieglarven gebruikt. De proefopzet wordt schematisch weergegeven in Figuur 25. ZSVL-frass (HI) werd in een gewichtspercentage van 0.5, 1, 2 of 4% (natte stof) gemengd met potgrond voor het kweken van frassplanten. Per type voorbehandeling (F en TD) werden controle-planten gekweekt in potgrond. Per behandeling werden telkens 7 replica's ingezet, de planten groeiden onder normale condities. Bijkomend werd eenzelfde experiment uitgevoerd, met voor de frassplanten toediening van 2% vers of gedroogd ZSVL-frass, waarbij de planten groeiden onder droogtestress condities, hiervoor werden 10 replica's ingezet. De 100 kweekpotten werden random verspreid in de groeikamer. Bonenplanten die groeiden onder normale condities kregen 3 maal per week water. Voor bonenplanten onder droogtestress werd deze hoeveelheid met de helft gereduceerd vanaf de derde week van de groeiproef.



Figuur 25. Schema plantexperiment 2 voor ZSVL-frass (HI); F: vers, TD: thermisch gedroogd; wit: normale groeicondities, 1 kweekpotje staat voor 7 herhalingen per frass voorbehandeling (F of TD); grijs: droogtestress, 10 herhalingen.

VII.2.3.3 Plantexperiment 3: pellets ZSVL-frass en GM-frass (2%) en NPK's, normale groeicondities en droogtestress

In het derde plantexperiment, waarvan de proefopzet schematisch wordt weergegeven in Figuur 26, werd gepelletiseerd restsubstraat van de kweek van zwarte soldatenvlieglarven (HI P) en gele meelwormen (TM P) gebruikt. Frass pellets werden in een gewichtspercentage van 2% (natte stof) homogeen verdeeld in de potgrond van de individuele kweekpotten voor het kweken van de frassplanten. Per frass-soort werden controle-planten en 2% NPK-planten gekweekt in potgrond. De NPK-planten kregen, verspreid over de totale groeiperiode van 9 weken, anorganische NPK-meststof toegediend. De totaal toegediende hoeveelheid N, P en K was gelijk aan de totale hoeveelheid N, P en K in de overeenkomstige stalen frass/potgrond mix. Per staal werden telkens 17 replica's ingezet die groeiden onder normale condities, voor 17 andere replica's groeiden de bonenplanten onder droogtestress (50% reductie watergift). De 170 kweekpotten werden random verspreid in de groeikamer. Bonenplanten die groeiden onder normale condities kregen 3 maal per week water. Voor de NPK-planten werd 1 maal per week NPK-oplossing in plaats van water toegediend. Bonenplanten die groeiden onder droogtestress condities kregen vanaf de derde week 50% minder water.



Figuur 26. Schema plantexperiment 3 voor pellets ZSVL-frass (HI P, blauw) en pellets GM-frass (TM P, rood), NPK-meststof (groen); wit: normale groeicondities, grijs: droogtestress; 1 kweekpotje staat voor 17 herhalingen per frass-type (HI of TM).

VII.2.4 NPK-oplossingen

Op basis van de concentraties aan stikstof (N), fosfor (P_2O_5) en kalium (K_2O) in de stalen onbehandeld en voorbehandeld ZSVL- en GM-frass werd de concentratie van de toe te dienen NPK-oplossingen berekend voor elk frass-type, elke voorbehandeling en elk toevoegingspercentage. Voor de bereiding van de NPK-oplossingen werden volgende stockoplossingen gebruikt:

- Ammoniumnitraat (NH_4NO_3) oplossing (18% (N totaal), 9% nitraatstikstof (NO_3), 9% ammoniumstikstof (NH_4), Van Iperen BV.)
- Fosfaat (P_2O_5) oplossing (42.5% fosforzuuranhydride oplosbaar in water, Van Iperen BV)
- Kaliumoxide (K_2O) oplossing (41.6% oplosbaar in water, Univar)

Toediening van NPK-oplossing gebeurde 1 maal per week, vanaf de derde week van het experiment.

VII.2.5 Generatieve en vegetatieve groeiparameters

De vegetatieve en generatieve groeiparameters van de bonenplanten die werden opgevolgd gedurende de groeiperiode van negen weken worden weergegeven in Tabel 33. De kieming vond plaats gedurende de eerste twee weken, het kiemingspercentage werd bepaald voor het totaal van de bonenzaden. Vanaf de derde week werd één zaailing per kweekpotje weerhouden waarvoor de groeiparameters verder opgevolgd werden.

Tabel 33. Overzicht van de opgevolgde vegetatieve en generatieve groeiparameters van de bonenplanten.

Vegetatieve groeiparameters	Generatieve groeiparameters
Kieming	Tijd tot eerste bloem
Planthoogte	Aantal bloemen
Aantal blaadjes	Aantal peulen
Pigmentgehalte bladeren	Vers-en drooggewicht peulen
Relatief watergehalte bladeren	
Vers- en drooggewicht plant	

VII.2.5.1 Planthoogte, aantal blaadjes, bloemen en peulen

De hoogte van de bonenplanten werd wekelijks gemeten, vanaf het laagste meetbare punt (net boven de potgrond) tot aan het hoogste punt, met behulp van een meetlat met een nauwkeurigheid van 1 mm. Het aantal blaadjes werd ook wekelijks opgevolgd. Ongeveer zes weken na het planten van de zaden, verschenen de eerste bloemen en vond de overgang van vegetatieve naar generatieve groei plaats. Vanaf dan werden het aantal bloemen en het aantal peulen elke week geteld.

VII.2.5.2 Vers- en drooggewicht

Na negen weken werden de peulen geoogst en werd het vers- en drooggewicht van zowel de plant als de peulen bepaald. Wegingen werden uitgevoerd op een bovenweger (Acculab, Atilon model) met een nauwkeurigheid van 0.001 g. Het versgewicht werd bepaald voor de plant (bovengrondse deel van de plant waarvan de peulen werden verwijderd) en voor de peulen. Het drooggewicht werd berekend aan de hand van het droge stofgehalte, bepaald voor een deelstaal van zowel plant als peulen, na 72 uur incubatie in een droogoven (VWR) bij 80 °C.

VII.2.5.3 Pigmentgehalte bladeren

Voor het bepalen van het pigmentgehalte in de bladeren werd bladmateriaal gedurende 72 uur geïncubeerd in N,N-dimethylformamide. Met een Genesys 10S UV-VIS spectrofotometer (Thermo Fisher Scientific) werden de absorptiewaarden in het supernatans gemeten bij de golflengtes 647, 664 en 470 nm (Wellburn, 1994). De gehalten chlorofyl a, chlorofyl b, totaal chlorofyl en carotenoiden in de bladeren werden berekend zoals vermeld in (Porra et al., 1989).

Een project van:



Met steun van:



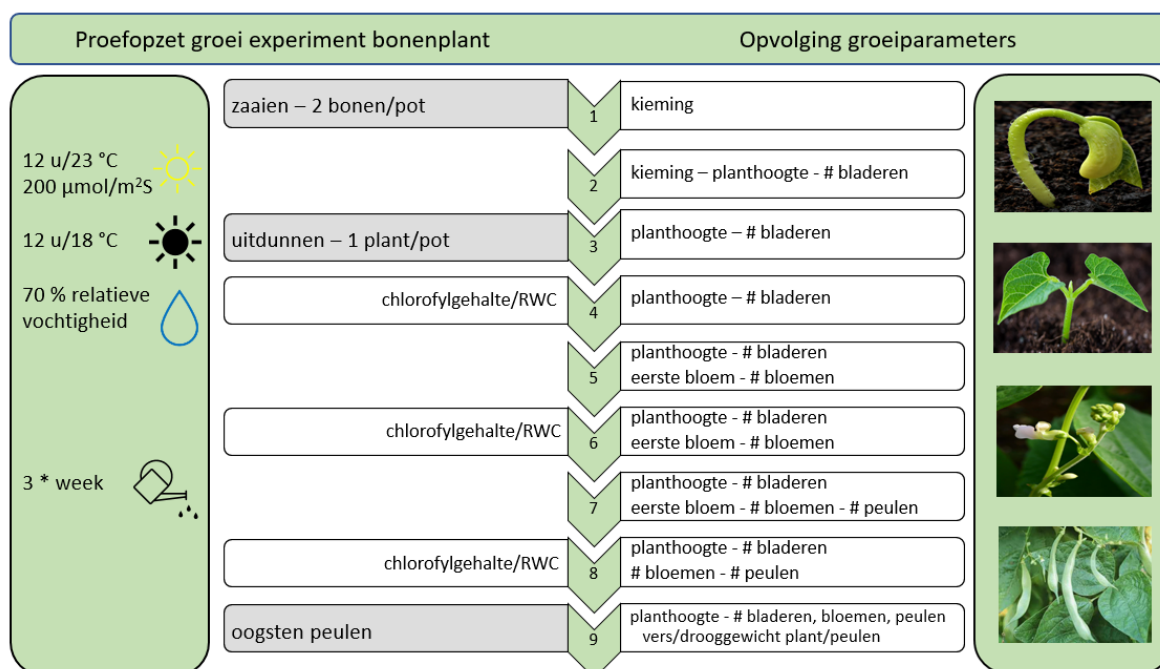
VII.2.5.4 Relatief watergehalte bladeren

Voor de bepaling van het relatief watergehalte (RWC) werd een stuk van het blad (bladtip) geknipt. Na bepaling van het versgewicht (balans type R160P, Sartorius) werd de bladtip overgebracht in een Falcon® tube. De tube werd gevuld met gedemineraliseerd water en vier uur geïncubeerd bij 4 °C. Hierna werd de bladtip opnieuw gewogen om het gewicht bij volle turgor te bepalen. Vervolgens werd de bladtip overgebracht in een lege Falcon® tube en 72 uur in een droogoven geplaatst bij 80 °C om het in de bladtip aanwezige water te verdampen. Vervolgens werd het drooggewicht bepaald. Het relatief watergehalte van de bladeren werd berekend met onderstaande formule (Ceusters et al., 2009):

$$RWC (\%) = \frac{(\text{versgewicht} - \text{drooggewicht})}{(\text{turgorgewicht} - \text{drooggewicht})}$$

VII.2.5.5 Opvolgen groeiparameters

Figuur 27 toont de groeicondities die werden gebruikt tijdens de drie groei experimenten met bonenplanten en geeft een schematisch overzicht van de timing voor het opvolgen van de vegetatieve en generatieve groeiparameters gedurende negen weken.



Figuur 27. Groeicondities en opvolging van de vegetatieve en generatieve groeiparameters van de bonenplant gedurende 9 weken.

VII.2.6 Statistische dataverwerking

Alle statistische dataverwerking werd uitgevoerd met JMP Pro 16.0.0 softwarepakket. In het geval normaliteit (geëvalueerd met Shapiro-Wilk test) en homoscedasticiteit (geëvalueerd met O'Brien) bevestigd werden, werd one-way ANOVA gevolgd door Tukey HSD post-hoc test gebruikt om data onderling te vergelijken. Wanneer er enkel aan normaliteit voldaan werd maar niet aan homoscedasticiteit (ongelijke varianties) werd gebruikt gemaakt van Welch's ANOVA met Steel-Dwass all pairs post-hoc test. Indien data niet normaal verdeeld waren werd gebruik gemaakt van de niet-parametrische Kruskal-Wallis test met een Wilcoxon each pair test om data onderling te vergelijken. Voor alle testen werd een significantieniveau van 5% (p = 0.05) gebruikt.

VII.3 Resultaten

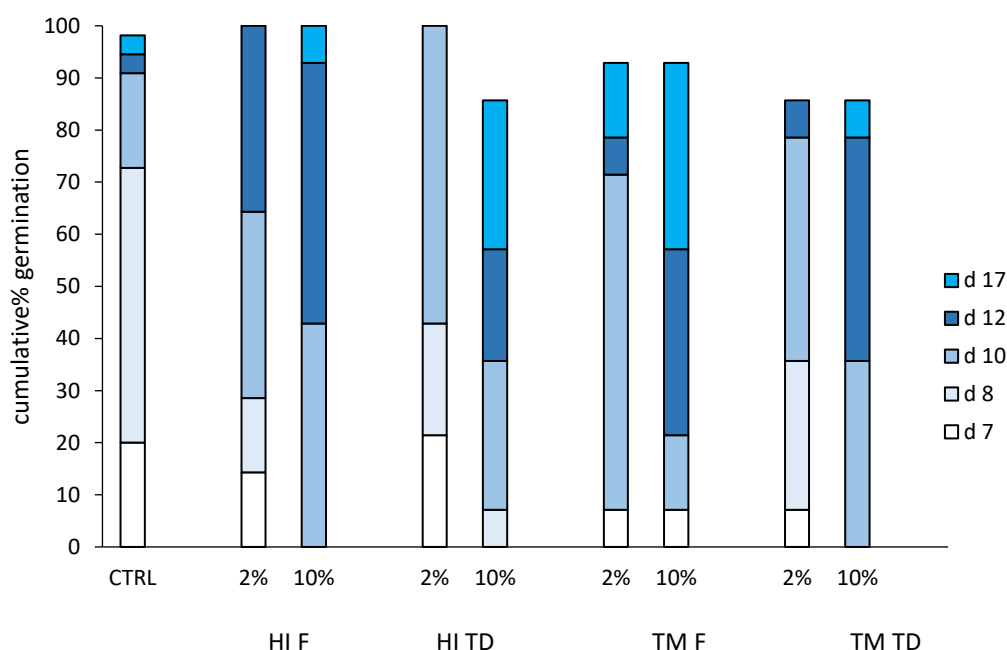
VII.3.1 Plantexperiment 1: vers en thermisch gedroogd ZSVL-frass en GM-frass (2 en 10%) en NPK's, normale groeiomstandigheden

In het eerste plantexperiment werden de groeiparameters bepaald voor verschillende behandelingen:

- controle-planten (CTRL) die groeiden in potgrond
- NPK-planten (NPK, HI of TM, 2 of 10%) die groeiden in potgrond en éénmaal per week NPK-oplossing kregen toegediend
- frass-planten die groeiden in potgrond vermengd met vers (F) of thermisch gedroogd (TD) restsubstraat van de kweek van zwarte soldatenvlieglarven (HI) of gele meelwormen (TM) in een gewichtspercentage van 2 of 10%.

VII.3.1.1 Kieming

De cumulatieve kiemingspercentages van de bonen (2 per kweekpotje) op dag 7, 8, 10, 12 en 17 na het zaaien, worden voor controle- en frass-planten (vers en thermisch gedroogd HI-frass (links) en TM-frass (rechts), toevoegpercentages 2 en 10%), weergegeven in Figuur 28. Omdat de kieming van de bonenzaden in de met frass gemengde potgrond traag verliep, werd het selecteren van 1 zaailing uitgesteld tot dag 17 na het zaaien. Vergelijken met de kieming van de controles in potgrond werd kieming in met frass gemengde potgrond geremd, zowel voor ZSVL- als GM-frass, vers en thermisch gedroogd. Het effect was het meest uitgesproken bij 10% frass toediening.



Figuur 28. Cumulatief kiemingspercentage: bonenzaden in potgrond (CTRL) en potgrond gemengd (2 en 10%) met vers (F) en thermisch gedroogd (TD) frass van de kweek van zwarte soldatenvlieglarven (HI links) en gele meelwormen (TM rechts) op dag 7 → 17 na het zaaien.

Op dag 8 was 73% van de bonen van de controles gekiemd, voor 10% HI-frass, vers en thermisch gedroogd was dit respectievelijk 0 en 7%, voor 10% TM-frass bedroegen de waarden op dit tijdstip 7 en 0%. Op dag 17 was 98% van de controles gekiemd. Alhoewel kieming bij frass toediening trager op gang kwam was op dit tijdstip het cumulatieve kiemingspercentage voor met HI-frass gemengde potgrond hiermee vergelijkbaar. Zowel voor HI F (2 en 10%) als HI TD 2% was 100% van de bonen

Een project van:

Met steun van:

ValoReSect

(VLAIO TETRA HBC.2021.0103)

67

gekiemd. Enkel voor 10% thermisch gedroogd HI-frass (HI TD 10%) was er op dag 17 een lager cumulatief kiemingpercentage van 86%. Voor TM-frass lag het cumulatief kiemingspercentage op dag 17 lager dan voor de controles. Bij vers TM-frass (TM F) was 93% van de bonen gekiemd, voor thermisch gedroogd TM-frass (TM TD) bedroeg de waarde 86%, met vergelijkbare cumulatieve kiemingpercentages voor 2 en 10% toediening.

VII.3.1.2 Vegetatieve groeiparameters

VII.3.1.2.1 Planthoogte

De hoogte van de bonenplanten werd minstens elke week opgemeten, in Figuur 30 zijn de resultaten voor 5 tijdstippen weergegeven (10, 17, 25, 35 en 63 dagen na zaaien) voor de verschillende behandelingen. De verschillen tussen tijdstippen 42, 49 en 56 dagen na zaaien waren miniem en worden daarom niet getoond. Vanaf ongeveer 40 dagen na zaaien stagneerde de lengtetoeename van de bonenplanten en vond de overgang van vegetatieve naar generatieve groei plaats. Dit was ook het tijdstip waarop de eerste bloemen verschenen.

10 dagen na zaaien waren de frass-planten het kleinst, de planten met 10% frass toevoeging waren significant kleiner dan zowel de controle- als de NPK-planten. 17 dagen na zaaien (tijdstip selectie 1 zaailing) waren er echter geen significante verschillen meer in planthoogte. Dit kan gerelateerd worden aan de geobserveerde remming van de kieming, die het meest uitgesproken was voor 10% frass toediening gedurende de eerste 10 dagen na het zaaien van de bonen.

Op dag 25, 35 en 63 na zaaien was de planthoogte bij zowel de 10% NPK als de 10% frass toevoegingen significant lager dan bij de 2% toevoegingen, voor zowel HI- als TM-frass. Ten opzichte van de controleplanten waren de 10% NPK TM- en 10% TM-planten altijd significant kleiner. Voor de planten die ZSVL-frass toegediend kregen was er meer variatie, maar ook hier waren de 10% NPK HI- en de 10% HI-planten (niet altijd significant) kleiner dan de controleplanten. (zie Figuur 30 A-D).

Het kleiner blijven van de planten die 10% NPK of frass toegediend kregen werd ook al snel visueel waargenomen gedurende het opvolgen van de plantproef zoals wordt geïllustreerd in Figuur 29.



Figuur 29. Vergelijking van de hoogte van de bonenplanten op dag 63 na het zaaien voor controleplanten (C), 2 en 10% HI TD-planten (F 2% en F 10%) en bijhorende 2 en 10% NPK-planten (N 2% en N 10%).

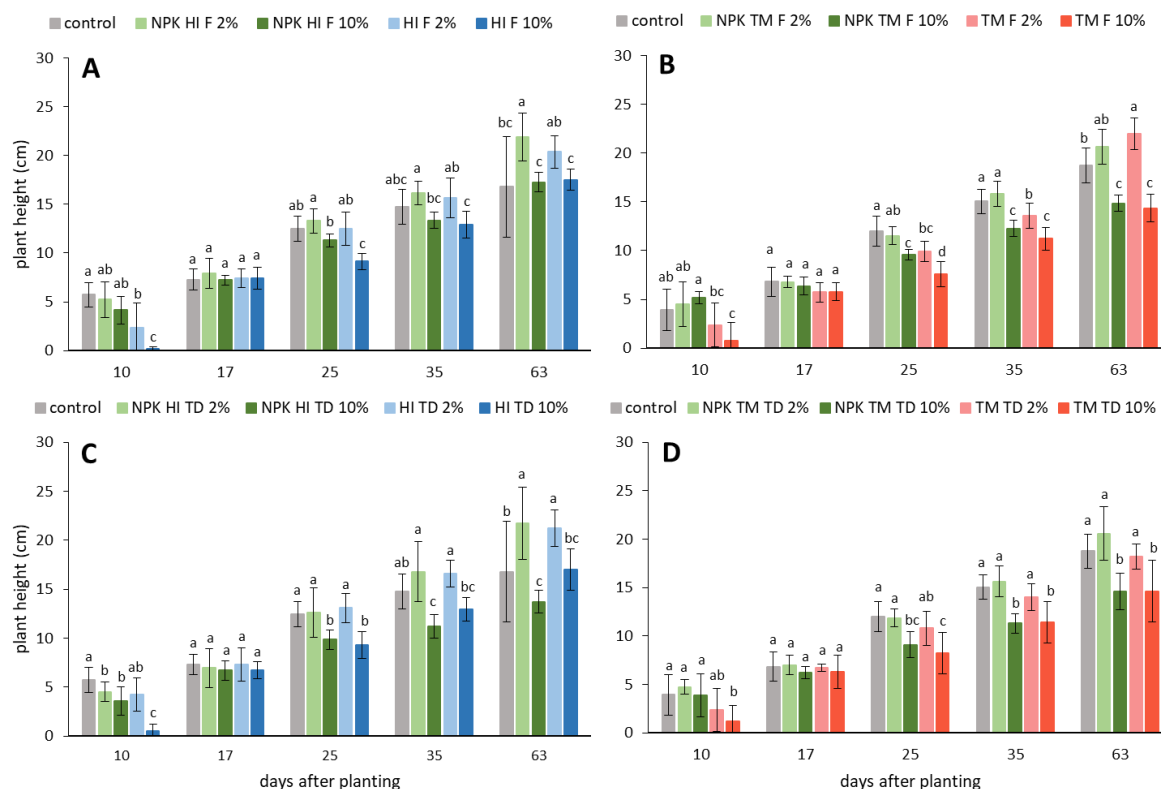
Bij 2% toediening van NPK of frass waren de bonenplanten voor de behandelingen met HI-frass even groot of significant groter (HI TD 2% d63) dan de controleplanten. Bij toevoegen van vers TM-frass waren de bonenplanten op dag 25 en 35 significant kleiner dan de controleplanten terwijl ze na 63 dagen significant groter waren. Voor thermisch gedroogd TM-frass waren er geen significante hoogteverschillen tussen de frass-planten en de controle- of NPK-planten.

Een project van:



Met steun van:



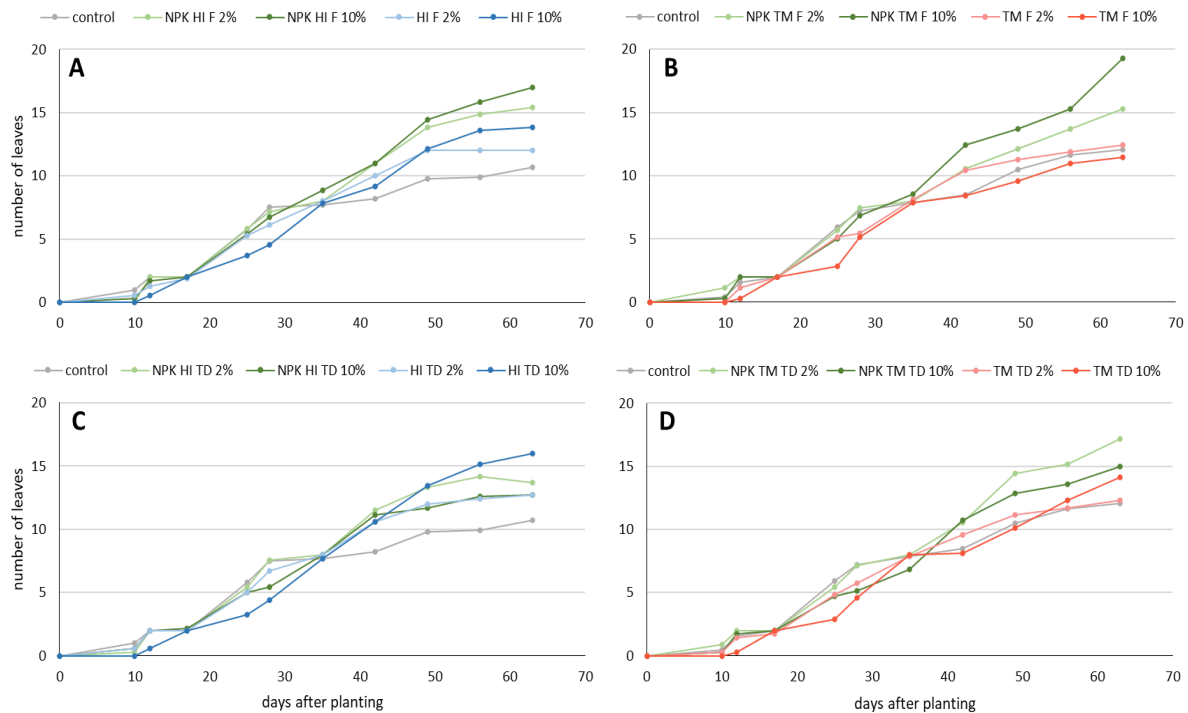


Figuur 30. Planthoogte (cm) op dag 10, 17, 25, 35 en 63 na zaaien van de *P. vulgaris* bonen. Figuren A en B (boven) geven de resultaten voor vers (F) HI- en TM-frass respectievelijk; Figuren C en D (onder) tonen de resultaten voor thermisch gedroogd (TD) HI- en TM-frass respectievelijk. Controle-planten (grijs); NPK-planten (groen); HI-planten (blauw) en TM-planten (rood); lichte kleur 2% toediening, donkere kleur 10% toediening. a-d: behandelingen met dezelfde letter, per tijdstip, per frass-type (HI of TM) en per voorbehandeling (F of TD), zijn statistisch niet significant verschillend ($p \geq 0.05$).

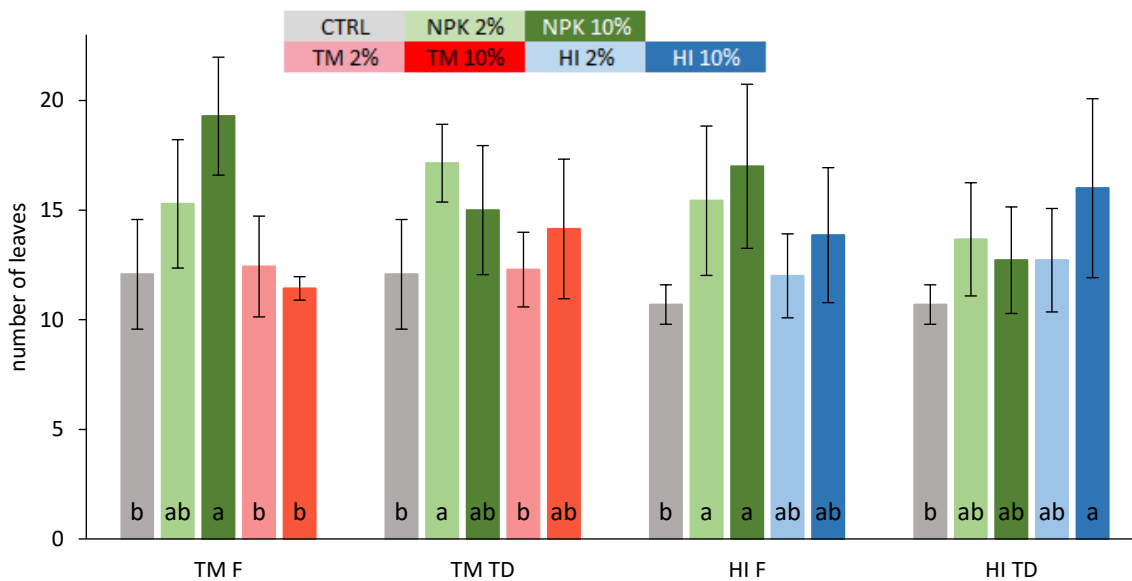
VII.3.1.2.2 Aantal blaadjes

Het aantal blaadjes van de bonenplanten werd minstens elke week geteld, het blad van de bonenplant is samengesteld uit drie blaadjes, al de individuele blaadjes werden meegeteld. In Figuur 31 wordt de evolutie van het aantal blaadjes gedurende de groeiperiode weergegeven. De zaailingen hadden op het ogenblik van selectie (dag 17) 2 bladeren, in de volgende weken verschenen er meer bladeren, telkens bestaande uit 3 deelblaadjes. De toename van het aantal blaadjes was het hoogst tijdens de periode van vegetatieve groei, daarna (ongeveer vanaf dag 42-49) was de toename beperkt.

Figuur 32 geeft het gemiddeld aantal blaadjes op dag 63 na zaaien weer. De TM-frass controle-planten hadden gemiddeld 12.1 ± 2.5 blaadjes, de HI-frass controle-planten 10.7 ± 0.9 . De frass- en NPK-planten vertoonden nergens een significant lager aantal blaadjes dan de controle-planten, terwijl de frass-planten nergens een significant hoger aantal blaadjes hadden dan de NPK-planten. Er was geen eenduidig verband tussen het aantal blaadjes van de bonenplanten en de toegepaste behandelingen.



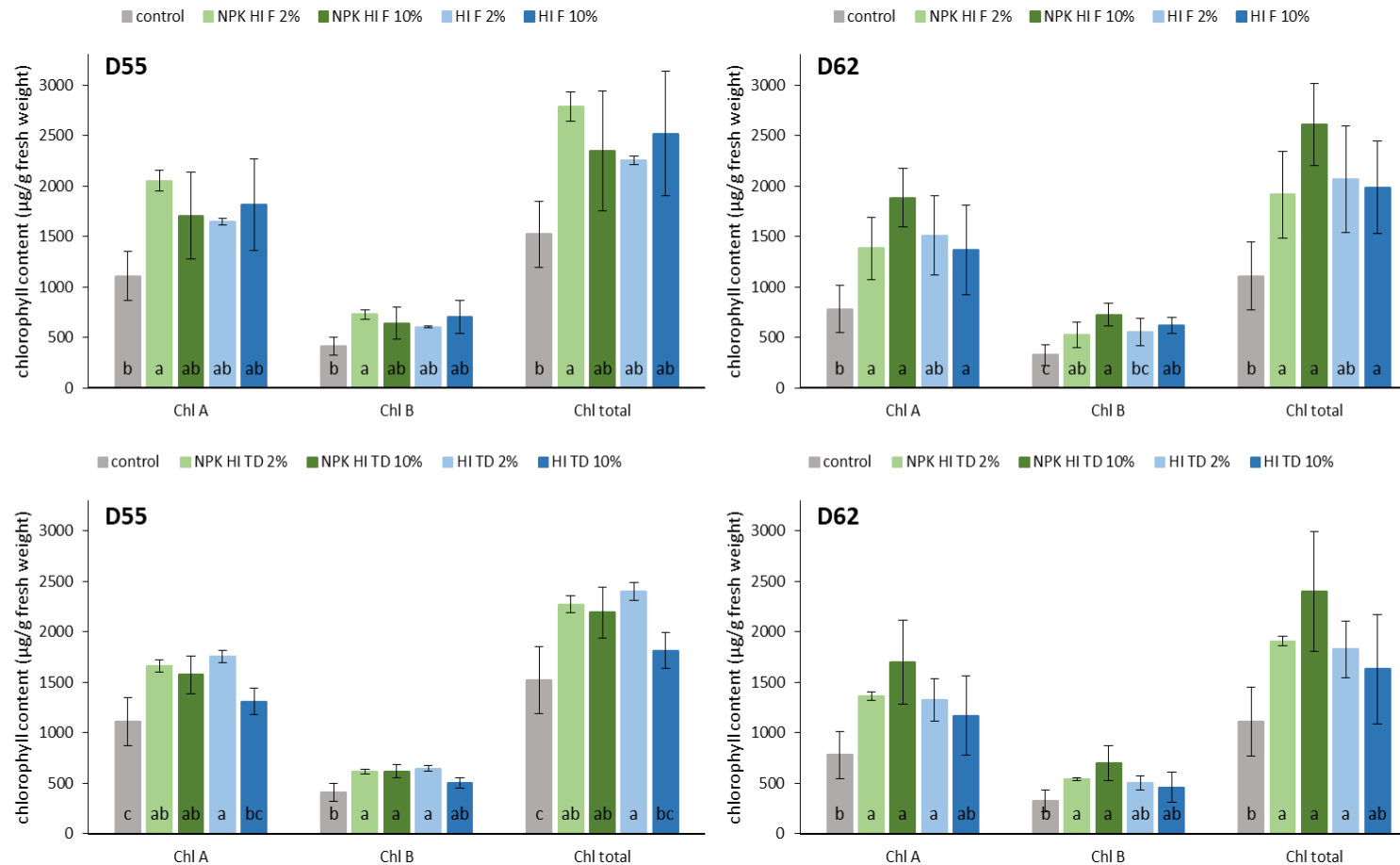
Figuur 31. Gemiddeld aantal blaadjes 2 tot 9 weken na zaaien van de *P. vulgaris* bonen. Figuren A en B (boven) geven de resultaten voor vers (F) HI-frass (links) en TM-frass (rechts); Figuren C en D (onder) tonen de resultaten voor thermisch gedroogd (TD) HI-frass en TM-frass. Controle-planten (grijs); NPK-planten (groen); HI-planten (blauw) en TM-planten (rood); lichte kleur 2% toediening, donkere kleur 10% toediening.



Figuur 32. Gemiddeld aantal blaadjes van de bonenplanten bij oogst (dag 63 na zaaien van *P. vulgaris* bonen) voor controles, NPK's en 2% en 10% vers en thermisch gedroogd HI-frass en TM-frass behandelingen. a-b: behandelingen met dezelfde letter, per frass-type (HI of TM) en per voorbehandeling (F of TD), zijn statistisch niet significant verschillend ($p \geq 0.05$).

VII.3.1.2.3 Pigmentinhoud bladeren

Figuur 33 illustreert de chlorofylinhoud (Chl a, Chl b en Chl totaal) van de bladeren voor vers en gedroogd ZSVL-frass op dag 55 en 62 na zaaien.



Figuur 33. Gemiddeld chlorofylgehalte (a, b en totaal), 55 (links) en 62 (rechts) dagen na zaaien voor plantproeven met vers (boven) en thermisch gedroogd HI-frass (onder), 2% en 10% toediening en bijhorende controle- en NPK-behandelingen. a-c: behandelingen met dezelfde letter, per dag en per voorbehandeling (F of TD), zijn statistisch niet significant verschillend ($p \geq 0.05$).

Een project van:

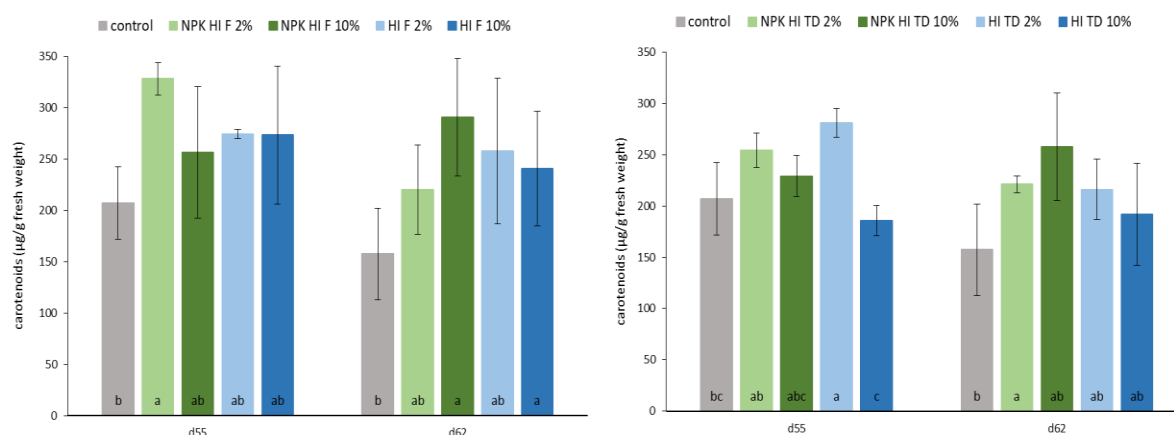


Met steun van:



Bij toediening van vers HI-frass was, 55 dagen na zaaien, het chlorofylgehalte (a, b en totaal) in de bladeren van de controle-planten significant lager dan in de bladeren van de 2% NPK-planten, het verschil bedroeg ongeveer 50%. De pigmentinhoud was voor de overige behandelingen onderling niet significant verschillend, noch significant verschillend van controle en 2% NPK. Eén week later (dag 62) waren de concentraties chlorofyl a en totaal chlorofyl van de controle-planten significant lager dan de gehalten van zowel de 2% en 10% NPK- als de 10% HI F-planten terwijl voor chlorofyl b dezelfde verhoudingen als op dag 55 werden vastgesteld. Het lagere chlorofylgehalte in de bladeren van de controle-planten werd ook visueel vastgesteld, de bladeren kregen een lichtere groene kleur in de loop van het groei experiment. Bij toediening van vers TM-frass werden nagenoeg geen significante verschillen in chlorofylgehalte van de bladeren waargenomen.

Bij toediening van HI-frass werden ook significante verschillen gevonden in carotenoïdegehalte op dag 55 en 62 na zaaien, zoals wordt weergegeven in Figuur 34. 55 dagen na zaaien was bij behandeling met vers HI-frass het gehalte carotenoïden significant hoger voor 2% NPK-planten dan voor de controle-planten maar vergelijkbaar met het gehalte voor de andere behandelingen. Bij de behandeling met thermisch gedroogd HI-frass hadden de 2% frass-planten het significant hoogste carotenoïdegehalte en was het gehalte voor de 2% NPK-planten vergelijkbaar met de waarde voor de controle-planten. Op dag 62 waren, bij de behandeling met vers HI-frass, de gehalten carotenoïden in de bladeren van zowel de 10% NPK-planten als de 10% HI F-planten significant hoger dan in de controle-planten. Bij behandeling met thermisch gedroogd HI-frass werd eenzelfde patroon waargenomen, echter was hier het gehalte significant hoger voor de 2% NPK-planten in vergelijking met de controle-planten. Bij toediening van vers TM-frass werden er geen significante verschillen gevonden in gehalte carotenoïden op 55 en 62 dagen na zaaien.



Figuur 34. Gemiddeld gehalte carotenoïden, 55 en 62 dagen na zaaien voor plantproeven met vers (links) en thermisch gedroogd (rechts) HI-frass, 2% en 10% toediening. a-b: behandelingen met dezelfde letter, per dag en per voorbehandeling (F of TD), zijn statistisch niet significant verschillend ($p \geq 0.05$).

VII.3.1.2.4 Relatief watergehalte bladeren

In de laatste week van de plantengroeioproef werd het relatief watergehalte (RWC) van de bladeren bepaald voor 3 herhalingen per behandeling, de gemiddelde RWC-waarden met bijhorende standaardafwijking worden weergegeven in Tabel 34.

De bladeren van de 10% NPK-planten hadden het laagste relatief watergehalte (80-84%), significant lager dan de RWC-waarde van 94-95% voor de controle-planten. Ook voor de 10% frass-planten was het relatief watergehalte significant lager in vergelijking met de controle-planten, behalve voor 10%

TMF. Voor de 2% toediening van NPK-oplossingen of frass was het relatief watergehalte in de bladeren van de bonenplanten (90-94%) vergelijkbaar met de waarde voor de controle-planten.

Tabel 34. Relatief watergehalte bladeren 63 dagen na zaaien voor controle-planten, NPK-planten en planten die vers en thermisch gedroogd HI-frass of TM-frass toegediend kregen, gehalten 2 en 10%.

Behandeling	Relatief watergehalte bladeren (%)			
	HI F	HI TD	TM F	TM TD
controle	95.1 ± 1.0 ^a	95.1 ± 1.0 ^a	94.1 ± 0.6 ^a	94.1 ± 0.6 ^a
NPK 2%	89.2 ± 1.0 ^{ab}	89.5 ± 3.5 ^{ab}	92.3 ± 0.6 ^a	91.4 ± 0.7 ^{ab}
NPK 10%	80.1 ± 2.1 ^c	80.9 ± 1.6 ^c	79.6 ± 2.0 ^b	84.0 ± 1.8 ^c
Frass 2%	92.4 ± 1.7 ^{ab}	90.0 ± 1.3 ^{ab}	92.6 ± 2.2 ^a	93.5 ± 0.7 ^{ab}
Frass 10%	86.5 ± 3.4 ^b	86.1 ± 2.8 ^{bc}	88.5 ± 2.5 ^a	90.0 ± 1.8 ^b

gemiddelde en standaardafwijkingen van 3 herhalingen

a-c: resultaten per kolom met dezelfde letter in superscript zijn niet significant verschillend ($p \geq 0.05$)

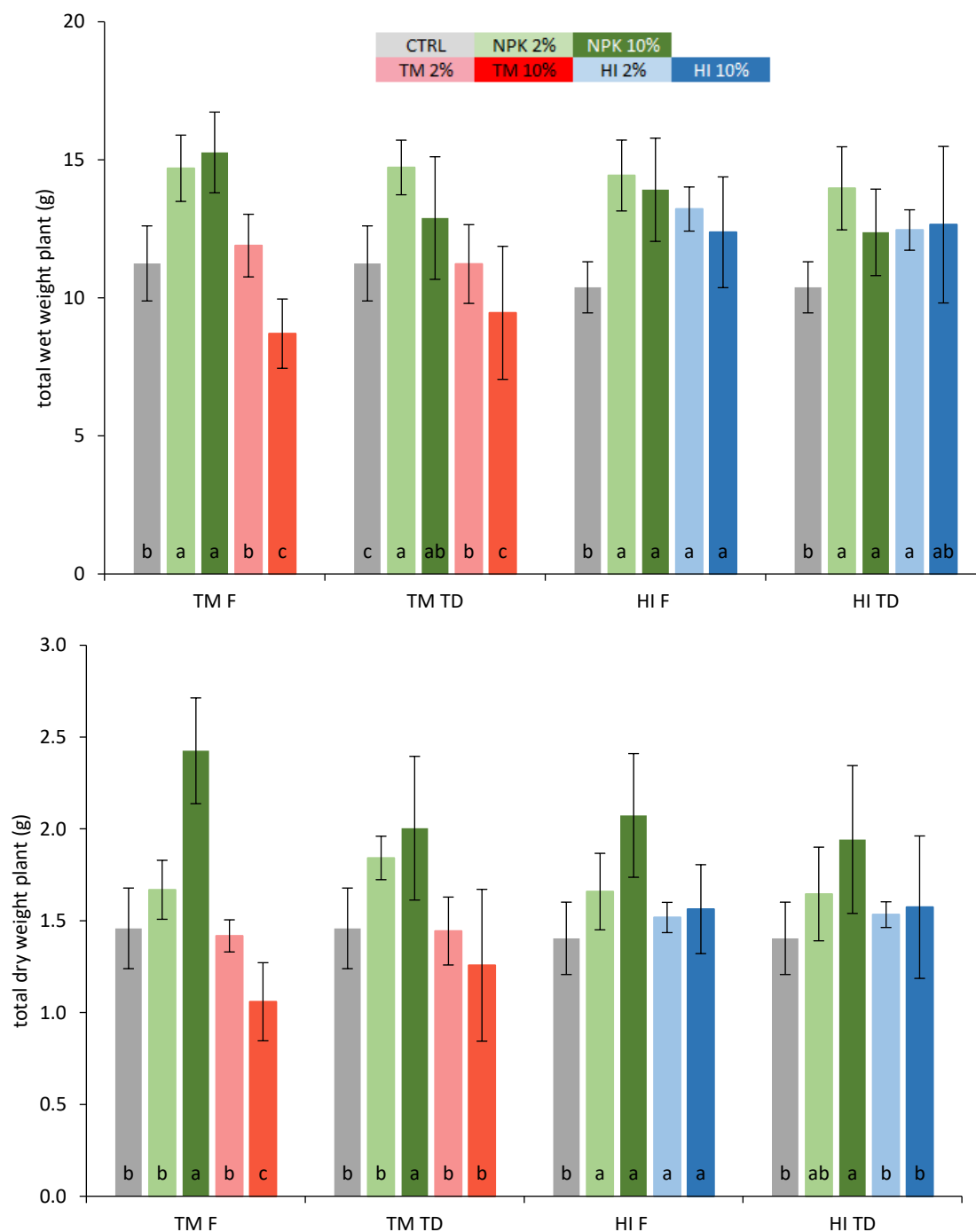
VII.3.1.2.5 Vers- en drooggewicht plant

Figuur 35 toont de resultaten voor de bepaling van het vers- en drooggewicht van de plant (bovengrondse delen van de plant waarvan de peulen werden verwijderd) op de oogstdag. Het versgewicht van de controle-planten bedroeg gemiddeld 10.8 g, voor de NPK-planten was dit gemiddeld 14.4 g en 13.7 g en voor de frass-planten 10.3 g en 11.4 g, voor respectievelijk de TM- en HI-behandelingen.

Bij toediening van vers TM-frass was het versgewicht voor de planten die 10% kregen significant lager in vergelijking met de andere behandelingen. Bij 2% toediening was het versgewicht van de frass-planten vergelijkbaar met dat van de controle-planten maar significant lager dan het versgewicht van de 2% en 10% NPK-planten. Bij toediening van thermisch gedroogd TM-frass was het versgewicht voor de 10% frass-planten vergelijkbaar met de controle-planten en voor de 2% frass-planten zelfs significant hoger.

Bij toediening van vers HI-frass was er geen onderling verschil tussen de frass- en NPK- behandelingen, het versgewicht voor deze planten was wel statistisch hoger dan voor de controle-planten. Voor het thermisch gedroogde HI-frass werd dit niet meer vastgesteld bij de 10% frass-planten, het versgewicht was vergelijkbaar met dat van de controle-planten.

Het droge stofgehalte van de bonenplanten varieerde van 11.3 tot 15.9%. Gemiddeld 13.3% voor de controle-planten, 13.6% voor de NPK-planten en 12.7% voor de frass-planten. Het gemiddeld drooggewicht van de bonenplanten vertoonde nagenoeg hetzelfde patroon als het gemiddeld versgewicht. De 10% NPK-planten hadden het hoogste drooggewicht, significant hoger dan het drooggewicht voor de controles en alle andere behandelingen bij vers en thermisch gedroogd frass.



Figuur 35. Gemiddeld versgewicht (boven) en drooggewicht (onder) bij de oogst, 9 weken na het zaaien, voor het bovengrondse deel van de bonenplanten zonder de peulen. Data zijn het gemiddelde en de standaardafwijking voor 7 herhalingen; a-c: behandelingen, per frass-soort (TM of HI) en per voorbehandeling (F of TD), met dezelfde letter zijn statistisch niet significant verschillend ($p \geq 0.05$).

In Tabel 35 wordt een overzicht gegeven van de tijdstippen waarop de eerste witte open bloem verscheen voor de verschillende behandelingen. Voor de controle-planten, 2% NPK-planten en 2% frass-planten verscheen de eerste witte bloem tussen 40 en 42 dagen na het zaaien van de *P. vulgaris* bonen. Het toevoegen van 10% frass, ongeacht soort (HI, TM) of voorbehandeling (F, TD) leidde tot een vertraging van de bloemvorming.

Tabel 35. Gemiddelde tijd tot het verschijnen van de eerste bloem voor controle-, NPK- en frass-planten (vers en thermisch gedroogd TM-frass of HI-frass, 2 en 10% toediening).

Behandeling	Tijd tot eerste bloem (dagen na zaaien)			
	TM F	TM TD	HI F	HI TD
Controle	41 ± 1.04 ^a	41 ± 1.04 ^a	40 ± 0.53 ^a	40 ± 0.53 ^a
NPK 2%	40 ± 0.00 ^a	40 ± 0.00 ^a	41 ± 0.98 ^{ab}	40 ± 0.76 ^a
NPK 10%	42 ± 2.14 ^a	44 ± 2.93 ^a	42 ± 1.81 ^{ab}	41 ± 1.89 ^a
Frass 2%	42 ± 0.76 ^a	41 ± 2.23 ^a	41 ± 1.91 ^{ab}	40 ± 0.76 ^a
Frass 10%	46 ± 1.13 ^b	47 ± 1.22 ^b	44 ± 2.82 ^b	45 ± 2.36 ^b

gemiddelde en standaardafwijking van 7 herhalingen

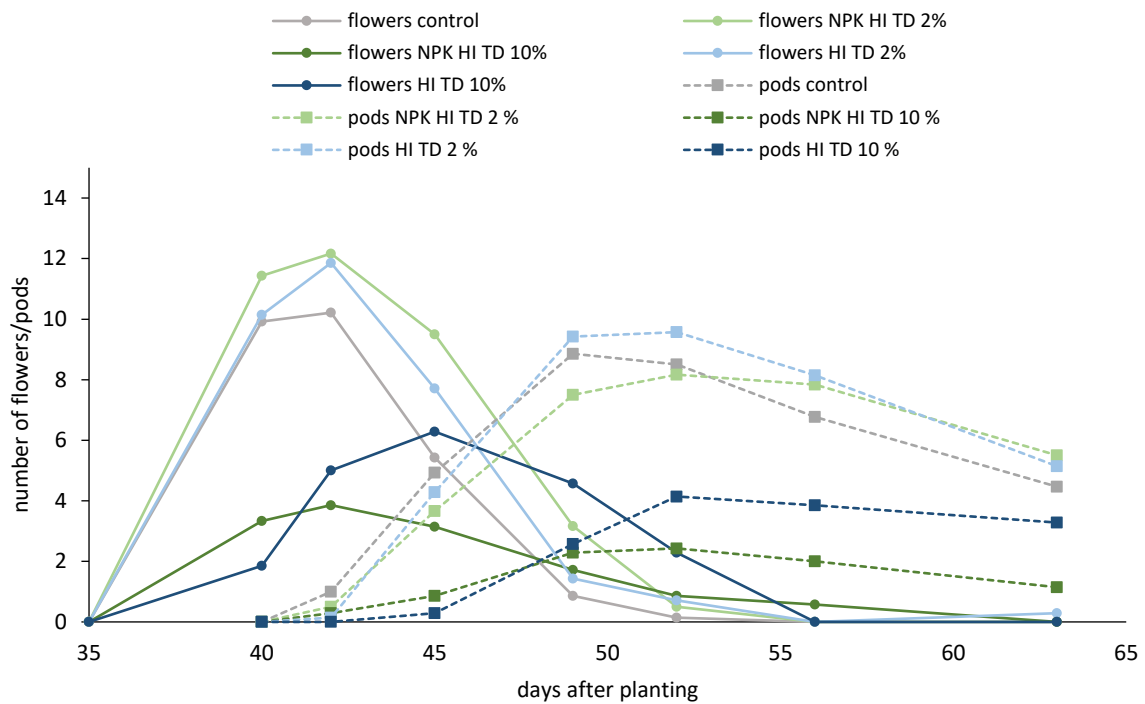
a-b: resultaten per kolom met dezelfde letter in superscript zijn niet significant verschillend ($p \geq 0.05$)

Vanaf het verschijnen van de eerste bloem werd het aantal bloemen en peulen geteld op verschillende momenten tot het oogsten op dag 63. Het gemiddeld aantal bloemen lag voor alle bonenplanten hoger dan het gemiddeld aantal peulen, ongeacht de behandeling. Niet alle bloemen ontwikkelden tot peul, bij het verder opvolgen van de bonenplanten werd ook vastgesteld dat een aantal van de gevormde peultjes verschrompelde en afviel.

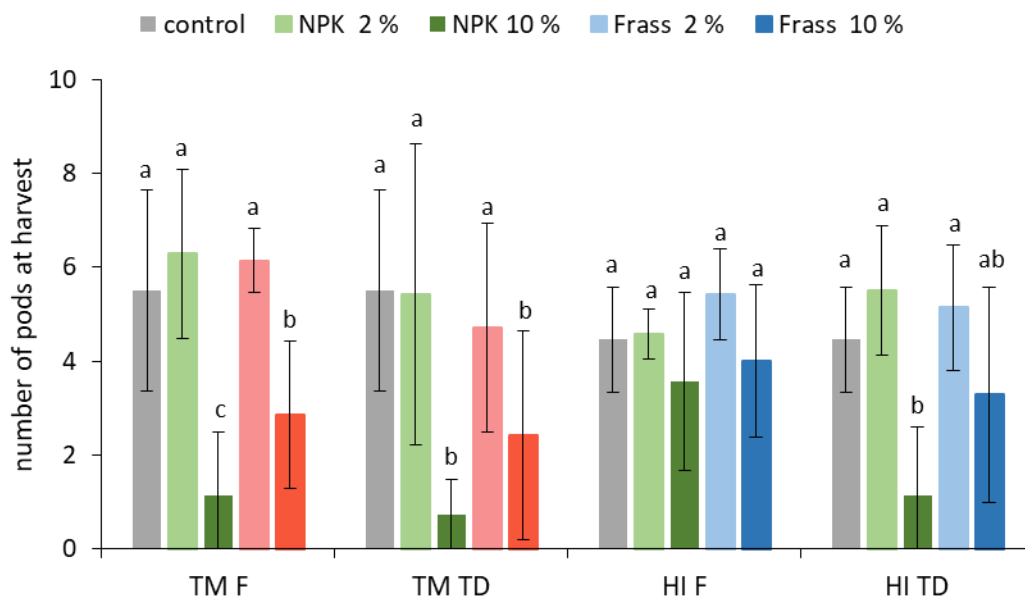
Figuur 36 toont het gemiddeld aantal bloemen (volle lijn) en peulen (stippellijn) in functie van het aantal dagen na zaaien van de bonenzaden voor de plantproef met thermisch gedroogd HI-frass. Voor 2% toevoeging van zowel NPK-oplossingen als frass lagen de gemiddelde aantallen bloemen en peulen in lijn met de aantallen voor de controle-planten. 10% toevoeging van NPK-meststoffen of frass resulteerde in vertraagde vorming van lagere aantallen bloemen en peulen. Voor de behandelingen met vers HI-frass en met vers en thermisch gedroogd TM-frass werd een gelijkaardig verloop vastgesteld.

Figuur 37 illustreert de opbrengst aan peulen op oogstdag 63. Bij de groeiproef met vers en thermisch gedroogd TM-frass was het aantal peulen voor de controle-, 2% NPK- en 2% frass-planten onderling vergelijkbaar en significant hoger dan voor de 10% NPK- en 10% frass-planten. Bij vers TM-frass was het aantal peulen voor de 10% frass-planten significant hoger dan voor de 10% NPK-planten, bij thermisch gedroogd TM-frass was er geen significant verschil in aantal peulen.

Bij de plantengroeiproef met vers HI-frass werden voor de verschillende behandelingen geen onderling significante verschillen in aantal peulen vastgesteld. Bij toediening van thermisch gedroogd HI-frass was de opbrengst aan peulen enkel voor de 10% NPK-planten significant lager in vergelijking met de controle- en 2%-planten. Voor de 10% frass-planten was het aantal peulen vergelijkbaar met dat van alle andere behandelingen.



Figuur 36. Gemiddeld aantal bloemen (volle lijn) en peulen (stippellijn) in functie van het aantal dagen na zaaien van de bonenzaden voor de plantproef met 2% thermisch gedroogd HI-frass.



Figuur 37. Gemiddeld aantal peulen bij oogst op dag 63 na het zaaien van de *P. vulgaris* bonen. Data zijn het gemiddelde en de standaardafwijking voor 7 herhalingen; a-c: behandelingen, per frass-soort (TM of HI) en per voorbehandeling (F of TD), met dezelfde letter zijn statistisch niet significant verschillend ($p \geq 0.05$).

VII.3.1.3.2 Vers- en drooggewicht peulen

Aan het einde van de plantproef werden de peulen geoogst en werd het vers- en drooggewicht bepaald. Zoals blijkt uit Figuur 38 lag niet enkel het aantal peulen maar ook hun vers- en drooggewicht lager voor bonenplanten die opgegroeid werden in behandelingen met 10% frass of NPK. Voor TM-frass lag het vers-en drooggewicht van de peulen significant hoger bij de controles en de 2% behandelingen in vergelijking met de 10% behandelingen. Voor HI-frass was dit ook zo behalve voor HI F 10% waar het versgewicht van de peulen vergelijkbaar was met dat van de controle, er was hier echter wel een grote standaardafwijking. Bij de 10% behandelingen was de versgewicht opbrengst aan peulen vergelijkbaar voor NPK- en frass-planten bij toediening van TM-frass maar significant lager voor de NPK-planten bij toediening van HI-frass.

Zowel de 2% NPK- als de 2% frass-planten hadden een significant hoger versgewicht van peulen in vergelijking met de controle-planten bij de behandelingen met HI-frass; voor TM-frass was de peulopbrengst vergelijkbaar met deze van de controles.

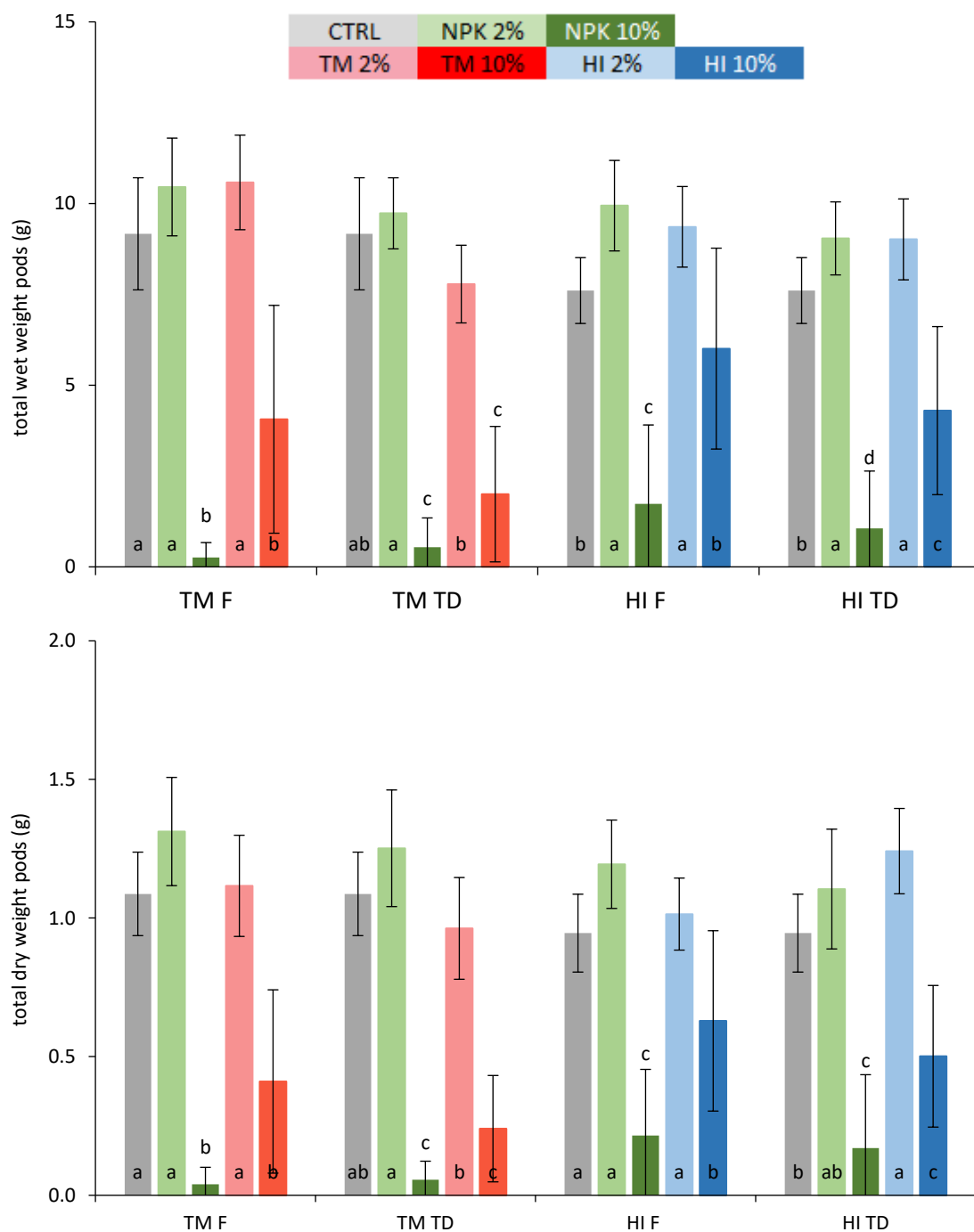
Het gemiddeld drooggewicht van de bonenplanten vertoonde nagenoeg hetzelfde patroon als het gemiddeld versgewicht. Bij de behandeling met vers HI-frass hadden de 2% NPK- en 2% frass-planten niet langer een significant hoger drooggewicht peulen in vergelijking met de controle-planten. Bij behandeling met thermisch gedroogd HI-frass was enkel het drooggewicht voor de peulen van de 2% frass-planten nog significant hoger in vergelijking met de peulen van de controle-planten.

Een project van:



Met steun van:





Figuur 38. Totaal versgewicht (bovenaan) en drooggewicht (onderaan) van de peulen, Resultaten zijn het gemiddelde en de standaardafwijking van 7 herhalingen; a-c: behandelingen per frass-soort (HI en TM) en per voorbehandeling (F en TD) met dezelfde letter zijn statistisch niet significant verschillend ($p \geq 0.05$).

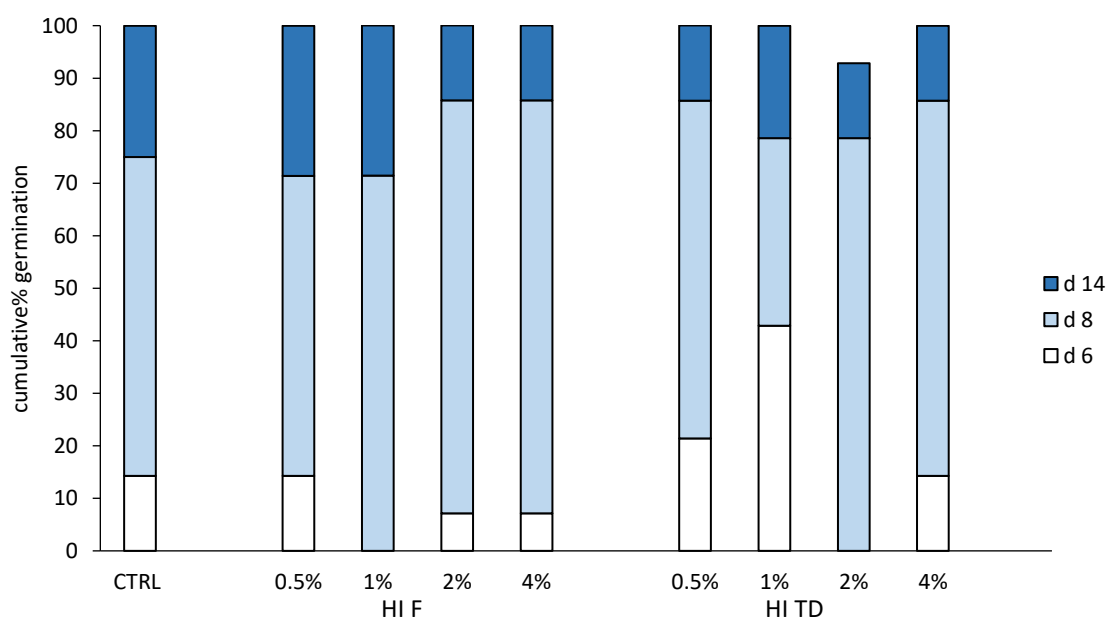
VII.3.2 Plantexperiment 2: vers en thermisch gedroogd ZSVL-frass (0.5 tot 4%) normale groeicondities en vers en thermisch gedroogd ZSVL-frass 2%, droogtestress.

In het tweede plantexperiment werden de groeiparameters bepaald voor volgende behandelingen:

- controle-planten (CTRL) die groeiden in potgrond, onder normale groeicondities en onder droogtestress (50% waterreductie)
- frass-planten die groeiden in potgrond vermengd met vers (F) of thermisch gedroogd (TD) restsubstraat van de kweek van zwarte soldatenvlieglarven (HI) in gewichtspercentages van 0.5, 1, 2 en 4%, onder normale groeicondities
- frass-planten die groeiden in potgrond vermengd met 2% vers (F) of thermisch gedroogd (TD) ZSVL-frass (HI), onder normale groeicondities en onder droogtestress.

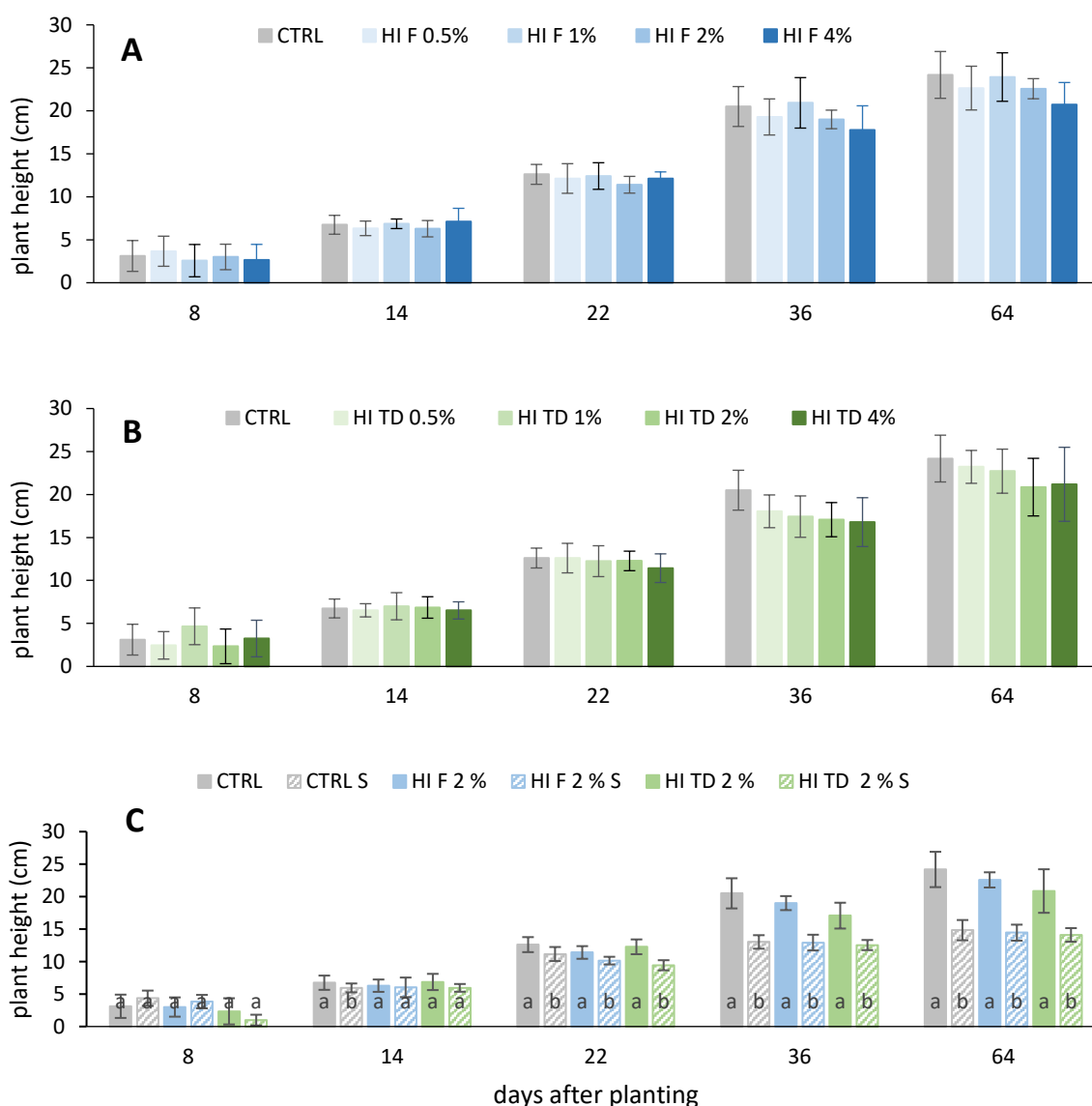
VII.3.2.1 Kieming

De cumulatieve kiemingspercentages van de bonen op dag 6, 8 en 14 na het zaaien, worden voor controle- en frass-planten (vers en thermisch gedroogd HI-frass, toevoegpercentages 0.5 tot 4%) weergegeven in Figuur 39. Vermengen van de potgrond met 0.5 tot 4% frass van de kweek van zwarte soldatenvlieglarven had weinig invloed op de kieming van de bonenzaden, noch op de snelheid van kieming, noch op het cumulatief kiemingspercentage twee weken na het zaaien. Na één week waren er geen bonenzaden gekiemd voor 1% HI F, terwijl 1% HI TD het hoogste cumulatief kiemingspercentage van alle behandelingen vertoonde. Ook voor 2% HI TD was er nog geen kieming op dit tijdstip. Na twee weken bedroeg het cumulatief kiemingspercentage 100% voor alle behandelingen met uitzondering van 2% HI TD met een waarde van 93%.



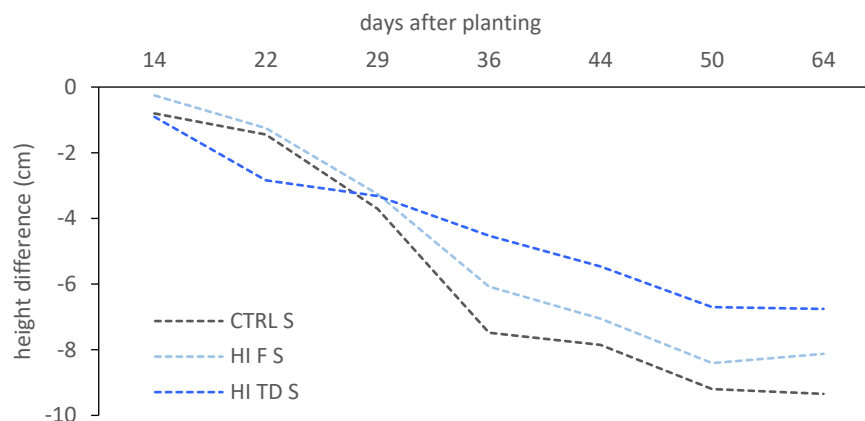
Figuur 39. Cumulatief kiemingspercentage bonenzaden in potgrond (CTRL) en potgrond gemengd (0.5 → 4%) met vers (F) en thermisch gedroogd (TD) frass van de kweek van zwarte soldatenvlieglarven (HI) op dagen 6, 8 en 14 na het zaaien.

De hoogte van de bonenplanten werd minstens elke week opgemeten, in Figuur 40A wordt de gemiddelde planthoogte voor 5 tijdstippen (8, 14, 22, 36 en 64 dagen na zaaien) getoond, voor controle-planten en planten die oplopende toevoegpercentages vers HI-frass kregen toegediend. Figuur 40B illustreert de resultaten voor thermisch gedroogd HI-frass. Figuur 40C toont de planthoogte bij toediening van 2% van beide soorten HI-frass onder normale groeicondities en droogtestress. Zoals geobserveerd in het eerste plantexperiment vertraagde de vegetatieve groei van de bonenplanten vanaf dag 40. Er waren geen significante hoogteverschillen tussen de controle- en frass-planten, ongeacht toedieningspercentage, zowel onder normale groeicondities als onder droogtestress.



Figuur 40. Gemiddelde planthoogte (cm) op dag 8, 14, 22, 36 en 64 na zaaien van de *P. vulgaris* bonen voor controles en oplopende toevoegpercentages van vers (A) en thermisch gedroogd (B) HI-frass, onder normale groeicondities; (C) planthoogte voor controles en 2% vers en thermisch gedroogd HI-frass onder normale en droogtestress condities; a-b: behandelingen per dag, per type (controle, HI F of HI TD) onder normale en stress condities met dezelfde letter zijn statistisch niet significant verschillend ($p \geq 0.05$).

De bonenplanten gekweekt onder droogtestress waren vanaf dag 22 significant kleiner dan de planten die de normale hoeveelheid water kregen toegediend. Voor de controle-planten bedroeg op dag 64 de gemiddelde planthoogte 24 ± 3 cm terwijl dit voor de stress controle-planten slechts 15 ± 2 cm was. Ook de planten die 2% frass toegediend kregen werden minder hoog onder droogtestress. Zoals geïllustreerd in Figuur 41 was het verschil met de planten die de normale hoeveelheid water kregen echter kleiner dan voor de controle-planten. De HI F-planten waren gemiddeld 8 cm kleiner, voor de HI TD-planten bedroeg het verschil 7 cm.



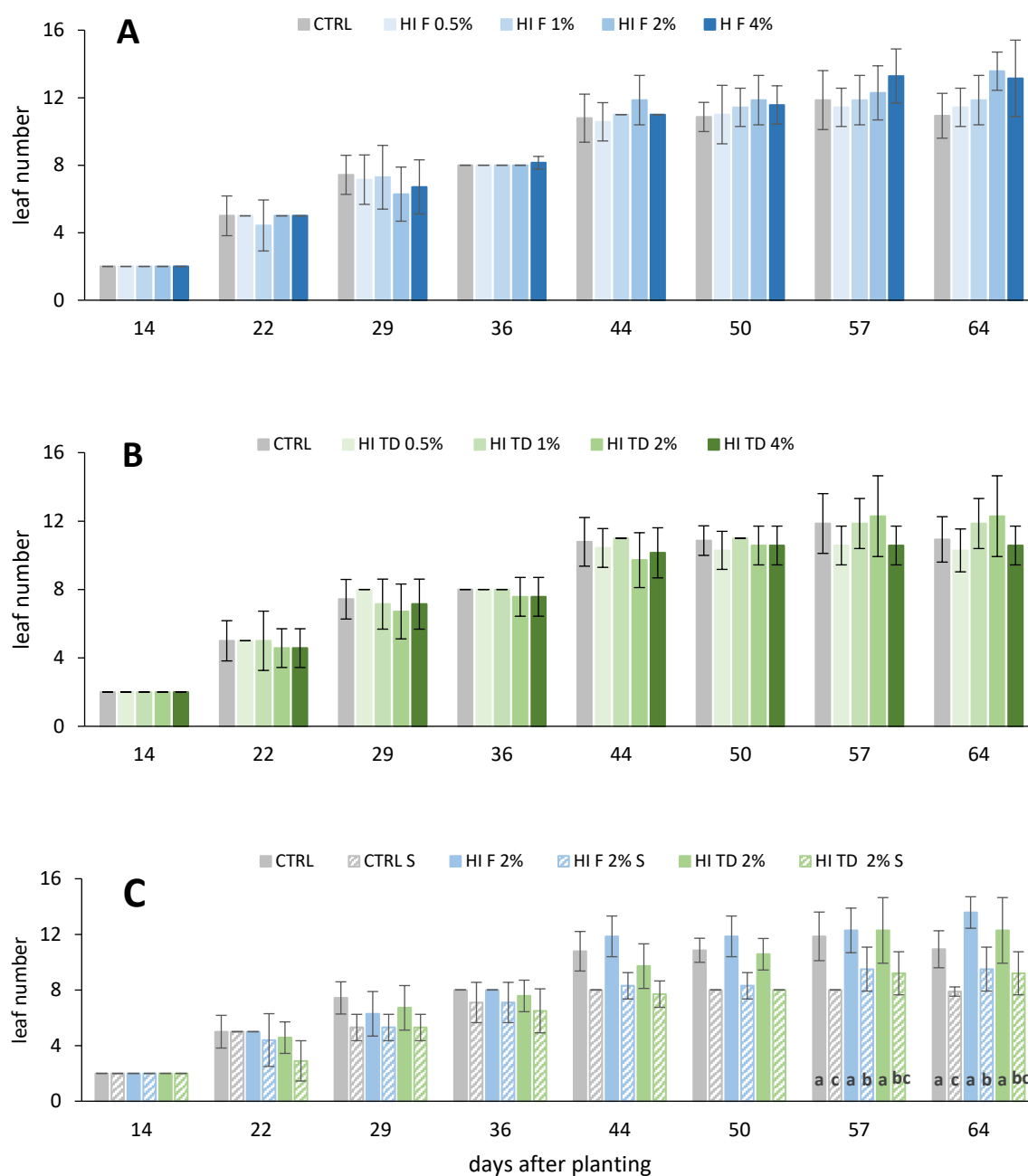
Figuur 41. Hoogteverschil (cm) op dag 8, 14, 22, 36 en 64 na zaaien van de *P. vulgaris* bonen tussen planten opgekweekt onder normale groeiomstandigheden en onder droogtestress (50% waterreductie) voor controle-planten en planten die 2% vers en thermisch gedroogd HI-frass kregen toegediend.

VII.3.2.2.2 Aantal blaadjes

In Figuur 42A worden de resultaten voor het aantal blaadjes getoond voor weken 3 tot 9 na het zaaien, voor controles en oplopende toevoegpercentages vers HI-frass; in Figuur 42B de waarden voor thermisch gedroogd HI-frass. Figuur 42C illustreert het gemiddeld aantal blaadjes bij toediening van 2% van beide soorten HI-frass onder normale groeiomstandigheden en droogtestress.

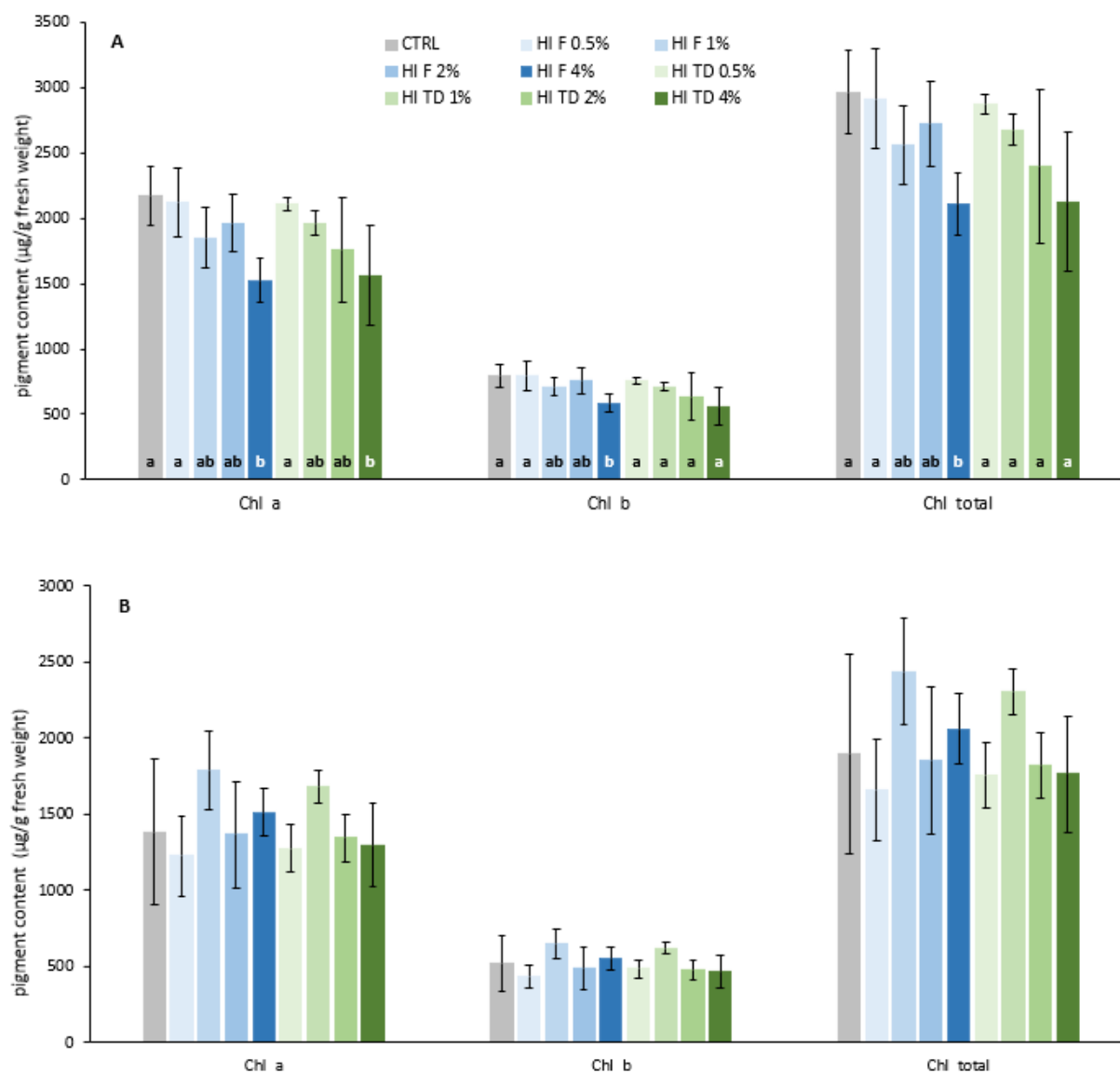
De controle-planten hadden op dag 64 gemiddeld 11.9 ± 1.3 blaadjes, voor vers HI-frass lagen de aantallen tussen 11.4 en 13.6 blaadjes, voor de verschillende toedieningspercentages, met het hoogste aantal voor 2% toediening. Voor thermisch gedroogd HI-frass varieerde het aantal blaadjes tussen 10.6 en 12.3, met ook hier het hoogste aantal voor 2% toediening. Hierbij moet echter wel opgemerkt worden dat er geen statistisch significante verschillen waren tussen de behandelingen op eenzelfde tijdstip.

De planten die groeiden onder droogtestress hadden vanaf dag 22 gemiddeld minder blaadjes in vergelijking met de planten die de normale hoeveelheid water kregen. Op dag 64 was het verschil voor de controle-planten 3 blaadjes, voor de frass-planten respectievelijk 4 en 3 blaadjes voor vers en thermisch gedroogd HI-frass. Ook onder droogtestress waren er geen statistisch significante verschillen tussen de behandelingen op eenzelfde tijdstip, behalve op dagen 57 en 64. Op deze tijdstippen hadden de planten die 2% vers HI-frass toegediend kregen een significant hoger aantal blaadjes in vergelijking met de controle-planten.



Figuur 42. Gemiddeld aantal blaadjes, 2 tot 9 weken na zaaien van de *P. vulgaris* bonen, voor controles en oopende toevoegpercentages van vers (A) en thermisch gedroogd (B) HI-frass, onder normale groeicondities, 7 herhalingen; (C) gemiddeld aantal blaadjes voor controles en 2% vers en thermisch gedroogd HI-frass onder normale en droogtestress condities, 10 herhalingen. a-c: behandelingen op respectievelijk dag 57 en dag 64 met dezelfde letter zijn statistisch niet significant verschillend ($p \geq 0.05$).

Figuur 43 (A, B) toont de meetresultaten voor het gemiddeld chlorofylgehalte van de bladeren van de bonenplanten in weken 4 en 8, voor de behandelingen met 0.5 tot 4% HI-frass onder normale condities en Figuur 44 voor de 2% toevoegingen onder droogtestress.

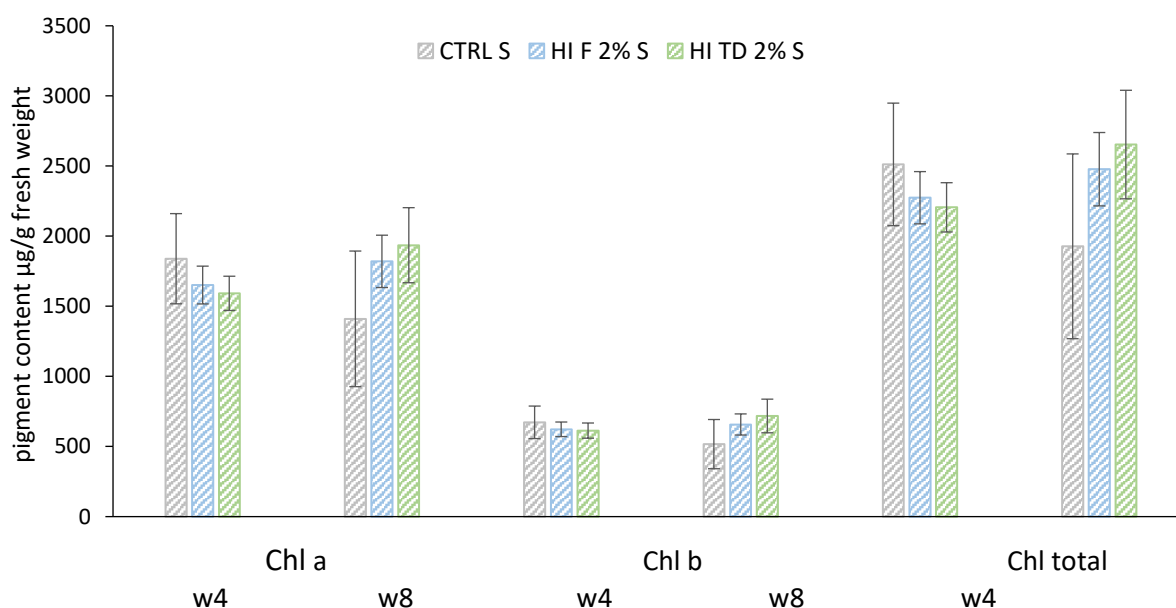


Figuur 43. Chlorofylinhoud bladeren in week 4 (A) en 8 (B) na zaaien; controles (grijs), HI-frass vers (blauw) en thermisch gedroogd (groen); 0.5→4% toediening; normale groeicondities; a-b: behandelingen met dezelfde letter, per week zijn statistisch niet significant verschillend ($p \geq 0.05$); geen letter betekent geen statistisch significante verschillen tussen de behandelingen.

In week 4 onder normale groeicondities hadden de planten die 4% vers of thermisch gedroogd HI-frass toegediend kregen een significant lager gehalte chlorofyl a in vergelijking met de 0.5% frass en de controle-planten. Voor chlorofyl b en totaal chlorofyl werd dit enkel waargenomen bij toedienen van 4% vers HI-frass. In week 8 waren er geen significante verschillen in chlorofylgehalte voor de bladeren van de bonenplanten bij de verschillende behandelingen.

De gemiddelde chlorofylinhoud van de bladeren van de controle planten nam af tussen week 4 en week 8 na het zaaien onder normale groeiomstandigheden ook voor de 0.5% en 2% vers HI-frass planten en de 0.5% en 1% thermisch gedroogd HI-frass planten was de afname statistisch significant.

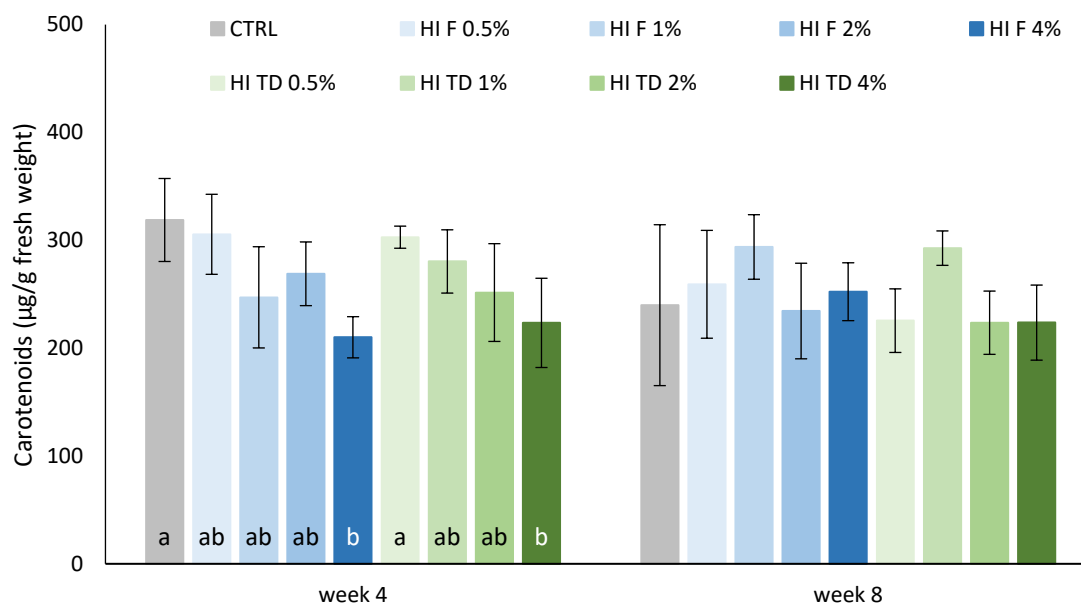
Onder droogtestress werd geen afname in pigmentinhoud waargenomen. Integendeel, voor de bonenplanten die 2% thermisch gedroogd HI-frass kregen toegediend nam de pigmentinhoud (chlorofyl a en totaal chlorofyl) significant toe tussen week 4 en week 8.



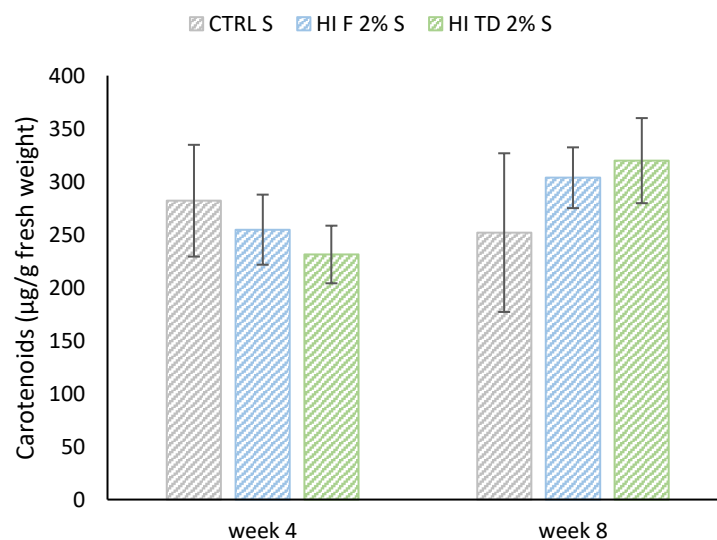
Figuur 44. Chlorofylinhoud bladeren in week 4 en 8 na zaaien; controles (grijs), HI-frass vers (blauw) en thermisch gedroogd (groen) voor 2% toediening onder droogtestress; geen statistisch significante verschillen per tijdstip.

De meetresultaten voor de gemiddelde concentratie aan carotenoïden in de bladeren van de bonenplanten in weken 4 en 8, voor de behandelingen met 0.5 tot 4% vers en thermisch gedroogd HI-frass onder normale groeiomstandigheden worden weergegeven in Figuur 45. De resultaten voor 2% toevoegingen onder droogtestress worden geïllustreerd in Figuur 46.

In week 4 onder normale groeiomstandigheden hadden enkel de planten die 4% vers of thermisch gedroogd HI-frass toegediend kregen een significant lager gehalte carotenoïden in vergelijking met de controleplanten. In week 8 waren er, net als voor chlorofyl, geen significante verschillen tussen de behandelingen. Zoals getoond wordt in Figuur 45 werden er evenmin significante verschillen gevonden in carotenoïdegehalte voor de bladeren van de controle- en 2% HI-planten onder droogtestressomstandigheden.



Figuur 45. Gemiddelde carotenoïdenconcentratie in de bladeren van bonenplanten in week 4 en week 8 na zaaien onder normale groeiomstandigheden. Controle (grijs), HI-frass vers (F, blauw) en thermisch gedroogd (TD, groen), 0.5 → 4%; gemiddelden van 5 herhalingen. a-b: behandelingen met dezelfde letter, per week en per frass voorbehandeling (F of TD), zijn statistisch niet significant verschillend ($p \geq 0.05$), geen letter betekent geen statistisch significante verschillen tussen de behandelingen.



Figuur 46. Gemiddelde carotenoïdenconcentratie in de bladeren van bonenplanten in week 4 en week 8 na zaaien onder droogtestress. Controle (grijs), 2% HI-frass vers (F, blauw) en thermisch gedroogd (TD, groen); gemiddelden van 5 herhalingen; geen statistisch significante verschillen tussen de behandelingen per tijdstip.

Naast de pigmentconcentratie werd ook het relatief watergehalte van de bladeren bepaald, de resultaten voor normale groeiomstandigheden worden weergegeven in Tabel 36. Voor alle behandelingen lag de gemiddelde RWC-waarde tussen 85 en 94%, er waren geen onderlinge significante verschillen.

Tabel 36. Gemiddeld relatief watergehalte voor de bladeren van bonenplanten in weken 4, 6 en 8 na het zaaien, voor controle-planten en planten die vers en thermisch gedroogd HI-frass toegediend kregen, gehalten 0.5 tot 4% onder normale groeiomstandigheden.

Behandeling	Relatief watergehalte bladeren (%)		
	Week 4	Week 6	Week 8
CTRL	87.3 ± 4.0	88.3 ± 3.6	93.6 ± 2.1
HIF 0.5%	88.4 ± 3.0	88.7 ± 0.7	91.1 ± 1.1
HIF 1%	87.6 ± 3.6	87.8 ± 2.9	90.2 ± 0.3
HIF 2%	88.9 ± 0.5	88.7 ± 0.4	90.7 ± 2.5
HIF 4%	84.7 ± 4.8	89.5 ± 1.0	91.2 ± 1.3
HI TD 0.5%	85.1 ± 4.9	87.2 ± 1.9	93.0 ± 2.0
HI TD 1%	87.9 ± 0.4	87.7 ± 1.5	92.6 ± 4.4
HI TD 2%	89.5 ± 1.8	88.9 ± 2.2	88.4 ± 0.9
HI TD 4%	86.4 ± 0.8	87.3 ± 3.1	89.2 ± 1.7

gemiddelden en standaardafwijkingen van 3 herhalingen, normale groeiomstandigheden

gemiddelden en standaardafwijkingen van 5 herhalingen, droogtestress

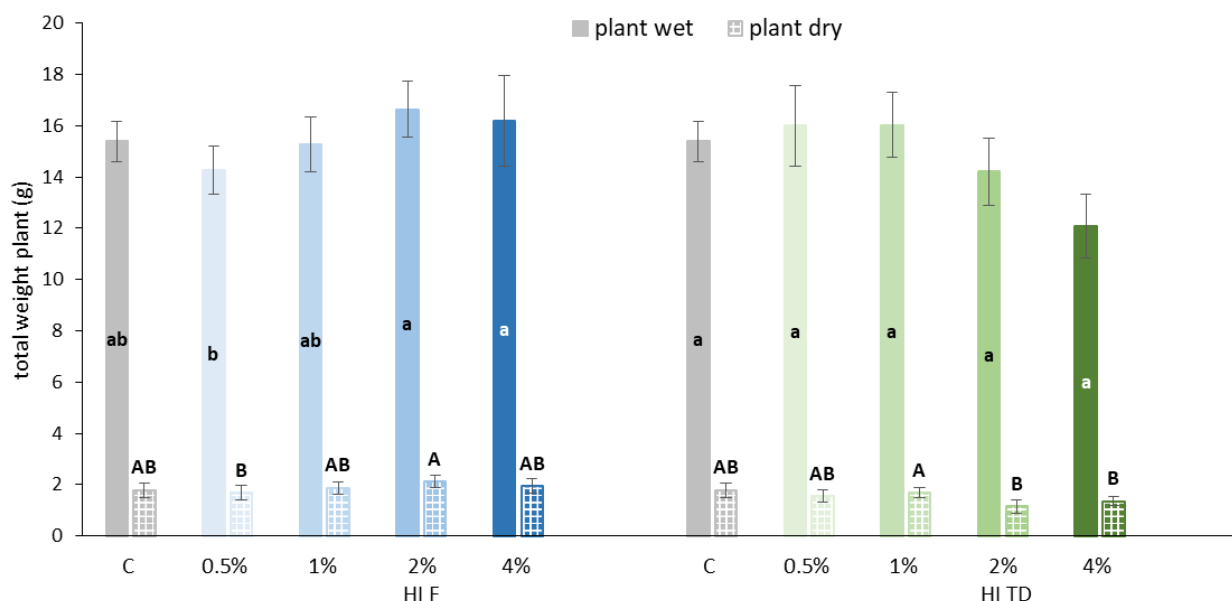
Zoals weergegeven in Tabel 37 waren de gemiddelde RWC-waarden onder droogtestress lager en varieerden van 79 tot 87%, met ook hier onderling geen significante verschillen tussen de controle-planten en de 2% frass-planten. In week 4 hadden alle stress-planten een significant lagere RWC-waarde in vergelijking met planten die de normale hoeveelheid water kregen. In week 6 werd enkel nog voor de 2% HI TD-planten een significant lagere RWC-waarde gemeten en in week 8 enkel voor de controle-planten.

Tabel 37. Gemiddeld relatief watergehalte voor de bladeren van bonenplanten in weken 4, 6 en 8 na het zaaien, voor controle-planten en planten die 2% vers en thermisch gedroogd HI-frass toegediend kregen, onder normale groeiomstandigheden en droogtestress.

Behandeling	Relatief watergehalte bladeren (%)		
	Week 4	Week 6	Week 8
CTRL	87.3 ± 4.0 ^a	88.3 ± 3.6 ^a	93.6 ± 2.1 ^a
CTRL S	79.8 ± 3.3 ^b	85.4 ± 3.2 ^a	87.3 ± 1.9 ^b
HIF 2%	88.9 ± 0.5 ^a	88.7 ± 0.4 ^a	90.7 ± 2.5 ^a
HIF 2% S	81.5 ± 3.4 ^b	82.3 ± 5.8 ^a	86.9 ± 4.1 ^a
HI TD 2%	89.5 ± 1.8 ^a	88.9 ± 2.2 ^a	88.4 ± 0.9 ^a
HI TD 2% S	78.6 ± 0.7 ^b	83.3 ± 0.3 ^b	86.6 ± 0.2 ^a

a-b: resultaten normale en stress omstandigheden, per behandeling en per week, met dezelfde letter in superscript zijn niet significant verschillend ($p \geq 0.05$)

Op de oogstdag werd het vers- en drooggewicht bepaald voor zowel het bovengrondse deel van de bonenplanten als de peulen. Resultaten voor de planten worden weergegeven in Figuur 47. Het versgewicht van de controle-planten bedroeg gemiddeld 15.4 g. Voor de planten die thermisch gedroogd HI-frass toegediend kregen waren er noch onderling, noch in vergelijking met de controle-planten significante verschillen in versgewicht. Voor planten die vers HI-frass kregen was het versgewicht significant hoger voor de 2% en 4% toediening ten opzichte van het laagste toevoegingspercentage van 0.5% maar niet verschillend van de andere toevoegingspercentages en de controles.

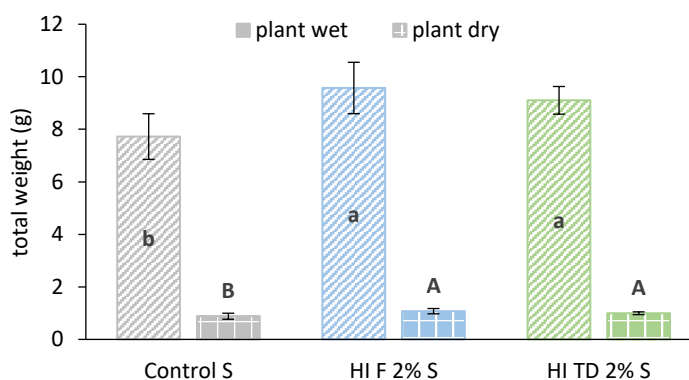


Figuur 47. Gemiddeld versgewicht (volle balk) en drooggewicht (ruitjes) bij de oogst, 9 weken na het zaaien, voor het bovengrondse deel van de bonenplanten zonder de peulen. Data voor controle-planten (14 herhalingen) en planten die vers en thermisch gedroogd HI-frass toegediend kregen, gehalten 0.5 tot 4% (7 herhalingen) onder normale groeicondities. a-b versgewicht en A-B drooggewicht plant voor controles en behandelingen (HI F en HI TD respectievelijk) met dezelfde letter zijn statistisch niet significant verschillend ($p \geq 0.05$).

Voor het drooggewicht van de bonenplanten werden bij toediening van vers HI-frass nagenoeg dezelfde onderlinge verhoudingen vastgesteld al was hier enkel voor de 2% HI F-planten het drooggewicht significant hoger in vergelijking met de 0.5% toevoeging. Voor de behandeling met thermisch gedroogd HI-frass werden er voor het drooggewicht van de planten wel significante verschillen gevonden. Het drooggewicht van de 2% en 4% HI TD-planten was significant lager in vergelijking met 1% HI TD- en controle-planten.

Zoals geïllustreerd in Figuur 48 was, voor de planten die werden opgekweekt onder droogtestress, zowel het vers- als het drooggewicht significant hoger voor de planten die 2% HI-frass (vers of gedroogd) kregen toegediend in vergelijking met de controle-planten. Gemiddeld was het versgewicht van de controle-planten onder droogtestress 7.7 ± 0.9 g en het drooggewicht 0.9 ± 0.1 g.

De 2% HI F-planten hadden met 9.6 ± 1.0 g gemiddeld een 24% hoger versgewicht in vergelijking met de controle-planten, het drooggewicht bedroeg 1.1 ± 0.1 g en was gemiddeld 22% hoger dan het gewicht van de controles. De 2% HI-TD planten hadden met respectievelijk 9.1 ± 0.5 g versgewicht en 1.0 ± 0.1 g drooggewicht vergelijkbare waarden als de 2% HI F-planten, respectievelijk 18 en 13 % hoger in vergelijking met de controle-planten.



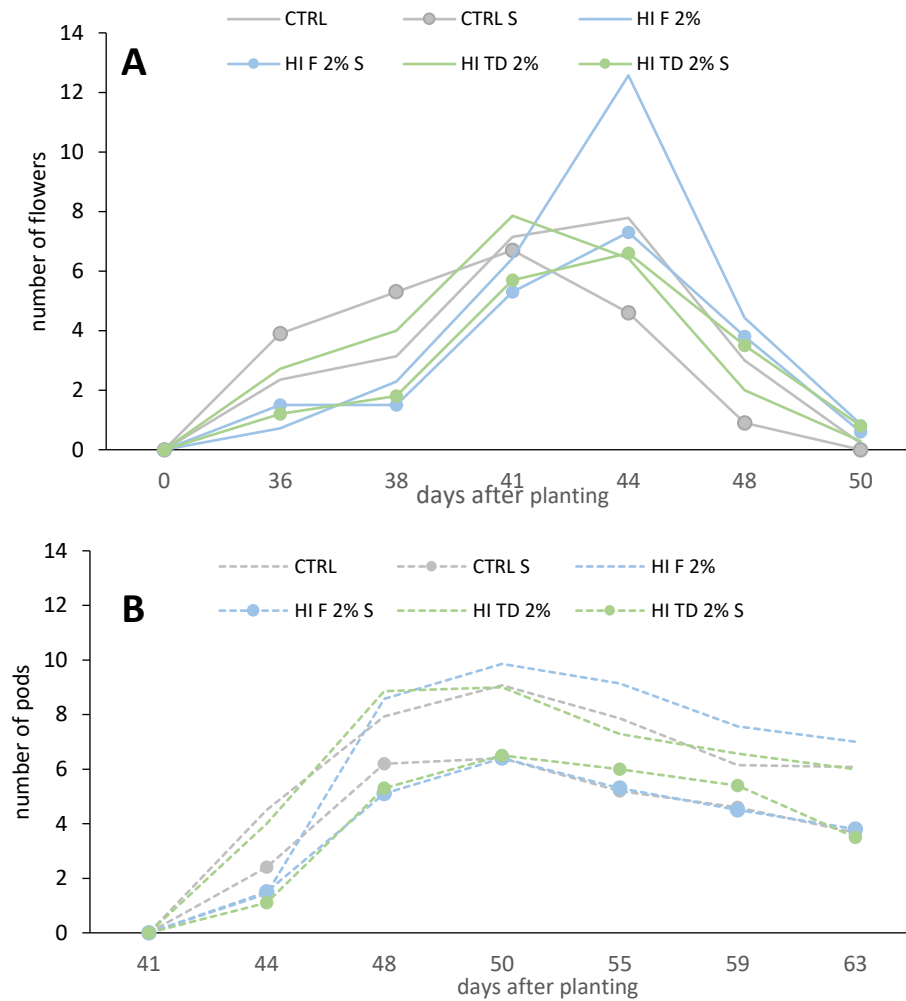
Figuur 48. Gemiddeld versgewicht (arcering) en drooggewicht (ruitjes) bij de oogst, voor het bovengrondse deel van de bonenplanten zonder de peulen. Data voor controle-planten (14 herhalingen) en planten die 2% vers en thermisch gedroogd HI-frass toegediend kregen (7 herhalingen) onder droogtestress. a-b en A-B: controles en behandelingen 2% HI-frass met dezelfde letter zijn statistisch niet significant verschillend ($p \geq 0.05$), voor respectievelijk vers- en drooggewicht.

VII.3.2.3 Generatieve groeiparameters

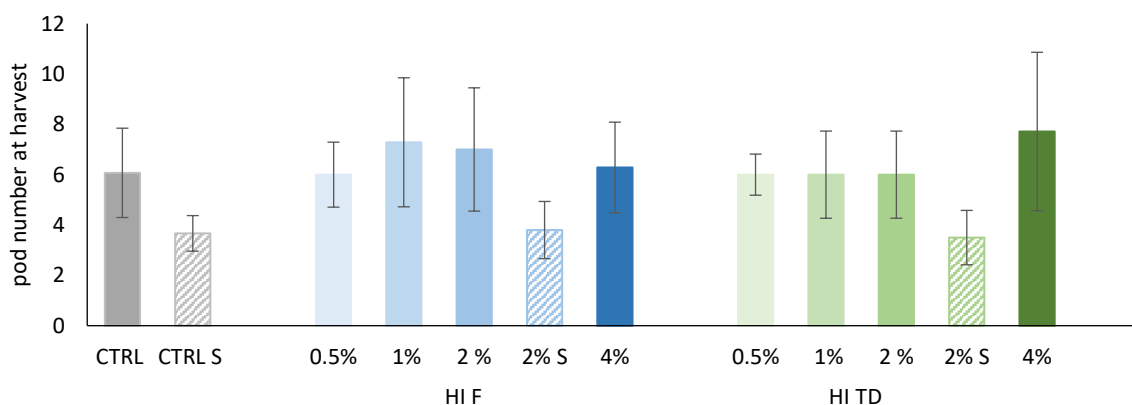
VII.3.2.3.1 Tijd tot eerste bloem, aantal bloemen, aantal peulen

De eerste bloemen verschenen op het einde van de vijfde week na het zaaien van de *P. vulgaris* bonen; het aantal bloemen nam voor alle behandelingen gelijkmatig toe tot dag 44. De eerste peulen verschenen in de zevende week. Figuur 49A toont het verloop van het aantal bloemen en Figuur 49B het verloop van het aantal peulen in de tijd voor 2% vers en thermisch gedroogd HI-frass, onder normale en droogtestress condities. Er waren geen onderlinge verschillen tussen de behandelingen; de planten die groeiden onder droogtestress hadden wel significant minder bloemen en peulen in vergelijking met de planten die de normale hoeveelheid water kregen.

Figuur 50 geeft het aantal peulen bij de oogst op dag 63 weer. Het gemiddeld aantal peulen lag voor alle behandelingen onder normale groeicondities tussen 6.1 en 6.6; de planten onder droogtestress droegen gemiddeld 3.5 tot 3.8 peulen. Er waren geen significante verschillen in aantal peulen tussen de onderlinge behandelingen, zowel voor normale groeicondities als voor droogtestress.



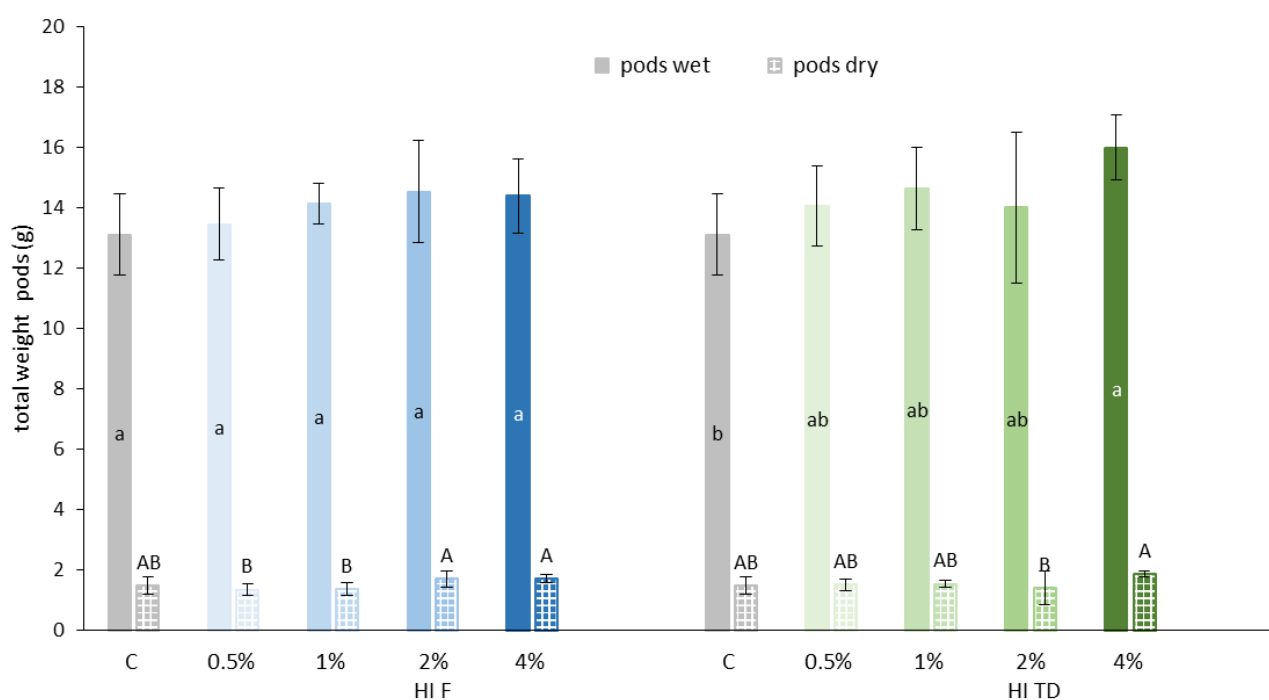
Figuur 49. A, gemiddeld aantal bloemen (volle lijn) en B, peulen (stippellijn) in functie van het aantal dagen na zaaien van de bonenzaden voor controles(grijs) en toediening van vers (F, blauw) en thermisch gedroogd (TD, groen) HI-frass onder normale groeiomstandigheden (lijn) en droogtestress (50% waterreductie (lijn met bolletje)).



Figuur 50. Gemiddeld aantal peulen bij de oogst voor controle(grijs) en planten die vers (blauw) en thermisch gedroogd (groen) HI-frass kregen toegediend; normale groeiomstandigheden (0.5 tot 4%, volle balk) en droogtestress (2% frass, 50% waterreductie, arcering). Geen significante verschillen tussen de behandelingen, bij normale of droogtestress groeiomstandigheden.

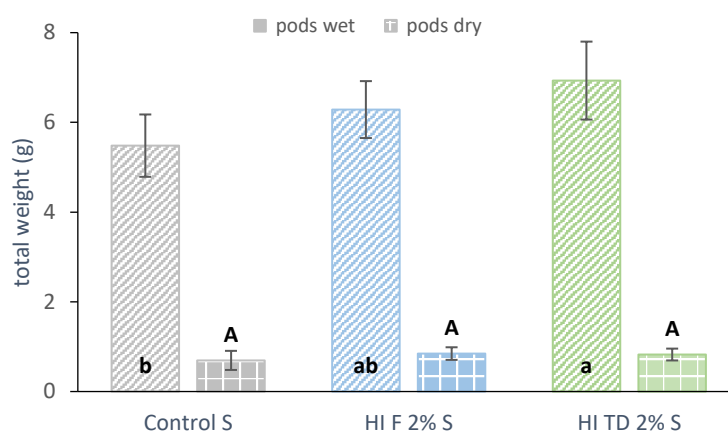
Naast het aantal peulen per bonenplant werd ook hun vers- en drooggewicht bepaald, resultaten worden weergegeven in Figuur 51 voor de planten die vers HI-frass toegediend kregen waren er noch onderling, noch in vergelijking met de controle-planten significante verschillen in versgewicht van de peulen. Bij toediening van 4% thermisch gedroogd HI-frass was het versgewicht van de peulen significant hoger in vergelijking met het versgewicht voor de peulen van de controle-planten, voor de lagere toedieningspercentages waren er geen significante verschillen.

Het drooggewicht van de peulen was bij toediening van vers HI-frass significant hoger voor de 2%- en 4%-planten in vergelijking met de 0.5%- en 1%-planten maar vergelijkbaar met het drooggewicht van de controle-planten. Bij toediening van thermisch gedroogd HI-frass was het drooggewicht van de 4%-peulen significant hoger in vergelijking met de 2%-peulen maar niet significant verschillend van de andere behandelingen.



Figuur 51. Gemiddeld versgewicht (volle balk) en drooggewicht (ruitjes) bij de oogst, 9 weken na het zaaien, voor de peulen van de bonenplanten. Data voor controle-planten (14 herhalingen) en planten die vers en thermisch gedroogd HI-frass toegediend kregen, gehalten 0.5 tot 4% (7 herhalingen) onder normale groeiomstandigheden. a-b versgewicht peulen en A-B drooggewicht peulen, voor controles en behandelingen HI F en voor controles en behandelingen HI T respectievelijk, met dezelfde letter zijn statistisch niet significant verschillend ($p \geq 0.05$).

Zoals geïllustreerd in Figuur 52 was, voor de planten die werden opgekweekt onder droogtestress, het versgewicht van de peulen significant hoger voor de planten die 2% thermisch gedroogd HI-frass toegediend kregen in vergelijking met de controle-planten. De planten die 2% vers HI-frass kregen hadden een vergelijkbaar versgewicht voor de peulen als de planten van beide andere behandelingen. Voor het drooggewicht van de peulen waren er geen significante verschillen.



Figuur 52. Gemiddeld versgewicht (arcering) en drooggewicht (ruitjes) voor de peulen van de bonenplanten onder droogtestress. Data voor controle-planten (14 herhalingen) en planten die 2% vers en thermisch gedroogd HI-frass toegediend kregen (7 herhalingen). a-b en A-B: controles en behandelingen 2% HI-frass met dezelfde letter zijn statistisch niet significant verschillend, ($p \geq 0.05$), respectievelijk voor vers- en drooggewicht.

VII.3.3 Plantexperiment 3: pellets ZSVL-frass en GM-frass (2%) normale groeicondities en droogtestress

In het derde plantexperiment werden de groeiparameters bepaald voor volgende behandelingen:

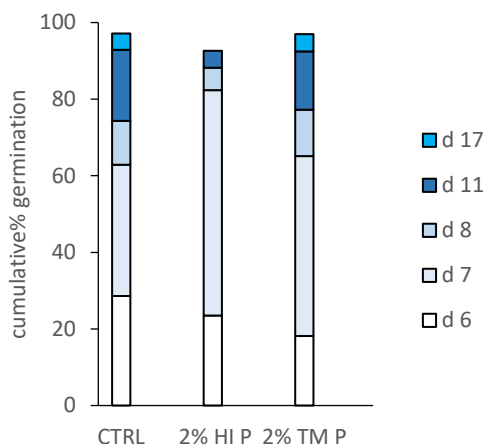
- controle-planten (CTRL) die groeiden in potgrond
- NPK-planten (NPK HI P of NPK TM P, 2%) die groeiden in potgrond en éénmaal per week NPK-oplossing kregen toegediend
- frass-planten die groeiden in potgrond vermengd met gepelletiseerd (P) restsubstraat van de kweek van zwarte soldatenvlieglarven (HI) of gele meelwormen (TM) in een gewichtspercentage van 2%

Al deze behandelingen werden zowel onder normale groeicondities als droogtestress uitgevoerd.

VII.3.3.1 Vegetatieve groeiparameters

VII.3.3.1.1 Kieming

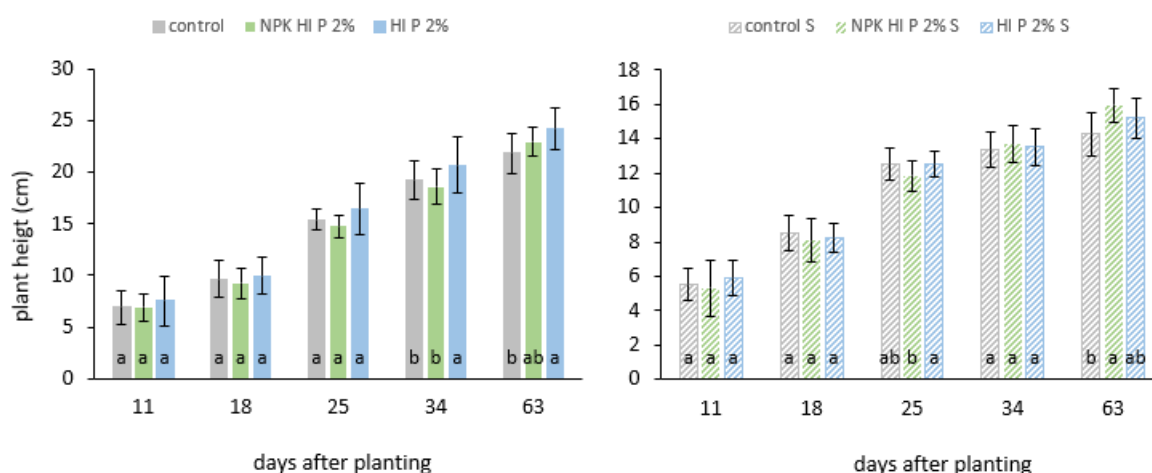
De cumulatieve kiemingspercentages van de bonen op dag 7, 8, 10, 12 en 17 na het zaaien, worden voor controles en 2% pellets HI-frass (links) en TM-frass (rechts), weergegeven in Figuur 53. Vermengen van de potgrond met 2% gepelletiseerd frass had weinig invloed op de kieming van de bonenzaden, noch op de snelheid van kieming, noch op het cumulatief kiemingspercentage twee weken na het zaaien. Het cumulatief kiemingspercentage op dag 17 bedroeg voor HI pellets 93% en was iets lager dan de waarde van 97% voor TM pellets en controles.



Figuur 53. Cumulatief kiemingspercentage bonenzaden in potgrond (CTRL) en 2% HI-frass pellets en TM-frass pellets mix op dag 7 → 17 na het zaaien.

VII.3.3.1.2 Planthoogte

De planthoogte nam geleidelijk toe in de tijd zowel voor de plantproef onder normale condities als onder droogtestress condities. Figuur 54 links illustreert de resultaten voor planthoogte onder normale groeicondities voor respectievelijk controle-, NPK- en HI P-planten bij 2% toevoeging aan de potgrond, rechts worden de resultaten bij droogtestress weergegeven. Bij de start van de vegetatieve groei onder normale condities, op dagen 11 tot 25 na zaaien, waren er geen significante verschillen tussen de behandelingen. Op dag 34 was de planthoogte bij HI P significant hoger dan die bij controles en NPK's. Bij de oogst was voor HI P de planthoogte enkel nog significant hoger dan deze voor de controles. Bij de plantproef met TM pellets nam de planthoogte eveneens geleidelijk toe in de tijd, er waren weinig significante verschillen tussen de behandelingen, de grafieken worden daarom niet getoond.



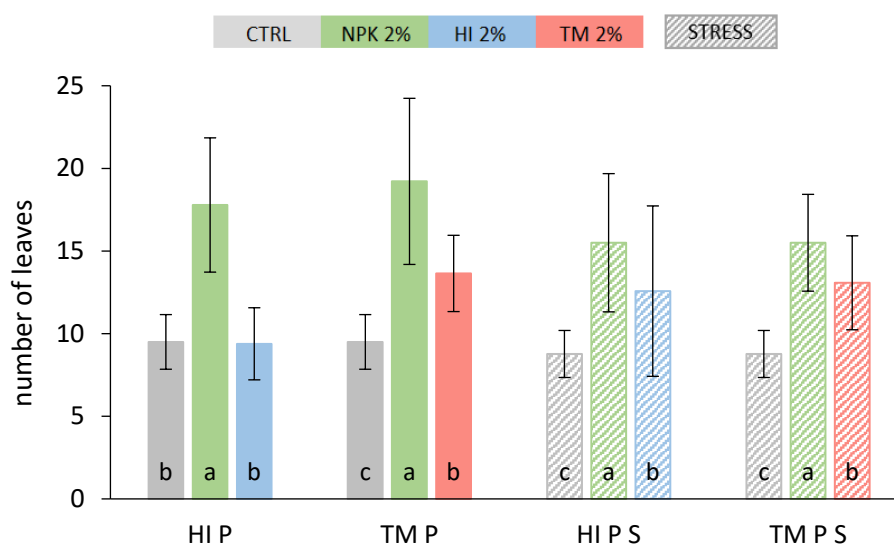
Figuur 54. Gemiddelde planthoogte (cm) op dag 11, 18, 25, 34 en 63 na zaaien van de *P. vulgaris* bonen voor controles, 2% NPK en 2% HI-frass pellets, normale groeicondities (rechts) en droogtestress (links). Gemiddelde en standaardafwijking van 17 herhalingen. a-b: behandelingen per dag met dezelfde letter zijn statistisch niet significant verschillend ($p \geq 0.05$).

Zoals verwacht bleven de bonenplanten onder droogtestress kleiner (gemiddelde hoogte 15 cm) dan de planten die groeiden onder normale condities (gemiddelde hoogte 23 cm). Onder droogtestress werden er enkel significante verschillen gevonden op dag 25 en dag 63. Op dag 25 na zaaien waren de HI P-planten significant hoger dan de NPK-planten. De planthoogte was echter voor zowel frass pellets als NPK-toediening vergelijkbaar met de hoogte van de controle-planten. Bij de oogst was de planthoogte voor de HI P-planten vergelijkbaar met deze voor de NPK- en controle-planten. De NPK-planten waren op dit tijdstip wel significant hoger dan de controle-planten.

VII.3.3.1.3 Aantal blaadjes

Het aantal blaadjes van de bonenplanten werd elke week opgemeten en kende een stijgende trend in de tijd. Figuur 55 geeft het aantal blaadjes weer dat geteld werd op de oogstdag (63 dagen na zaaien van bonen). Voor de experimenten onder normale groeicondities was het aantal blaadjes van 2% NPK-planten significant hoger in vergelijking met de controle- en frass-planten (links op Figuur 55) voor zowel de behandelingen met HI pellets als TM pellets. Het aantal blaadjes van de TM P-planten was significant hoger dan het aantal blaadjes van de controle-planten.

Bij de experimenten onder droogtestress waren de drie behandelingen onderling significant verschillend. De controle-planten hadden het laagste aantal blaadjes, gevolgd door de frass-planten, de NPK-planten hadden het hoogste aantal. De verschillen in aantal blaadjes tussen normale en stress condities waren beperkt.



Figuur 55. Gemiddeld aantal blaadjes, 63 dagen na zaaien van de *P. vulgaris* bonen voor HI-frass pellets en TM-frass pellets onder normale groeicondities (links) en droogtestress (rechts). Gemiddelde en standaardafwijking van 17 herhalingen; a-c: behandelingen per frass-type en per groeiconditie met dezelfde letter zijn niet significant verschillend ($p \geq 0.05$).

VII.3.3.1.4 Pigmentinhoud bladeren

De chlorofyl- en carotenoïdeninhoud van de bladeren werd bepaald op drie tijdstippen tijdens de groei van de bonenplanten, voor minimaal drie herhalingen per behandeling. Omdat niet voor alle behandelingen en/of tijdstippen verschillen in pigmentinhoud van de bladeren werden waargenomen, worden enkel de relevante grafieken getoond.

Figuur 56 (bovenaan) illustreert de chlorofylinhoud (Chl a, Chl b en Chl totaal) van de bladeren voor het groei experiment met gepelletiseerd HI-frass en TM-frass op dag 39 en 56 na zaaien voor normale groeiomstandigheden. Op dag 21 waren er geen significante verschillen in chlorofylgehalte tussen de behandelingen.

Op dag 39 na zaaien was de pigmentinhoud echter wel significant verschillend voor alle behandelingen onderling voor zowel de proef met HI-frass pellets als TM-frass pellets. De bladeren van de controleplanten hadden het significant laagste gehalte chlorofyl (a, b en totaal) en de bladeren van de NPK-planten het significant hoogste chlorofylgehalte. Het chlorofylgehalte van de bladeren van de frassplanten lag tussen de twee in. Op dag 56 waren de chlorofylgehalten over het algemeen lager, dezelfde onderlinge verhoudingen werden waargenomen, de absolute onderlinge verschillen waren wel groter. Deze bevindingen werden ook visueel waargenomen tijdens de visuele opvolging van de plantproef zoals geïllustreerd wordt in Figuur 57. De bladeren van de controleplanten waren op het einde van de plantproef geel, terwijl deze van de frassplanten lichtgroen-geel waren en de bladeren van de NPK-planten nog een intens groene kleur hadden.

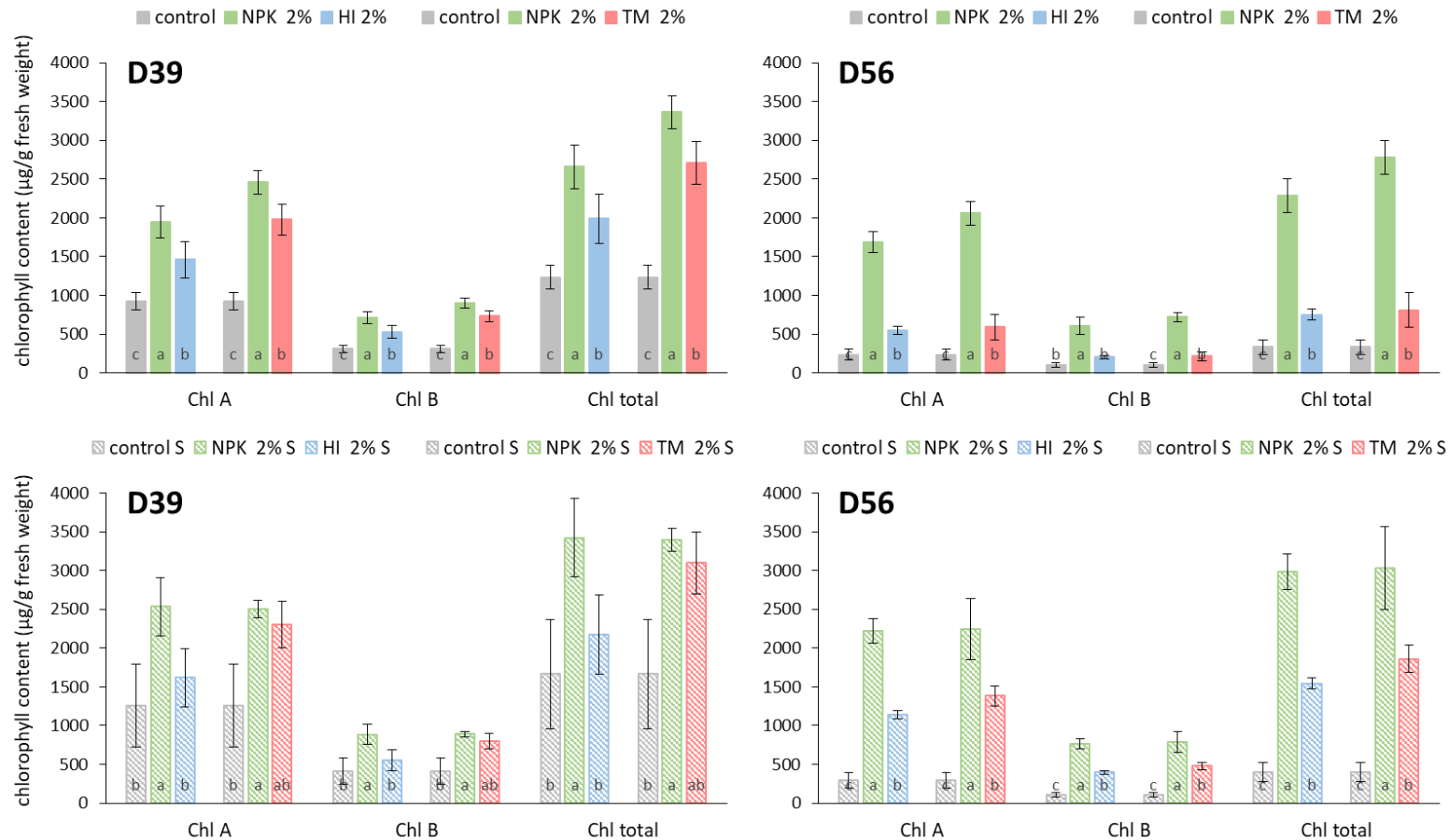
Onderaan Figuur 56 wordt de pigmentinhoud van de bladeren voor de experimenten onder droogtestress weergegeven, de chlorofylgehalten zijn niet lager dan deze onder normale groeiomstandigheden, in sommige gevallen zelfs hoger. Op dag 39 na planten waren de verschillen tussen de behandelingen nog niet zo uitgesproken. Het chlorofylgehalte van de bladeren van de NPK-planten lag significant hoger dan dat van controle- en HI-pellet-planten, die onderling een vergelijkbare pigmentinhoud hadden.

Een project van:



Met steun van:





Figuur 56. Gemiddeld chlorofylgehalte (a, b en totaal), 39 (links) en 56 (rechts) dagen na zaaien voor plantproeven met 2% toediening gepelletiseerd HI- en TM-frass, normale groeicondities (boven) en droogtestress (onder). Gemiddelde en standaardafwijking van 5 herhalingen. a-c: behandelingen met dezelfde letter, per dag en per frass-soort (HI P of TM P) zijn statistisch niet significant verschillend ($p \geq 0.05$).

Een project van:



Met steun van:



ValoReSect

(VLAIO TETRA HBC.2021.0103)

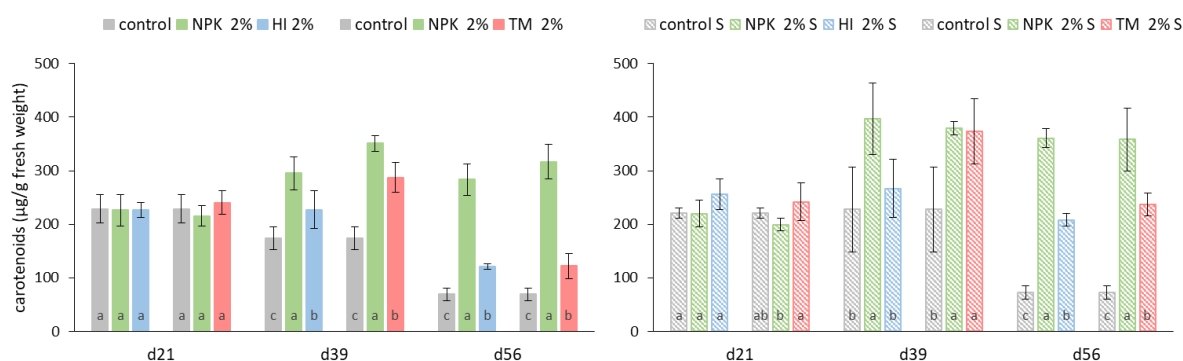
95

Voor het experiment met TM pellets hadden de NPK-planten enkel een significant hoger chlorofylgehalte in vergelijking met de controle-planten, de pigmentinhoud voor de frass-planten was vergelijkbaar met deze van de NPK-planten. Op dag 56 na zaaien werden onder droogtestress dezelfde verhoudingen als onder normale groeicondities waargenomen (controle < frass < NPK). De verschillen in chlorofylgehalten tussen frass- en NPK-planten zijn kleiner onder droogtestress in vergelijking met de verschillen onder normale groeicondities.



Figuur 57. Ponsjes van bladeren van NPK-planten (links), frass-pellet-planten (midden) en controle-planten (rechts), genomen aan het einde van de plantproef (56 na zaaien,) waarop de verschillen in chlorofylinhoud (CTRL < frass < NPK) visueel zichtbaar zijn

De resultaten voor het gehalte aan carotenoïden in de bladeren bij toediening van 2% HI- en TM-frass pellets, onder normale groeicondities en droogtestress, worden weergegeven in Figuur 58 en volgen dezelfde trend als het chlorofylgehalte.



Figuur 58. Gemiddeld gehalte carotenoïden, 21, 39 en 56 dagen na zaaien voor plantproeven met gepelletiseerd frass (HI en TM, 2% toediening), onder normale groeicondities (links) en onder droogtestress (rechts). Gemiddelde en standaardafwijking van 5 herhalingen. a-c: behandelingen met dezelfde letter, per dag en per frass-soort (HI of TM), zijn statistisch niet significant verschillend ($p \geq 0.05$).

Een project van:



Met steun van:



VII.3.3.1.5 Relatief watergehalte bladeren

Tijdens de derde plantproef werd de relatieve waterinhoud op twee tijdstippen gemeten. Op het eerste tijdstip, 35 dagen na het zaaien van de bonen, werden er geen significante verschillen gevonden in relatief watergehalte van de bladeren tussen controle-, NPK- en frass-planten. Voor het tweede tijdstip, 61 dagen na zaaien, worden de resultaten weergegeven in Tabel 38. De RWC-waarden bij normale groeicondities lagen tussen 86.7 en 91.2%; er werden geen significante verschillen gevonden tussen de behandelingen onderling. De waarden bij droogtestress lagen tussen 82.4 en 88.4% en weken dus niet veel af van de waarden onder normale condities. Er werd enkel bij droogtestress een significant verschil in RWC gevonden tussen de controle- en 2% NPK-planten voor de behandeling met TM pellets.

Tabel 38. Relatief watergehalte bladeren 61 dagen na zaaien, voor controle-planten, NPK-planten en planten die 2% HI- of TM-frass pellets toegediend kregen.

Behandeling	Relatief watergehalte bladeren (%)			
	HI P	TM P	HI P S	TM P S
controle	87.1 ± 4.1 ^a	87.1 ± 4.1 ^a	88.4 ± 2.6 ^a	88.4 ± 2.6 ^a
NPK 2%	91.2 ± 3.3 ^a	88.9 ± 1.2 ^a	86.1 ± 3.6 ^a	82.4 ± 2.6 ^b
Frass 2%	91.2 ± 3.3 ^a	86.7 ± 3.5 ^a	86.1 ± 1.4 ^a	86.0 ± 1.0 ^{ab}

gemiddelden en standaardafwijkingen van 3 herhalingen

a-b: resultaten per kolom, met dezelfde letter in superscript zijn niet significant verschillend ($p \geq 0.05$)

VII.3.3.1.6 Vers- en drooggewicht plant

Figuur 59 toont de resultaten voor de bepaling van het vers- en drooggewicht van de plant (bovengrondse delen van de plant waarvan de peulen werden verwijderd) op de oogstdag.

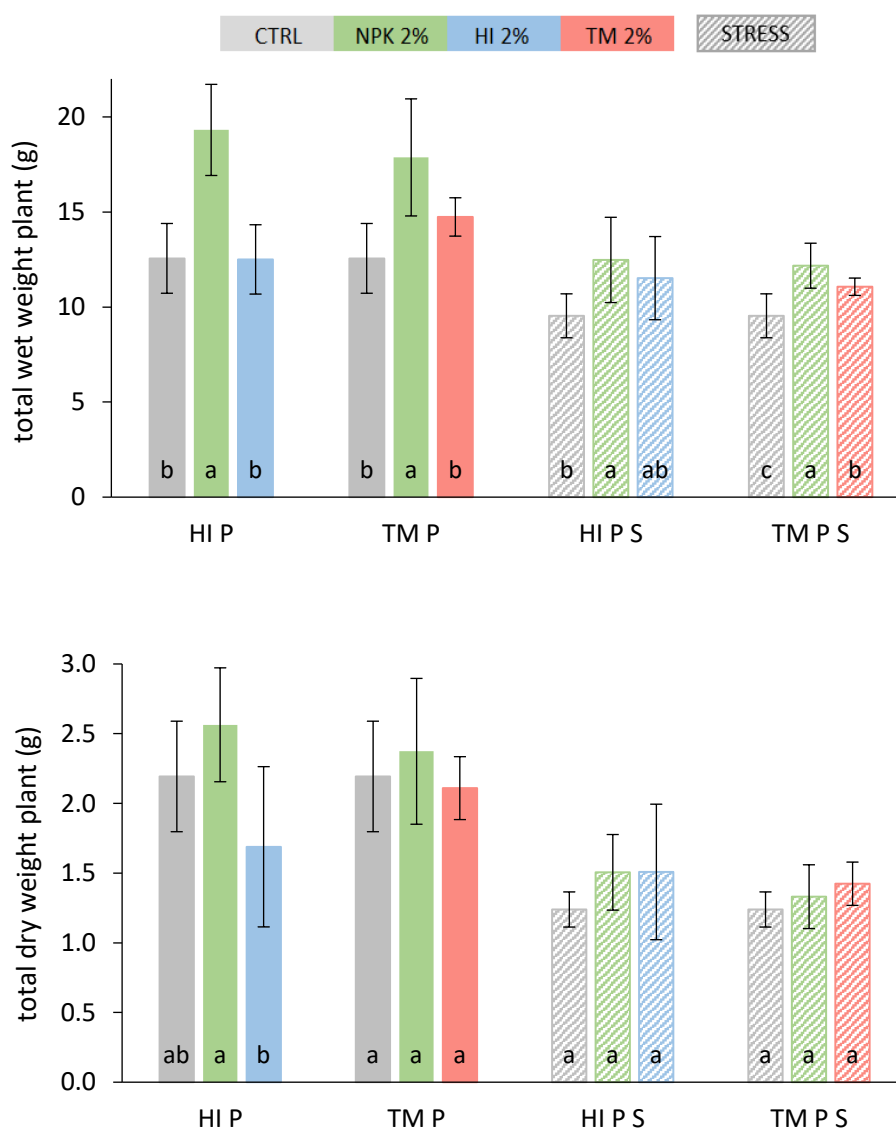
Onder normale groeicondities hadden de NPK-planten een significant hoger versgewicht (gemiddeld 19.3 en 17.9 g voor de respectievelijke behandelingen HI P en TM P) dan de controle-planten (12.6 g) en de frass-planten (12.5 en 14.7 g). Bij het experiment met HI pellets onder droogtestress was het versgewicht van de controle-planten significant lager dan het versgewicht van NPK-planten. Het versgewicht van de frass-planten vertoonde geen significante verschillen, noch met de NPK-planten noch met de controle-planten. Bij het experiment met TM pellets onder droogtestress hadden de planten van alle behandelingen onderling een significant verschillend versgewicht (controle < frass < NPK). Voor het drooggewicht van planten werden geen significante verschillen gevonden tussen de behandelingen behalve voor het experiment onder normale condities met HI pellets. Hier was het gemiddeld drooggewicht van de frass-planten (1.7 g) significant lager dan het gemiddeld drooggewicht van de NPK-planten (2.6 g).

Een project van:



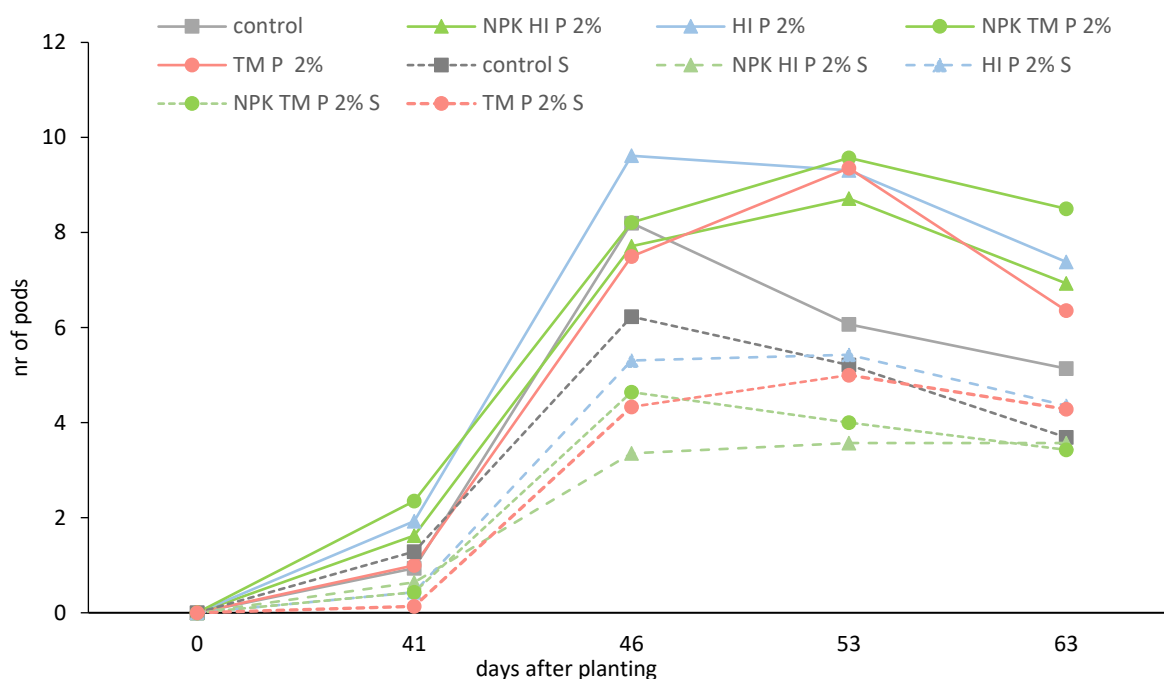
Met steun van:





Figuur 59. Gemiddeld versgewicht (boven) en drooggewicht (onder) bij de oogst, 9 weken na het zaaien, voor het bovengrondse deel van de bonenplanten zonder de peulen bij normale groeicondities (links, volle balken) en droogtestress (rechts, gearceerde balken) voor plantproeven met gepelletiseerd frass (HI en TM, 2% toediening). Gemiddelde en standaardafwijking van 9 herhalingen. a-c: behandelingen, per frass-soort met dezelfde letter zijn statistisch niet significant verschillend ($p \geq 0.05$).

De eerste bloemen verschenen tijdens de vijfde week na het zaaien van de *P. vulgaris* bonen en dit was zo voor alle behandelingen. Het aantal bloemen nam voor alle behandelingen gelijkmatig toe en na zeven weken ontwikkelde de eerste bloemen tot peulen. Figuur 60 toont het verloop van het aantal peulen in de tijd voor toediening van 2% HI-frass pellets en TM-frass pellets, onder normale en droogtestress groeicondities.

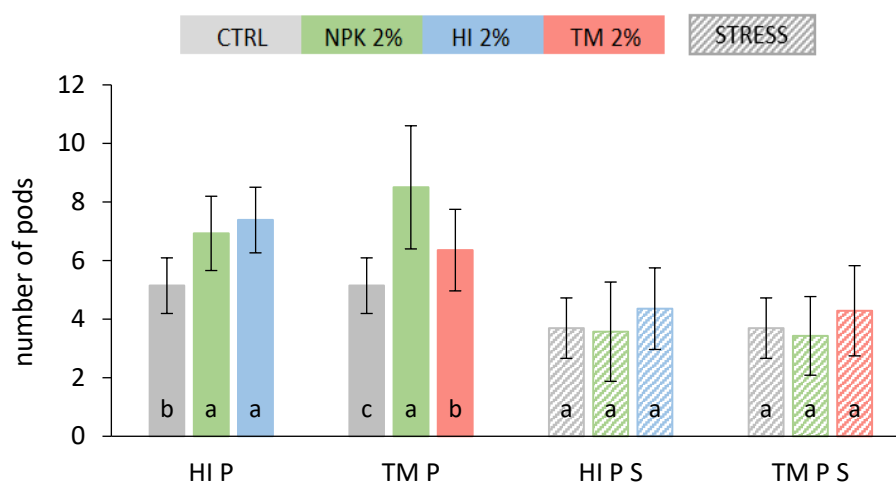


Figuur 60. gemiddeld aantal peulen in functie van het aantal dagen na zaaien van de bonenzaden voor pellets HI-frass (blauw) en TM-frass (rood), frass met bijhorende controle (grijs) en NPK-behandelingen (groen), onder normale groeicondities (volle lijnen) en droogtestress (50% waterreductie (stippellijnen)).

Tot dag 46 verliepen de curves voor het aantal peulen van de bonenplanten gekweekt onder normale groeicondities vergelijkbaar voor de controles en de behandelingen met NPK-meststoffen of frass pellets. Later in de groei was voor de controle-planten het aantal peulen lager in vergelijking met de behandelde planten, die onderling weinig verschillen vertoonden. Onder droogtestress nam het aantal peulen voor de controle- en NPK-planten af vanaf dag 46, maar voor de controles was de afname beperkter in vergelijking met de normale groeicondities. De frass pellet-planten produceerden onder droogtestress minstens even veel of meer peulen dan de controle- en NPK-planten.

Figuur 61 toont de opbrengst aan peulen op de oogstdag 63 voor de groei experimenten met toediening van 2% HI-frass pellets en TM-frass pellets, onder normale en droogtestress groeicondities. Onder normale groeicondities was bij de oogst het gemiddeld aantal peulen voor HI pellet- en NPK-planten (gemiddeld 7 peulen) vergelijkbaar en significant hoger dan het aantal peulen voor de controle-planten (gemiddeld 5 peulen). Voor het experiment met TM pellets was het aantal peulen voor frass- en NPK-planten significant hoger dan voor de controle-planten, hier hadden de NPK-planten echter ook een significant hoger aantal peulen dan de frass-planten.

Bij de experimenten onder droogtestress condities daarentegen werden geen significante verschillen gevonden tussen de behandelingen onderling. Het aantal peulen bij droogtestress lag lager dan het aantal peulen onder normale groeicondities.



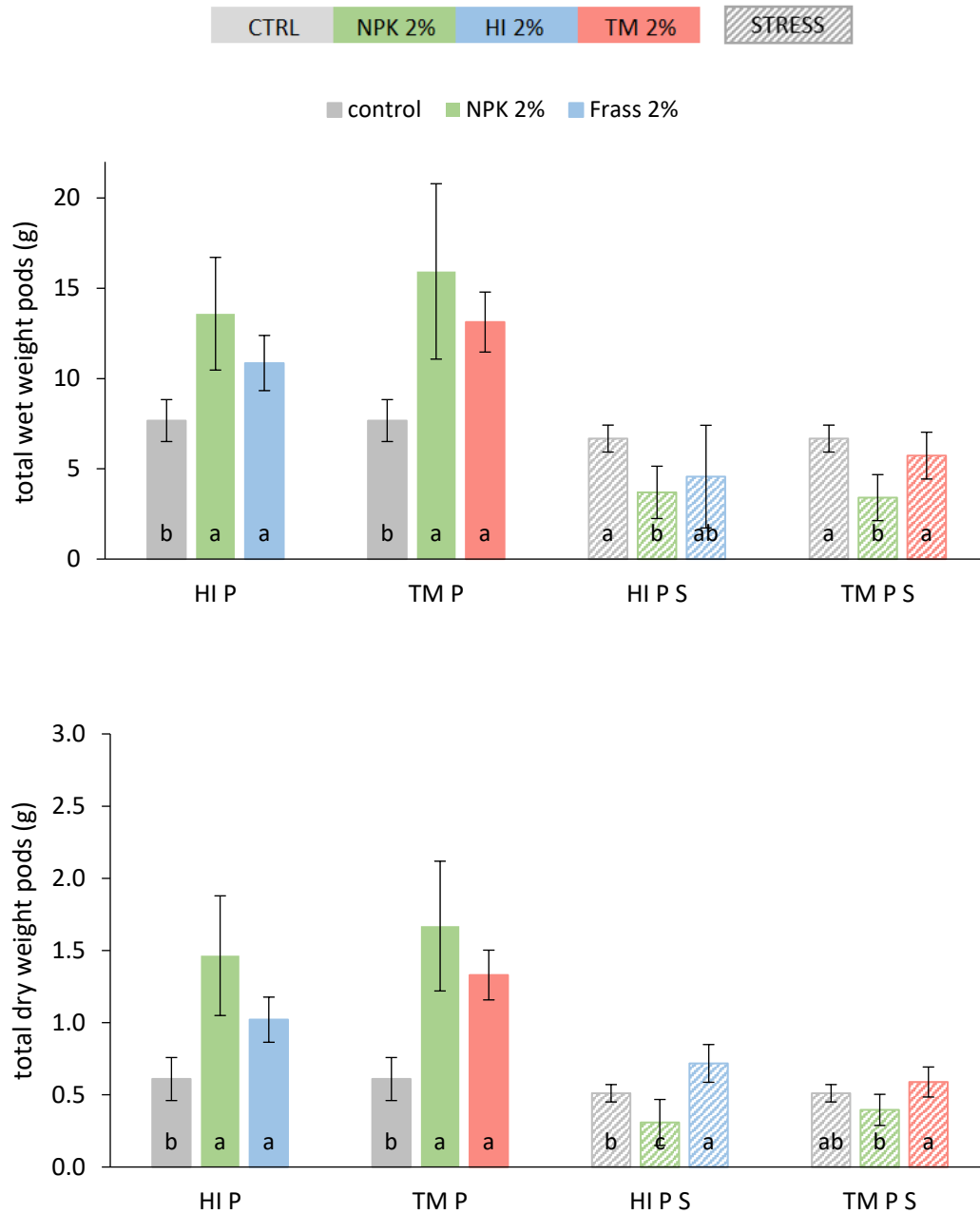
Figuur 61. Gemiddeld aantal peulen bij de oogst (63 dagen na zaaien), voor controles, 2% NPK en 2% HI-pe (HI en TM), onder normale groeicondities (rechts) en droogtestress (links). Gemiddelde en standaardafwijking van 14 herhalingen. a-c: behandelingen per frass-type, zonder of met droogtestress, met dezelfde letter zijn statistisch niet significant verschillend ($p \geq 0.05$).

VII.3.3.2.2 Vers- en drooggewicht peulen

Onder normale groeicondities was het vers- en drooggewicht van de peulen significant hoger voor 2% frass- en 2% NPK-planten dan voor controle-planten, voor toevoeging van zowel HI- als TM-frass pellets, zoals weergegeven in Figuur 62.

Voor de planten die groeiden onder droogtestress werden andere verhoudingen waargenomen. Bij het experiment met HI pellets was het vers peulgewicht voor de NPK-planten significant lager dan voor de controle-planten. Voor de frass-planten was het vers peulgewicht niet significant verschillend in vergelijking met controles en NPK's. Het drooggewicht van de peulen daarentegen was voor de frass-planten significant hoger dan het drooggewicht voor zowel de NPK- als de controle-planten. De NPK-peulen hadden ook hier een significant lager drooggewicht dan de controle-peulen.

Bij het droogtestress experiment met TM pellets was het vers peulgewicht voor de controle- en frass-planten vergelijkbaar en significant hoger dan voor de NPK-planten. Hetzelfde werd waargenomen voor het drooggewicht, al was hier enkel nog voor de frass-planten een significant hoger droog peulgewicht in vergelijking met de NPK-planten.



Figuur 62. Gemiddeld versgewicht (boven) en drooggewicht (onder) van de peulen van de bonenplanten bij de oogst, voor controles, 2% NPK en 2% frass pellets (HI en TM), onder normale groeicondities (rechts) en droogtestress (links). Gemiddelde en standaardafwijking van 9 herhalingen. a-c: behandelingen per frass-type met dezelfde letter zijn statistisch niet significant verschillend ($p \geq 0.05$).

VII.4 Discussie en besluit

De groei experimenten met bonenplanten werden uitgevoerd om het potentieel van zowel onbehandelde als behandelde rests substraten van insectenkweek als stimulator van plantengroei en -ontwikkeling te onderzoeken. Het nutritioneel potentieel werd bestudeerd door vergelijking van controle-planten met planten die frass of NPK-meststoffen toegediend kregen. Het potentieel van het rests substraat als mogelijke biostimulant werd nagegaan in vergelijkbare experimenten onder droogtestress, waarbij de planten de helft minder water kregen. De resultaten van de groei experimenten laten mogelijk toe de waarde van de rests substraten als grondstof voor bodemverbeteraar of meststof in te schatten.

VII.4.1 Kieming

De kieming van *P. vulgaris* bonen wordt geremd bij toevoeging van 10% frass aan de potgrond, zowel voor vers als thermisch gedroogd frass van de kweek van zwarte soldatenvlieglarven en gele meelwormen. Gemiddeld 73% van de bonen gezaaid in potgrond kiemt al na 7 dagen terwijl op dit tijdstip 0 tot maximaal 7% van de bonen in de 10% frass/potgrond mix gekiemd is. Alhoewel de kieming later start zijn de verschillen na twee weken beperkt. Voor potgrond en voor 10% vers ZSVL- en GM-frass/potgrond mix kiemt 93 tot 100% van de bonen; voor de 10% mix met thermisch gedroogd ZSVL- of GM-frass is dit 86%. Toevoeging van lagere hoeveelheden frass (0.5 tot 4%), ongeacht de voorbehandeling, heeft weinig invloed op de snelheid van kieming of op het cumulatief kiemingspercentage van de bonenzaden na twee weken. Voor alle geteste behandelingen kiemt 93 tot 100% van de *P. vulgaris* bonen.

VII.4.2 Vegetatieve groeiparameters

VII.4.2.1 Planthoogte, aantal blaadjes, relatief watergehalte bladeren, vers-en drooggewicht plant

De vegetatieve groei van de bonenplanten, zowel in hoogte als in aantal blaadjes, is het meest uitgesproken tot ongeveer 40 dagen na het zaaien. Bij het verschijnen van de bloemen stagneert de vegetatieve groei ten voordele van de generatieve groei.

Bij toediening van zowel 10% frass als 10% NPK-meststof blijven de planten kleiner in vergelijking met de controle-planten en de planten met 2% toevoeging. Mogelijk wordt de vegetatieve groei geremd door overbemesting. Bij de lagere toedieningspercentages (0.5 tot 4%) zijn er geen uitgesproken verschillen in planthoogte tussen de geteste behandelingen onder normale groeicondities. Bij droogtestress blijven de planten zoals verwacht kleiner. Ook hier zijn er weinig verschillen in planthoogte tussen de controles en de 2% frass- of NPK-toedieningen.

De zaailingen hebben op het ogenblik van selectie (2 weken na zaaien) 2 bladeren, tijdens de groeiperiode worden meer bladeren gevormd, telkens bestaande uit 3 deelblaadjes. Er is geen eenduidig verband tussen het aantal blaadjes van de bonenplanten op een bepaald tijdstip in de groeiperiode en de toegepaste behandelingen, noch onder normale groeicondities. noch bij droogtestress. Wel lijkt, onder droogtestress condities, de toediening van 2% frass (vers ZSVL en ZSVL of GM pellets) te zorgen voor een hoger aantal blaadjes bij de frass-planten in vergelijking met de controle-planten.

Het relatief watergehalte van de bladeren van de bonenplanten ligt tussen 87% en 95% voor controle-planten en behandelingen met 0.5 tot 4% frass of NPK-meststoffen bij normale groeicondities. De waterhuishouding van de bonenplanten ondervindt weinig invloed van het toedienen van lage percentages frass of NPK-meststoffen. Er zijn nauwelijks onderlinge verschillen in RWC-waarde of verschillen in vergelijking met de onbehandelde planten.

Een project van:



Met steun van:



Enkel bij het hoge toedieningspercentage van 10% frass of NPK-meststof is er een negatief effect, de bladeren van de behandelde planten hebben een lagere RWC-waarde in vergelijking met de niet-behandelde controle-planten. Onder droogtestress ligt de RWC-waarden tussen 76% en 88% met ook hier geen onderlinge verschillen.

Bij het vers- en drooggewicht van de bonenplanten (bovengrondse delen van de plant zonder de peulen) op de oogstdag is de invloed van toevoeging van frass of organische meststoffen aan de potgrond merkbaar. Bij de behandeling met 2% GM-frass, zowel vers, thermisch gedroogd als gepelletiseerd, is het vers plantgewicht van de frass-planten vergelijkbaar met dat van de controle-planten maar significant lager dan het versgewicht van de planten die NPK-meststoffen krijgen. Bij toevoeging van ZSVL-frass wordt dit enkel vastgesteld voor de pellets. Bij toevoegen van vers of thermisch gedroogd ZSVL-frass is het versgewicht van de 2% frass-planten vergelijkbaar met het versgewicht van de 2% NPK-planten en zijn beide significant hoger dan het versgewicht van de controle-planten.

Ook onder droogtestress hebben de 2% ZSVL-planten (vers en thermisch gedroogd) een significant hoger versgewicht (ongeveer +20%) dan de controle-planten. Voor de toediening van 2% ZSVL pellets en 2% GM pellets is het versgewicht onder droogtestress eveneens hoger dan het versgewicht van de controle-planten. Het droge stofgehalte van de bonenplanten ligt gemiddeld tussen 9 en 15%, het drooggewicht van de planten volgt in grote lijnen dezelfde tendens als het versgewicht.

VII.4.2.2 Pigmentinhoud bladeren

De pigmentinhoud (chlorofyl a, chlorofyl b en carotenoïden) van de bladeren verandert in de loop van het groeiproces van de bonenplanten. Het chlorofylgehalte neemt geleidelijk toe vanaf de bladvorming (week 2-3) tot ongeveer de zesde week na het zaaien; daarna is er een daling merkbaar. De chlorofylinhoud van de bladeren van de met frass behandelde bonenplanten is hoger dan deze van de controle-planten. Het verschil was enkel significant voor de behandelingen met 2 % gedroogd ZSVL-frass, 2 % ZSVL- en GM-pellets. Omdat ook het toedienen van NPK-meststoffen het chlorofylgehalte in de bladeren verhoogt, wijst dit mogelijk op een bemestingseffect van frass toediening.

Visueel is merkbaar dat de bladeren van de NPK-planten gedurende de ganse groeiperiode een intens groene kleur behouden, bij de bladeren van de frass-planten vermindert de kleurintensiteit en de bladeren van de controle-planten vergelen. Dit gebeurt zowel onder normale groeiomstandigheden als onder droogtestress. De verkleuring van de bladeren was het meest uitgesproken bij het derde plantexperiment met gepelletiseerd frass.

VII.4.3 Generatieve groeiparameters

VII.4.3.1 Aantal bloemen, aantal peulen, vers- en drooggewicht peulen

De generatieve groeifase van de bonenplanten start met het verschijnen van de eerste bloemen, 5 tot 6 weken na het zaaien van de bonen, gevolgd door de vorming van de peulen. Het aantal bloemen ligt voor alle bonenplanten, ongeacht de toegepaste behandeling, hoger dan het aantal peulen op de oogstdag omdat niet alle bloemen ontwikkelen tot peul en gevormde peultjes soms verschrompelen en afvallen. De peulen zelf zijn ook zeer heterogeen qua grootte en gewicht.

Bij het telen van *P. vulgaris* is de opbrengst aan peulen een belangrijke factor. Bij toedienen van 10% frass of 10% NPK-meststoffen komt de bloei later op gang en worden er minder peulen gevormd. De hoge nutriëntenhoeveelheid kan dus gerelateerd worden met een latere overschakeling naar de generatieve fase. Bij lagere toevoeging (0.5% tot 4%) van ZSVL-frass is een trend merkbaar van toename van het versgewicht van de peulen met oplopend toedieningspercentage maar zijn de onderlinge verschillen tussen de behandelingen meestal niet statistisch significant.

Een project van:



Met steun van:



Enkel bij het toevoegen van 2% ZSVL-frass, zowel vers als thermisch gedroogd of gepelletiseerd, is het vers peulgewicht hoger voor de behandelde planten in experimenten 1 en 3. Bij het toevoegen van 2% GM-frass is er geen effect merkbaar voor vers of thermisch gedroogd frass. Voor bonenplanten behandeld met pellets van gele meelwormenfrass is het vers peulgewicht hoger in vergelijking met niet-behandelde planten.

Onder droogtestress produceren de bonenplanten minder peulen. Toevoegen van 2% ZSVL-frass, vers of thermisch gedroogd, zorgt ervoor dat het versgewicht van de peulen onder droogtestress significant hoger ligt voor de frass-planten. Bij het experiment met 2% frass pellets is de opbrengst onder normale groeiomstandigheden het hoogst voor de bonenplanten die NPK-meststof krijgen. Onder droogtestress is de opbrengst aan peulen bij deze NPK-planten echter significant lager in vergelijking met de opbrengst van de frass-planten, wat mogelijk wijst op een biostimulant effect.

VII.4.4 Algemene conclusie

Het toevoegen van frass aan de potgrond heeft geen negatief effect op de groei en ontwikkeling van bonenplanten, mits de toegevoegde hoeveelheid niet meer dan 4% bedraagt. Omdat de negatieve invloed bij 10% toevoeging ook wordt vastgesteld voor NPK-meststoffen, is de verminderde groei wellicht te wijten aan overbemesting en niet gerelateerd aan specifieke frass-eigenschappen.

Bij lagere toevoegingspercentages presteren de frass-planten minstens even goed of beter dan de controle-planten, ongeacht de voorbehandeling (onbehandeld, thermisch drogen of pelletiseren). De voorbehandelingen van frass blijken dus geen negatief effect uit te oefenen met betrekking tot gebruik ervan in de plantproeven. Door thermisch behandelen kunnen mogelijk plantengroei bevorderende micro-organismen aanwezig in frass afgedood worden, maar dit kwam niet tot uiting in de uitgevoerde experimenten.

Bij het vergelijken van het bemestingseffect van frass met dat van anorganische NPK-meststoffen dient opgemerkt te worden dat er mogelijk verschillen zijn in de beschikbaarheid van nutriënten voor opname door de plant. De totale hoeveelheid nutriënten tijdens de groeiperiode van negen weken is voor beide behandelingen gelijk. De NPK-meststoffen worden verspreid in de tijd toegediend (wekelijkse portie) in een vorm die direct door de plant kan opgenomen worden. De nutriënten in frass zijn vanaf het planten aanwezig in de bodem maar moeten eerst uit het frass vrijgesteld worden door mineralisatie vooraleer ze voor de plant beschikbaar zijn. Om meer informatie te verkrijgen over de vrijstelling van nutriënten uit frass zou in de toekomst de mineralisatie van frass in de bodem moeten bestudeerd worden. Zo kan nagegaan worden of de methode die gebruikt werd tijdens de plantproeven om vrijstelling nutriënten uit frass na te bootsen correct was en of er aanpassingen zouden moeten gebeuren.

Deze studie had tot doel het potentieel van behandelde restsubstraten van de kweek van insecten als grondstof voor bodemverbeteraar of meststof en als mogelijke biostimulant in plantenteelt in te schatten. Algemeen kan gesteld worden dat het (on)behandelde restsubstraat een invloed heeft op de groei en ontwikkeling van bonenplanten. Planten die geteeld worden in met frass gemengde potgrond presteren minstens even goed of beter in vergelijking met planten die geen extra nutriënten toegediend krijgen, wat wellicht duidt op een bemestingseffect. Dit is meer uitgesproken voor frass van de kweek van zwarte soldatenvlieglarven dan voor frass van de kweek van gele meelwormen, zowel onder normale groeiomstandigheden als onder droogtestress condities (50 % waterreductie). Om het potentieel van frass als biostimulant onder stress condities (droogtestress, temperatuurstress, biotische stress...) te kunnen inschatten is bijkomend onderzoek nodig.

Een project van:



Met steun van:



VII.5 Referenties

- Barragán-Fonseca, K. Y., Nurfikari, A., van de Zande, E. M., Wantulla, M., van Loon, J. J. A., de Boer, W., & Dicke, M. (2022). Insect frass and exuviae to promote plant growth and health. In *Trends in Plant Science* (Vol. 27, Issue 7, pp. 646–654). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2022.01.007>
- Bloukounon-Goubalan, A. Y., Saïdou, A., Clottey, V. A., Coulibaly, K., Erokotan, N., Obognon, N., Chabi, F., & Chrysostome, C. A. A. M. (2021). By-products of insect rearing: insect residues as biofertilizers. In *Insects as animal feed: novel ingredients for use in pet, aquaculture and livestock diets* (pp. 60–71). CABI. <https://doi.org/10.1079/9781789245929.0008>
- Ceusters, J., Borland, A. M., Londers, E., Verdoodt, V., Godts, C., & De Proft, M. P. (2009). Differential usage of storage carbohydrates in the CAM bromeliad *Aechmea* “Maya” during acclimation to drought and recovery from dehydration. *Physiologia Plantarum*, 135(2), 174–184. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.2008.01186.x>
- Fuhrmann, A., Wilde, B., Conz, R. F., Kantengwa, S., Konlambigue, M., Masengesho, B., Kintche, K., Kassa, K., Musazura, W., Späth, L., Gold, M., Mathys, A., Six, J., & Hartmann, M. (2022). Residues from black soldier fly (*Hermetia illucens*) larvae rearing influence the plant-associated soil microbiome in the short term. *Frontiers in Microbiology*, 13. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.994091>
- Porra R.J., Thompson W.A., & Kriedemann P.E. (1989). Determination of accurate extinction coefficients and simultaneous equations for assaying chlorophylls a and b extracted with four different solvents: verification of the concentration of chlorophyll standards by atomic absorption spectroscopy. *Biochimica et Biophysica Acta*, 975, 384–394.
- Poveda, J. (2021). Insect frass in the development of sustainable agriculture. A review. *Agronomy for Sustainable Development*, 41(1). <https://doi.org/10.1007/s13593-020-00656-x>
- Wellburn Alan R. (1994). The Spectral Determination of Chlorophylls a and b, as well as Total Carotenoids, Using Various Solvents with Spectrophotometers of Different Resolution. *Plant Physiol.*, 144, 307–313.