

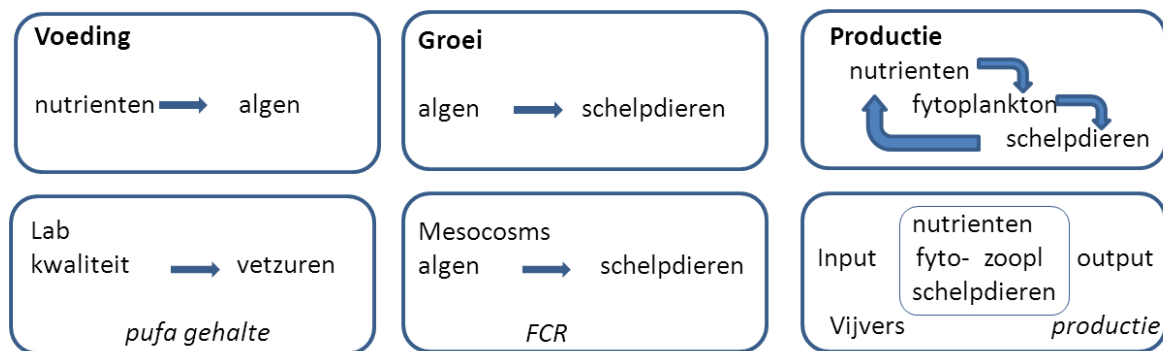
## Werkpakket 2. Schelpdieren: groei en gedrag van schelpdieren in vijverteelt; resultaten 2012.

Auteurs: Pauline Kamermans, Mascha Dedert, Henrice Jansen, Tim Schellekens & Aad Smaal

### 2.1. Inleiding

Binnendijkse teelt van schelpdieren is nieuw voor Zeeland en succesvolle voorbeelden ontbreken nog. Voor een economisch renderende uitgroei van het uitgangsmateriaal van schelpdieren tot marktgroote is de garantie van een stabiele productie van algen van hoge kwaliteit op grote schaal tegen een lage kostprijs noodzakelijk. Vijverteelt lijkt een geschikte vorm om grootschalig en economisch haalbaar binnendijks algen en schelpdieren te produceren. Daartoe is kennis nodig van de condities die leiden tot maximale algenproductie van goede kwaliteit, van de respons van de schelpdieren in termen van groei en overleving als functie van dieet, en van het maximaliseren van de productie als functie van de kweekcondities. Dit is de focus van werkpakket 2. Het project is opgezet langs de volgende lijnen: = voeding: wat bepaalt de voedingswaarde van algen voor schelpdieren en hoe kunnen hoogwaardige algen worden geproduceerd, = groei schelpdieren: wat is de respons van schelpdieren op diverse diëten, en = groei en overleving van de schelpdieren in de pilots.

In schema: cursief zijn de belangrijkste indicatoren aangegeven.



In 2012 is de aandacht wat betreft empirisch onderzoek gericht op het onderwerp productie. Verder is een database opgebouwd die is gericht op de integratie van de verschillende componenten en fluxen.

Het doel van het onderzoek in de tweede fase van het Zeeuwse Tong project bestaat uit twee delen:

#### 1. Voeding van schelpdieren in vijverteelt

Inzicht in de voedselbronnen die schelpdieren in vijverteelten (kunnen) benutten voor een snelle groei.

Specifieke doelstellingen hiervan zijn:

- Identificeren van factoren in gekweekte algen die de voedingswaarde voor schelpdieren bepalen en nagaan in hoeverre hierin soortspecifieke verschillen optreden zowel mbt de algen als de schelpdieren. Als modelorganisme is de kokkel gekozen.
- Identificeren van kweekcondities van algen die de voedingswaarde voor schelpdieren verhogen zoals menging, verblijftijd, beënting en samenstelling nutriënten aanbod.

#### 2. Groei en gedrag van schelpdieren in vijverteelt

Analyse van knelpunten zoals gesignaleerd in schelpdierpilots, identificatie van oplossingsrichtingen en experimentele beoordeling van oplossingen.

Specifieke doelstellingen hiervan zijn:

- Ontwikkeling en gebruik van een testkit voor het meten van de respons van schelpdieren op voedsel met verschillende voedingswaarden c.q. gekweekt onder verschillende condities.
- Bepalen van condities in vijverteelt op massabalans, groei, overleving en kwaliteit van schelpdieren.
- Bijdragen aan een ontwerp voor geïntegreerde teelt vis-voer-algen-schelpdieren-planten.

## 2.1 Voeding van schelpdieren in vijverteelt

### Protocol outdoor algenkweek als voedsel voor schelpdieren

#### Voedingswaarde algen

Wetenschappelijk onderzoek heeft aangetoond dat de samenstelling van algenvoer aan schelpdieren voor minimaal 20% uit levende algen moet bestaan (Spencer 2002). Wanneer het voer volledig bestaat uit gedroogde algen treedt een vermindering van groei en vitaliteit op (Espinosa & Allam, 2006). Dit betekent dat voor een optimale kweek van schelpdieren gelijktijdig een algenteelt moet plaatsvinden van algen met de juiste voedingswaarde, hoeveelheid en continuïteit. In het onderstaande protocol worden de verschillende facetten die hiervan op invloed zijn behandeld.

Om een voldoende hoeveelheid algen te kunnen kweken kan worden gebruik gemaakt van outdoor kweekfaciliteiten. Hierin wordt in grote volumes algen gekweekt welke kunnen worden gebruikt als voer voor schelpdieren of andere toepassingen (fig. 1).



**Fig. 1** Voorbeelden van outdoorkweek van algen. **a)** Algenvijver bij Zeeland Aquacultuur, **b)** raceways IMARES te yerseke, **c)** algenkweek voor biobased economy toepassingen

#### Verschillende kweekmethoden

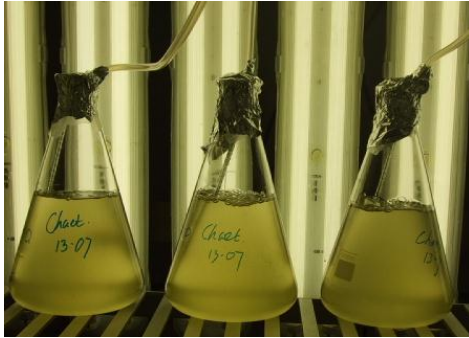
Voor het opstarten van outdoor cultures moet een algenculture opgekweekt worden. Hierbij wordt de stock door middel van overenting geleidelijk gedurende enkele weken in een groter volume medium (gefiltreerd zeewater met toegevoegde nutriënten, zie bijlage 1) gekweekt, bv. van 30ml naar 100ml kweekflesjes, die vervolgens worden verder gekweekt (geïnoculeerd) in erlenmeyers van 250 ml inhoud (bijlage 2). Bij voldoende hoge celconcentraties (na ~2 weken groei) kunnen deze erlenmeyers worden overgeënt op in 10L flessen of plastic zakken van 25L inhoud met een celconcentratie van minimaal 100.000 cellen per ml (fig. 2). Deze cultures dienen als inoculatiemateriaal voor de outdoor kweekfaciliteiten. Algen kunnen gekweekt worden gebruikt makend van verschillende methoden. Deze methoden zijn gebaseerd op het al dan niet continue kweken van de algen.



**Fig. 2)** 25 L zakken voor schelpdierkweek of als inoculatiemateriaal voor de raceways

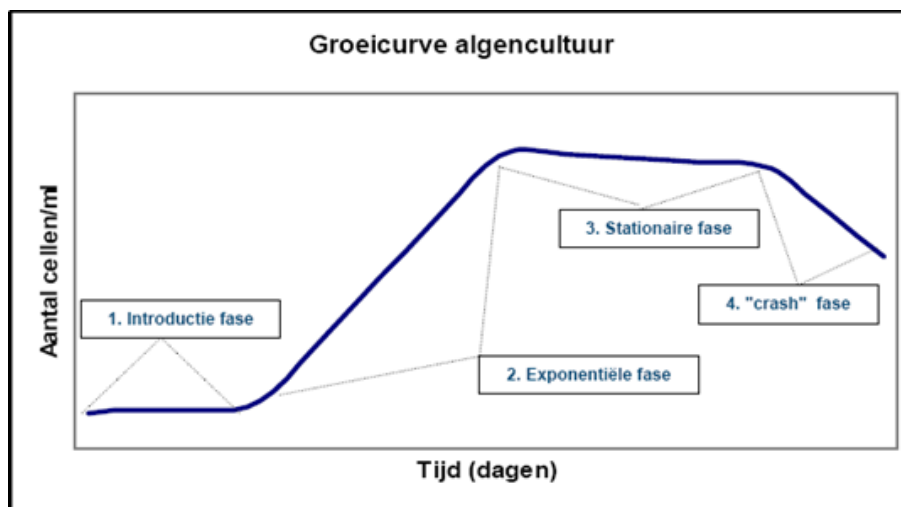
#### Batch culture

Voor het kweken van algen kunnen verschillende methoden toegepast worden. De meest gangbare is de batch culture. Tijdens een batchculture wordt een algensoort opgekweekt tot hoge celdichtheden waarna de gehele culture geoogst wordt.



**Fig. 3** Een voorbeeld van een batch culture in een erlenmeyer.

Het optimale tijdstip voor het oogsten van deze culture is wanneer de culture het eind van de exponentiële fase nadert (fig. 4). Dit is de fase met de hoogst haalbare celconcentraties van meest optimale kwaliteit. Door middel van dagelijkse algentellingen is deze fase te bepalen als een stagnatie in de toename van celconcentraties (Bijlage 3).



**Fig. 4** Figuur met het verloop van de algengroei gedurende een batch cultuur (Hoff en Snell, 2001).

#### Semi-batch

Een kweekmethode waarbij een deel van culture wordt geoogst en het resterende deel wordt aangevuld met nieuw medium wordt een semi-batch culture genoemd. Hierbij is het noodzakelijk de celdichtheden en celkwaliteit te monitoren om het juiste tijdstip van oogsten te bepalen. Door tijdig te oogsten wordt voorkomen dat de culture in kwaliteit en dichtheid afneemt, d.w.z. in de stationaire fase komt (fig. 4). Het is belangrijk de culture regelmatig te controleren op contaminatie met andere algen of bacteriën. Het tijdig oogsten van een deel van de culture kan ervoor zorgen dat de gewenste algensoort in de exponentiële fase blijft en daarmee voorkomt dat andere algen de culture overneemt.

Voor het uitvoeren van een semi-batch culture zijn dezelfde materialen nodig als voor een batch culture. Echter, omdat deze vorm van algenkweek een continue groei van algen betreft, moet voortdurend het gebruikte materiaal worden gereinigd om er verzekerd van te zijn dat er voldoende materiaal aanwezig is.

#### Continu culture

Een kweektechniek waarbij een culture zeer langdurig in stand worden gehouden door voortdurend medium toe te voegen en een deel van de algen te oogsten (doorstroom) heet een continu culture (Fig. 5). Afhankelijk van de groeisnelheid van de culture en resulterend de celdichtheid kan de doorstroom worden aangepast. Hiermee wordt voorkomen dat lichtlimitatie optreedt en een gebrek aan nutriënten de groei van de culture beperkt, en kunnen resulteren in een kwalitatief slechtere en lichtere alg (Michels et al. 2010). Daarnaast worden contaminaties zoals bacteriën en zooplankton zodanig verdund dat zij in mindere mate de culture kunnen aantasten. Ook zal, net als in een semi-batch culture, bij voldoende doorstroom de gewenste algensoort in exponentiële fase gehouden kunnen worden en contaminatie met andere algen voorkomen kunnen worden. Proefondervindelijk is vastgesteld dat een doorstroom of verversingssnelheid van de raceways bij 40% de hoogste productie behaald. Daarentegen bleek dat de cultures bij een verversingssnelheid van ~10% stabiel zijn (Kamermaans et al., 2009). Aanpassing van de stroomsnelheid gedurende de kweek zal gewenst zijn bij wisselende weersomstandigheden.



**Fig. 5** Een voorbeeld van een continu culture. Via de blauwe en doorzichtige slangen links wordt continu medium toegevoegd en de algen worden continu geoogst via een staande pijp (niet zichtbaar op de foto).

Voor een continue culture worden systemen gebruikt waar door middel van een voortdurende monitoring de procesparameters kunnen worden aangestuurd om tot de optimale groeiomstandigheden te komen. Bij voldoende kennis van de optimale kweekomstandigheden van een bepaalde soort kunnen de omstandigheden grotendeels worden ingesteld. Grote outdoor kweeksystemen, zoals raceways, kunnen indien de kweekomstandigheden gecontroleerd worden, voor bepaalde tijd als continu systemen gebruikt worden.

Parameters die gedurende de kweek gemonitord kunnen worden:

- Zuurstof concentratie
- pH
- Saliniteit
- Temperatuur
- Licht
- Algenconcentratie
- Drooggewicht
- Nutriënten:  $\text{PO}_4^{3-}$ ,  $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{NO}_2^-$ ,  $\text{NH}_4^+$ ,  $\text{SiO}_4^{4-}$ ,

Hierbij kan gebruik gemaakt worden van de volgende meetapparatuur:

- $\text{O}_2$  concentratie(mg/l) Hach HQd Field case
- $\text{O}_2$  verzadiging (%) Hach HQ Field case
- pH, Hach HQ Field case
- Saliniteit (psu) Hach HQ Field case
- Temperatuur ( $^{\circ}\text{C}$ ) Hach HQ Field case
- Temperatuur ( $^{\circ}\text{C}$ ) logger
- Licht (PAR) Li-cor sensor
- Hach kit of Autoanalyser (nutriënten)

De monsters worden de autoanalyser dienen vooraf te zijn gefiltreerd over een  $0,45\mu\text{m}$  filter om alle algen en zwevend stof te verwijderen. Monsters worden genomen in triplo, en voor Fosfaat ( $\text{PO}_4^{3-}$ ), N-componenten ( $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{NO}_2^-$  en  $\text{NH}_4^+$ ) bewaard in de vriezer. Het monster voor de silicaat analyse dient te worden bewaard in de koelkast.

Alle kweekmethoden zijn redelijk tijdsintensief. Automatisering van het proces zal voor alle drie de technieken een kostenbesparing kunnen opleveren. Daarnaast zal een initiële monitoring van de groei van een algensoort inzicht kunnen geven in de factoren die bepalend zijn voor de groei. Deze kennis kan ingezet worden om het proces verder te optimaliseren, zodat een verdere kostenbesparing bestaande uit een betere kwaliteit, dichtheid en continuïteit gerealiseerd kan worden. Dit zal met name gelden voor de semi-continue en continue cultures.

#### Benodigdheden voor alle kweekmethoden

- Stocks (algencultures)
- Gefiltreerd zeewater (bij voorkeur over  $0.2\ \mu\text{m}$  filter)
- Kweekflesjes (30 ml en 100 ml)
- Schoon glaswerk (erlenmeyers met stop of afgesloten met parafilm met openingen voor beluchting)
- Autoclaaf
- Medium (bestaande uit nutriënten, spoormetalen en vitaminen)
- Beluchting (slangen, filters ( $0.2\ \mu\text{m}$ ), pomp)
- Pipetten / pipetteerballon

- 70% alcohol
- Tissues
- Haematocytometer (telraam voor celdichtheid)
- Microscoop

*Specifiek voor 25L en grotere volumes:*

Ter desinfectie van het zeewater i.p.v. middels de autoclaaf (i.v.m. te grote volumes water voor autoclaaf):

- UV lamp ter desinfectie van gefiltreerd zeewater
- Natriumhypochloriet (*1 ml natrium hypochloriet (bleek water) oplossing per liter gefiltreerd zeewater, 1 dag laten inwerken onder beluchting*) en Natrium(waterstof)-carbonaat ( $\text{NaHCO}_3$ ) voor neutralisatie van chloor (*1,25 g per 25 L*)

Specifiek voor continu cultures:

- Meetapparatuur voor temperatuur, licht
- Pompen
- Filters
- Sensoren overloop

Voorkomen van contaminatie

Ten alle tijde moet contaminatie van de culture voorkomen worden. Het opstarten van een culture heeft de meeste kans van slagen wanneer gewerkt wordt met een reine culture zonder infecties en contaminaties. Het medium moet daarom, na filtratie over een  $0.2 \mu\text{m}$  filter bij voorkeur geautoclaveerd worden om alle bronnen van contaminaties te elimineren. Glaswerk, flessen en ander materiaal dat met de culture in aanraking komt moeten ook met de autoclaaf gesteriliseerd zijn. Tijdens het overenten en opschalen van de cultures moet zo steriel mogelijk gewerkt worden. Overenten dient plaats te vinden in een flow kast die is gereinigd met alcohol (70%) en waarbij onder steriele condities de cultures worden overgeënt.

Het zeewater dat gebruikt wordt voor de kweek in grote watervolumes, zoals raceways (1800L) dient in eerste instantie gefilterd te worden over een  $5 \mu\text{m}$  en vervolgens over een  $0.2 \mu\text{m}$  filter. Hierdoor worden contaminaties als andere algen, bacteriën en protozoa uit het water verwijderd (Fig. 6).



**Fig. 6** Kweek van zeewater zonder inoculum in raceway met water gefiltreerd door  $5 \mu\text{m}$  filter, en b, water gefiltreerd over een  $0,2 \mu\text{m}$  filter

Ook gedurende de kweek is het noodzakelijk bij het tussentijds bemonsteren van cultures in afgesloten flessen, erlenmeyers of plastic zakken voorzorgsmaatregelen te nemen die contaminatie kunnen worden voorkomen. Cultures in open lucht die in aanmerking komen met contaminaties van buitenaf dienen regelmatig gecontroleerd te worden op contaminaties en celkwaliteit. Zoals in de beschrijving van de semi-batch en continue culture eerder is aangegeven, kan tijdens oogsten of verhogen van de doorstroom een schadelijke contaminatie van de culture voorkomen. Het afdekken van de open lucht kweekfaciliteiten (fig. 7) of voorkomen van direct contact met de buitenlucht kan contaminaties uit de buitenlucht verder voorkomen.



**Fig. 7** Een raceway afgedekt met plastic folie ter voorkoming van contaminatie

### **Kweekomstandigheden van invloed op algengroei**

Algen worden hoofdzakelijk beperkt in groei door temperatuur, licht (PAR) en nutriënten. Daarnaast kunnen ook andere factoren als pH, zuurstofgehalte en saliniteit een beperkend factor zijn.

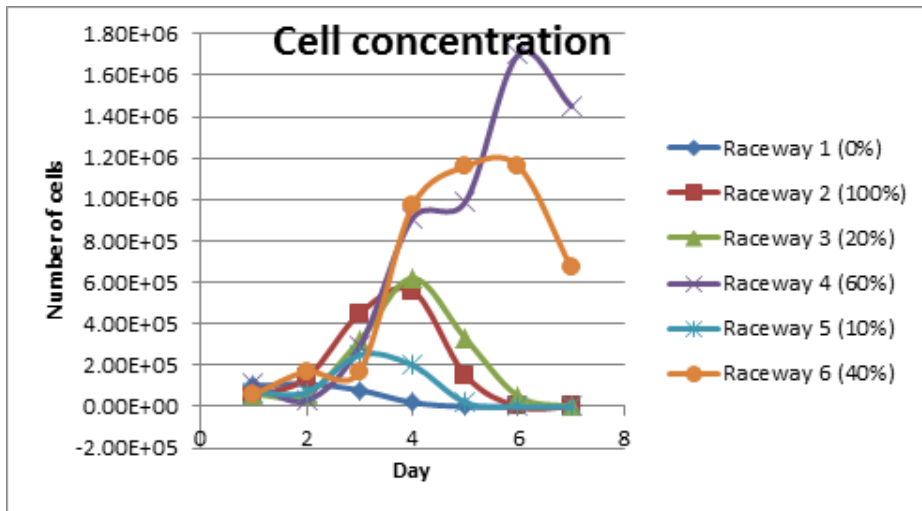
Licht kan zowel in overmaat, waardoor photoinhibitie (een overbelasting van het fotosynthese apparaat) optreedt, als bij lage intensiteit de groei limiteren. Onder limiterende omstandigheden kunnen hogere energetische kosten ter aanpassing aan de lage lichtintensiteit zorgen voor afname in groei. Groeisnelheden voor *Skeletonema costatum* bij verschillende lichtintensiteiten laten de hoogste groei zien bij de 100% lichtintensiteit in het voorjaar en ~een 50% afname bij een 25% lichtintensiteit (Maas 2011). In de wintermaanden, wanneer de dagelijkse instraling lager is en gedurende de dag minder uren licht beschikbaar is, zal lichtlimitatie een belangrijke limiterende factor zijn. Lichtlimitatie kan verder optreden onder hoge celdichtheden.

Lichtintensiteit beïnvloedt niet alleen de groei, maar ook de samenstelling van de cellen, bv. pufa (vetzuur)gehalten nemen in bepaalde soorten toe onder hogere lichtintensiteiten (Thompson *et al.* 1993). Optimale kweekomstandigheden met betrekking tot licht kunnen gerealiseerd worden door het waarborgen van voldoende menging van de culture in bij voorkeur niet te diepe kweekfaciliteiten. Menging kan plaatsvinden door middel van bv. een schoepenrad of beluchting. Daarnaast zal een goede beluchting de groei van algen bevorderen door de toevoeging van CO<sub>2</sub> aan het water. CO<sub>2</sub> is noodzakelijk voor de fotosynthese, en voldoende beschikbaarheid zal de groei van de algen bevorderen.

Naast licht is temperatuur een belangrijke factor die van invloed is op algenkweek. Afhankelijk van de algensoort en strain laten algen een toename in groei zien tot een optimale temperatuur, waarna de groeisnelheid snel afneemt. Zo is bekend uit de literatuur dat *Skeletonema constatum* een hoge groeisnelheid laat zien bij 25°C (Suzuki & Takahashi, 1995), hoewel genetische variatie en adaptie aan kweekomstandigheden kunnen leiden tot een ander groeioptimum. Onder een voldoende beschikbaarheid van nutriënten lijkt de effecten van temperatuur op de groei minder groot te zijn (Curl & McLeod, 1961).

### **Nutriënten**

Het toevoegen van nutriënten in de juiste verhoudingen zal bevorderlijk zijn voor de groeisnelheid en duur van de culture. Media bevatten een mix aan macro- en micronutriënten tezamen met vitaminen en mineralen. De samenstelling en daaraan verbonden de kostprijs van verschillende media kan enorm verschillen (tabel 1). Het veelgebruikte Walne medium (bijlage 1; tabel 1) is naar verhouding zeer duur, alsmede ook media die NaNO<sub>3</sub> gebruiken als bron van stikstof. De benodigde toe te voegen nutriënten is afhankelijk van de reeds in het water aanwezige nutriënten. Inname van zeewater gedurende perioden in het jaar wanneer concentraties hoog zijn maakt toevoeging van dure media overbodig. Een groeiexperiment in het voorjaar (Maas, 2012) heeft aangetoond dat verschillende concentraties van het dure Walne medium geen effect had op de groeisnelheid en maximale groei. Een soortgelijk experiment gedurende de zomermaanden in hetzelfde jaar laat zien dat optimale groei bereikt wordt in cultures waaraan Walne is toegevoegd, zij het dat de culture met 100% Walne minder goed presteert dan de cultures waaraan 60 en 40% Walne medium was toegevoegd. Echter, bij 0% Walne vertoonde de culture bijna geen groei en stortte de culture vroegtijdig in (Fig. 8; Quesnot, 2012).



**Fig. 8)** Groei onder verschillende concentraties toegevoegd Walne medium

Deze resultaten laten zien dat de samenstelling van het zeewater bij aanvang van de kweek bepalend is voor de benodigde toe te voegen nutriënten. Indien gewenst, kan een analyse van nutriënten (N, P en Si met de autoanalyser) en spormetalen (ICP-ms) duidelijkheid kunnen geven over potentiële limitaties, welke door toevoeging van bepaalde nutriënten opgelost kunnen worden. Aan de hand van deze gegevens kan een medium enkel bestaande uit de noodzakelijk nutriënten worden toegevoegd, wat zodoende tot een kostenbesparing op hoeveelheid toe te voegen en soort media zal leiden. Van enkele algensoorten is aangetoond dat zij in staat zijn tot een goede groei met goedkoop media, zoals de diatomeeën *Chaetoceros muelleri* en *Skeletonema costatum*.

Tabel 1 Kostprijs van media per 1000L

	Walne medium	N <sup>1</sup> /P 25:1	N <sup>2</sup> /P 25:1	N <sup>1</sup> /P 10:1	N <sup>1</sup> /P 16:1	C <sup>3</sup> /N <sup>1</sup> /P 128:16:1	N <sup>1</sup> /P+Fe 25:1	N <sup>1</sup> /P+Mn 25:1	N <sup>1</sup> /P+Vit 25:1	N <sup>1</sup> /P+Fe+Mn 25:1
€/1000L	9.91	0.85	7.679	0.73	0.64	24.4043	0.88882	0.8991	1.945865	0.92884

<sup>1</sup> NH<sub>4</sub>Cl; <sup>2</sup> NaNO<sub>3</sub>; <sup>3</sup> NaHCO<sub>3</sub>

#### Nutriënten versus lichtlimitatie

Algen maken pigmenten aan hoofdzakelijk ten behoeve van fotosynthese. Kweekomstandigheden, zoals nutriënten beschikbaarheid en lichtintensiteit beïnvloeden de mate waarin deze pigmenten worden aangemaakt. Uit onderzoek is gebleken dat de ratio tussen bepaalde pigmenten; carotenoïde (400 tot 600nm, best meetbaar bij 480 nm) en chlorofyl *a* (665 nm) een indicatie geeft van of een culture door licht of door nutriënten gelimiteerd is. Riegman en Rowe (1994) hebben in natuurlijke populaties aangetoond dat rond een ratio van 1 de algen voldoende nutriënten tot hun beschikking hebben. Naarmate de ratio verder oploopt naar 2 worden de algen in toenemende mate licht gelimiteerd. Met een spectrometer is de verhouding tussen deze pigmenten eenvoudig te bepalen en geeft direct inzicht in de limiterende factoren voor groei van de culture. Echter, in de door Riegman en Rowe (1994) geanalyseerde watermonsters werden eerst de pigmenten geëxtraheerd. Hierdoor is een calibratie waarin de golflengte van de culture (achtergrondsignaal (750nm)) wordt meegenomen noodzakelijk:

$$Ratio = \frac{A_{480} - A_{750}}{A_{665} - A_{750}}$$

Door het meenemen van het achtergrondsignaal heeft Quesnot (2012) het optreden aangetoond dat lichtlimitatie optreedt in raceway cultures, met een ~30% toename van de ratio ongeveer een dag voordat de culture in de crash fase kwam. Deze verandering in de ratio was in eerdere experimenten van Quesnot (2012) en (Maas, 2012) waarin het achtergrondsignaal niet in de berekening werd meegenomen, niet aangetoond.

#### Keuze van algen

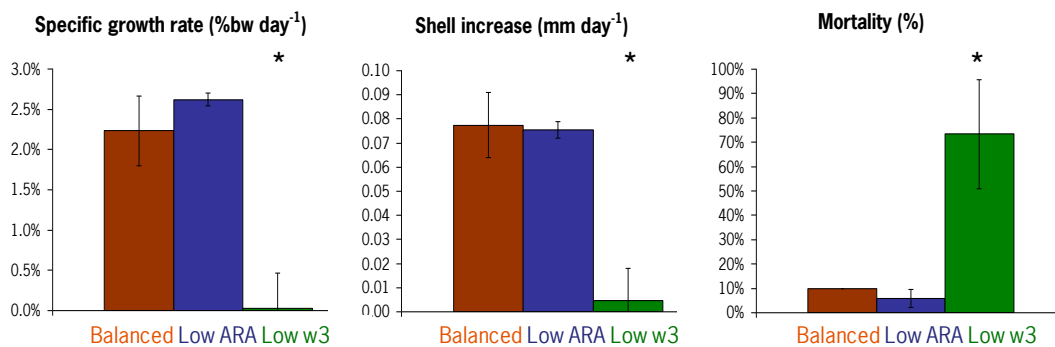
Voor een goede groei van schelpdieren dienen de te voeren algen aan een aantal voorwaarden te voldoen. Naast celgrootte (niet groter dan 30 µm) en tolerantie voor temperatuur is met name het vetzuurgehalte in de cellen van belang. Vetzuren zijn van belang voor de groei van schelpdieren en zullen in de juiste verhoudingen en hoeveelheden de groei bevorderen. Deze vetzuren zijn bepaald in een aantal algen die zijn geselecteerd op basis van voorkomen in de Oosterschelde en niet toxisch zijn (tabel 2). De aanmaak van vetzuren is te sturen door manipulatie van de kweekomstandigheden. Onder hogere stikstof concentraties en N:P ratio's vindt een toename in de vetzuurgehalten plaats. Daarnaast

zorgt een hogere N-beschikbaarheid voor een percentueel hoger gehalte aan onverzadigde vetzuren (PUFA) (Yongmanitchai and Ward, 1991). Daarnaast kan toevoeging van vitamine B12 de productie van EPA, een PUFA van belang voor de groei van schelpdieren, stimuleren tot een 65% toename in EPA productie met toevoeging van 100 ng aan vitamine B12 (Yongmanitchai and Ward, 1991).

**Tabel 2.** Vetzuurgehalten (EPA & DHA) gemeten in geselecteerde algen (bron: Kamermans et al., 2009)

Soort	% EPA	% DHA	%C	%N	%P
<i>Tetraselmis</i>	6.1	0.0	33.2	4.5	0.81
<i>Phaeodactylum</i>	29.6	2.9	29.1	3.0	0.34
<i>Skeletonema</i>	19.3	5.6	44.4	7.2	0.87
<i>Thalassiosira</i>	18.8	5.2	41.5	5.4	0.68
<i>Dunaliella</i>	0.0	0.0	16.2	1.4	0.74
<i>Pyramimonas</i>	0.0	8.7	39.2	4.9	0.45
<i>Isochrysis</i>	0.8	19.7	40.1	5.3	0.21
<i>Chaetoceros</i>	26.2	3.6	30.4	4.5	0.56

Onderzoek heeft uitgewezen dat geschikte diëten voor de kweek van schelpdieren (op basis van resultaten bij kokkels) bestaan uit algensoorten met hoge PUFA gehalten. Hiervoor zijn voederproeven uitgevoerd met diëten van verschillende samenstelling. Het dieet bestaande uit algen met hoge PUFA gehalten, met gebalanceerde vetzuurgehalten bestaande uit *Pyramimonas parkae* en *Chaetoceros muelleri*, en uit hoge vetzuurgehalten bestaande uit *Pyramimonas parkae* en *Phaeodactylum tricornutum*, laten de beste groei zijn (fig. 9). Het dieet met een laag vetzuurgehalte, bestaande uit *Brachiomonas submarina* en *Tetraselmis suecica* laten een lage groei zien en veroorzaakt daarnaast ook een hoge mortaliteit.



**Fig. 9** Groeisnelheid en sterfte van kokkels gevoerd met 3 diëten (bron: Kamermans et al., 2012)

Op basis van de selectiecriteria en de gevonden vetzuurgehalten zijn de volgende algensoorten het meest geschikt bevonden voor de outdoorkweek:

- Diatomeeën:
  - *Phaeodactylum tricornutum*
  - *Skeletonema costatum*
  - *Thalassiosira pseudonana*
  - *Chaetoceros muelleri*
- Flagellaten:
  - *Tetraselmis suecica*
  - *Pyramimonas parkae*

Daar een combinatie van verschillende algen een betere samenstelling van het dieet geeft, wordt een combinatie van een diatomee en een flagellaat aanbevolen voor een optimale groei van de schelpdieren. Het gebruik van soorten met een lagere voedingswaarde, zoals *Phaeodactylum tricornutum* en *Dunaliella tertiolecta* (Tabel 2) wordt gecompenseerd door het feit dat deze soorten in staat zijn om met extreme omstandigheden in temperatuur en saliniteit om te kunnen gaan.

Onder buitenomstandigheden presteren *Phaeodactylum*, *Chaetoceros*, *Thalassiosira*, *Tetraselmis* en *Dunaliella* het best, met celconcentraties van ~1 miljoen cellen/ml. Daarentegen bereiken *Pyramimonas* en *Skeletonema* maximaal ~0,5 miljoen cellen/ml. Onder condities in de raceways behalen met name de diatomeeën hoge celconcentraties (~1 tot 12 miljoen)(Kamermans et al., 2009; Maas 2012; Merel 2011). De celconcentraties van de flagellaten daarentegen blijven onder de 1 miljoen cellen/ml (Kamermans et al., 2009).



## **Literatuur**

Espinosa, E.P., and Bassem Allam, (2006), Comparative Growth and Survival of Juvenile Hard Clams, *Mercenaria mercenaria*, Fed Commercially Available Diets, Zoo Biology 25:513–525

Kamermans, P., A. Blanco, E. Brummelhuis, A. Smaal (2009), Zeeuwse Tong Deelproject 8: Binnendijkse schelpdierkweek, Rapport C043/09

Kamermans, P., M. Dedert, H. Jansen, T. Schellekens & A. Smaal (2012), Werkpakket 2. Schelpdieren: groei en gedrag van schelpdieren in vijverteelt.

Maas R (2012) Indicatoren voor groeilimitatie bij buitenkweek van microalgen  
Onderzoek naar het effect van licht- en nutriënt limitatie op mogelijke indicatoren voor groeilimitatie bij *Skeletonema costatum* IMARES studenten rapport 12.007

Merel, S., (2011), Improvement of a culture of algae in a raceway: *Chaetoceros muelleri*, IMARES Student report

Michels H.A.M, A.J. van der Groot, N.H Norsker & R.H. Wijffels (2010) Effects of shear stress on the microalgae *Chaetoceros muelleri*. Bioprocess Biosyst Eng. 2010 October; 33(8): 921–927.

Quesnot A (2012) Culture of algae (*Skeletonema costatum* / *Tetraselmis*) in outdoor raceways. Determine an indicator of the physiological state of the algae : the ratio A480/A665, IMARES Student report.

Spencer, B.E. (2002) General biology of bivalves with respect to cultivation In *Molluscan shellfish farming* (Spencer, B.E. ed.). Fishing News Books.

Suzuki, Y., Takahashi, M., 1995. Growth responses of several diatom species isolated from various environments to temperature. Journal of Phycology 31, 880-888

Riegman & Rowe, (1994) NUTRITIONAL STATUS AND PIGMENT COMPOSITION OF PHYTOPLANKTON DURING SPRING AND SUMMER *PHAEOCYSTIS* BLOOMS IN DUTCH COASTAL WATERS (MARSDIEP AREA) Netherlands Journal of Sea Research 32 (1): 13-21

## 2.2 Groei en gedrag van schelpdieren in vijverteelt

### 2.2.1. Doel & Aanpak

In 2011 is een onderlinge vergelijking van voedsel condities en schelpdiergroei uitgevoerd op de 3 pilots. Uit de data bleek dat voor het bepalen van optimale schelpdiergroei meer eenduidige gegevens nodig zijn over voedselcondities en fysiologische behoeften van de schelpdieren. In 2012 lag de focus daarom niet op een onderlinge vergelijking van de pilots (WP, Colijn, ZA) maar zijn er onafhankelijke metingen verricht om specifieke hypothesen per pilot te toetsen.

#### *Pilot Zeeland Aquacultuur*

De nadruk bij Zeeland Aquacultuur lag in 2012 op de relatie tussen voedselcondities en de fysiologische behoeften van de schelpdieren. Om een vergelijking tussen jaren op te stellen is er in eerste instantie (i) een monitoringsprogramma opgesteld dat gelijk was aan de metingen in 2011. Daarnaast is uit de data van 2011 gebleken dat de groei van de tapijtschelpen in de vijvers achterliep in vergelijking met schattingen gebaseerd op modelberekeningen (Zie Figuur 1). Dit duidt er op dat optimalisatie mogelijk is. Er zijn daarom ook specifieke metingen verricht om te toetsen of de achterblijvende groei veroorzaakt wordt door een mis-match in de fysiologische behoefte van de schelpdieren (ii). Op basis van de balansen wordt antwoord worden gegeven op de vraag in hoeverre voedselaanbod toereikend is voor maximale schelpdiergroei. Bij het ontwikkelen van modellen om de schelpdiergroei te voorspellen wordt er aangenomen dat zowel de voedselconcentraties als de schelpdier-dichtheden homogeen verdeeld zijn in de vijver. De aanname met betrekking tot verdeling van voedselconcentraties is getoetst (iii).

#### *Pilot Colijnsplaat*

De nadruk bij Colijnsplaat lag in 2012 op de sturende processen voor algenproductie. Daarbij worden twee aspecten belicht: (i) De voedsel en nutriënten concentraties in de vijvers zullen gekoppeld worden aan de voergift van de zagers om zodoende te bepalen hoe deze voergift doorvertaald wordt naar de algenproductie (ii) door dagelijkse en seizoenale variatie in nutriënten en algen concentraties vast te stellen werd gekeken wat de limiterende factoren voor een verhoging van algenproductiviteit zijn.

#### *Pilot Wilhelminapolder*

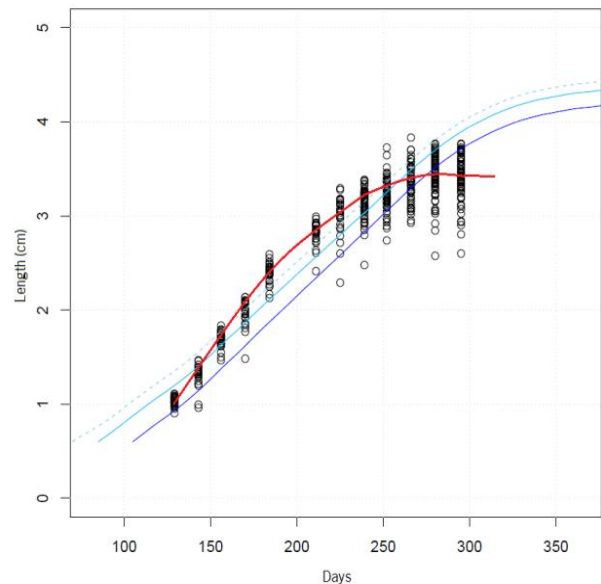
In de zomer/najaar van 2012 zijn er nieuwe bakken aangelegd waardoor de biomassa aan schelpdieren enorm vergroot kan worden. Door de werkzaamheden en verstoring van het systeem zijn er daarom in 2012 geen metingen verricht in de Wilhelminapolder. Wel is er in de beginfase gewerkt aan een (simpel)model om de potentiële biomassa aan schelpdieren te berekenen (productie scenario's).

### 2.2.3 Resultaten

#### Resultaten Pilot Zeeland Aquacultuur

##### **(1) Monitoring schelpdiergroei en algenconcentraties**

Vanaf begin April 2012 zijn de voedselcondities en schelpdiergroei gemonitord. Figuur 2 laat de schelpenlengte voor de batches uit 2011 (groen) en 2012 (blauw) zien. Daarnaast laat de rode lijn de resultaten zien van een batch tapijtschelpen die in de winter (November-Maart) gevolgd zijn. De groei van mosselen was 70% hoger in 2012 in vergelijking met 2011 (Figuur 2, Tabel 1). Dit is mogelijk een gevolg van de wijze waarop de experimentele mosselen gehouden werden. In 2011 werden de mosselen in kooitjes gehouden die, ondanks regelmatig schoonmaken, regelmatig begroeid raakten. Dit kan de water doorstroming en dus de voedseltoevoer negatief beïnvloed hebben. Er is daarom in 2012 gekozen om de mosselen in (uien)zakken te houden. Deze bleven relatief schoon we kunnen dus aannemen dat er

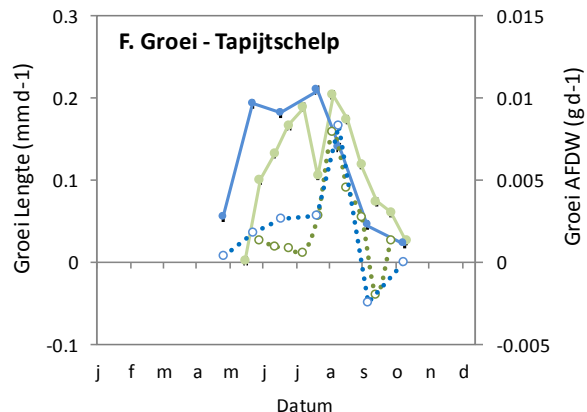
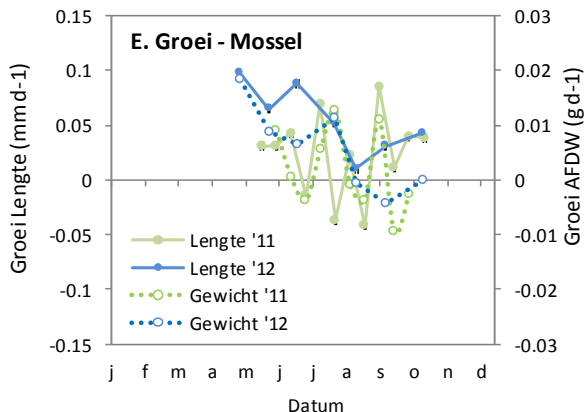
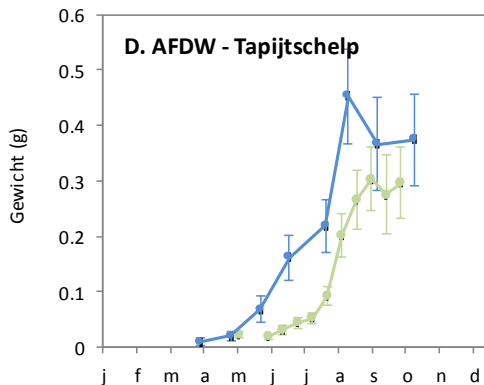
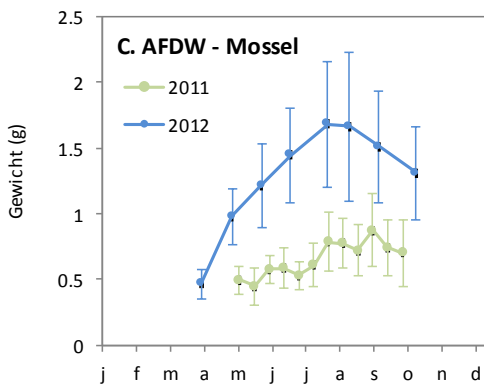
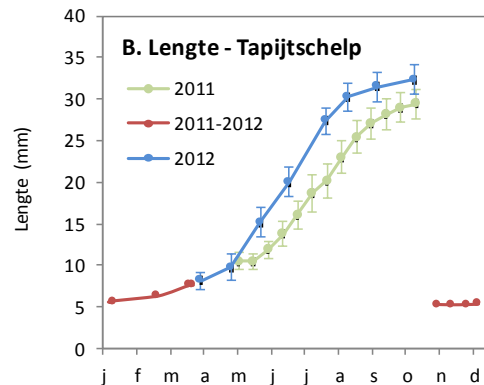
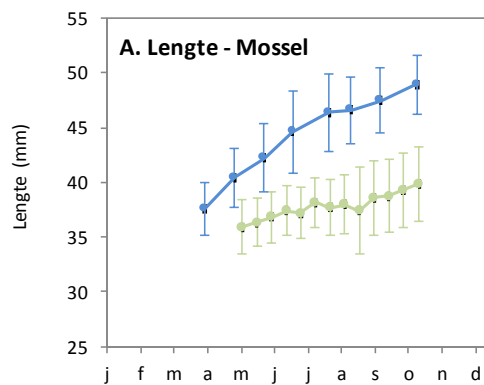


*Figuur 1*

*Groei van tapijtschelpen in lengte in 2011. De blauwe lijn geeft de groeivoorspellingen op basis van het DEBmodel, de open cirkels geven de gemeten groei weer waarbij de rode lijn het gemiddelde van de gemeten waarden weergeeft. Groei in as-vrij drooggewicht levert een soortgelijke vergelijking op aangezien er een sterke correlatie bestaat tussen AFDW en lengte.*

voledende water langs de mosselen kon stromen. De tapijtschelpen zijn in 2011 en 2012 op een vergelijkbare wijze uitgezet en bemonsterd. Echter, ondanks dat de tapijtschelpen in 2012 ongeveer een maand eerder uitgezet werden dan in 2011, en in eerste instantie een snellere groei waargenomen werd (Figuur 2F), bereikten zij aan het einde van het seizoen een vergelijkbare lengte (circa 30mm, Figuur 2B). Het natgewicht van de schelpen is in 2012 niet bepaald aangezien er voorgaande jaren gebleken is dat er een goede (lineaire) relatie bestaat tussen het as-vrij-droog-gewicht en het natgewicht:  $AFDW=0.0718*NW$   $r^2=0.92$  voor tapijtschelpen en  $AFDW=0.1235*NW$   $r^2=0.74$  voor mosselen op basis van de 2011 data.

Voor de mosselen werden vergelijkbare trends waargenomen in de groeisnelheden van de schelp en het tissue materiaal (Figuur 2E). Ondanks dat de schelp nog licht doorgroeide aan het einde van het seizoen nam het vleesgewicht af wat leidt tot een afname van de conditie van de mosselen. Bij de tapijtschelpen waren de groeisnelheden van de schelp en het vlees echter verschillend van elkaar. Onafhankelijke schelp en tissue groei is vaker beschreven voor schelpdieren onder natuurlijke condities. Hilbish (1986), Witbaard et al. (2012) en Strohmeier et al (in press) lieten eerder zien dat seizoenspatronen in schelpgroei en tissuegroei niet aan elkaar gekoppeld waren en dat gedurende bepaalde periodes de energie die verkregen wordt met het voer eerder aan tissuegroei besteed wordt (inclusief reproductie) dan aan de groei van de schelp. De exacte sturende processen die zowel groei van de schelp als van de tissue beschrijven zijn (nog) niet geheel duidelijk.



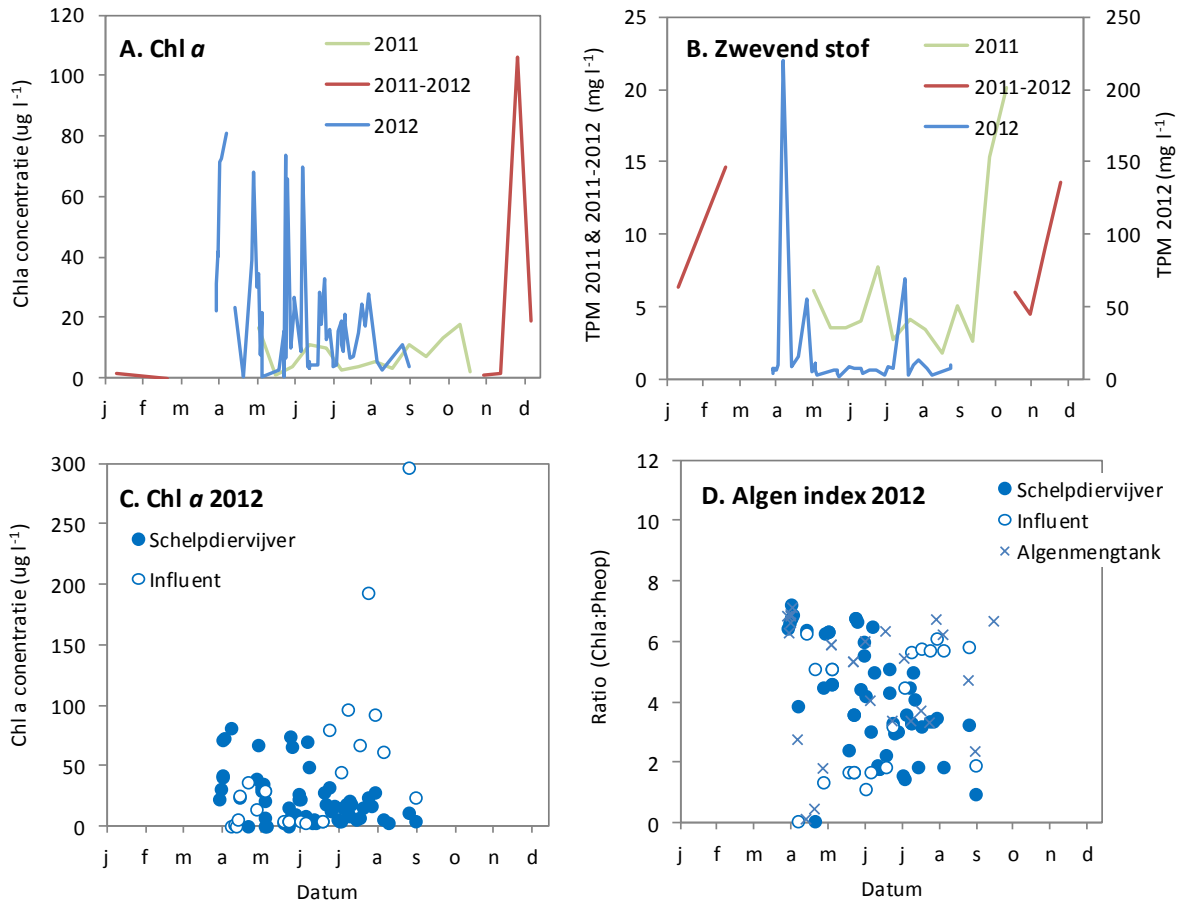
*Figuur 2 Groei van schelpdieren in de pilot 'Zeeland Aquacultuur' in 2011 (Mei-Oktober), de winter periode 2011-2012 (November – Maart) en gedurende 2012 (April-Oktober).*

*Tabel 1 Gemiddelde schelpdiergroei (in mm per week) in de verschillende pilots gedurende drie meetperiodes.*

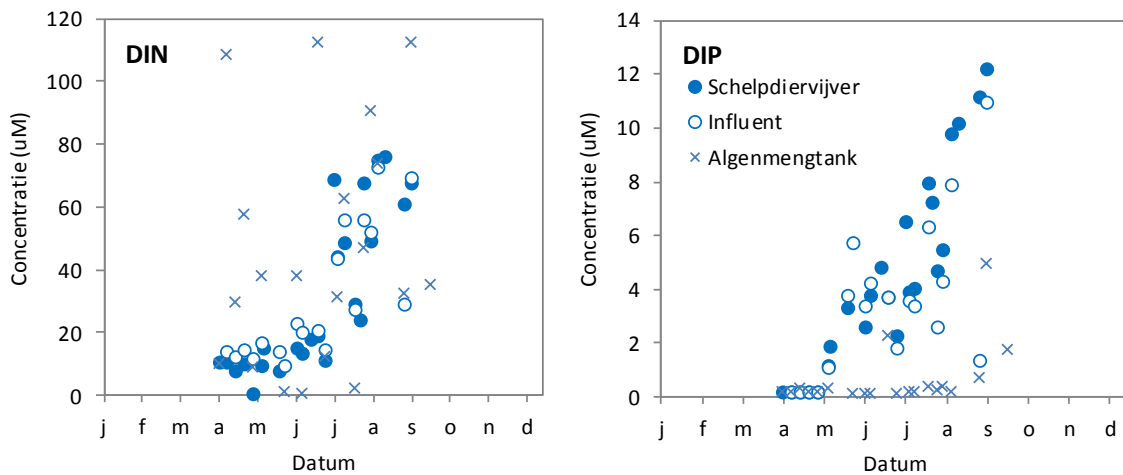
Pilot	Mei-Nov 2011		Nov 2011 – Maart 2012		April-Okt 2012	
	Tapijtschelp	Mossel	Tapijtschelp	Mossel	Tapijtschelp	Mossel
Colijnsplaat	0.87	0.19	0.03	0.19		
Wilhelminapolder	0.68	0.25	0.04	0.16		
Zeeland Aqua.	0.87	0.23	0.07	0.09	0.83	0.39
Gemiddeld	0.81	0.22	0.05	0.16		

In de periode Mei-Juli zijn de Chla concentraties in de schelpdiervijver in 2012 hoger dan in 2011 (Figuur 3A). Ondanks dat begin Juli de voedseltoevoer naar de schelpdiervijver is verhoogd (zie toegenomen concentraties in de influent, Figuur 3C) leidde dit niet tot verhoogde voedselconcentraties in de schelpdiervijver. Dit geeft aan dat door filtratieactiviteit van de schelpdieren de algen snel uit het water verwijderd worden. Aan het einde van het seizoen (Sept-Nov) is er beduidend minder gevoerd (data ZA pilot). In 2012 zijn er op frequente basis monsters genomen om de Chlorofyl concentraties vast te stellen (2-3x per week in 2012 in vergelijking met 1x per twee weken in 2011). Deze hoge bemonsteringsfrequentie laat zien dat er een grote dag-tot-dag variatie in Chla concentraties plaats vindt welke direct gerelateerd is aan het management van de pilot. Het gehalte zwevende stof, exclusief de drie uitschieters (zie figuur x), was  $7.1 \pm 2.6 \text{ mg l}^{-1}$  in de schelpdiervijver (Figuur 3B),  $15.8 \pm 14.9 \text{ mg l}^{-1}$  in de influent en  $39.2 \pm 15.9 \text{ mg l}^{-1}$  in de algenmengtank. Daarnaast was ook de fractie organisch materiaal hoger in de algenmengtank ( $70 \pm 5\%$ ) in vergelijking met de monsters uit de schelpdiervijver ( $57 \pm 9\%$ ) en de influent ( $55 \pm 11\%$ ). De influent bestaat uit water afkomstig uit de algenmengtank aangevuld met Oosterschelde water en water dat gerecirculeerd wordt in het systeem. De AlgenIndex (Figuur 3D) geeft de relatie tussen Chla en pheopigmenten weer. Deze ratio is een indicator voor de gezondheid van de algen, waarbij geldt dat een hogere ratio een betere gezondheid weergeeft. Aan het begin van het seizoen was de index in de schelpdiervijver in enkele gevallen hoger dan de index in de algenmengtank. Dit lijkt tegenstrijdig, maar het is bleken dat in die periodes de algencultures in elkaar gestort waren wat mogelijk de lage waarden in de algenmengtank kan verklaren. De hogere waarden in de schelpdiervijver kan op een interne productie van algen in de vijvers duiden, wat goed mogelijk is omdat de schelpdier biomassa op dat moment laag was. Aan het einde van het seizoen is de index in de algenmengtank en in het influent vrijwel altijd hoger dan in de schelpdiervijver.

De concentraties anorganische nutriënten (dissolved inorganic nitrogen [DIN]; dissolved inorganic phosphorus [DIP]) nemen in de schelpdiervijver en in de influent toe gedurende het seizoen (Figuur 4). Anorganische nutriënten in de schelpdiervijver zijn afkomstig van externe input (water uit algenmengtank en Oosterschelde), maar worden ook toegevoegd door het metabolisme van de schelpdieren (uitscheiding van  $\text{NH}_4$  en  $\text{PO}_4$ ) en door decompositie van organisch materiaal op de bodem van de vijver (oa feces van de schelpdieren). Opvallend zijn de hoge concentraties DIN, welke voor  $>75\%$  uit ammonia bestaat en voor een kleiner deel uit nitraat en nitriet. De hoge concentraties DIN, en met name de relatief lage DIP concentraties in de algenmengtank resulteren in hoge NP ratio's voor de algenmengtank ( $119 \pm 114$ ). NP ratio's in de schelpdiervijver en influent zijn respectievelijk  $7 \pm 3$  en  $10 \pm 2$ . Samen met de resultaten van de NSi ratio's die  $1.9 \pm 2.2$  waren voor de algenmengtank,  $1.4 \pm 0.8$  voor de schelpdiervijver en  $1.9 \pm 1.5$  in de influent, duidt dit erop dat de algengroei (in de algenvijvers) fosfaat gelimiteerd was.



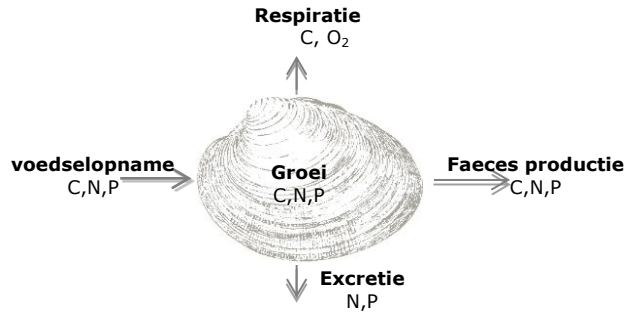
Figuur 3 Voedselcondities in de vijvers van de pilot 'Zeeland Aquacultuur'



Figuur 4 Concentraties opgeloste anorganische nutriënten in de vijvers van de pilot 'Zeeland Aquacultuur' in 2012. (dissolved inorganic nitrogen [DIN]; dissolved inorganic phosphorus [DIP])

## (2) Eco-fysiologie irt optimalisatie schelpdiergroei

In de periode Mei-Augustus zijn er verschillende experimenten uitgevoerd om de eco-fysiologie van de tapijtschelpen in de vijvers beter in kaart te brengen met het doel mogelijke oorzaken voor groeivertraging te bepalen. Hierbij wordt oa gekeken naar filtratiesnelheden, voedselopname, respiratie, excretie, feces productie en nutriënten balansen (zie Figuur 5).



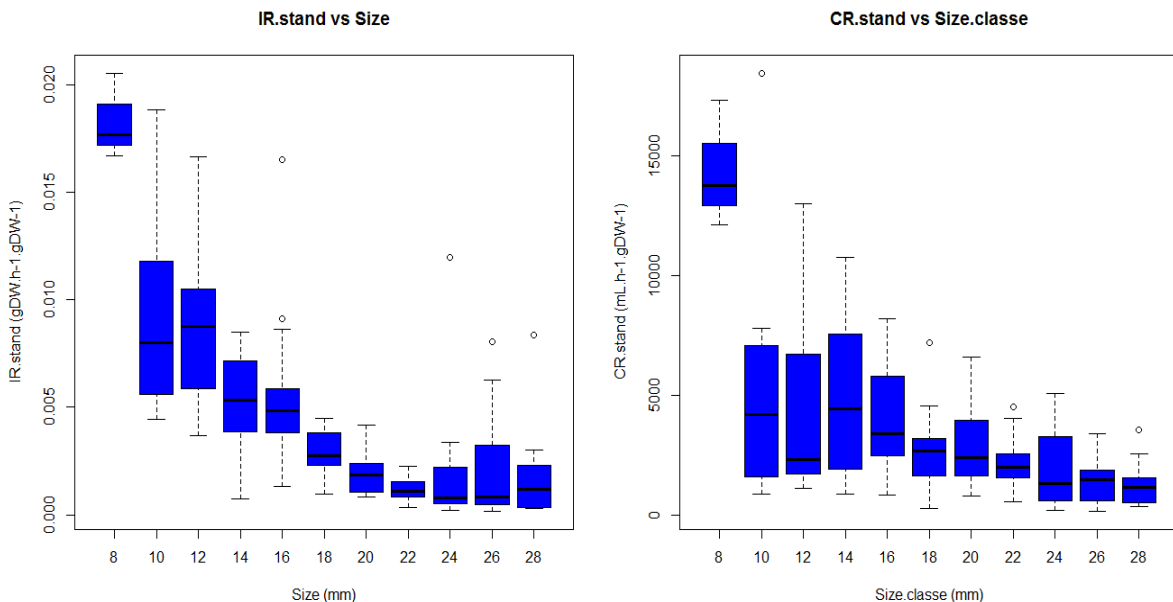
Figuur 5 Schematische voorstelling van onderzochte processen en de bijbehorende elementen C, N en P.

De Eco-fysiologie experimenten zijn opgedeeld in twee studenten onderzoeken. Het ene zoekt naar een verklaring voor groeivertraging in de voedselconcentraties (voedselkwantiteit) en fysieke limitaties als functie van de grootte van individuen (Debeuf, 2012). Het andere studentenproject zoekt naar verklaringen in verschillen tussen nutriënten composities van het voedsel (voedselkwaliteit) en het individu (Ten Brinke, 2012).

Voor de beide experimenten zijn algen samples, faeces samples en tapijtschelpen onderzocht in een vijver van Zeeland Aquacultuur (Yerseke), en zijn de bovengenoemde processen gecorreleerd aan temperatuur, voedselconcentraties, voedselkwaliteit en grootte van individuen.

### Fysiologie

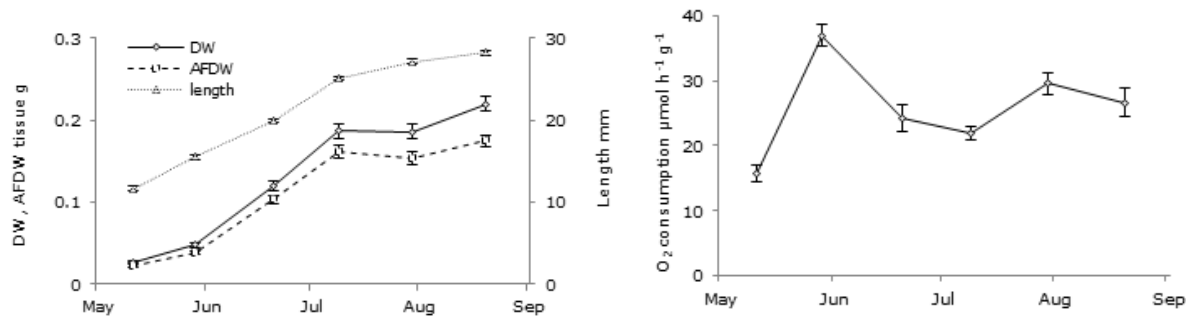
Uit de metingen van Deveuf (2012) blijkt dat voedselopname (gram voedsel opgenomen per uur per gram individu) negatief gecorreleerd is met de grootte van een individu (zie Figuur 6).



Figuur 6 Gestandaardiseerde voedselopname (IR) en filtratie (CR) in relatie tot individuele grootte (size).

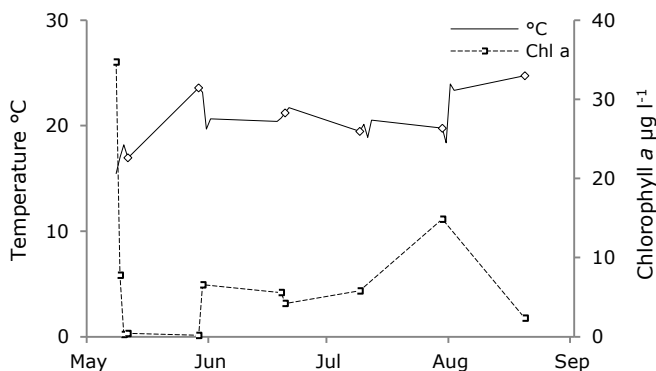
In de loop der tijd groeit het individu in volume en gewicht. De sifon waarmee water gefiltreerd wordt, en voedsel binnengehaald, vergroot alleen in oppervlakte. Als men stelt dat de hoeveelheid water en voedsel daarin dat binnengehaald wordt stijgt met de oppervlakte van de sifon-opening en dat het gewicht van een individu stijgt met het volume, verhoudt de voedselinname per gram individu zich als

sifon-oppervlakte : volume  $\sim a \cdot \text{Lengte}^2 : b \cdot \text{Lengte}^3$  (Kooijman 2010, met a en b als constanten). Als een individu groeit in lengte zal het volume daarom sneller toenemen dan de sifon-opening. Hierdoor neemt de voedselopname per gram individu af als het individu groeit. Daarentegen blijkt uit metingen van Ten Brinke (2012) dat respiratie geen relatie met individuele grootte vertoont (zie Figuur 7).



Figuur 7 Verloop van gewicht (asvrij drooggewicht; AFDW, drooggewicht; DW) en lengte van tapijtschelpen over de tijd (linker paneel). Verbruik van zuurstof per gram individu gemeten op 6 punten in de tijd (rechter paneel).

Door de fysieke limitaties van het groter worden, en het gelijk blijven van de onderhoudskosten worden tijdens de groei de eisen van voedselconcentraties hoger. Zo zal een groter individu een hogere voedselconcentratie nodig hebben dan een klein individu. Uit metingen van Chlorofyl in de vijver blijkt echter dat er geen structurele toename van chlorofyl a concentratie over de tijd heeft plaatsgevonden, alleen begin juni en augustus is een hogere concentratie aangetroffen dan daarvoor (zie Figuur 8).



Figuur 8 Verloop van chlorofyl a en temperatuur over de tijd.

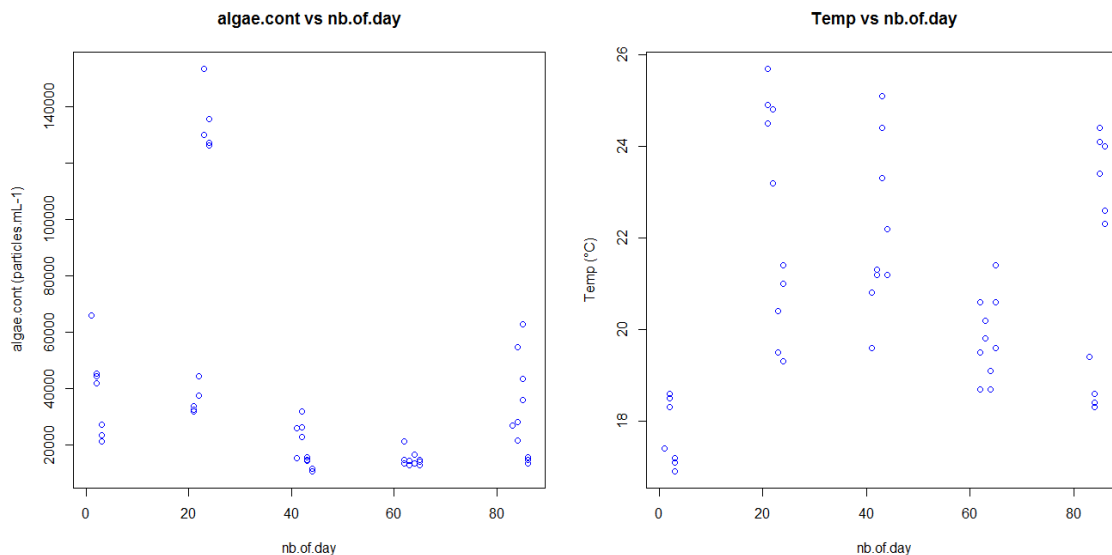
De toenemende fysieke limitatie en noodzaak voor hogere voedselconcentraties, waar deze niet hoger werden, kan mede als oorzaak voor de groeivertraging hebben opgetreden (Debeuf, 2012).

#### Variabiliteit

Uit waarnemingen van algen counts door Deveuf (2012) lijkt nog een andere verklaring voor de groeivertraging mogelijk (Figuur 9).

Uit Figuur 9 blijkt dat de variatie in algenconcentratie (over de dag, week en tussen meet-weken) hoog is. Mogelijke oorzaken voor deze variatie in algen toevoer zouden zowel problemen met pompen als problemen met kweek van algen kunnen zijn.

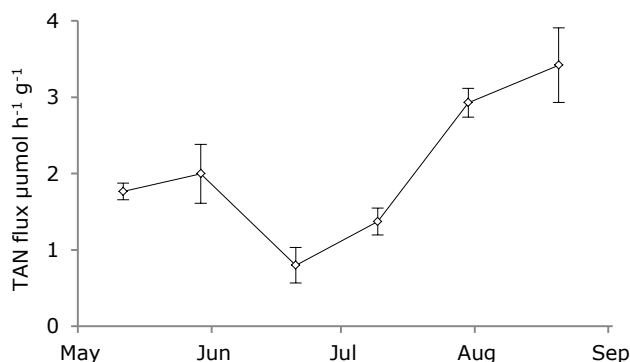
Robert et al. (1993) stellen dat scherpe variabiliteit in o.a. voedselaanbod groei kunnen vertragen doordat schelpdieren eerder dicht gaan, waardoor er minder gefiltreerd kan worden.



Figuur 9 Variatie in algen counts (links) en temperatuur meerdere keren gemeten op meet-dagen (drie of vier meet-dagen in een meet-week).

### Reproductie

De metingen van Ten Brink (2012) laten een onbalans zien tussen de nutriënten (C:N) aanvoer dmv algen en nutriënten in het lichaam van tapijtschelpen. Bij nader onderzoek door dissectie van enkele tapijtschelpen bleek dat deze reproductief materiaal (gonaden) aan het aanmaken waren. Omdat gonaden rijk zijn aan N, wordt door de aanmaak van gonaden de vraag naar N ook hoger. Uit Figuur 10 blijkt verder dat ammonia excretie opliep vanaf juli. Dit wijst mogelijk op een aanstaande reproductie.



Figuur 10 Verloop ammonia (TAN) excretie.

Ontwikkeling van de gonaden zou ook kunnen betekenen dat energie dat normaal gebruikt wordt om te groeien in plaats daarvan wordt gebruikt om reproductieve massa te kweken. Daarmee is een aanstaande reproductie, naast fysieke limitaties en variabiliteit in algen concentraties, de derde mogelijke oorzaak voor de ondervonden groeivertraging.

### (3) Spatiële en temporele variatie in algenconcentraties

In Augustus zijn metingen uitgevoerd om de spatiële variatie in algenconcentraties in kaart te brengen door een student (Bezault, 2012). Centrale vraag bij dit onderzoek was: vindt er depletie van voedsel plaats over het verloop van de vijver? Om deze vraag te beantwoorden is op drie dagen in Augustus op 18 vaste plaatsen langs de schelpdijvijver van Zeeland Aquacultuur fluorescentie gemeten en omgerekend naar chlorofyl a concentraties.

#### Spatiële variatie

Uit de metingen blijkt dat er depletie van voedsel optreedt op twee manieren. Ten eerste wordt de concentratie voedsel lager van eerste inflow naar outflow. Om het verschil tussen begin en eind van de vijver te verminderen zijn 8 inflow punten geïnstalleerd. En tweede type spatiële variatie die we zien



door deze extra inflow punten is dat er tussen deze punten ook depletie van voedsel optreedt. Het gevolg van deze twee typen variatie is een golvende afname in voedselconcentratie over de lengte van de vijver (zie Figuur 11).

Leng	IP 0	IP 3	IP 6	IP 9	IP 12	IP 15	IP 18	IP 21	IP 24	IP 27	IP 30	IP 33	IP 36	IP 39	IP 42	IP 45	IP 48	IP 50	
0										0.208519									
1			0.543038	0.413578	0.402807		0.257239		0.217017	0.213361	0.1540	0.2185	0.179761	0.248841			0.212768		
2	0.819646			0.43107	0.374444		0.265837	0.21761	0.228876			0.236782	0.189544				0.198735		
3	0.798399			0.409131			0.440854	0.281451	0.275027		0.195573	0.153474	0.222453	0.251013	0.248348	0.203182	0.127878		
4	0.767467						0.423955	0.279079	0.259413			0.129657	0.191719	0.227394	0.218302		0.187074	0.175808	
5				0.371479	0.369602		0.280462		0.225615			0.144382	0.231841	0.220476	0.220575		0.216622	0.217413	
6	0.815397		0.535923				0.386698	0.443819	0.261093			0.150707	0.199921		0.252989	0.171756	0.146951	0.20081	0.210199
7	0.787133	0.683664		0.423164	0.380374	0.417826			0.210989			0.149125				0.217215	0.174227		
8		0.673189	0.511908		0.392526							0.152485				0.200119	0.195968		0.205949
9	0.805514	0.658662	0.523273							0.197549	0.183417	0.246665				0.236486		0.218006	0.18569
10	0.797806	0.608855	0.52265					0.2521	0.184109	0.191916		0.14201		0.200415	0.18233	0.254966			0.165728
11		0.666864	0.516849	0.425338		0.435517		0.260698		0.154363	0.14369								0.156024
12				0.374444		0.41348				0.209507	0.143591								0.16642
Ave	0.830714	0.697599	0.554277	0.425594	0.407048	0.45086	0.300005	0.276492	0.244079	0.215216	0.154882	0.254795	0.237515	0.255478	0.255927	0.223762	0.227205	0.211304	

Figuur 11 Algenconcentraties (relatief tot het maximum gevonden tijdens meting 1) tijdens experimentdag 1 op 18 plaatsen langs de vijver op 13 breedtegraden van de vijver (meting was niet mogelijk bij breedtegraden 0 en 12 door gebrek aan diepte in de vijver voor diepgang van fluorometer). Vetgedrukte waarden zijn waarden onder het gemiddelde van de lengtegraad (onderste waarde). De lijnen geven een groepering van de voedselconcentraties aan die onder het gemiddelde vallen

### Temporele variatie

Tabel 2 laat het debiet op de verschillende inflow punten over de drie metingen zien.

Input	exp1	exp2	exp3
1	0.1 L/s	=	-
2	0.4 L/s	=	--
3	0.4 L/s	=	-
4	0.4 L/s	=	=
5	0.4 L/s	=	+
6	0.4 L/s	=	+
7	0.2 L/s	=	+
8	0.3 L/s	=	++

Tabel 2 Debiet op de 8 inflow punten tijdens experiment 1, en verandering in debiet t.o.v. experiment 1 in experiment 2 en 3. "=": gelijk, "--": minder, "+": meer dan in experiment 1.

Het effect van de verandering in debieten tijdens exp. 3 was zeer merkbaar in het verloop van depletie over de lengte van de vijver (zie Figuur 13 en vergelijk met Figuur 12). Door de verhoogde debieten aan het eind van de vijver is er niet langer depletie zichtbaar over de gehele lengte van de vijver, maar slechts tussen de inflow punten. Waar eerst de gemiddelde minimumconcentratie 21% van het maximum (experiment 1) en 50% van het maximum in de vijver (experiment 2) was, werd na het veranderen van het debiet de gemiddelde minimumconcentratie niet meer gevonden aan het eind van de vijver (66% van het maximum, experiment 3).

leng	0	3	6	9	12	15	18	21	24	27	30	33	36	39	42	45
1	0.763648	0.821577	0.898189	0.672437		0.66245	0.639814		0.627169	0.605193		0.574567				
2			0.719707			0.62783	0.617843			0.611831	0.621838					0.459521
3		0.807777	0.723702	0.673103		0.637816	0.619174		0.627822	0.613848		0.579228	0.565276			0.494341
4	0.73036		0.709055				0.635153			0.614514	0.629161					
5	0.778961		0.698402		0.679096		0.601864	0.665119	0.612517	0.625832	0.619174	0.556591				0.472969
6		0.767643	0.721039			0.654461	0.641811		0.610519	0.61984		0.558589	0.490346	0.55992	0.496072	0.481957
7	0.784953	0.729694	0.731691	0.689081			0.659787	0.655792	0.597204	0.630493	0.593209	0.567909	0.496338	0.565912	0.466511	0.480892
8		0.706391	0.719707	0.681092	0.677763		0.672437	0.674434	0.593209		0.606525		0.490945	0.555925	0.4753	0.480759
9	0.818901		0.711718		0.635153	0.669108		0.669108	0.609188		0.606525	0.573901		0.557923	0.466378	0.470373
10				0.650466	0.639814	0.651432		0.673768	0.59787			0.568575	0.533089	0.553928	0.483156	
11					0.656458						0.61984	0.58522	0.518509		0.499134	
12															0.51285	
Av	0.786285	0.774168	0.733755	0.6958	0.681758	0.669229	0.680245	0.676062	0.618267	0.68026	0.641811	0.592321	0.53752	0.574101	0.519358	0.496538

Figuur 12 Algenconcentraties (relatief tot het maximum gevonden tijdens meting 1) tijdens experimentdag 2 op 18 plaatsen langs de vijver op 13 breedtegraden van de vijver (meting was niet mogelijk bij breedtegraden 0 en 12 door gebrek aan diepte in de vijver voor diepgang van fluorometer). Vetgedrukte waarden zijn waardes onder het gemiddelde van de lengtegraad (onderste waarde). De lijnen geven een groepering van de voedselconcentraties aan die onder het gemiddelde vallen.

Leng	IP 0	IP 3	IP 6	IP 9	IP 12	IP 15	IP 18	IP 21	IP 24	IP 27	IP 30	IP 33	IP 36	IP 39	IP 42	IP 45	IP 48	IP 50
1				0.731432	0.656566	0.722519	0.748069		0.787285	0.718954		0.728461	0.79085		0.755791	0.71954	0.705882	
2			0.647653		0.67142		0.777184	0.827689	0.775401	0.788322		0.758695	0.746286		0.758766			0.777778
3	0.688651	0.688057	0.656596				0.761141	0.762923	0.732026	0.736423		0.737968	0.773024	0.851456		0.683898	0.7439	0.767083
4			0.636364	0.730838	0.676173	0.718954	0.764432	0.828877	0.77956	0.78502	0.660131	0.73262			0.727368	0.647059	0.748865	0.729055
5	0.68568		0.654189		0.669043	0.756387	0.756387	0.915627	0.807487	0.80834		0.708853	0.773024			0.648247	0.74701	0.755199
6		0.683898			0.672014	0.741533			0.802733		0.657398	0.698752			0.720737	0.693495		
7	0.677356		0.651812		0.67142	0.724956		0.898662			0.6388	0.653001			0.683304	0.660725	0.686869	0.69702
8					0.676173	0.756982				0.743672		0.713012	0.734997	0.805704	0.698752	0.682115	0.686869	0.683898
9	0.676768		0.647633	0.718954	0.654783		0.721331		0.720083	0.603446			0.73975	0.855615	0.726084	0.708853	0.775995	
10	0.690434	0.666667	0.654189	0.682709	0.666072		0.742721	0.859774	0.800357	0.800357	0.800357	0.800357	0.75104	0.787285	0.741533		0.721926	0.721926
11		0.622103	0.644088	0.688651	0.67855		0.778966		0.771836	0.745455			0.742721		0.693999	0.669043	0.710636	
12					0.729649								0.784908		0.751631			
Ave	0.697445	0.699396	0.66321	0.736834	0.678105	0.759412	0.782207	0.891536	0.81125	0.7725	0.666488	0.75098	0.779659	0.86126	0.732472	0.685032	0.727543	0.78978

Figuur 13 Algenconcentraties (relatief tot het maximum gevonden tijdens meting 1) tijdens experimentdag 3 op 18 plaatsen langs de vijver op 13 breedtegraden van de vijver (meting was niet mogelijk bij breedtegraden 0 en 12 door gebrek aan diepte in de vijver voor diepgang van fluorometer). Vetgedrukte waarden zijn waardes onder het gemiddelde van de lengtegraad (onderste waarde). De lijnen geven een groepering van de voedselconcentraties aan die onder het gemiddelde vallen.

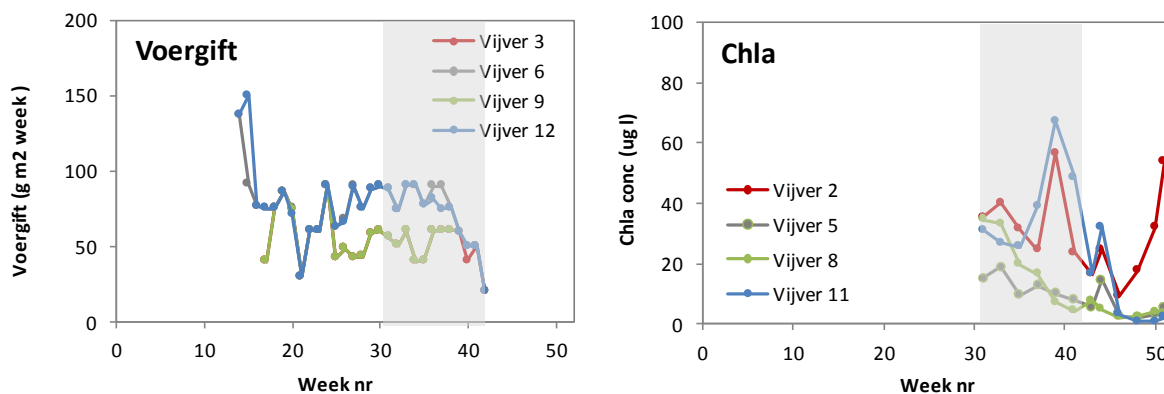
## Conclusie

Hoewel uit deze proeven vooral blijkt dat er veel variatie in tijd en ruimte is in voedselconcentraties, is het wellicht mogelijk om uit het verloop van concentraties filtratie-activiteit af te lezen. In de eerste 5 lengtegraden (0 t/m 12m) is in alle experimenten veel depletie ondanks dat er 3 (nr 1 t/m 3 uit Tabel 2) van de 8 inflow punten in dit transect aanwezig zijn. Dit zou kunnen duiden op een hoge filtrerende biomassa. Ter hoogte van de volgende 2 lengtegraden (15 en 18m) neemt de voedselconcentratie weer toe in alle 3 de experimenten ondanks dat er maar 1 inflow punt is gevestigd (punt 4 in Tabel 2). Dit duidt erop dat de filtrerende biomassa hier lager is, of dat er minder gefiltreerd wordt.

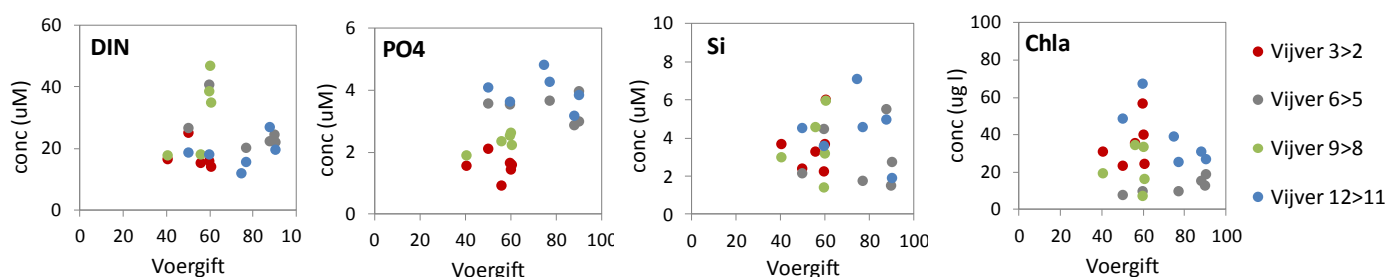
## Resultaten Pilot Colijnsplaat

### (1) Relatie voergift Chla en nutriënten concentraties

Er is over een korte periode informatie beschikbaar van zowel de voergift in de zager/vis vijver als algen en nutriënten concentraties in de daaraan gekoppelde algenvijver (zie Figuur 14, Figuur 15, Tabel 3). Deze data laat geen duidelijke correlatie zien tussen voergift en algen concentraties. Hieruit blijkt dat een hoge biomassa en gerelateerde voergift niet vanzelfsprekend leidt tot hoge nutriënten en algen concentraties. Vijver 6 en 12 hebben een vergelijkbare voergift, echter in de geschakelde algenvijvers leidt dit in vijver 5 tot een relatief lage en in vijver 11 tot een hoge algenproductie. Daarentegen is de voergift in vijver 3 veel lager, maar worden wel relatief hoge algenconcentraties waargenomen in vijver 2.



Figuur 14 Voergift (links) en Chla concentraties (rechts) in de verschillende vijver systemen in 2011. De grijze box geeft de periode aan wanneer er zowel chla data als voergift data beschikbaar is



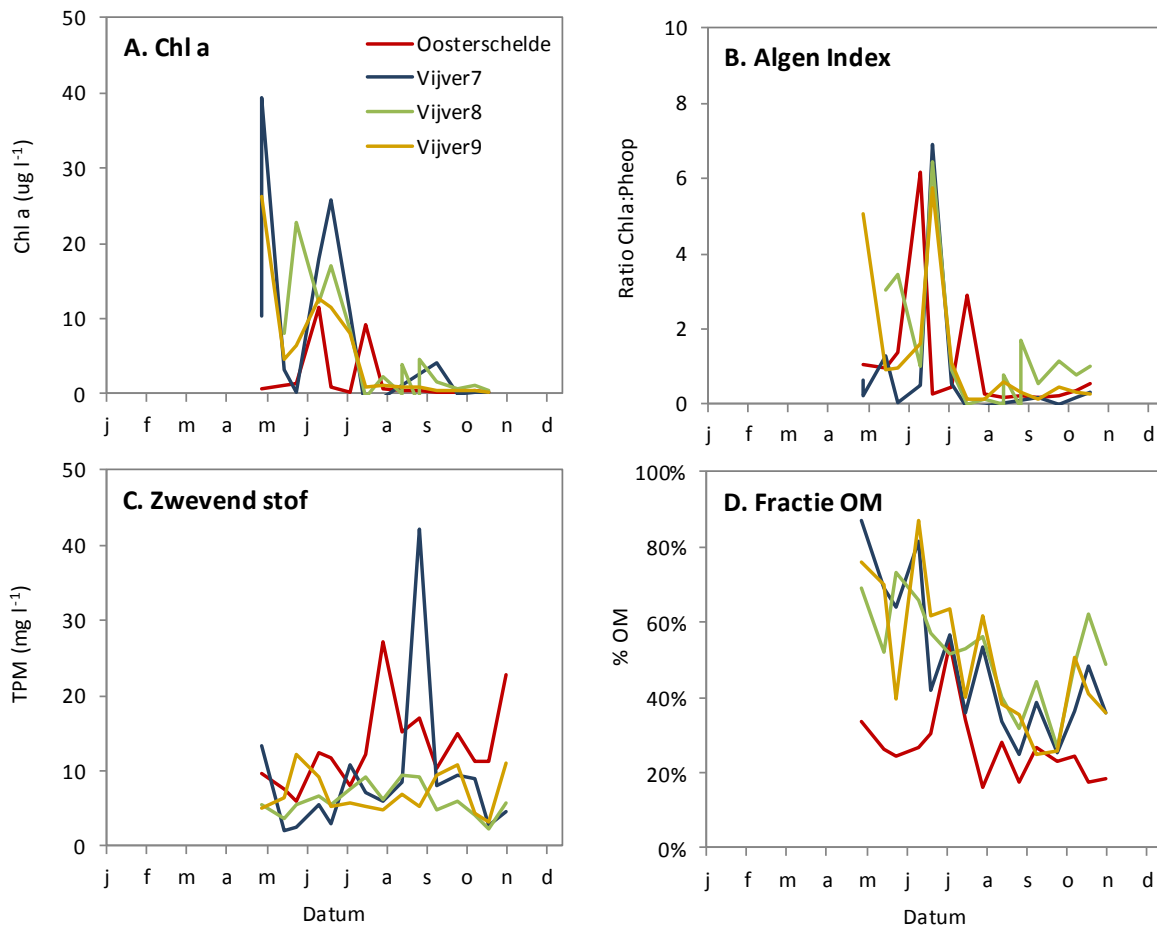
Figuur 15 Correlatie tussen voergift (x-as) en stikstof (DIN), fosfaat (PO4), silicaat (Si) en Chla in de verschillende vijversystemen voor de periode Aug-half Okt (week 31-42) (grijze box in bovenstaande figuur).

Tabel 3 Biomassa tong en zagers in de vijvers op 'Colijnsplaat' in 2011

	Biomassa Tong (week 43/44 2011)	Biomassa zagers (week 40 2011)
Vijver 3	201	1500
Vijver 6	471	1650
Vijver 9		1000
Vijver 12	486	2150

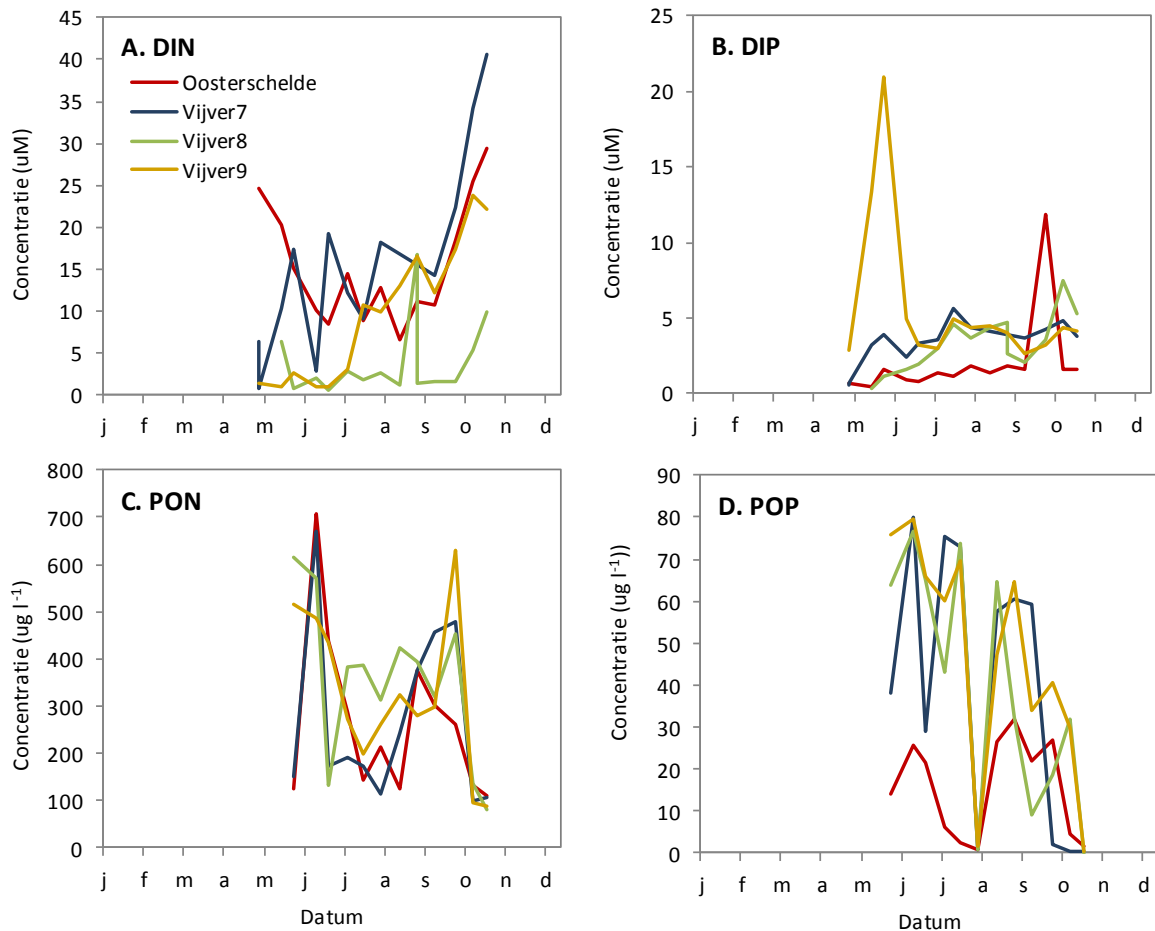
## (2) Monitoring Nutriënten en algen concentraties in 2012

Daarnaast zijn er van Mei tot November 2012 in de geschakelde vijvers 7>8>9 de algen concentraties, het zwevend organisch materiaal en de nutriënten concentraties gemonitord. Vijver 7 bevat volwassen tong, zagers en schelpdieren, vijver 8 wordt gebruikt als algen vijver en vijver 9 wordt gebruikt voor de productie van juveniele tong, zagers en schelpdieren. Vijver 7 ontvangt Oosterschelde water en de stroomingsrichting is dus van vijver 7 naar 8 naar 9. De Chla concentratie is variabel in alle bemonsterde vijvers, en hoogste waarden worden waargenomen in vijver 7 en 8. Dit duidt erop dat ondanks dat er een grote biomassa aan schelpdieren aanwezig is in vijver7, de interne primaire productie hoog is. Een andere verklaring voor de hoge waarden in vijver 7 kan zijn dat er geen goede mixing van de waterkolom plaats vindt en de algenconcentraties enkel afnemen in de onderste laag van de vijvers (als het ware creatie van een 'benthic boundary layer' zoals deze ook op natuurlijke schelpdierbedden is waargenomen). Het gehalte zwevend stof is het hoogste in het inkomende Oosterschelde water (Figuur 16C), maar bevat relatief weinig organisch materiaal (Figuur 16D). In alle vijvers nam de fractie organisch materiaal af gedurende het seizoen. De fitheid van de algen wordt uitgedrukt in de AlgenIndex, en met uitzondering van de maanden Juni en Juli, geeft deze index lage waarden weer.



Figuur 16 Variatie in algen concentraties en overige opgelost materiaal gedurende 2012 in de pilot 'Colijnsplaat'

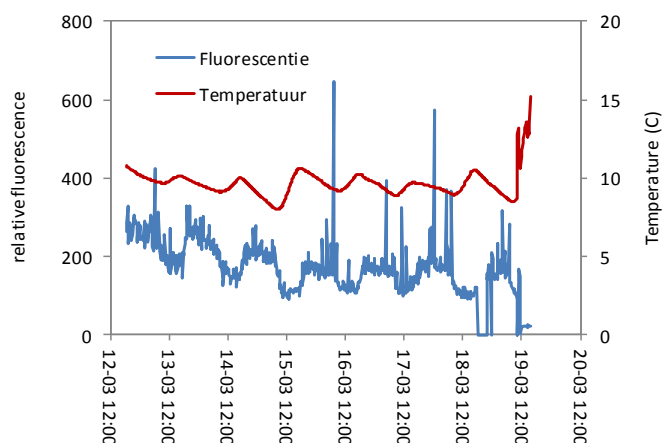
De concentraties opgelost stikstof (DIN) was het hoogst in vijver7 en wordt veroorzaakt door de instroom van nutriëntenrijk Oosterschelde water en metabolische activiteit van de vissen, schelpdieren en zagers in de vijver. Ook decompositie van organisch materiaal (oa feces) draagt bij aan de concentraties anorganische nutriënten in de vijvers. DIN concentraties waren laag in Vijver8, wat laat zien dat de algen de nutriënten opnemen. DIP concentraties waren hoger in alle vijvers in vergelijking met het Oosterschelde water. Lage DIN, en vergelijkbare DIP waarden duiden erop dat de algengroei in vijver8 gelimiteerd werd door de aanwezigheid van voldoende stikstof. Ook de zeer lage NP ratio's in vijver8 ( $1.0 \pm 0.9$ ) geven aan dat stikstoflimitatie optreedt.



Figuur 17 Variatie in opgeloste anorganische (AB) en organische (CD) nutriënten gedurende 2012 in de pilot 'Colijnsplaat'. (dissolved inorganic nitrogen [DIN]; dissolved inorganic phosphorus [DIP]; particulate organic nitrogen [PON]; particulate organic phosphorus [POP])

### (3) Dagelijkse variatie in algen en nutriënten concentraties

Om naast de variatie over de lange termijn inzicht te krijgen in de dagelijkse variatie zijn twee metingen uitgevoerd. In maart is er gedurende enkele dagen ene fluorescentie meter in de schelpdijvijver geplaatst welke om de 10 minuten een meting nam. Uit deze metingen is voor zowel de temperatuur als voor de algenconcentratie een duidelijk dag-nacht ritme te onderscheiden (Figuur 18). De algen concentraties kunnen gedurende de nacht 1.5-2x lager zijn dan overdag.



Figuur 18 Dagelijkse variatie in algenconcentratie en temperatuur in de schelpdiervijver op de pilot 'Colijnsplaat'

Daarnaast is er begin Augustus een bemonstering uitgevoerd waarbij op drie meetmomenten (10:00-14:00-16:00 uur) primaire productie, gebonden organische nutriënten, opgeloste anorganische nutriënten, Chlorofyl a en zwevend stof is bepaald. Ook is getracht met een ratio waar absorptie wordt gemeten bij 480 nm en 665 nm (Riegman & Rowe, 1994) vast te stellen wat de limiterende factor is voor algen productie: licht of nutriënten. Echter, omdat uit het studentenonderzoek van Quesnot (2012) bleek dat we naast de 2 golflengtes ook op 750nm moeten meten kunnen we hier helaas geen conclusies aan verbinden (zie ook sectie 2.2.1).

Metingen zijn verricht in de drie geschakelde vijvers die ook in onderdeel 1 bemonsterd zijn. Vijver 7 bevat volwassen tong, zagers en schelpdieren, vijver 8 wordt gebruikt als algen vijver en vijver 9 wordt gebruikt voor de productie van juveniele tong, zagers en schelpdieren. Het debiet tussen de vijvers is ongeveer  $20\text{m}^3\text{h}^{-1}$ . In totaal zijn op zeven verschillende punten metingen verricht:

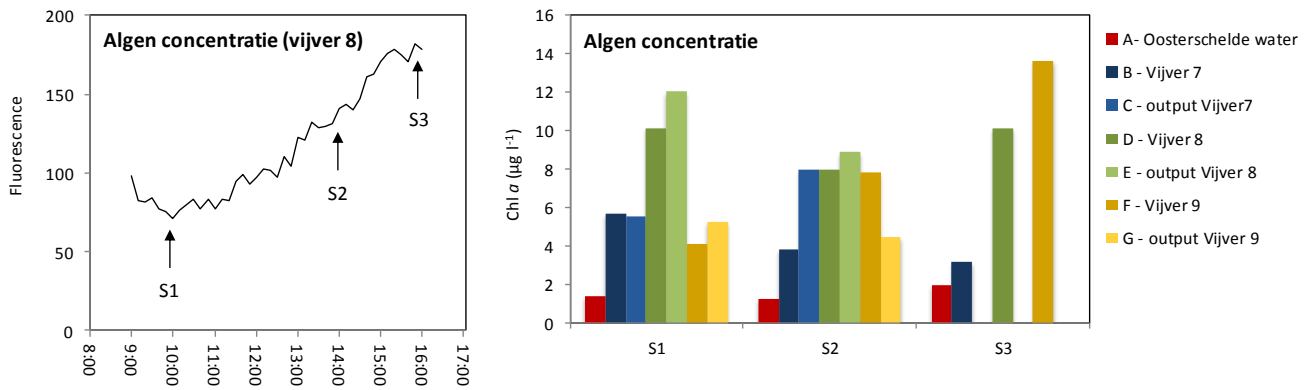
- A. Het inkomende water uit de Oosterschelde
- B. In het midden van vijver 7
- C. In het water dat vijver 7 verlaat en naar vijver 8 stroomt
- D. In het midden van vijver 8
- E. In het water dat vijver 8 verlaat en naar vijver 9 stroomt
- F. In het midden van vijver 9
- G. In het water dat vijver 9 verlaat en naar de ringsloot wordt geleid

Tabel 4 Opgeloste nutriënten concentraties. Totaal stikstof (DIN - voornamelijk ammonia) en fosfaat (DIP), en de gerelateerde NP ratio gedurende de drie meetmomenten (S1=10:00, S2=14:00, S3=16:00) op ieder van de meetpunten (-=niet bepaald).

station	DIN (uM)			DIP (uM)			Ratio NP		
	S1	S2	S3	S1	S2	S3	S1	S2	S3
A	10.8	10.7	13.9	0.97	0.99	0.92	11.1	10.8	15.1
B	10.8	9.1	8.8	3.74	3.88	3.76	2.9	2.3	2.3
C	15.0	13.4	-	3.47	3.66	-	4.3	3.7	-
D	1.5	1.5	1.2	3.04	3.03	3.13	0.5	0.5	0.4
E	1.7	14.0	-	2.97	3.05	-	0.6	4.6	-
F	14.4	13.7	4.4	3.97	3.55	4.16	3.6	3.9	1.1
G	10.1	10.1	-	3.61	3.79	-	2.8	2.7	-

Tabel 5 Algen informatie. Particulare nutriënten concentraties, chla concentraties en primaire productie gedurende de drie meetmomenten (S1=10:00, S2=14:00, S3=16:00) in het midden van de drie vijvers

station	PON (mg l <sup>-1</sup> )		POP (mg l <sup>-1</sup> )		Chla (µg l <sup>-1</sup> )			PP (mgC mgChla <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> )		
	S1	S2	S1	S2	S1	S2	S3	S1	S2	S3
B	182.2	259.5	29.8	0.47	5.7	3.9	3.2	2.8	2.1	1.7
D	394.4	381.1	0.3	0.70	10.2	8.0	10.1	1.9	1.9	1.8
F	208.0	196.1	0.44	0.42	4.1	7.9	13.7	2.0	-	2.3



Figuur 19 Variatie in algenconcentraties gedurende 1 dag (10:00-16:00uur). Linker panel geeft een continue meting weer in vijver 8 (meetpunt D), het rechter paneel geeft 3 puntsgewijze bemonsteringen op alle meetpunten weer.

De dagelijkse variatie in anorganisch opgeloste stoffen is relatief gering (Tabel 4). De resultaten verkregen tijdens deze meetdag geven eenzelfde beeld als de seizoensale bemonstering, namelijk dat de vijvers stikstof gelimiteerd zijn (lage NP verhouding). Interne regeneratie van nutriënten leidt tot verhoogde fosfaat concentraties. De continue meting in vijver 8 (D) geeft aan dat de algen concentratie ongeveer verdubbeld gedurende de dag (Figuur 19, linker paneel). Ondanks dat de Chl  $\sigma$  concentraties enkele malen hoger zijn in algenvijver in vergelijking met de vis/zager/schelpdier vijvers, zijn de primaire productie niveaus vergelijkbaar in alle vijvers gedurende de meetpunten (Tabel 1). Omdat de PP in Tabel 5 uitgedrukt is als relatieve maat tov de eenheid chlorofyl, zal de absolute PP wel hoger zijn in de algenvijver.

## Resultaten Pilot Wilhelminapolder

Ter voorbereiding van de uitbreiding van de faciliteiten van WP is berekend welke opties er zijn. Op basis van een spreadsheet model zijn berekeningen gemaakt van de capaciteit van de WP vijver en de geschatte opbrengst aan mosselen bij een bepaald nivo van primaire productie. Daarbij is gebruik gemaakt van de gegevens over de chlorofyl concentratie uit eerdere metingen, met en zonder bemesting, en van een FCR = 1.

Uit tabel 5 blijkt dat er met bemesting een primaire productie mogelijk is van 1100 gC/m<sup>2</sup>/yr, dit is 7 \* nivo Oosterschelde, op basis van een chlorofyl gehalte van 50  $\mu\text{g/l}$ .

Tabel 5. Productie scenario met en zonder bemesting op basis van 1 cohort mosselen, met toevoer van voedsel in een concentratie rond de pseudofaces drempel.

OP BASIS PRAKTIJK 2009-2010		
	ZONDER BEMESTING	MET BEMESTING
<b>voedselconcentratie</b>		
POM mg/l	5	21
CHL $\mu\text{g/l}$	15	50
verduunning	0	5*
<b>berekende productie</b>		
totaal kg in 316 d	2370.00	9954.00
prod: gC/m <sup>2</sup> /yr	263.33	1106.00
prod ds kg/dag	7.50	31.50
prod mg ds/m <sup>2</sup> /d	1.67	7.00
prod mg chl/m <sup>2</sup> /d	16.67	70.00
<b>mossel prod kg</b>	1 cohort	1 cohort
bij FCR = 1	2370	9954

Als we uitgaan van meerdere cohorten die deels overlappend worden gekweekt is een opbrengst haalbaar van ca 15 mln kg per jaar, bij een FCR = .77 (Tabel 6). Dit is een potentie berekening omdat is uitgegaan van maximale voedselbeschikbaarheid.

Tabel 6. Productie berekening bij maximale voedselbenutting door inzet van 3 cohorts.

MODEL					
		1 cohort		3 cohorts	
		dag	kg oogst	dag	kg oogst
stock cohort 1				1 tot 162	5000
stock cohort 2		316	5000	1 tot 316	5000
stock cohort 3				92 tot 316	4488
som					14488
<b>voedsel productie</b>					
totaal nodig	kg		4851.25		11194.00
productie per m2	gC/m2/yr		539.03		1244.00
prod/dag	kg/d		15.35		35.00
prod per m2/dag	g POM/m2		3.41		7.90
idem chlorofyl	mg CHL/m2		34.12		78.00
<b>voedsel concentratie = productie * 3</b>					
droge stof	POM mg/L		10.23		23.60
chlorofyl	mug CHL/L		102.35		230.00
verduunning grondwater			2*		5*
FCR			0.97		0.77

De berekeningen vereisen nadere validatie omdat er vrij grove aannamen zijn gedaan over het nivo van primaire productie gedurende het gehele jaar, en over de voedselbeschikbaarheid.

## 2.2.4 Conclusies & Aanbevelingen

Gedurende het meetjaar 2012 zijn er verscheidene metingen verricht met het doel meer inzicht te krijgen in het voedselaanbod (algen) en de fysiologische behoeften van de schelpdieren. Hieruit is onder andere gebleken dat er grote variatie bestaat in het aanbod van algen bij zowel de pilot 'Zeeland Aquacultuur' als ook op 'Colijnsplaat'. De variabiliteit wordt veroorzaakt door natuurlijke omstandigheden zoals licht, temperatuur en nutriënten concentraties, als ook door het gevolgde management regime. Het is niet goed bekend hoe de grote variatie in voedselcondities zich relateren aan de voedselopname, groei en allocatie van opgenomen voedingsstoffen door de schelpdieren. In de literatuur wordt beschreven dat scherpe variabiliteit in voedselaanbod schelpdiergroei kan vertragen, en/of dat voedselcondities bepalend zijn voor allocatie van energie richting de schelp dan wel groei van tissue materiaal. Hieronder worden de belangrijkste bevindingen per pilot weergegeven.

### *Zeeland Aquacultuur*

De algenconcentraties in de schelpdiervijvers laten een grote dagelijkse variatie zien, zonder duidelijke toe- of afname gedurende het seizoen. Daarnaast is er ook gebleken dat er veel variatie van de voedselconcentraties optreedt op een ruimtelijke schaal. Ondanks dat er tijdens de aanleg 8 inflow punten geïnstalleerd langs de lengte van de vijver, vindt er depletie van algenconcentraties plaats langs de lengtegradiënt van de schelpdiervijver (van het begin naar het einde van de vijver). Door de extra inflow punten is dit echter niet een lineaire afname maar werd een meer golvend patroon waargenomen. Management regime (aansturen van het debiet) kan de ruimtelijke depletie gedeeltelijk voorkomen.

Het voedselaanbod voor de schelpdieren is voornamelijk afkomstig uit de algenmengtank, echter er vindt vermoedelijk ook interne primaire productie plaats in de schelpdiervijvers. De algenproductie in de algenvijvers lijkt fosfaat gelimiteerd, maar door uitscheiding van metabolische afvalproducten door de schelpdieren en door decompositie van organische materiaal op de bodem van de schelpdiervijver



worden er nutriënten (oa fosfaat) aan het water toegevoegd. Hoe groot, en of deze primaire productie gebaseerd op geregenereerde nutriënten van wezenlijk belang is, is niet bekend.

Uit de data van 2011 bleek dat de groei van de tapijtschelpen in de vijvers achterliep in vergelijking met schattingen gebaseerd op modelberekeningen. Ook in 2012 werd er voor zowel mosselen als tapijtschelpen aan het einde van het seizoen een vertraging in de groeisnelheden waargenomen. Daarnaast waren de seizoenale patronen in schelpgroei en tissuegroei voor de tapijtschelpen niet aan elkaar gekoppeld; aan het einde van het seizoen was de schelpgroei verwaarloosbaar terwijl er nog wel groei van tissue materiaal plaats vond wat resulteerde in een verbeterde conditie van de tapijtschelpen.

Om oorzaken voor de groeivertraging te bepalen zijn er verschillende eco-fysiologische experimenten uitgevoerd. Hieruit zijn de volgende mogelijke oorzaken vastgesteld: (i) Door groei worden de fysieke eisen aan de voedselconcentraties hoger. Aangezien de voedselconcentraties niet toenamen gedurende het seizoen kan dit één van de oorzaken zijn voor de groeivertraging (ii) Daarnaast kan de scherpe variabiliteit in voedselaanbod een andere reden zijn voor de waargenomen groeivertraging, en tenslotte (iii) zijn er aanwijzingen dat er opbouw van reproductief materiaal plaats vond (ontwikkeling gonaden). Een aanstaande reproductie kan betekenen dat de energie die normaal gebruikt wordt om te groeien in plaats daarvan wordt gebruikt om reproductieve massa aan te maken.

Beheer van een constant, minder variabele toename in algenconcentraties over het verloop van groei van individuen behoort tot een van de aanbevelingen. Verder, verdient aandacht een onderzoek naar mogelijkheden om de opbouw van gonaden uit te stellen of te verminderen.

#### *Colijnsplaat*

De dagelijkse variatie in algen concentraties in de schelpdiervijver op 'Colijnsplaat' is kleiner in vergelijking met 'Zeeland Aquacultuur' wat aansluit bij de verwachting aangezien de systemen op 'Colijnsplaat' een meer gebufferd systeem vertegenwoordigen. Daarentegen werden wel grote verschillen in algen en nutriënten concentraties waargenomen gedurende het seizoen. Het is niet direct duidelijk waar de hoge variatie door veroorzaakt wordt. Nutriënten worden middels de voergift aan zagers en via de inlaat van Oosterschelde water aan het systeem toegevoegd. Er is echter geen duidelijke correlatie tussen voergift en nutriënten/algen concentraties. Grote variatie tussen de vijvers met een vergelijkbare voergift laat zien dat het lastig is om de primaire productie in de vijvers te voorspellen aan de hand van de toegevoegde nutriënten en biomassa vis/zagers. Dit geeft ook de complexiteit in de systemen weer. Om een stabiele en hoge algen productie te realiseren, die noodzakelijk is voor commerciële kweek van schelpdieren, kan er overwogen worden om de vijvers extra te bemesten (gezien de nutriëntenlimitatie in algenvijver). Een adequaat monitoringsprogramma en gecontroleerd bemesten is hierbij van belang om wildgroei aan wieren te voorkomen.

#### *Wilhelmina polder*

In de zomer/najaar van 2012 zijn er nieuwe bakken aangelegd op de pilot 'Wilhelmina polder' waardoor de biomassa aan schelpdieren enorm vergroot kan worden. Op basis van de productieschatting wordt verwacht dat er circa 10 ton per jaar geproduceerd kan worden met de nieuwe systemen. De nieuwe systemen bestaan uit 2 onafhankelijke lijnen, ieder met 4 geschakelde bassins. Ook zijn er plannen om de algenvijver te enten en -indien nodig- te bemesten. Het valt daarom te verwachten dat de concentratie algen gedurende het seizoen variabel zal zijn omdat hier een management regime aan ten grondslag ligt. Een goede monitoring is van belang om de verwachte productiviteit van de vijver vast te kunnen stellen. Maar ook in de opeenvolgende bassins zal er een gradiënt in de voedselcondities plaats gaan vinden. Omdat het niet geheel duidelijk is hoe variabiliteit zich door vertaald naar de schelpdierrespons is de aanbeveling om verschillende schelpdierdichtheden en dichtheidsverdelingen ('treatments') toe te passen in de geschakelde bassins, en zodoende inzicht te krijgen in optimale voedselopname schelpdieren en daaraan gekoppeld een optimaal management regime vast te kunnen stellen.

## **2.3 Werkplan 2013 – PM (wordt in werkgroep voorbesproken)**

## Bijlage 1: Walne-medium & andere media

Table a. Amount of chemicals needed for 1 l Walne solution A.

Chemical	Amount
Na <sub>2</sub> EDTA	45 g
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	33.6 g
NaNO <sub>3</sub>	100 g
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> *2H <sub>2</sub> O	20 g
MnCl <sub>3</sub> *4H <sub>2</sub> O	0.36 g
FeCl <sub>3</sub> *6H <sub>2</sub> O	1.30 g
Solution 2	1 ml

Table b. Amount of chemicals needed for 100 ml Walne solution B.

Chemical	Amount
ZnCl <sub>2</sub>	2.1 g
CoCl <sub>2</sub> *6H <sub>2</sub> O	2.0 g
(NH <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> Mo <sub>7</sub> O <sub>24</sub> *4H <sub>2</sub> O	0.9 g
CuSO <sub>4</sub> *5H <sub>2</sub> O	2.0 g

Table c. Amount of chemicals needed for 100 ml Walne vitamine solution C.

Chemical	Amount
Thiamine chlorhydraat (B <sub>1</sub> )	200 µg
Cyanocobalamine (B <sub>12</sub> )	10 mg
Biotin (H)	10 mg

Table d. Amount of chemicals needed for 1 liter NaSiO<sub>3</sub>.5H<sub>2</sub>O solution D (For diatom cultures).

Chemical	Amount
NaSiO <sub>3</sub> .5H <sub>2</sub> O	20 g

Table e. Amount of chemicals needed for Walne medium for 1800 liter seawater.

Chemical	Amount
Walne solution	1.8 l
Vitamine solution	0.18 l
NaSiO <sub>3</sub> .5H <sub>2</sub> O solution	7.2 l

### The amount of nutrients to add to 250 ml of medium.

	FeCl <sub>3</sub> *6H <sub>2</sub> O (g)	MnCl <sub>3</sub> *4H <sub>2</sub> O (g)	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> *2H <sub>2</sub> O (g)	NaNO <sub>3</sub> (g)	NH <sub>4</sub> Cl (g)	B1 (mg)	B12 (mg)	H (mg)	Vitamins (ml)	NaHCO <sub>3</sub> (g)
Walne	0.000325	0.00009	0.005	0.025		0.0005	0.025	0.03	0.025	
N/P 25:1			0.005		0.04286					
NO <sub>3</sub> /P 25:1			0.005	0.0681						
N/P 10:1			0.005		0.01714					
N/P 16:1			0.005		0.02743					
C/N/P 128:16:1			0.005		0.02743					0.344526
N/P/Fe	0.000325		0.005		0.04286					
N/P/Mn		0.00009	0.005		0.04286					
N/P/vit			0.005		0.04286	0.0005	0.025	0.03	0.025	
N/P/Fe/Mn	0.000325	0.00009	0.005		0.04286					

The amount of nutrients to add to make 1 L of stock medium.

	FeCl <sub>3</sub> *6H <sub>2</sub> O (g/L)	MnCl <sub>3</sub> *4H <sub>2</sub> O(g/L)	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> *2H <sub>2</sub> O(g/L)	NaNO <sub>3</sub> (g/L)	NH <sub>4</sub> Cl (g/L)	EDTA (g/L)
Walne	1.3	0.36	20	100		45
N:P 25:1			10		85.71959	
N:P:Mn		0.18	10		85.71959	
Fe:EDTA	0.325					11.25

The amount of stock medium to add to make 1 L of medium

Walne	1 ml of stock medium + 0.1 ml of vitamins
N:P:Vit 25:1	2 ml of N:P 25:1 + 0.1 ml of vitamins
N:P:Fe:Vit	2 ml of N:P 25:1 + 4 ml of Fe:EDTA + 0.1 ml of vitamins
N:P:Fe:Mn:Vit	2 ml of N:P:Mn + 4 ml of Fe:EDTA + 0.1 ml of vitamins

## Bijlage 2: Algenvoorraad cultuur, start cultuur en plastic zak culturen

### Voorraad cultuur

De voorraad cultuur wordt gehouden in 30 ml weefselkweekflessen (Fig. 1). Ze worden bewaard in de blauwe klimaatkast bij een temperatuur van 19°C.

Nieuwe voorraad cultures worden elke week gemaakt om ze in goede staat te houden. Om risico's te vermijden worden er twee series voorraad culturen gehouden.

- 1) De eerste stap in het algen cultuur systeem is de ontsmetting van de werkplek en de handen. Een kleine hoeveelheid ethanol 70% wordt geschonken over alles wat in aanraking kan komen bij het maken van de algen culturen. De handen worden ontsmet door ze te wassen met ethanol 70 %.
- 2) Het water dat gebruik wordt voor de voorraad culturen wordt gefiltreerd over een aantal filters met verschillende maten. De kleinste maat is 0.2 µm. 500 ml Schot flessen worden gevuld en geautoclaveerd (15 psi voor 15 minuten). Als het water afgekoeld is worden de nutriënten toegevoegd, 500 µl Walne's medium en 50 µl Vitamine oplossing. Voor diatomeeen wordt hierbij ook nog 2 ml silicaat toegevoegd. 5 weefselkweekflessen per algensoort worden gevuld met 20 ml gefiltreerd zeewater
- 3) 5 ml algencultuur wordt met een glazen Pasteur pipet overgebracht in de 30 ml weefselkweekfles. De glazen Pasteur pipetten worden in de stoof gesteriliseerd (minimaal 48 uur bij 70 °C). Voor de inoculatie van de voorraad culturen wordt de pipet in 90% ethanol ondergedompeld een door het blauwe vlam van de brander gehaald.
- 4) De datum van inoculatie en de algen soort worden op de nieuwe cultuur geschreven en de cultuur wordt op in de klimaatkast (Fig. 2) geplaatst.



Figuur 1: Voorraad cultuur.



Figuur 2: Klimaatkast.

### Kleine startculturen

Het eerste inoculum voor onze start culturen komen van de voorraad cultuur. Als deze start culturen groeien, zullen ze gebruikt worden als inoculum voor de grotere startculturen, de overgebleven hoeveelheid wordt ook gebruikt als inoculum voor de nieuwe kleine start culturen.

Inoculatie gaat als volgt:

1) De eerste stap is het ontsmetten van de werkplek en handen. Een kleine hoeveelheid Ethanol 70% wordt gegoten over alle oppervlaktes die in aanraking komen met het materiaal dat gebruikt wordt om de algen culturen te maken. De ontsmetting van de handen wordt bereikt door de handen te wassen met een beetje ethanol.

2) Het water dat gebruik wordt voor de voorraad culturen wordt gefiltreerd over een aantal filters met verschillende maten. De kleinste maat is 0.2  $\mu\text{m}$ . 1L Schot flessen worden gevuld en geautoclaveerd (15 psi voor 15 minuten). Als de water afgekoeld is worden de nutriënten toegevoegd, 1 ml Walne's medium en 100  $\mu\text{l}$  Vitamine oplossing. Voor diatomeen wordt hierbij ook nog 4 ml silicaat toegevoegd. 5 weefselkweekflessen per algensoort worden gevuld met 70 ml gefiltreerd zeewater

3) De gehele 30 ml voorraadcultuur wordt overgebracht in de 100 ml weefselkweekfles.

4) De datum van inoculatie en de algen soort worden op de nieuwe cultuur geschreven en de cultuur wordt op in de klimaatkast geplaatst.



Figuur 3: Kleine start culturen.

### **Grote start culturen**

Er worden 3 L erlenmeyers gebruikt om de grote culturen te kweken (Fig. 4). Deze culturen worden gehouden in de precultuur kamer onder een licht intensiteit van 2000 luxes (per lamp) en kamertemperatuur van 19°C. Als inoculum voor deze grote start culturen worden kleine start culturen van 100 ml gebruikt die niet ouder zijn dan 14 dagen.

1) De eerste stap is het ontsmetten van de werkplek en handen. Een kleine hoeveelheid Ethanol 70% wordt gegoten over alle oppervlaktes die in aanraking komen met het materiaal dat gebruikt wordt om de algen culturen te maken. De ontsmetting van de handen wordt bereikt door de handen te wassen met een beetje ethanol.

2) De erlenmeyer wordt gevuld met 2,5 gefiltreerd zeewater (1  $\mu\text{m}$  filter, UV licht bestraald) en bedekt met aluminium folie en geïncubeerd in de autoclaaf bij 120°C gedurende 30-45 min.

3) Van de kleine start cultuur die gebruikt wordt als inoculum worden monsters genomen en onder de microscoop geplaatst. De staat van de culturen wordt gecontroleerd: vorm van de cellen okay, activiteit van de cellen in het geval van flagellaten okay en het ontbreken van elk type contaminatie. Alleen goede culturen worden gebruikt.

4) Na verwijdering van de aluminiumolie wordt de hals van de erlenmeyer door een blauwe vlam van de brander gehaald. 2,5 ml van Walne medium en 250  $\mu\text{l}$  vitamine oplossing worden gepipetteerd in de Erlenmeyer. Bij diatomeen wordt ook 10 ml silicaatoplossing toegevoegd.

5) 200-300 ml kleine startcultuur wordt overgebracht in de grote start cultuur.

6.) De hals van de erlenmeyer wordt door de blauwe vlam gehaald, dan wordt een steriele plastic 2 ml de pipet toegevoegd voor de beluchting en de erlenmeyer bedekt met parafilm.

7.) De nieuwe erlenmeyer wordt gelabeld met de datum van inoculatie en de naam van de algen soort.

8) Deze culturen worden belucht (delucht wordt ook gefiltreerd door een 1  $\mu\text{m}$  membraan filter).

9) De lege erlenmeyers worden gewassen met een peroxide oplossing en hierna afgespoeld met demi water. Ze worden vervolgens gevuld met gefiltreerd zeewater, geautoclaveerd en zijn hierna klaar om opnieuw gebruikt te worden.



*Figuur 4. Grote start culturen.*

### **Cultuur op grote schaal**

De cultuur op grote schaal wordt in een andere kamer gehouden dan de preculturen. Deze kamer heeft een temperatuur van ongeveer 19°C. Plastic zakken van 25 L worden gebruikt om de batch cultuur te houden (Fig. 5). Voor het maken van plastic zakken wordt buisfolie met een breedte van 40 cm en dikte 130 micron gebruikt.

Van de buisfolierol wordt 105 cm geknipt en op het voorbeeld exemplaar 'algenczak' gelegd. Met een Edding 3000 stift worden de markeringen van de voorbeeldzak overgenomen op het nieuwe exemplaar. Aan de ene kant van de buisfolie wordt nu met behulp van een sealapparaat 2 seals gemaakt (in puntvorm) aan de andere kant wordt de folie circa 11 cm omgeslagen en 2 seals direct naast elkaar gebracht. Deze seals worden wat langer en heter geseald omdat dit wordt opgehangen.

De volgende sealinstellingen aan het apparaat worden met 2 knoppen gedaan: Warmteintensiteit 6 en duurre van het sealen stand 7.

- 1) *De plastic zakken worden gevuld met gefiltreerd zeewater (0.2 µm, UV-licht bestraald, pH en zoutgehalte worden gemeten) en de chemische sterilisatie vindt plaats met 1 ml natrium hypochloriet (bleek water) oplossing per liter gefiltreerd zeewater. Maak 0.2 um filter schoon aan het eind van de dag en vervang UV lamp jaarlijks.*
- 2) *24 uur na chloreren wordt de chloortest gebruikt om de hoeveelheid te meten. Het restant van natrium hypochloriet wordt geneutraliseerd met natrium thiosulfaat (50 mg per liter gefiltreerd zeewater). (1,25 g per 25 L). Het natriumthiosulfaat wordt opgelost in gechloreerd zeewater (genomen uit de afvoerslag van een plastic zak) alvorens het wordt toegediend.*
- 3) *De beluchting wordt hierna toegevoegd aan de zakken door een pipet in het plastic te prikken en na een circa 20 minuten wordt er een chloor test uitgevoerd om zeker te zijn van de afwezigheid van chloor. (Chloortest 0- 20 mg/l (MERCK) d.i. een analytische methode mbv teststrips)*
- 4) *De oppervlakte die in aanraking komt met het materiaal dat gebruikt wordt gedurende de inoculatie wordt ontsmet met ethanol 70%. De handen worden ook ontsmet met ethanol 70%.*
- 5) *De nutriënten worden toegevoegd in de hoeveelheden zoals vermeld wordt in tabel 5.*
- 6) *Een grote startcultuur, meestal 14 dagen oud, wordt altijd bekeken op aanzicht (vorm) voordat deze wordt toegevoegd. De minimale celdichtheid in de 25 L plastic zak moet 50.000 cellen per ml zijn aan het begin . De kwaliteit van de algen word altijd voorafgaand aan inoculatie bepaald onder de microscoop (x40 en x100 vergroting).*
- 7) *De plastic zak wordt gelabeld met de datum van inoculatie en de naam van de algen soort.*
- 8) *De materialen gebruikt voor de inoculatie worden gewassen met een peroxide+peracetic acid oplossing en hierna afgespoeld met water.*
- 9) *Bij vroegtijdig instorten van een algencultuur wordt het aanzicht, vorm, beweeglijkheid en status reinheid) beoordeeld en tevens pH en zoutgehalte van de cultuur gemeten.*



*Figuur 5. Plastic zakken van 25 liter.*

### Bijlage 3: protocol algenbepaling met behulp Bürker-türk

#### Determination of cell concentrations using haematocytometer according to Bürker

Bürker Haematocytometer (a modified protocol of Worksheet 2.2. in Lavens and Sorgeloos, 1996;  
<http://www.fao.org/DOCREP/003/W3732E/w3732e0b.htm>)

- Cells are counted under the microscope using a Bürker haematocytometer with two rafters on the upper surface allowing for two subsamples to be examined (each measuring 1.0\*1.0 mm). It has the following characteristics:

	Bürker
Depth (mm)	0.100
Surface of smallest square (in mm <sup>2</sup> )	0.0400
Minimal cell concentration (in cells ml <sup>-1</sup> )	10 <sup>6</sup>

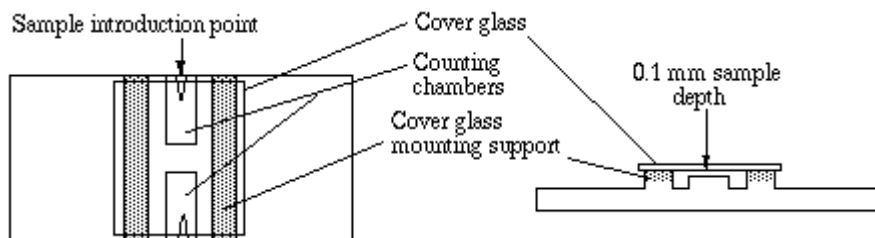


Figure 1. Hematocytometer

#### Protocol:

- Dilute sample if needed (use formalin 4% to fixate moving algal cells)
- Clean slide and cover-class with Kleenex-paper, press cover glass onto the slide until the Newton diffraction rings appear
- Fill both slides of the counting chamber under the cover-glass with a single smooth flow of suspension using a Pasteur pipet (avoid air bubbles), total volume of each chamber 0.1 mm<sup>3</sup>
- The central grid of each chamber is sub-divided into 144 squares; estimate cell density as follows:
- Count the number of cells in 25 squares (the two diagonals plus one square); on each square, the cells on the center and two borders (upper and left or lower and right border)
- The same procedure is followed with the second chamber
- The average cell number is calculated to have the mean number of algae cells per 1/10 of a microliter; this number is multiplied by 10,000 to know the cells per milliliter present in the algae culture
- For greater accuracy make three duplicate counts (3 separate dilutions each counted in two rafters)

#### Voorbeeld berekening

Voor het berekenen van het aantal algen per milliliter wordt gebruik gemaakt van de volgende formule:  
= (aantal algen\* 1000)/(aantal hokjes\*0,004)



Stel nu dat er in 25 hokjes van de Bürker-türk bij elkaar opgeteld 270 algen aanwezig zijn.

Het aantal algen per milliliter is dan:

$$=(270 \cdot 1000) / (25 \cdot 0,004) = 2.700.000 \text{ algen per milliliter.}$$