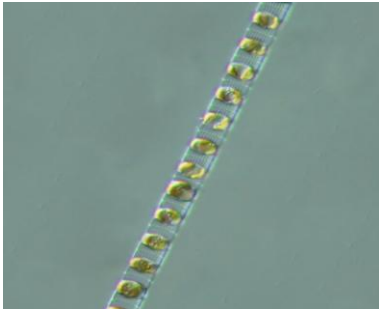


# Indicatoren voor groeilimitatie bij buitenkweek van microalgen

Onderzoek naar het effect van licht- en nutriënt limitatie op mogelijke  
indicatoren voor groeilimitatie bij *Skeletonema costatum*

Roel Maas

Rapport 12.007



# IMARES Wageningen UR

(IMARES - Institute for Marine Resources & Ecosystem Studies)

Opdrachtgever:

IMARES Yerseke  
Korringaweg 5  
4401 NT Yerseke

Publicatiedatum:

5 juni 2012



**IMARES is:**

- een onafhankelijk, objectief en gezaghebbend instituut dat kennis levert die noodzakelijk is voor integrale duurzame bescherming, exploitatie en ruimtelijk gebruik van de zee en kustzones;
- een instituut dat de benodigde kennis levert voor een geïntegreerde duurzame bescherming, exploitatie en ruimtelijk gebruik van zee en kustzones;
- een belangrijke, proactieve speler in nationale en internationale mariene onderzoeksnetwerken (zoals ICES en EFARO).

Naam	Roel Maas
Departement:	HZ university of applied sciences, Delta academy
Programma:	Aquatische Ecotechnologie
Studenten registratie nummer:	00045528
Supervisie:	Dr. Pauline Kamermans
Plaats:	Yerseke
Datum:	5 juni 2012

P.O. Box 68  
1970 AB IJmuiden  
Phone: +31 (0)317 48 09 00  
Fax: +31 (0)317 48 73 26  
E-Mail: imares@wur.nl  
www.imares.wur.nl

P.O. Box 77  
4400 AB Yerseke  
Phone: +31 (0)317 48 09 00  
Fax: +31 (0)317 48 73 59  
E-Mail: imares@wur.nl  
www.imares.wur.nl

P.O. Box 57  
1780 AB Den Helder  
Phone: +31 (0)317 48 09 00  
Fax: +31 (0)223 63 06 87  
E-Mail: imares@wur.nl  
www.imares.wur.nl

P.O. Box 167  
1790 AD Den Burg Texel  
Phone: +31 (0)317 48 09 00  
Fax: +31 (0)317 48 73 62  
E-Mail: imares@wur.nl  
www.imares.wur.nl

© 2012 IMARES Wageningen UR

IMARES is onderdeel van Stichting DLO  
KvK nr. 09098104,  
IMARES BTW nr. NL 8113.83.696.B16

De Directie van IMARES is niet aansprakelijk voor gevolgschade, noch voor schade welke voortvloeit uit toepassingen van de resultaten van werkzaamheden of andere gegevens verkregen van IMARES; opdrachtgever vrijwaart IMARES van aanspraken van derden in verband met deze toepassing.

Dit rapport is vervaardigd op verzoek van de opdrachtgever hierboven aangegeven en is zijn eigendom. Niets uit dit rapport mag weergegeven en/of gepubliceerd worden, gefotokopieerd of op enige andere manier gebruikt worden zonder schriftelijke toestemming van de opdrachtgever.

# Voorwoord

---

Als vierdejaars student aan de opleiding Aquatische Ecotechnologie is de laatste test om te kijken of je de titel Bachelor of Watermanagement (B.WM) verdient, het afstuderen. Hierbij dien je aan te tonen dat je in staat bent zelfstandig een onderzoek op te stellen, uit te voeren en de resultaten te kunnen interpreteren waarna de conclusies getrokken kunnen worden.

In mijn geval betrof het een stage bij IMARES Yerseke in de periode van 6 februari t/m 14 juni. Imares is een onderzoeksinstituut gespecialiseerd in strategisch en toegepast marien ecologisch onderzoek, het werkveld dat mijn interesse heeft. Ik ben Imares dankbaar voor de mogelijkheid die zij mij gegeven heeft tot het doen van mijn afstudeerstage bij hun instelling. Het zelfstandige en op een wetenschappelijke manier van onderzoek doen is mij goed bevallen. Ik heb de sfeer, mensen en de manier van werken als zeer prettig ervaren en kijk met plezier terug naar deze tijd en het leerproces dat ik ondergaan heb.

Via Dr. Pauline Kamermans ben ik in contact gekomen met Imares en zij heeft me verder geholpen met de mogelijkheid tot het stage komen lopen. Uiteindelijk ben ik een onderzoek gaan uitvoeren dat zij als optie had en zij is mijn begeleider geworden. De samenwerking met Pauline heb ik als zeer prettig ervaren, ze was altijd bereid tot het geven van hulp en advies en interesse tonend in mijn onderzoek.

Een aantal mensen hebben bijgedragen om het hier gepresenteerde onderzoek en rapport te verkrijgen en hen ben ik daar zeer dankbaar voor. In de weekenden was ik niet aanwezig en moesten de metingen van de experimenten voortgezet worden. Noortje van Ros en Yoeri van Es hebben de metingen in het weekend overgenomen en mij daarmee vrije weekenden bezorgd. Noortje heeft mij ook wegwijs gemaakt met de apparatuur en manier van werken. De nutriënt analyses met de auto analyzer zijn uitgevoerd door Angelo Hofman en wederom Noortje, dit heeft veel tijd gekost en voor overuren gezorgd om tijdig de resultaten te verkrijgen. Mascha Dedert heeft me geholpen met de Flow cyto meter en de PAM en haar kon ik raadplegen als deskundige.

Jasper van Houcke en de HZ university of applied sciences ben ik dankbaar dat een dergelijke stage mogelijk is. Bij mijn stage hebben zij mij aan Imares toevertrouwd en gezorgd dat de formele zaken werden afgerond.

Bij Imares hoop ik wellicht eens terug te komen om m'n stage of thesis te volbrengen van de master (Aquaculture and marine resource management aan de Wageningen Universiteit) die ik na het succesvol afronden van Aquatische Ecotechnologie wil gaan volgen.

# Samenvatting

---

Het in dit rapport beschreven onderzoek is uitgevoerd voor IMARES Yerseke in het kader van het Europese project REPROSEED. REPROSEED staat voor: Research to improve PROduction of SEED met als doel de promotie en verbetering van productie van schelpdierzaad in hatcheries (broedhuizen) en nurseries (kinderkamers). Het project bestaat uit verschillende onderdelen waarvan de productie van algen voor de nursery fase er één van is en waar dit onderzoek betrekking op heeft. Het onderzoek is uitgevoerd in de periode februari t/m mei 2012.

Om de algenkweek te optimaliseren wordt naar indicatoren gezocht die aan kunnen geven of de cultures lijden aan nutriënt- en licht limitatie. Een potentiële indicator is de absorptieratio voor pigment gemeten bij golflengtes 480- en 665nm die de verhouding tussen carotenoïde pigmenten en Chlorofyl-a weergeeft (Riegman & Rowe, 1994). De onderzoekers Riegman & Rowe (1994) beschouwen een ratio van 1 als uiterste van licht limitatie en een ratio van 2 als uiterste van nutriënt limitatie. Het gepresenteerde onderzoek vindt plaats omdat bovengenoemde relatie tussen limitatie en ratio waarde nooit in een experimentele opzet is getest, maar afkomstig is van monitoring van de Waddenzee. Het is onbekend of de indicator kan worden gebruikt voor intensieve algenkweek.

Daarnaast zijn er metingen verricht met PAM (Pulse-Amplitude-Modulation). Met PAM wordt de Fv/Fm en de Fm waarde gemeten, deze geven aan hoe efficiënt het fotosysteem werkt onder de aanwezige licht en nutriënt omstandigheden en vormen zo indicatoren voor een mogelijke licht- en nutriënt limitatie.

Om het causaal verband tussen deze indicator en nutriënt- en licht limitatie duidelijk te krijgen zijn algen gekweekt in zogenaamde raceway systemen. In deze raceways zijn in verschillende experimenten voor een limitatie in licht en nutriënten gezorgd, waarbij de groeisnelheid van de algen (*Skeletonema costatum*) in vergelijking met een controle gebruikt is als indicator voor het aanwezig zijn van een limitatie.

De experimenten laten zien dat de aangebrachte limitaties, die duidelijk terug zijn te zien in de groei, geen duidelijke veranderingen van de absorptieratio laten zien ten opzichte van de controle cultures. Bij slechts één proef laat de absorptieratio een duidelijk verschil zien ten opzichte van de controle cultures bij de laatste twee dagen van het experiment. Echter waren in dit stadium de cultures van *Skeletonema costatum* ingestort en vrijwel verdwenen. Als deze absorptieratio toegepast zou worden in de praktijk is het van belang dat deze iets over de limitatie van enerzijds licht en anderzijds nutriënten gedurende de exponentiële groeifase zegt, zodat het management van de cultures tijdig aangepast kan worden. Als de ratio pas verandering laat zien die duidt op limitatie van licht of nutriënten als de culturen aan het instorten zijn en dus in de crash fase verkeren, zijn aanpassingen aan het kweekstelsel te laat. Als de absorptieratio tijdens de exponentiële fase geen duidelijk verandering laat zien, kan deze niet gebruikt worden om tijdig een limitatie van licht en nutriënten aan te geven. Dat is in dit onderzoek het geval wat deze ratio als indicator ongeschikt maakt.

De Fv/Fm ratio is tijdens de experimenten niet gaan afwijken met de controle cultures ondanks de duidelijk aanwezige heersende limiterende omstandigheden, wat deze Fv/Fm ratio voor dergelijke opstellingen niet geschikt maakt als indicator voor limitatie. De maximale fluorescentie (Fm) liet in geval van licht limitatie ten opzichte van de controle cultures duidelijke verschillen zien. Dit uitte zich in een lagere Fm voor de gelimiteerde cultures, waarbij het beschikbare licht dus effectiever wordt opgenomen. Deze Fm kan gebruikt worden om gebrekkige lichtomstandigheden waar te nemen, maar is ongeschikt als indicator voor nutriënten limitatie.

# Abstract

---

The research described in this report was conducted for IMARES Yerseke in context of the European project REPROSEED. REPROSEED stands for: Research to improve PROduction of SEED which aims on the promotion and improvement of the production of shellfish seed in hatcheries and nurseries. The project consists of several parts, one of them is the production of algae for the nursery phase, this research is related to that part. The study was conducted in the period from February till May 2012.

To optimize the cultivation of algae, one is looking for indicators which show whether the limiting factor for the growth of algae cultures is either light or nutrient deficiency. A potential indicator is the absorption ratio of pigment measured at wavelengths of 480- and 665 nm. This shows the ratio between carotenoids and Chlorofyl-a (Riegman & Rowe, 1994). The researchers Riegman & Rowe (1994) considered a ratio of 1 as an extreme limitation by light and a ratio of 2 as an extreme for nutrient limitation. The research presented is done because the previously mentioned relation between the limitation and ratio is never tested in an experimental design, but is derived from monitoring the Wadden Sea. It is unknown whether the indicator can be used for intensive algae cultivation.

In addition, measurements were performed using PAM (Pulse Amplitude Modulation). With PAM the Fv/Fm and Fm values can be measured. These values indicate how efficient the photosynthetic system works under the present light and nutrient conditions and are expected indicators for light and nutrient limitation

To show the causal link between these indicators and nutrient- and light limitation, algae are grown in so-called raceway systems. In different experiments nutrient and light limitation is applied to the cultures, in which the rate of algal growth (*Skeletonema costatum*) in control cultures is used as an indicator for the presence of a limitation.

The experiments show that the applied limitations, which are clearly reflected in the growth, show no changes of the absorption ratio compared to the control cultures. Only one experiment shows a difference in absorption ratio compared to the control in the last two days of the experiment. However at this stage the cultures of *Skeletonema costatum* were collapsing and almost vanished. If the absorption ratio would be applied in practice, it is important that the ratio shows a limitation of light or nutrients throughout the exponential growth phase, so that the management of the cultures can be adjusted in time. If the ratio shows only changes which indicate limitation of light or nutrients when the cultures are collapsing and thus in the crash phase condition of the cultures, changes in the culture systems will be too late. Collapsed cultures cannot be restarted. If the absorption ratio shows no clear limitation during the exponential phase, then it cannot be used as an indicator for light- and nutrient limitation. This is the case for this study, therefore the absorption ratio is unsuitable as an indicator for limitation

The Fv/Fm ratio during the experiments did not diverge from the control cultures and did not indicate limiting conditions despite the obvious ruling limiting conditions. This makes the Fv/Fm ratio for similar setups unsuitable as an indicator for limitation. In case of light limited conditions the maximum fluorescence (Fm) showed clear differences compared to the control cultures. This was reflected in a lower Fm for the limited cultures, where the available light is absorbed more effective. This Fm can be used to indicate poor light conditions, but is unsuitable as an indicator of nutrient limitation.

# Inhoudsopgave

---

	Begrippenlijst & Afkortingen.....	1
1	Inleiding.....	2
2	Achtergronden .....	4
	<u>2.1</u> Chlorofyl-a.....	4
	<u>2.2</u> Carotenoïde pigmenten.....	4
	<u>2.3</u> Absorptieratio pigment (480/665 nm) .....	5
	<u>2.4</u> Fotosynthese reactie .....	5
	<u>2.5</u> Fotosysteem II efficiëntie .....	6
	<u>2.6</u> Maximale fluorescentie(Fm).....	6
	<u>2.7</u> (Fv/Fm) ratio .....	6
	<u>2.8</u> Groei van een algencultuur .....	7
	<u>2.9</u> <i>Skeletonema costatum</i> .....	8
3	Methode.....	9
	<u>3.1</u> Proefopzet .....	9
	3.1.1 Raceways .....	9
	3.1.2 Water.....	9
	3.1.3 Medium .....	10
	3.1.4 Opkweken.....	10
	<u>3.2</u> Experimenten.....	10
	3.2.1 Experiment 1: Nutriënt limitatie gradiënt.....	11
	3.2.2 Experiment 2: Nutriënt limitatie .....	12
	3.2.3 Experiment 3: Licht limitatie gradiënt.....	12
	3.2.4 Experiment 4: Licht limitatie .....	13
	<u>3.3</u> Metingen.....	14
	3.3.1 Abiotische Parameters .....	15
	3.3.2 Indicatoren voor licht- en nutriënten limitatie .....	16
	3.3.2.1 Absorptie 480 en 665nm.....	16
	3.3.2.2 Fv/Fm en Fm.....	16
	3.3.3 Algen concentratie .....	17
	3.3.3.1 Bürker-türk telraam.....	17
	3.3.3.2 Flow cytometer .....	17
	3.3.3.3 Biomassabepalingen .....	18
	3.3.5 Nutriëntbepalingen .....	19
	3.3.5 Statistische analyses.....	20

4	Resultaten .....	21
4.1	<u>experiment 1: nutriënt limitatie gradiënt</u> .....	21
4.1.1	Algengroei.....	22
4.1.2	Absorptieratio.....	22
4.1.3	Nutriënten .....	22
4.1.4	Fv/Fm.....	25
4.1.5	Fm.....	26
4.1.6	Abiotische factoren .....	26
4.2	<u>experiment 1: nutriënt limitatie proef</u> .....	27
4.2.1	Groei .....	27
4.2.2	Absorptieratio.....	28
4.2.3	Nutriënten .....	28
4.2.4	Fm/Fv.....	31
4.2.5	Fm.....	31
4.2.6	Abiotische factoren .....	32
4.3	<u>experiment 3: licht limitatie gradiënt</u> .....	32
4.3.1	Groei .....	32
4.3.2	Absorptieratio.....	33
4.3.3	Nutriënten .....	33
4.3.4	Fv/Fm.....	34
4.3.5	Fm.....	35
4.3.6	Abiotische factoren .....	35
4.4	<u>experiment 4: licht limitatie proef</u> .....	35
4.4.1	Groei .....	35
4.4.2	Absorptieratio.....	36
4.4.3	Nutriënten .....	36
4.4.5	Fv/Fm.....	36
4.4.4	Fm.....	37
4.4.6	Abiotische factoren .....	37
4.5	<u>Uitdoving</u> .....	38
4.6	<u>Drooggewicht</u> .....	39
4.7	<u>Flow cyto meter</u> .....	40
5	Discussie en conclusie .....	41
6	Aanbevelingen.....	46
	Referenties .....	47
	Bijlagen.....	50
	<i>Bijlage 1: Walne-medium</i> .....	50
	<i>Bijlage 2: Protocol algenbepaling met behulp van Bürker-türk</i> .....	51
	<i>Bijlage 3: Protocol drooggewicht bepaling</i> .....	53

<i><u>Bijlage 4: Resultaten experimenten</u></i> .....	54
<i><u>Bijlage 5: Resultaten statistische toetsing</u></i> .....	71



# Begrippenlijst & Afkortingen

---

**Batch cultuur:** kweekmethode zonder voortdurende toevoer van voedingsstoffen en geen voortdurende afvoer van een deel van de cultuur.

**Carotenoïden:** rode, oranje of gele oplosbare lipide pigmenten die ingebed te vinden zijn in de membranen van chloroplasten.

**Chlorofyl:** groene kleurstof (bladgroen) in een chloroplast.

**Chloroplast:** ook wel bladgroenkorrel, vindt fotosynthese plaats.

**Chromoplast:** veranderde chloroplast, geeft kleur van veel plantendelen aan.

**Continue cultuur:** kweekmethode waarbij de cultures continue worden voorzien van voeding en waarbij continue een deel van de cultuur geoogst wordt.

**Excitatie:** het proces waarbij lichtenergie wordt overgenomen door een elektron, waardoor deze in een hogere baan komt.

**Exicton:** elektron dat zich in een hogere baan bevindt als gevolg van excitatie.

**Fluorescentie:** het terugvallen van een exicton, waarbij een foton wordt uitgezonden.

**Fm:** maximale fluorescentie, gemeten door een oververzadiging aan licht op het fotosysteem af te sturen.

**Foton:** lichtdeeltje.

**Foto oxidatie:** het kapot gaan van organische moleculen als gevolg van een hoge lichtinstraling.

**Fotosysteem II efficiëntie:** is de fractie van lichtenergie omgezet in chemische energie tijdens de fotosynthese.

**Fv/Fm ratio:** indicator voor de efficiëntie van fotosysteem II, gemeten met de PAM.

**IMARES:** Institute for Marine Resources & Ecosystem Studies.

**Lipide:** organische stof die is opgebouwd uit glycerol en vetzuren.

**PAM:** Pulse Amplitude Modulation

**PAR:** Photosynthetically Active Radiation.

**pH:** zuurgraad.

**Poryfine ring:** stabiel ringvormig molecuul waaromheen elektronen vrij kunnen bewegen.

**psu:** practical salinity units

**Reproseed:** research to improve production of seed.

**Thylakoïde:** membraam dat chlorofyl en enzymen bevat die nodig zijn voor de lichtreactie.

# 1 Inleiding

---

Bij het op verschillende manieren kweken van algen kan er limitatie in groei plaatsvinden. Factoren die voor een limitatie kunnen zorgen zijn gebrek aan nutriënten en licht. Deze factoren kunnen de groei afremmen of zelfs stopzetten waardoor de cultuur instort.

Imares is betrokken bij een Europees project genaamd REPROSEED wat staat voor: Research to improve PROduction of SEED. Bij dit project zijn meerdere landen betrokken met als doel de promotie en verbetering van productie van schelpdierzaad in hatcheries (broedhuizen) en nurseries (kinderkamers). Er wordt verwacht dat deze industrie de komende jaren meer gaat bijdragen aan de Europese economie. Het project bestaat uit verschillende onderdelen waar de productie van algen voor de nursery fase er één van is en hier heeft dit onderzoek betrekking op (Reproseed website, 2012).

De productie van microalgen in Europa bedroeg in 2008 658 ton waarvan 257 ton bestemd was als voer voor de kweek van schelpdieren met een totale waarde van ongeveer 200 miljoen euro (Otero, 2010). De technieken die momenteel gebruikt worden voor de productie van microalgen als voer voor de hatcheries en nurseries is erg arbeidsintensief en neemt 30% van de totale kosten voor de productie van schelpdierzaad in beslag. In een poging om rendabele alternatieven te bieden zijn de afgelopen jaren kunstmatige voedingsstoffen getest, maar microalgen zijn nog steeds van onmisbare waarde, doordat de alternatieven niet zulke goede resultaten geven en een lagere voedingswaarde hebben dan microalgen. Om de hoge kosten van het kweken van algen tegen te gaan zullen de algen efficiënter gekweekt moeten worden (REPROSEED, 2009).

Om te kijken wat limiterend is voor de buitenkweek van algen wordt gezocht naar indicatoren die aan kunnen geven of nutriënten- en licht limitatie optreedt. Een potentiële indicator is de absorptieratio voor pigment (Riegman & Rowe, 1994). In het onderzoek van Riegman en Rowe (1994) zijn water monsters afkomstig van de Waddenzee uit het voorjaar onderzocht. Daarin viel op dat aan het begin van de algenbloeiperiode een lage absorptieratio te zien was, in deze periode was er nog een overvloed aan nutriënten en zorgde het licht voor de vermindering in de groei. Tegen het einde van het seizoen raakte het stikstof op en dit zorgde voor een verminderende groei, waarbij een stijging van de absorptieratio te zien was. Het hier in dit rapport gepresenteerde onderzoek heeft plaatsgevonden omdat de bovengenoemde relatie tussen limitatie en ratio waarde nooit in een experiment getest is, maar afkomstig is van monitoring van de Waddenzee. Het is onbekend of de indicator kan worden gebruikt voor intensieve algenkweek. Door middel van het experimentele karakter van het onderzoek zou het causaal verband duidelijk moeten worden.

Mocht deze ratio duidelijk een limitatie van nutriënten of licht aan kunnen geven, zou dit een uitkomst kunnen bieden voor algenkwekers. Deze absorptieratio zouden de kwekers zeer eenvoudig en snel kunnen meten. Eenmaal in bezit van, of mogelijkheid tot gebruik maken van, een spectrometer waarmee de absorptieratio gemeten wordt, brengt dit slechts geringe kosten met zich mee. Door te kunnen meten wat limiterend is voor de algengroei zouden de kwekers hierop in kunnen spelen door hun management aan te passen. Door wijze van minder of meer nutriënten toevoegen, vroeger of later oogsten van de cultures om zo de groei te optimaliseren en kosten te reduceren (REPROSEED, 2009).

Ook worden er metingen verricht met PAM (Pulse Amplitude Modulation). PAM is een methode waarmee de fotosynthese efficiëntie gemeten kan worden wat een indicator voor licht- en nutriënt

limitatie kan zijn. Met deze PAM wordt de Fv/Fm en de Fm waarde gemeten, die aangeven hoe “goed” de alg functioneert bij een bepaalde hoeveelheid licht (limitatie of foto inhibitie) en de aanwezige nutriënten.

*Doelstelling van het onderzoek:*

Door middel van het experimenteel aanbrengen van verschillende niveaus in licht en nutriënten in een buitenkweek van *Skeletonema costatum* in raceways het effect op mogelijke indicatoren meten. Daarbij wordt de groeisnelheid van algen gebruikt als indicator voor het aanwezig zijn van een limitatie. De resultaten zullen vergeleken worden met bevindingen uit de literatuur.

*Om dit doel te bereiken is de volgende hoofdvraag opgesteld:*

Hoe valt te meten wat limiterend is voor de buitenkweek van *Skeletonema costatum* in raceways?

Om deze hoofdvraag te kunnen beantwoorden zijn er meer specifieke deelvragen opgesteld:

1. Wat is het effect van vermindering van nutriënten op de absorptieratio voor pigment?
2. Wat is het effect van vermindering van licht op de absorptieratio voor pigment?
3. Wat is het effect van vermindering van licht op de fotosynthese efficiëntie?

## 2 Achtergronden

---

In dit hoofdstuk wordt achtergrondinformatie gegeven met betrekking tot het onderzoek. Door deze achtergrondinformatie moeten onduidelijke zaken en termen duidelijk worden, waardoor het rapport begrijpelijker en makkelijker te lezen wordt.

### 2.1 Chlorofyl-a

Chlorofyl zijn groenachtige pigmenten die een porfyriene ring bevatten, dit is een stabiel ringvormig molecuul waaromheen elektronen vrij kunnen bewegen. Doordat de elektronen vrij kunnen bewegen kunnen deze ringen gemakkelijk elektronen winnen of verliezen met de potentie deze door te geven aan andere moleculen. Dit is het fundamentele proces waarbij chlorofyl de energie van zonlicht vangt. Er zijn verschillende soorten chlorofyl waarvan chlorofyl-A de belangrijkste is. Chlorofyl-A maakt de fotosynthese mogelijk, door het doorgeven van energie door middel van elektronen aan moleculen die met behulp van deze energie suikers maken en dus groei realiseren. Alle planten, algen en cyanobacteriën die aan fotosynthese doen bevatten chlorofyl-A (Speer, 1997).

Verreweg het meeste chlorofyl-A treedt op in twee vormen van absorptiemaxima, op ongeveer 673 en 683nm. Een veel kleiner deel heeft zijn piek op ongeveer 695nm (Yael, 1961). Er wordt echter voor de ratio gemeten bij een golflengte van 665nm. Onderzoek (Heath et al, 1990) heeft uitgewezen dat bij metingen met een golflengte van 665nm het beste inzicht verkregen kan worden in de status van de beschikbare nutriënten voor de algen. Onderzoek van Pirastru (2010), toonde dat na behandeling van algen cultures met een hoge instraling een afname van chlorofyl te zien is. Chlorofyl afbraak vond plaats naast een sterke afname in fotosynthetische elektrontransport als gevolg van de hoge instraling.

### 2.2 Carotenoïde pigmenten

Carotenoïden zijn rode, oranje of gele oplosbare lipide pigmenten die ingebed te vinden zijn in de membranen van chloroplasten (bladgroenkorrels) en chromoplasten (veranderde chloroplasten die verantwoordelijk zijn voor de kleur). De kleur van deze pigmenten wordt gemaskeerd door chlorofyl in fotosynthetische weefsels, maar in latere stadia van de ontwikkeling van de plant of alg kunnen deze pigmenten bijdragen aan de kleur. Carotenoïden beschermen het fotosynthese systeem tegen potentieel schadelijke foto oxidatieprocessen en zijn essentiële componenten van het fotosynthetisch pigment. De functie van deze pigmenten wordt hoofdzakelijk bepaald door het feit of deze zich in fotosynthetisch of non fotosynthetisch weefsel bevinden. In non fotosynthetisch weefsel wordt de functie beperkt tot het beïnvloeden van de kleur van het weefsel. Carotenoïde absorbeert de energie van het blauwe gebied van het spectrum (400 tot 600nm) en draagt deze energie over aan het chlorofyl. Bij een golflengte 480nm is de hoeveelheid carotenoïde het beste meetbaar. Carotenoïde dient als een accessoire pigment door de energie van het licht weg te vangen van het spectrum dat niet wordt gedekt door het chlorofyl en deze energie door te geven. In afwezigheid van carotenoïde lijden planten aan foto oxidatie, wat kan lijden tot het afsterven van het organisme (Glenn, 1995). In een onderzoek van Pirastru (2010) is gekeken naar de verandering van de carotenoïde productie bij een limitatie van nutriënten (in dit geval stikstof). Hier is aangegeven dat veranderingen van de voedselsamenstelling (limitatie N), hoge saliniteit of grote hoeveelheid licht kan leiden tot stress in de fysiologische activiteiten van algen, wat kan leiden tot een toename in de productie van carotenoïde pigmenten.

### 2.3 Absorptieratio pigment (480/665 nm)

Om de kweek van algen zo optimaal mogelijk te laten plaatsvinden is het een handig gegeven te weten welke factor er voor een limitatie zorgt. In de meeste gevallen vindt de limitatie plaats door het gebrek aan licht of het tekort van nutriënten waarvan er één meestal voor de limitatie zorgt. Er is onderzoek gedaan door Riegman en Rowe (1994) naar de invloed van limitatie van licht en nutriënten op de absorptieratio voor pigmenten gemeten bij een golflengte van 480nm en 665nm. Hierin wordt er verondersteld dat de limitatie van enerzijds licht en anderzijds nutriënten terug te zien is in deze ratio. Deze ratio geeft de verhouding tussen carotenoïde pigmenten en chlorofyl-a weer. Deze ratio wordt berekend door de optische dichtheid bij een golflengte van 480nm (carotenoïde pigmenten) te delen door de optische dichtheid bij 665nm (chlorofyl-a) waar deze pigmenten het beste zijn waar te nemen (Watson, 1979). Bij een ratio van rond de 1 (relatief veel chlorofyl-a) wordt er verondersteld dat gebrek aan licht voor limitatie vormt en bij een ratio rond de 2 (relatief veel carotenoïden) zouden de nutriënten de limiterende factor zijn. Riegman en Rowe (1994) zien in hun onderzoek dat aan het begin van het algenbloeiseizoen voldoende nutriënten beschikbaar zijn en de groei afhankelijk is van de hoeveelheid licht wat resulteert in een ratio van rond de één, deze situatie is te vergelijken met de stationaire fase van een batchcultuur. Naarmate het algenbloeiseizoen vordert neemt de hoeveelheid algen toe en is er een sterke afname van nutriënten waarbij uiteindelijk nitraat op raakt, waardoor de absorptieratio van 1.1 naar 1.7 stijgt. Een absorptieratio van 2 wordt beschouwd als uiterste voor nutriënt limitatie.

### 2.4 Fotosynthese reactie

Planten en algen zijn opgebouwd uit cellen/een cel, waarin zich bladgroenkorrels of chloroplasten bevinden. In deze bladgroenkorrels bevindt zich een membraam, de thylakoid, opgebouwd uit eiwitten en vetten. Hierin liggen verzamelingen van enkele honderden chlorofyl-moleculen ingebed, de zogenaamde fotosystemen. Deze verzorgen de energietoelevering voor de fotosynthese. Ze functioneren als antennes die lichtdeeltjes (fotonen) opvangen. Als het fotosysteem een foton opvangt, wordt de lichtenergie overgenomen door een elektron. Dit elektron komt daardoor in een hogere baan. Dit verschijnsel heet excitatie. Het elektron in deze toestand wordt ook wel exciton genoemd. Het exciton kan van molecuul naar molecuul springen en zo door het fotosysteem bewegen. Aan één zijde van het thylakoid bevindt zich een gespecialiseerd molecuul, dat het reactiecentrum wordt genoemd. Het reactiecentrum kan het exciton binden waardoor er een elektrisch potentiaalverschil over het membraam ontstaat. De elektronen zijn nodig voor de fotosynthesereactie waarbij zuurstof en glucose wordt geproduceerd:



Het chemische deel van de fotosynthesereactie verloopt veel langzamer dan de lichtreactie. Het doorsturen van een elektron vanaf het reactiecentrum duurt langer dan het sluiten van het reactiecentrum door een exciton. In de tijd dat het reactiecentrum gesloten is, kunnen meerdere excitaties plaatsvinden. De geëxciteerde toestand heeft echter een beperkte levensduur en als een exciton geen reactiecentrum ontmoet, of als dat al gesloten is, valt het terug in een lagere baan. De extra energie komt dan voornamelijk vrij in de vorm van warmte. In beperkte mate wordt bij het terugvallen weer een foton uitgezonden (fig. 1). Dit verschijnsel het fluorescentie (Rosema, 2011)

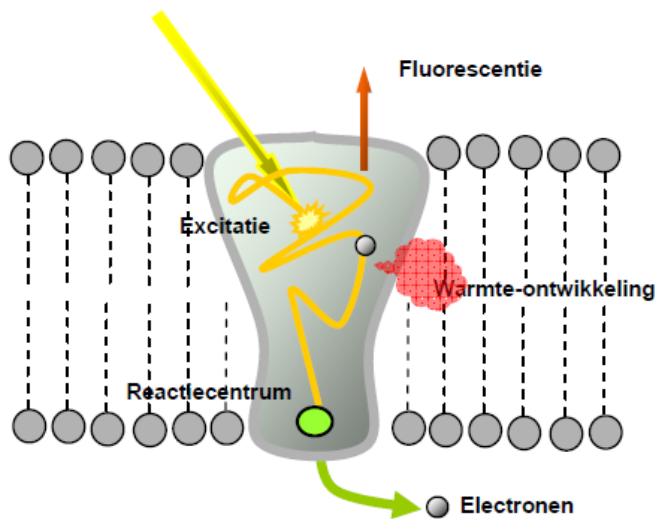


Fig 1: schematische voorstelling van het fotosysteem toont de excitatie van een elektron en de drie alternatieve energiebewegingen: fotosynthese, warmte-ontwikkeling en fluorescentie (Rosema, 2011)

## 2.5 Fotosysteem II efficiëntie

In de Thylakoïde membranen van de chloroplasten zijn twee fotosystemen, namelijk fotosysteem I & II. Fotosysteem I absorbeert fotonen optimaal bij een golflengte van 700nm en fotosysteem II absorbeert fotonen optimaal bij een golflengte van 680 nm. De cijfers van de fotosystemen geven de volgorden aan waarin de fotosystemen ontdekt zijn en niet de volgorde van het overbrengen van de elektronen. Fotosysteem II gebruikt licht energie voor het oxideren van twee watermoleculen naar één zuurstof molecuul. De vier elektronen van de watermoleculen worden overgedragen naar de elektronen transport keten waar het proces verder gaat (Miles, 2003). De fotosynthetische efficiency is de fractie van lichtenergie omgezet in chemische energie tijdens de fotosynthese in planten en algen. Voor zonlicht waarbij slechts 45% van het licht fotosynthetisch actief is, is het maximale rendement van de omzetting ongeveer 11%. In werkelijkheid absorberen planten en algen niet al het licht. Dit is een gevolg van reflectie van het licht. Als de fotosynthese door foto inhibitie niet optimaal verloopt moet licht energie afgevoerd worden om beschadiging te voorkomen wat tot een lagere efficiëntie leidt (Aquaculture and consumer protection, 1997).

## 2.6 Maximale fluorescentie(Fm)

De maximale frequentie, kortweg Fm, wordt gemeten met behulp van PAM. Door monsters van algen in het donker te plaatsen worden alle fotosystemen geopend om in geval van een lichtpuls zoveel mogelijk licht op te kunnen vangen voor fotosynthese. Met PAM wordt op het monster een oververzadiging van licht op de algen afgestuurd. Door deze overmaat is de fluorescentie het hoogst en kan dus de maximale fluorescentie (Fm) gemeten worden (Rosema, 2011). Een in verhouding lagere Fm duidt op een effectiever fotosysteem, doordat minder energie verloren gaat in de vorm van fluorescentie.

## 2.7 (Fv/Fm) ratio

Een andere indicator die gebrek aan licht of nutriënten aan kan geven is de Fv/Fm ratio die wordt gemeten met PAM. De Fv/Fm ratio geeft een mogelijke stressreactie in de chlorofylfluorescentie van de alg weer bij een bepaalde hoeveelheid licht, zowel een tekort als een overvloed (foto inhibitie) en tijdens nutriënt limitatie. Dit kan bekeken worden door naar de fotosynthese activiteit te kijken (Stibal, 2007). De maximale energie omzetting efficiëntie van fotosysteem II waarvoor de Fv/Fm ratio een indicator is, wordt berekend met de volgende formule:

$$Fv/Fm = (Fm - F_0) / Fm$$

Waarbij F<sub>0</sub> de minimum fluorescentie is, Fm the maximale fluorescentie en Fv de maximale fluorescentie variabele opbrengst is van een monster dat minimaal 15 minuten in donkere omstandigheden is blootgesteld (Kamermans, 1999). De minimale fluorescentie F<sub>0</sub> geeft tijdens

afwezigheid van fotosynthetisch licht informatie over de minimale fotochemische afbraak en de efficiëntie van Fotosysteem II (Maxwell, 2000). Janknegt (2008) geeft aan dat de fotosynthese II efficiëntie afneemt tijdens een periode van een overvloed aan straling en toeneemt wanneer er weinig straling is. Bij een lage instraling zal de Fv/Fm hoger worden en bij een te hoge instraling zal Fv/Fm dalen. Deze Fv/Fm waarde zou in overeenstemming moeten zijn met de limitatie van licht. Excitatie energie verkregen van de absorptie door de pigmenten complexen die verantwoordelijk zijn voor de opnamen van energie in fotosysteem II kunnen worden gebruikt voor het opstarten van de fotochemische reactie voor fotosynthese. Deze energie kan worden verloren in de vorm van warmte van fluorescentie (het in energie terugvallen van een elektron van een hoge naar een lagere energietoestand). Deze processen concurreren met elkaar en beïnvloeden op deze manier de energie omzettingen efficiëntie. Een optimale waarde ligt rond de 0,83 voor deze Fv/Fm waarden. (Maxwell, 2000). Parkhill et al (2001) laat een afname van de Fv/Fm ratio zien als gevolg van N-limitatie, waar deze ratio afneemt van 0,65 naar 0,2 over een periode van 25 dagen. Hierin wordt een Fv/Fm ratio van 0,6 als relatief hoog beschouwd waar het fotosysteem goed functioneert.

## 2.8 Groei van een algencultuur

Een algencultuur ontwikkelt zich door enkele groeifasen te doorlopen. In figuur 2 worden deze fasen weergegeven in een groeicurve. De fasen worden aansluitend besproken.

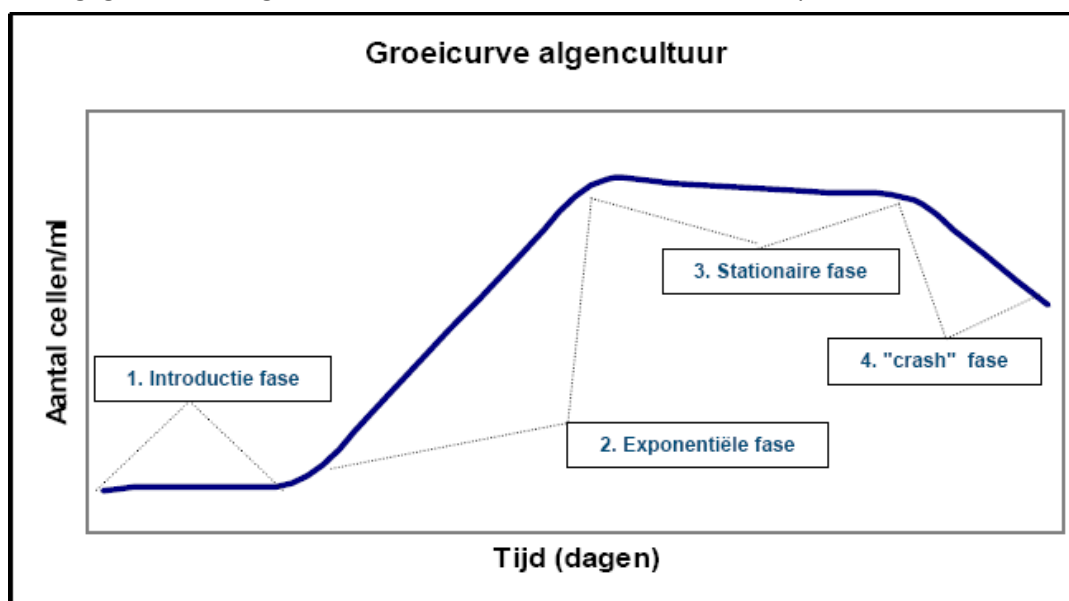


Fig 2: Groeifasen algencultuur (Hoff en Snell, 2001)

### 1. Introductiefase (Lag-fase)

De introductiefase of Lag-fase is de fase waarin de dichtheid van het aantal cellen niet of nauwelijks toeneemt. De algen hebben een korte periode nodig om te wennen aan hun nieuwe omgeving (acclimatiseren) alvorens ze gaan groeien.

### 2. Exponentiële fase (Log-fase)

Nadat de algen zich hebben geacclimatiseerd aan de kweekcondities, vindt er een exponentiële groeifase plaats. Hierin zal de celdeling zich zodanig versnellen dat de stijging in aantal als logaritmisch beschouwd kan worden. De exponentiële groeifase is afhankelijk van de aanwezige lichtcondities, temperatuur en nutriënten en verschilt per algensoort.

### 3. Stationaire fase

In deze fase zullen er evenveel algen bijkomen als afsterven. Bij een grotere dichtheid van algen binnen de cultuur zal dit leiden tot een korte stationaire fase. Cellen welke in deze fase geoogst worden, hebben vaak al een lagere calorische waarde, omdat door de algen onderlinge concurrentie plaats vindt op gebied van ruimte, licht en nutriënten wat energie kost.

### 4. Crash fase

De dichtheid van de cultuur neemt sterk af (cultuur stort in ook wel crashed genoemd). Oorzaken hiervan kunnen zijn: gebrek aan nutriënten, licht, tekort aan koolstofdioxide of verandering van de pH. Een ingestorte cultuur kan niet opnieuw worden opgestart (Hoff en Snell, 2001).

## 2.9 Skeletonema costatum

Voor het onderzoek is gebruik gemaakt van de alg *Skeletonema costatum*. *Skeletonema costatum* is een mariene alg en behoort tot de diatomeeën (fig. 3) (algeabase website, 2012). *Skeletonema costatum* is een diatomeeën soort, dit betekent dat deze een uitwendig citoskelet vormt uit silicaat. Aan het medium wordt silicaat toegevoegd om groei en vorming van het citoskelet mogelijk te maken. *Skeletonema costatum* is wereldwijd verspreid over de oceanen met uitzondering van de noord- en zuidpool, speelt een belangrijke rol in het marine ecosysteem en vormt een voedselbron voor bijvoorbeeld micro-organismen en schelpdieren. *Skeletonema costatum* wordt gekenmerkt door de geel bruine kleur. Ze zijn in staat zich zowel seksueel als asexueel voor te planten. *Skeletonema costatum* heeft de eigenschap ketens te vormen zoals weergegeven in figuur 4 (Guiry, 2011)

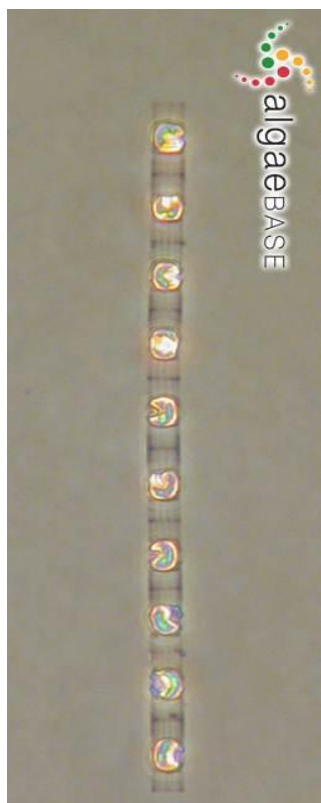


Fig 4: *Skeletonema costatum* (algeabase)

### Scientific Classification

Empire:	<i>Eukaryota</i>
Kingdom:	<i>Chromista</i>
Subkingdom:	<i>Harosa</i>
Infrakingdom:	<i>Heterokonta</i>
Phylum:	<i>Ochrophyta</i>
Subphylum:	<i>Khakista</i>
Class:	<i>Bacillariophyceae</i>
Subclass:	<i>Coscinodiscophycidae</i>
Superorder:	<i>Thalassiosiranae</i>
Order:	<i>Thalassiosirales</i>
Family:	<i>Skeletonemaceae</i>
Genus:	<i>Skeletonema</i>

(A. Cleve 1878)

Fig 3: Wetenschappelijke classificatie *Skeletonema costatum*



# 3 Methode

---

Hier zal de proefopzet van de in totaal vier uitgevoerde experimenten behandeld worden.

## 3.1 Proefopzet

De voorbereiding die nodig is om tot het uitvoeren van de experimenten te komen zal hier behandeld worden.

### 3.1.1 Raceways



Fig 5: Raceway

Voor de proeven is gebruik gemaakt van speciaal geconstrueerde raceways (fig. 5) waar cultures met een volume van 1800 liter in gekweekt kunnen worden. Deze polyester bakken zijn geschikt voor het kweken van cultures met een diepte van 0,6 m. Deze raceways zijn voorzien van een schoepenrad dat voor beweging van de cultures zorgt. Door de beweging vindt er diffusie plaats en worden de cultures voorzien van zuurstof en koolstofdioxide. Dit is noodzakelijk voor de fotosynthese en dus groei van de algen. In de raceways zit een stop waar een standpijpje op is aangesloten om een vast peil in de cultures te kunnen handhaven. Imares heeft de beschikking over zes van deze raceways, die allen gebruikt zijn tijdens de experimenten.

Voordat de raceways gebruikt zijn, zijn deze zorgvuldig schoongemaakt en voor 24 uur gechloreerd. De raceways zijn zo kort mogelijk voor gebruikname schoon gemaakt om de kans op besmettingen te minimaliseren.

### 3.1.2 Water

Voor het vullen van de raceways is gebruik gemaakt van zeewater. Dit zeewater is afkomstig de Oosterschelde dat ter hoogte van Imares Yerseke wordt opgepompt. Het water is door een zandfilter geleid waarna het nog door drie kaarsfilters van 25, 5 en 0,2  $\mu\text{m}$  (fig. 6) wordt geleid om de kans op besmetting en vervuiling van het water te minimaliseren.



Fig. 6: kaarsfilter,  
25, 5 en 0,2  $\mu\text{m}$

### 3.1.3 Medium

Bij de experimenten is er gebruik gemaakt van een zoutwater alg (*Skeletonema costatum*), waardoor er voor een zoutwatermedium gekozen is, namelijk het walne-medium (Walne, 1970). Dit medium bestaat uit de deeloplossingen A,B,C en D waarvan verschillende hoeveelheden aan de algencultures toegevoegd zijn. De complete samenstelling van het Walne-medium is weergegeven in bijlage 1. Deeloplossing A bevat de benodigde Nutriënten, oplossing B spoorelementen, oplossing C vitamine en oplossing D bevat silicaat. Oplossing D wordt speciaal gebruikt bij diatomeeën. Deze hebben silicaat nodig voor hun citoskelet.

### 3.1.4 Opkweken

Om de experimenten uit te voeren was er voldoende algen culture nodig om de zes raceways van 1800 liter op te kunnen starten. Om te zorgen dat er voldoende algen beschikbaar waren, zijn deze eerst op kleinere schaal opgekweekt. De algen die gebruikt zijn, zijn afkomstig van de hatchery van de Roem van Yerseke. De Roem van Yerseke was in staat om grote hoeveelheden algen aan te leveren (200 liter), waardoor er rechtstreeks in één raceway geënt kon worden. In deze raceway werden de algen opgekweekt tot een concentratie van 0,6 miljoen cellen/ml. Wanneer een concentratie van 0,6 miljoen cellen/ml bereikt was kon de inhoud van deze raceway verdeeld worden over de totaal 6 raceways. Dit zorgt ervoor dat de startconcentratie aan algen bij de experimenten ongeveer 0,1 miljoen cellen/ml bedroeg.

## 3.2 Experimenten

Bij alle experimenten is er gebruik gemaakt van batch culturen, d.w.z. groei zonder toevoeging van extra medium. De experimenten voor de nutriënt- en licht limitatie zijn apart uitgevoerd. Voor de experimenten zijn er zes raceways beschikbaar. Totaal is de serie van zes raceways vier keer opgestart waarbij de bijbehorende experimenten uitgevoerd zijn. Tabel 1 laat een overzicht zien van de in totaal vier uitgevoerde experimenten.

Tabel 1: overzicht experimenten	Behandeling	Data van uitvoering
<b>Experiment 1: Nutriënt gradiënt</b>	6 verschillende behandelingen in nutriënt concentratie: 100, 60, 40, 20 en 10 procent met de gebruikelijke hoeveelheid van het Walne medium	19 t/m 26 maart 2012
<b>Experiment 2: Nutriënt proef</b>	3 aangepaste cultures zonder toevoeging van Walne-medium en 3 controle cultures met 100% van de gebruikelijke hoeveelheid van het Walne-medium	7 t/m 13 mei 2012
<b>Experiment 3: Licht gradiënt</b>	6 verschillende behandelingen met verschillende percentages van het beschikbare daglicht: 100, 50, 25, 12,5, 6,25 en 0 %	2 t/m 9 april 2012
<b>Experiment 4: Licht proef</b>	3 aangepaste cultures met 6,25% van het beschikbare licht en 3 controle cultures met 100% van het beschikbare daglicht	23 t/m 30 april

Elk experiment heeft afhankelijk van de groei ongeveer 8 dagen geduurd. Er is gestopt met monitoring als de cultures in cel concentratie afnamen en dus in de crash fase verkeerden. Voor het opzetten en opkweken van de algen voor de experimenten was ongeveer vijf dagen uitgetrokken. In figuur 7 is een schematische opzet van de raceways weergegeven.

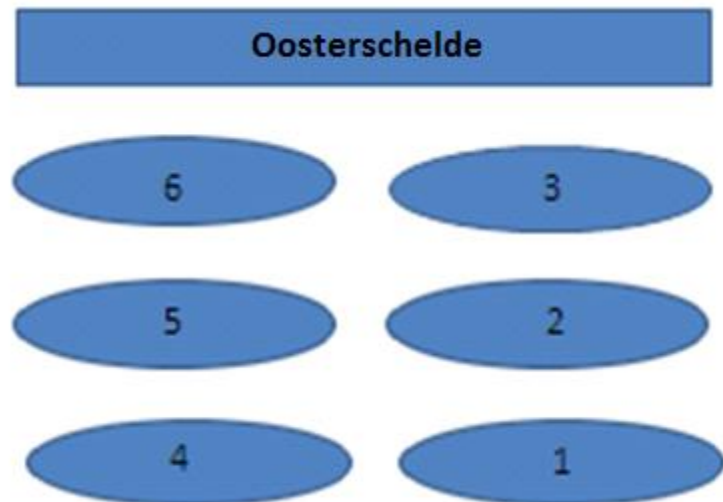


Fig 7: Schematische weergegeven opzet raceways

### 3.2.1 Experiment 1: Nutriënt limitatie gradiënt

Experiment 1 is uitgevoerd om te achterhalen bij welke hoeveelheid toegevoegde nutriënten een limitatie in de groei waar te nemen is en waar de waardes die limitatie aan kunnen geven, zoals de absorptieratio 480/665nm, gaan verschillen van de controle. Om dit te achterhalen zijn in de zes raceways verschillende hoeveelheden van de standaard gebruikte hoeveelheid van het Walne-medium gebruikt, waardoor er een gradiënt ontstaat met verschillende hoeveelheden nutriënten concentraties.

De volgende percentages van de standaard gebruikte hoeveelheid van het Walne-medium zijn voor de eerste proef gebruikt:

- Raceway 1: geen Walne-medium
- Raceway 2: 100% Walne-medium
- Raceway 3: 20% Walne-medium
- Raceway 4: 60% Walne-medium
- Raceway 5: 10% Walne-medium
- Raceway 6: 40% Walne-medium

Zoals te zien is ligt de focus meer op de lagere hoeveelheden Walne-medium waar een duidelijkere afname in groei (limitatie) te verwachte is.

### 3.2.2 Experiment 2: Nutriënt limitatie

Aan de hand van de resultaten van experiment 1 is experiment 2 uitgevoerd worden. Hier is gebruik gemaakt van drie aangepaste cultures afhankelijk van waar bij experiment 1 een duidelijke negatieve invloed (limitatie) op de groei waar te nemen was, maar waar de cultuur nog wel enige groei vertoonde. De resultaten van experiment 1, die worden toegelicht in hoofdstuk 4.1 hebben doen beslissen dat bij de aangepaste cultures geen Walne-medium is toegevoegd. Deze cultures worden in triplo opgestart en zullen dienen om de resultaten bij het gradiënt experiment te bevestigen. Hierbij wordt gebruik gemaakt van drie controle cultures waarbij de gebruikelijke hoeveelheid Walne-medium wordt toegevoegd.

De experimentelen opzet zag er als volgt uit:

- Raceway 1: 100% Walne-medium (controle)
- Raceway 2: 0 % Walne-medium
- Raceway 3: 100% Walne-medium (controle)
- Raceway 4: 0 % Walne-medium
- Raceway 5: 100% Walne-medium (controle)
- Raceway 6: 0 % Walne-medium

Na het uitvoeren van dit experiment zal de invloed tussen nutriënt limitatie en de absorptieratio van pigment (480/665nm) en de andere gemeten waardes zichtbaar moeten zijn.

### 3.2.3 Experiment 3: Licht limitatie gradiënt

Voor de licht limitatie is er eerst een gradiënt uitgezet met verschillende percentages van het buitenlicht. Dit om te achterhalen bij welke limitatie van het licht een limitatie in de groei waar te nemen is en waar de waardes die limitatie aan kunnen geven zoals de absorptieratio 480/665nm mogelijk gaan verschillen van de controle

Bij het limiteren worden voor de volgende percentages van het aanwezige buitenlicht gezorgd:

- Raceway 1: 6,25 % licht
- Raceway 2: 25 % licht
- Raceway 3: 100 % licht (controle)
- Raceway 4: 12,5 % licht
- Raceway 5: 50 % licht
- Raceway 6: 0 % licht

Voor het verduisteren van de cultures is gebruik gemaakt van transparante pvc (polyvinylchloride) platen, deze platen zijn licht gegolft. De platen zijn deels zwart afgeplakt m.b.v. duct tape en zwarte vuilniszakken om de aangegeven percentages van de lichtdoorlatendheid te verkrijgen. De controle cultuur wordt ook afgedekt met transparante platen, om de omstandigheden van buitenaf zoals invloed van regen voor alle culturen hetzelfde te houden.

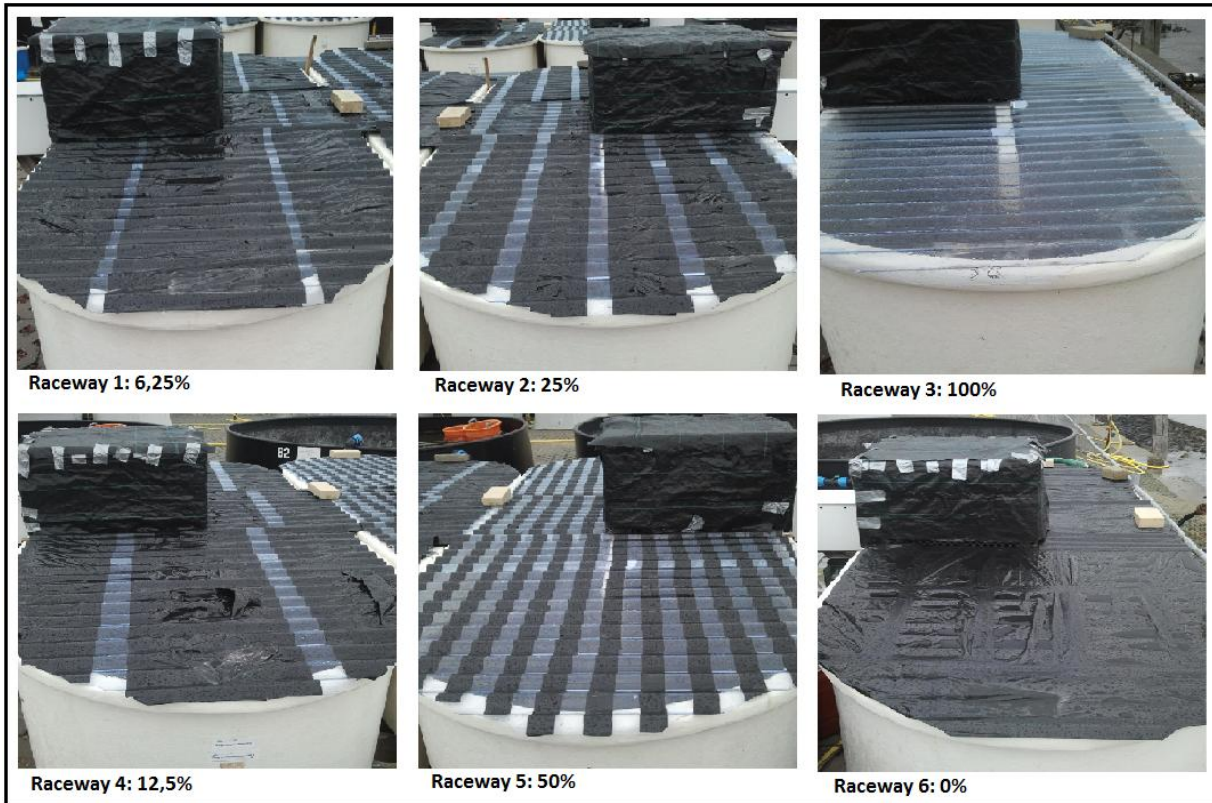


Fig. 8: weergaven verschillende licht behandelingen bij experiment 3, behandelingen met 6,25%, 25%, 100%, 12,5%, 50% en 0% van het beschikbare daglicht

In figuur 8 is de opzet met de verschillende behandelingen weergegeven. De schoepenraden zijn alle afgeplakt m.b.v. worteldoek (fig. 9). Dit is gedaan om te voorkomen dat er licht bij de schoepenraden naar binnen komt en dit de groei zou kunnen beïnvloeden, bij met name de culturen waarbij weinig licht wordt doorgelaten.



Fig. 9: Schoepenrad bedekt met worteldoek

### 3.2.4 Experiment 4: Licht limitatie

Aan de hand van de resultaten van experiment 3 is experiment 4 uitgevoerd. Hier is gebruik gemaakt van drie aangepaste cultures afhankelijk van waar bij experiment 3 een duidelijke negatieve invloed (limitatie) op de groei waar te nemen was, maar waar de cultuur nog wel enige groei vertoonde. De resultaten van experiment 3, die zijn toegelicht in hoofdstuk 4.3, hebben doen beslissen dat bij de aangepaste cultures 6,25% van het buitenlicht is doorgelaten. Deze cultures zijn in triplo opgestart en zullen dienen om de resultaten bij het gradiënt experiment te bevestigen. Hierbij is gebruik gemaakt van drie controle cultures met enkel transparante platen. Het experiment heeft er als volgt uit gezien zien:

- Raceway 1: 100% licht (controle cultuur)
- Raceway 2: 6,25% licht
- Raceway 3: 100% licht (controle cultuur)
- Raceway 4: 6,25% licht
- Raceway 5: 100% licht (controle cultuur)
- Raceway 6: 6,25% licht

Na het uitvoeren van dit experiment is de invloed tussen licht limitatie en de absorptieratio van pigment (480/665nm) en de andere gemeten waardes zichtbaar

### 3.3 Metingen

Dagelijks zijn de cultures gemonitord en metingen verricht om het verloop van de cultures waar te kunnen nemen. Om de meetomstandigheden zo betrouwbaar mogelijk te houden zijn de metingen dagelijks op ongeveer dezelfde tijdstippen gestart (8:30) en in dezelfde volgorde uitgevoerd. Alle uitgevoerde metingen zijn weergegeven in tabel 2 waarna deze verder toegelicht zullen worden. Voor alle experimenten zijn dezelfde metingen verricht.

Tabel 2: overzicht metingen

Meting	Apparatuur	Uitvoering	Eenheid
<b>Zuurstof concentratie</b>	Hach HQd Field case	Dagelijks	mg/l
<b>Zuurstof verzadiging</b>	Hach HQd Field case	Dagelijks	%
<b>pH</b>	Hach HQd Field case	Dagelijks	/
<b>Saliniteit</b>	Hach HQd Field case	Dagelijks	psu
<b>Temperatuur</b>	Hach HQd Field case/ temperatuur logger	Dagelijks	°C
<b>Licht</b>	Li-cor sensor LI-193	Exp 2 & 4 dagelijks	PAR
<b>Absorptie 480 en 665</b>	Spectrometer	Dagelijks	nm
<b>Fv/Fm</b>	Pulse amplitude modulation (PAM)	Door de weeks	/
<b>Fm (maximale absorptie)</b>	Pulse amplitude modulation (PAM)	Door de weeks	/
<b>Algenconcentratie</b>	Bürker-türk	Dagelijks	Cellen/ml
<b>Drooggewicht</b>	Droogstoof	Random 3keer per exp.	g/cel & g/100 ml
<b>Nutrienten: PO<sub>4</sub><sup>3-</sup>, NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, NO<sub>2</sub><sup>-</sup>, NH<sub>4</sub><sup>+</sup>, SiO<sub>4</sub><sup>4-</sup></b>	Auto analyser (skalar systeem sam <sup>plus</sup> )	Dagelijks	µmol/l & ppb
<b>Flow cytometer</b>	BD Accuri® C6 Flow Cytometer	Dagelijks	/

### 3.3.1 Abiotische Parameters

Deze parameters zeggen wat over de waterkwaliteit en omstandigheden waar de algen zich in bevinden. De groei van de cultures kan deze waarden beïnvloeden. Door het meten van deze parameters kan er meer inzicht verkregen worden in de staat van de cultures en kunnen mogelijke veranderingen verklaard worden.

De volgende abiotische parameters zijn dagelijks gemeten, met de aangegeven meetapparatuur:

- O<sub>2</sub> concentratie(mg/l) Hach HQd Field case (fig. 11)
- O<sub>2</sub> verzadiging (%) Hach HQ Field case
- pH, Hach HQ Field case
- Saliniteit (psu) Hach HQ Field case
- Temperatuur (°C) Hach HQ Field case
- Temperatuur (°C) logger
  
- Licht (PAR) Li-cor sensor (Spherical Quantum Sensor Model Number: LI-193) (fig. 10)

De temperatuur van de eerste vier raceways zullen naast de handmatige metingen met de Hach HQ Field case ook met een temperatuurlogger gemeten worden. Met deze logger is de temperatuur om de 30 minuten gemeten waardoor de schommeling gedurende dag zichtbaar is. Gedurende de experimenten zijn meerdere temperatuurloggers storings gaan geven. Daardoor zijn niet alle gemeten cultures weergegeven in de resultaten van de temperatuurlogger.

De hoeveelheid licht uitgedrukt in PAR (Photosynthetic Active Radiation) is aan het wateroppervlak, op 20 cm en 40 cm diepte gemeten. Door het meten van de PAR op verschillende diepten kan de uitdoving van het licht in het water bepaald worden, die plaatsvindt door vertroebeling van het water als gevolg van algengroei. Door het meten van de uitdoving is er een beeld gevormd van de beschikbaarheid van het licht voor fotosynthese op verschillende dieptes.



Fig. 10: lichtmeter (Li-cor sensor)



Fig. 11: Hach HQ Field case, pH en zuurstof, temp.

### 3.3.2 Indicatoren voor licht- en nutriënten limitatie

Deze parameters geven de aanwezigheid van pigmenten en de activiteit van fotosynthese weer. Deze parameters kunnen iets zeggen over de omstandigheden waaronder de algengroei plaatsvindt.

#### 3.3.2.1 Absorptie 480 en 665nm

De absorptie is gemeten met behulp van de spectrometer (fig. 12) bij een golflengte van 480 en 665nm. Bij een golflengte van 480nm zijn de carotenoïdenpigmenten het best waar te nemen en bij 665nm chlorofyl-a.



Fig 12: spectrometer

#### 3.3.2.2 Fv/Fm en Fm

De Fv/Fm ratio en Fm wordt gemeten met behulp van PAM: Pulse Amplitude Modulation (fig. 13). Met behulp van PAM kan fluorescentie gemeten worden. De hoeveelheid fluorescentie varieert als gevolg van de toestand van de operationele componenten die verantwoordelijk zijn voor de fotosynthese. Door het monster minimaal 15 minuten in het donker te houden kan de minimale fotochemische afbraak ( $F_0$ ) van het monster gemeten worden in het donker. Als het monster vervolgens wordt blootgesteld aan voldoende licht zodat alle fotosystemen verzadigd raken met fotonen kan de maximale fluorescentie gemeten worden. Het verschil tussen deze twee uiterste waarden is de variabele fluorescentie (Fv) die met de onderstaande formule berekend wordt.

$$Fv/Fm = (Fm - F_0) / Fm$$



Fig 13: weergave van PAM (pulse amplitude modulation) 1: monitor waar de gegevens worden afgelezen 2: Besturingssysteem PAM 3: licht sensor en detectie



### 3.3.3 Algen concentratie

Door het meten van algenconcentratie over de dagen wordt de groei(curve) zichtbaar. De algenconcentratie is een belangrijk gegeven doordat de limitatie in groei hierin zichtbaar wordt. Voor het bepalen van de dichtheid en fases van de cultures worden verschillende methodes toegepast.

#### 3.3.3.1 Bürker-türk telraam

De algentellingen met een Bürker-türk telraam (fig. 14) zijn gedaan met behulp van een lichtmicroscop. Met een pasteurpipet wordt een hoeveelheid algen op het telraam aangebracht. Door cohesie-werking tussen het telraam en het afdekglasje, wordt het monster onder het afdekglasje gezogen. Een Bürker-türk telraam bestaat uit hokken met een oppervlakte van 0,04 mm<sup>2</sup> en een diepte van 0.1 mm. Het werkprotocol voor de algentelling met behulp van de Bürker-türk is weergegeven in bijlage 2. Door het tellen met de lichtmicroscop worden de algen afzonderlijk bekeken. Op deze manier kan besmettingen van andere algensoorten ook waargenomen worden.

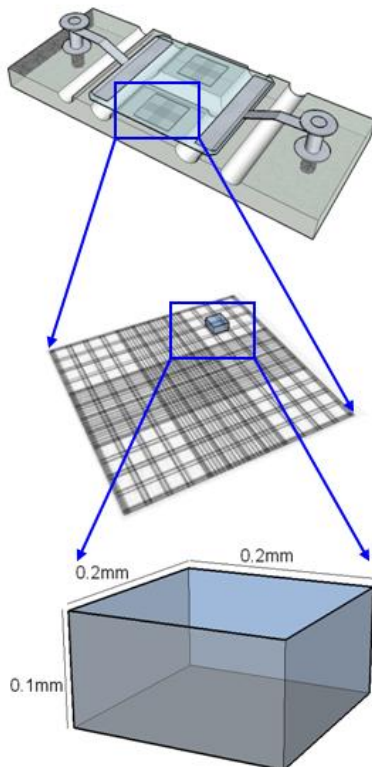


Fig 14: Bürker-türk telraam

#### Voorbeeld berekening

Voor het berekenen van het aantal algen per milliliter wordt gebruik gemaakt van de volgende formule:

$$= (\text{aantal algen} * 1000) / (\text{aantal hokjes} * 0,004)$$

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:

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

#### 3.3.3.2 Flow cytometer

Met de flow cytometer (fig. 15) is het mogelijk om de eigenschappen van afzonderlijke deeltjes te meten. Bij het injecteren van het monster worden de deeltjes willekeurig verdeeld in een drie dimensionale ruimte. De deeltjes moeten geordend worden in een stroom van enkele deeltjes waarna deze kan worden uitgelezen door het detectie systeem van de machine. Bij de metingen passeren de deeltjes één of meer lichtstralen. Door de lichtverstrooiing van licht en de fluorescentie wordt er informatie over de eigenschappen van de deeltjes gegeven. Doordat *Skeletonema costatum* ketens vormen worden de algen niet afzonderlijk geteld maar als ketens, waardoor er geen betrouwbare gegevens zijn voor algenconcentraties, maar kan er wel inzicht in de fysische en chemische eigenschappen van de cultures verkregen worden (Rahman, 2006).



Fig 15: Flow cytometer

### 3.3.3.3 Biomassabepalingen

De biomassabepalingen kunnen wat zeggen over de kwaliteit van de algen. Zo kan bijvoorbeeld de biomassa van twee monsters verschillend zijn terwijl de algenc concentratie gelijk is. Dit heeft te maken met de grootte van de algencellen. Omdat bij biomassabepalingen met minimale gewichten gewerkt wordt, is het van belang dat de metingen uiterst nauwkeurig worden uitgevoerd. Hiervoor is een vaste volgorde ontwikkeld.

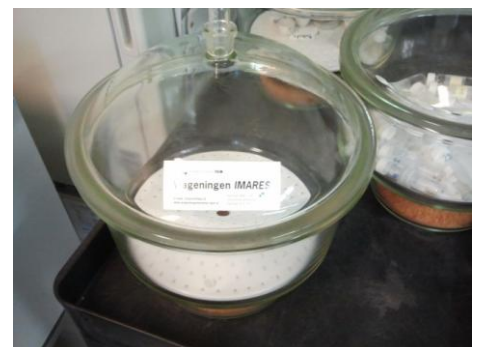
Om een nauwkeurige meting van het gewicht van het filter te verkrijgen is het van belang dat het filter gedurende 24 uur in de droogstoof met een temperatuur van 104 °C wordt geplaatst om mogelijk vocht te doen verdampen. Hierna is het van belang dat het filter in een exsiccator afkoelt zodat het filter geen vocht uit de lucht aantrekt. Het gewicht wordt bepaald met een analytische balans. Een bekende hoeveelheid volume wordt gefiltreerd met behulp van een vacuümpomp (fig. 16). Om te voorkomen dat er zout op het filter achterblijft wordt er nagespoeld met ammoniumformaat dat mogelijke zout resten doet oplossen. Hierna moet het filter voor 24 uur in de droogstoof geplaatst worden (fig. 17). Na 24 uur wordt het filter in de exsiccator (fig. 18) gezet om af te koelen. Dit wordt gedaan met een grijptang om contact met de handen te voorkomen, zodat er bijvoorbeeld geen vet overgebracht wordt en de meting nauwkeuriger blijft. Na twee uur tijd kan het gewicht van het filter met algen gewogen worden. Het verschil in gewicht is gelijk aan de biomassa van de algen voor een bepaalde volume. In bijlage 3 is het werkprotocol voor deze bepaling en berekening te vinden.



Figuur 16: vacuümpomp



Figuur 17: droogstoof



Figuur 18: exsiccator

### 3.3.5 Nutriëntbepalingen

De nutriëntbepalingen zijn belangrijk om te kunnen achterhalen of deze voor een limitatie in de groei zorgen. Door het verloop van de opnamen van nutriënten door algen te meten, kan er bekeken worden hoeveel nutriënten er nodig zijn voor een bepaalde productie van algen. De nutriënten die dagelijks worden bepaald zijn:

- Fosfaat ( $\text{PO}_4^{3-}$ )
- Nitraat ( $\text{NO}_3^-$ )
- Nitriet ( $\text{NO}_2^-$ )
- Ammonium ( $\text{NH}_4^+$ )
- Silicaat ( $\text{SiO}_4^{4-}$ )

Deze bepalingen zijn uitgevoerd met de auto analyzer (skalar systeem sam<sup>plus</sup>, fig. 19) Bij bepalingen met de auto analyzer wordt een hele serie aan monsters in één keer volledig automatisch gemeten. De monsters worden met een peristaltisch pompje opgezogen en in een dun slangenstelsel geleid. Bij elk opgenomen monster wordt er reagens toegevoegd en voor een luchtbel tussen de verschillende monsters gezorgd om interacties tussen de monsters te voorkomen. In het slangenstelsel worden de monsters indien nodig verhit en vindt de reactie met het reagens plaats waarbij een lichte kleurverandering plaatsvindt. Als de reactie plaats gevonden heeft, komen de monsters door een soort curvette waarbij de absorptie gemeten wordt. Het gemeten signaal wordt door de computer omgezet in pieken, waarna deze afgelezen kunnen worden.

Elke dag zijn per cultuur vier monsters genomen voor analyse met de auto analyzer. De monsters zijn gefiltreerd met 0,45µm filters om alle algen en zwevend stof te doen verwijderen. Drie monsters zijn bewaard in de vriezer: Fosfaat ( $\text{PO}_4^{3-}$ ), N-componenten ( $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{NO}_2^-$  en  $\text{NH}_4^+$ ) en een back-up monster. het monster voor de silicaat analyse werd bewaard in de koelkast.

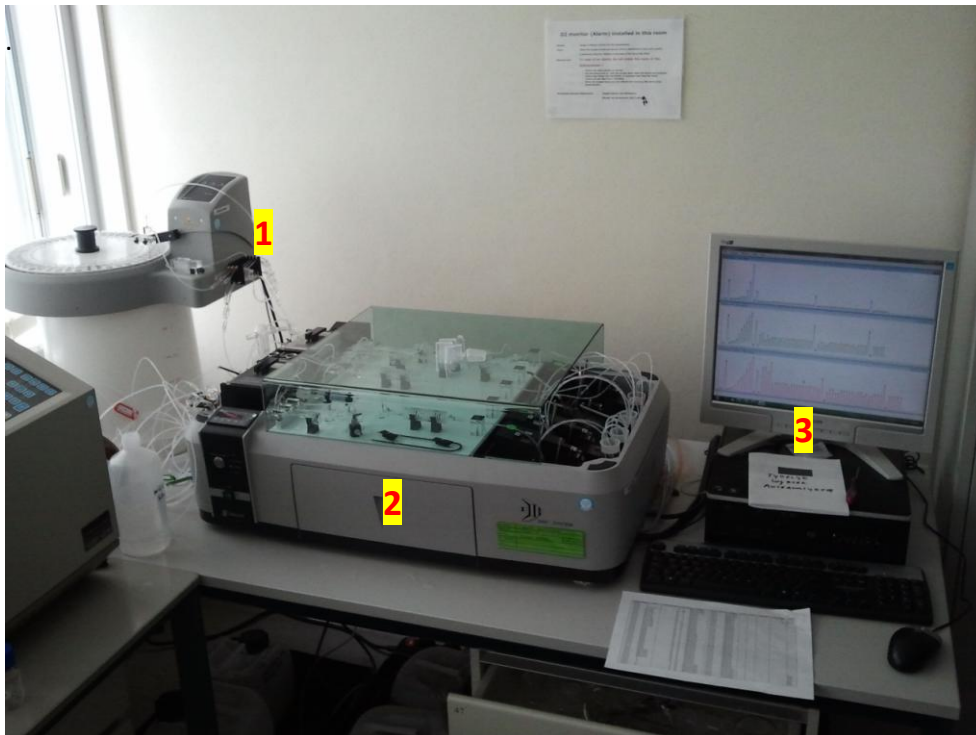


Fig. 19: auto analyzer (skalar systeem sam<sup>plus</sup>), 1: peristaltisch pompje neemt monster. 2: slangenstelsel waar de reactie met het reagens plaatsvindt en waar de absorptie gemeten wordt. 3: computerprogramma verwerkt de gemeten absorptie.

### 3.3.5 Statistische analyses

Om aan te kunnen geven of de onderlinge verschillen significant zijn, zijn deze statistisch getest. Iets is significant als het onwaarschijnlijk is dat de onderlinge verschillen toevallig tot stand zijn gekomen. Voor de tests is gebruik gemaakt van het software programma IBM SPSS 19 (Statistical Package for the Social Science), waarbij gebruik wordt gemaakt van zogenaamde ANOVA tests. De homogeniteit van de variaties werd getest met een Levene test, die aangeeft of er getest mag worden. Aangezien niet alle variaties homogeen verdeeld waren (Levene test) zijn sommige data getransformeerd (log voor ratio's en wortel voor tellingen). De statistische tests kunnen enkel toegepast worden voor experimenten waarbij gebruik gemaakt is van duplicaten (experiment 2 & 4). Het geteste is significant als de waarden voor significantie aangeven met P kleiner is dan 0,050. Alle waarden boven de 0,050 worden niet als significant beschouwd.

## 4 Resultaten

Totaal zijn er vier verschillende experimenten uitgevoerd, deze hebben 7 à 8 dagen geduurd. Bij de experimenten 1 en 3 is er een gradiënt in licht en nutriënten ingesteld. Aan de hand van deze resultaten is voor de behandeling van de definitieve proef (2 en 4) gekozen om de resultaten te bevestigen. Tijdens de eerste dag van de start van de experimenten is de cultuur waaruit de cultures geënt zijn op een later tijdstip gemeten dan de overige cultures. Dit doordat deze cultuur na het overenten nog aangevuld moest worden tot het juiste volume. Het aanvullen hiervan kan tot 4 uur in beslag nemen. Door het later monitoren van deze cultuur kunnen op dag 1 afwijkende waarden aangetroffen worden.

### 4.1 experiment 1: nutriënt limitatie gradiënt

Experiment 1 is uitgevoerd van 19 tot en met 26 maart 2012. Bij het experiment is voor de zes raceways voor verschillende concentratie van het Walne-medium gezorgd: 100%, 60%, 40%, 20%, 10% en 0% van de standaard gebruikelijke hoeveelheid van het Walne-medium. Het doel van het experiment is om nutriënten opzettelijk te limiteren en te achterhalen bij welke hoeveelheid toegevoegde nutriënten een limitatie in de groei waar te nemen is en waar de waardes die limitatie aan kunnen geven zoals de absorptieratio 480/465nm gaan verschillen van de controle.

#### 4.1.1 Algengroei

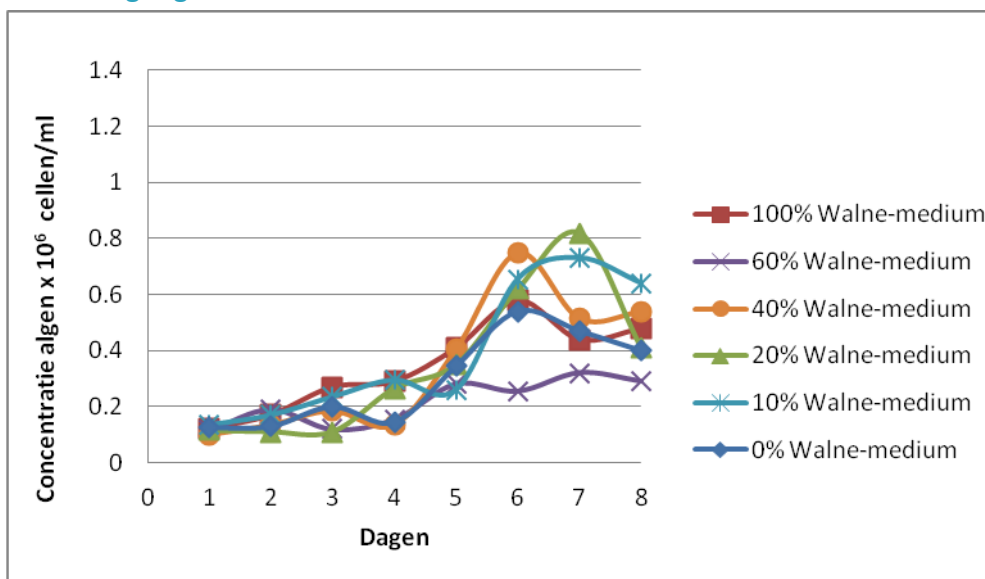


Fig. 20: Verloop van de algconcentratie gedurende experiment 1 bij verschillende nutriënt behandelingen.

Het verloop van de algconcentraties komt overeen met de theoretische groeifases (fig. 20). Op het begin is een introductie fase te zien waar de groei op gang komt, gevolgd door een exponentiële fase. De groei gaat steeds langzamer naarmate de top van de groei behaald wordt. Bij de cultures is de stationaire fase goed te zien, gevolgd door de crash fase waar de cultures instorten.

De toegevoegde hoeveelheid Walne-medium laat geen invloed op de groeisnelheid en de maximale groei zien. Uiteindelijk wordt de hoogste groei behaald bij de cultuur met 20% Walne-medium waar na zeven dagen een concentratie van  $0,82 \cdot 10^6$  cellen/ml behaald wordt. Bij de cultuur met 60%

Walne-medium is de laagste groei te zien. Bij deze culture functioneerde het schoepenrad gedurende dit experiment niet en werd er voor waterbeweging gebruik gemaakt van beluchting d.m.v. slangetjes. Dit heeft ertoe geleid dat de omstandigheden niet exact hetzelfde waren (minder waterbeweging).

#### 4.1.2 Absorptieratio

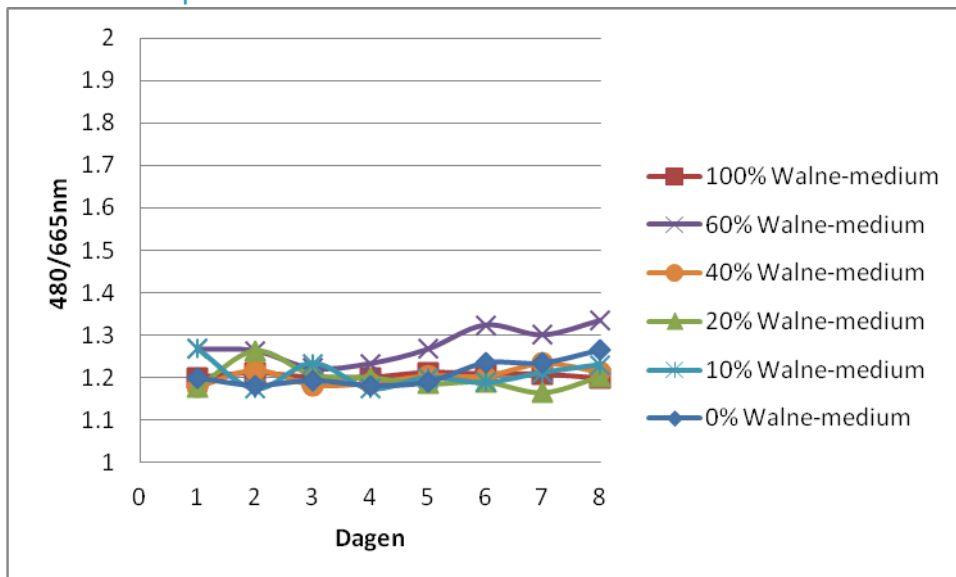


Fig. 21: Verloop absorptieratio gedurende experiment 1 bij verschillende nutriënt behandelingen.

De absorptieratio begint voor alle cultures rond de 1,2 en blijft ook rond deze waarde schommelen (Fig. 21) De verschillende behandelingen in hoeveelheid Walne-medium en dus nutriënten lijken bij dit experiment niet van invloed op de absorptieratio. Alleen de 60% behandeling liet een hogere waarde zien dan de andere behandelingen.

#### 4.1.3 Nutriënten

Gedurende de groei van de algencultures worden er nutriënten door de algen opgenomen die nodig zijn om groei te realiseren. Bij dit experiment is gebruik gemaakt van verschillende beginconcentraties van het Walne-medium. Dit is terug te zien in de resultaten van de nutriëntbepalingen.  $\text{NH}_4^+$

## Silicaat

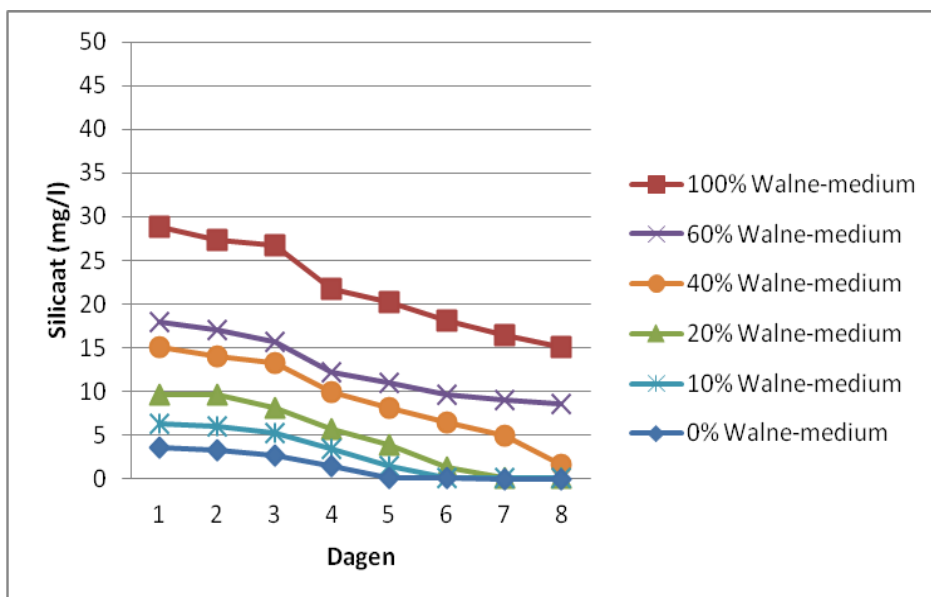


Fig. 22: Verloop concentratie silicaat gedurende experiment 1 bij verschillende nutriënt behandelingen.

De percentages van de verschillende toevoegingen van het Walne-medium zijn duidelijk terug te zien in figuur 22. De culture zonder toevoeging van het Walne-medium heeft een begin concentratie van 3,5mg/l. Deze 3,5 mg/l is te wijten aan de achtergrondconcentratie uit de Oosterschelde. Bij de cultures met 0% en 10% Walne-medium is het silicaat op dag 6 op en bij de culture met 20% is dit het geval na 7 dagen.

## Fosfaat

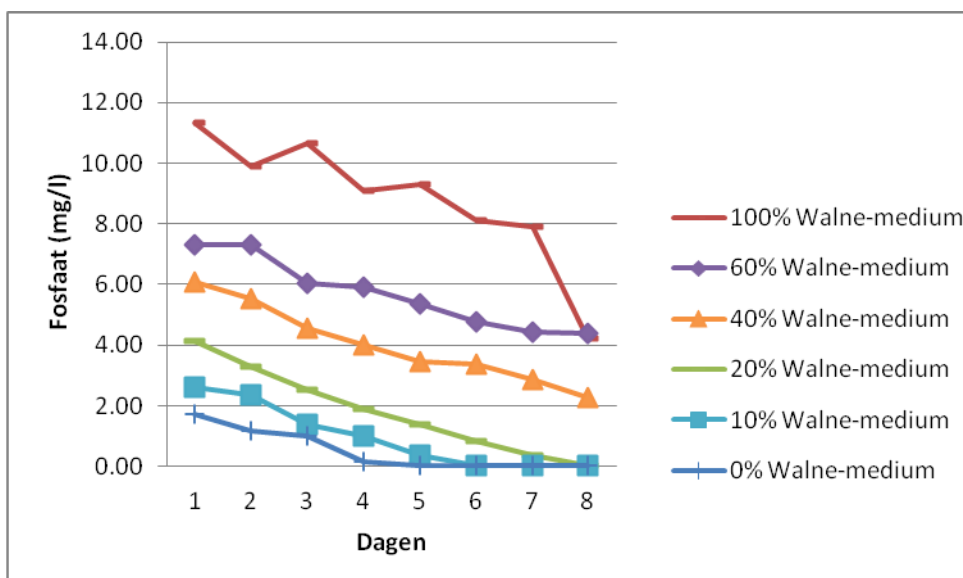


Fig. 23: Verloop concentratie gedurende fosfaat experiment 1 bij verschillende nutriënt behandelingen.

Het verloop van de concentratie fosfaat (fig. 23) komt overeen met die van het silicaat. Bij het fosfaat is de achtergrondconcentratie 2,6 mg/l. Hier begint het fosfaat voor de culture met 0% op te raken na 4 dagen, gevolgd door de cultures met 10- en 20% waar respectievelijk bij 6 en 8 dagen het fosfaat op was.

## Nitraat

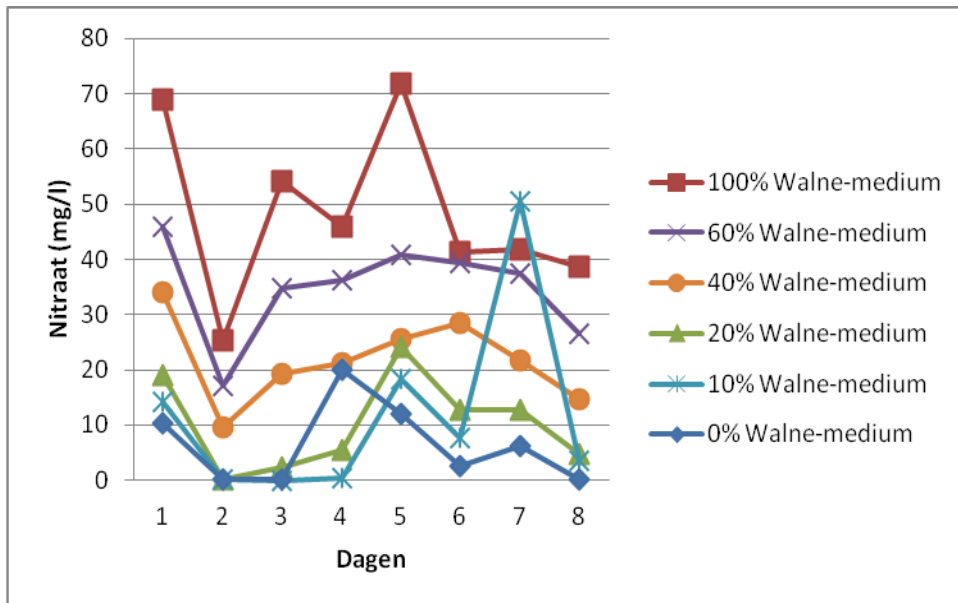


Fig. 24: Verloop concentratie nitraat gedurende experiment 1 bij verschillende nutriënt behandelingen.

Het verschil in toevoeging van hoeveelheid Walne-medium is goed te zien bij de waarden op dag 1. Na de eerste dag is er voor alle culturen een daling te zien waarna de waarden gaan schommelen. De maximale concentratie komt niet boven de 72 mg/l. De cultuur zonder toevoeging van het Walne-medium heeft een begin concentratie van 10 mg/l, deze concentratie is te wijten aan de concentratie nitraat in de Oosterschelde. De cultures met toevoeging van 0-, 10-, en 20% geven meerdere dagen aan het nitraat op is.

## Nitriet

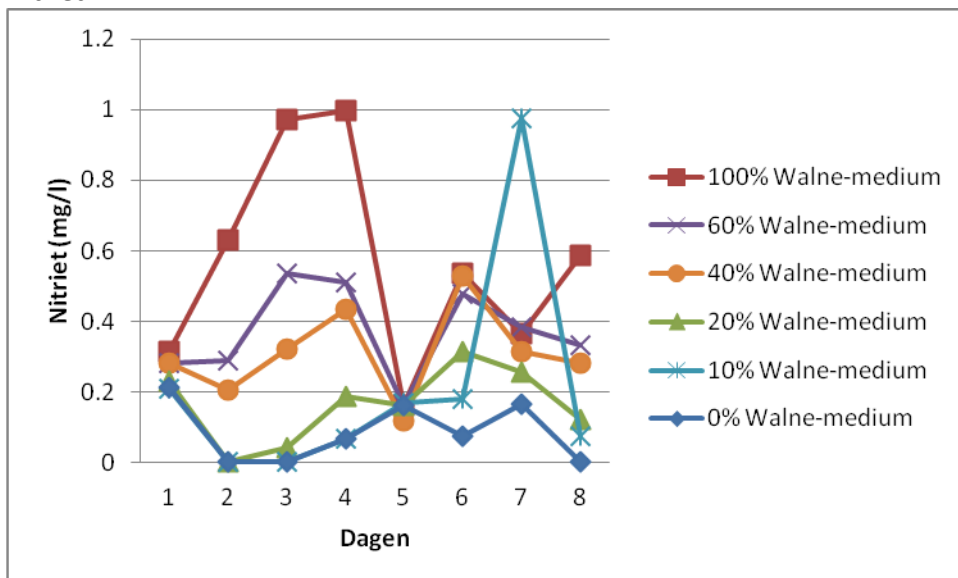


Fig. 25: Verloop concentratie nitriet gedurende experiment 1 bij verschillende nutriënt behandelingen.

Nitriet laat gedurende het experiment geen duidelijke trend zien. De concentratie van nitriet komt gedurende het experiment niet boven de 1 mg/l (fig.25).



## Ammonia

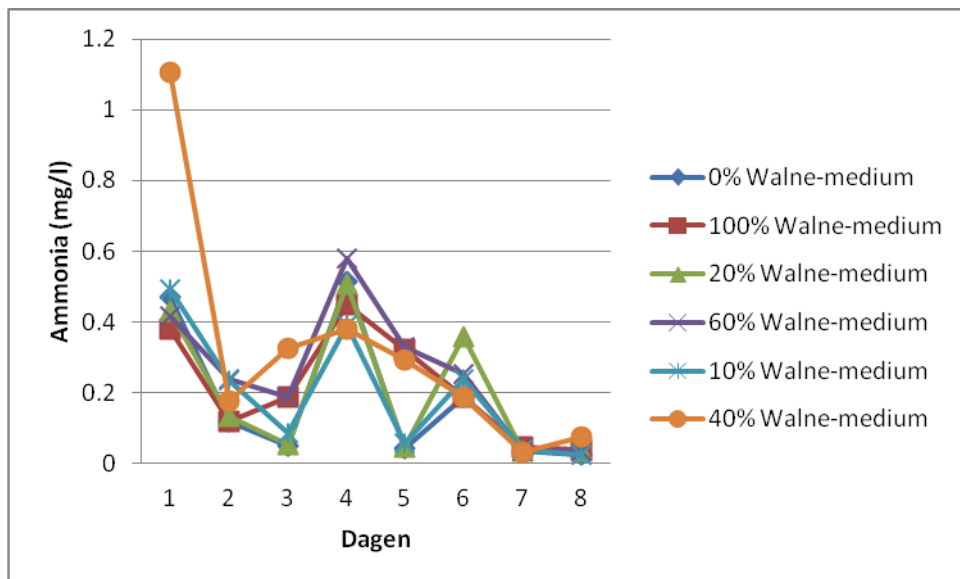


Fig. 26: Verloop concentratie ammonia gedurende experiment 1 bij verschillende nutriënt behandelingen.

Ammonia kan als stikstof bron gebruikt worden voor de algen. In het geval van het Walne-medium wordt nitraat als stikstof bron gebruikt. Op een uitschieter na bij de behandeling met 40% Walne-medium waar een concentratie van 1,1 mg/l gemeten is komt de beginconcentratie aan ammonia overeen (fig. 26). Gedurende de rest van het experiment blijft de concentratie onder de 0,6 mg/l.

### 4.1.4 Fv/Fm

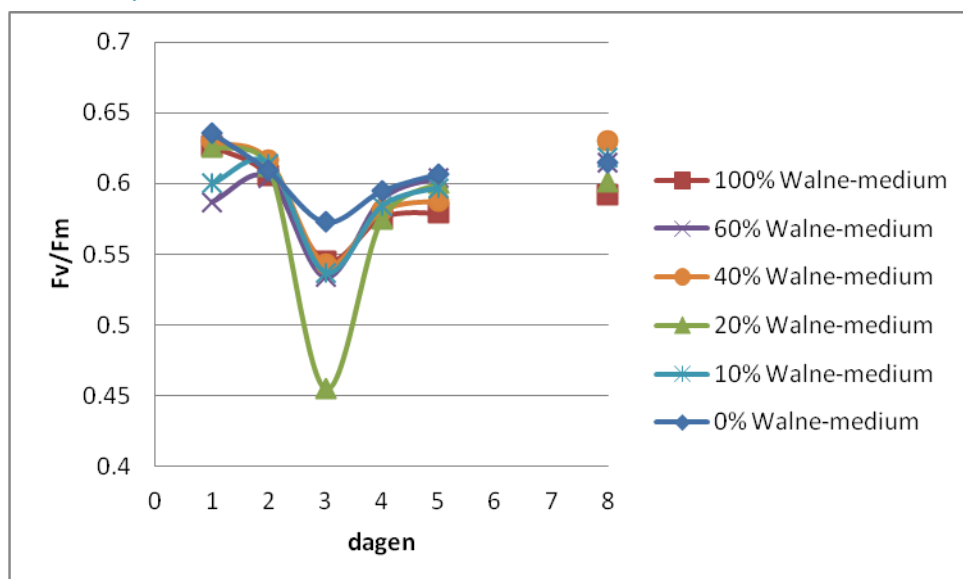


Fig. 27: Verloop Fv/Fm gedurende experiment 1 bij verschillende nutriënt behandelingen.

Dag 3 laat een dal zien wat zou duiden op een limitatie (fig. 27). De Fv/Fm waarde blijft rond de 0,6 en geeft geen indicatie van licht en nutriënten stress.

#### 4.1.5 Fm

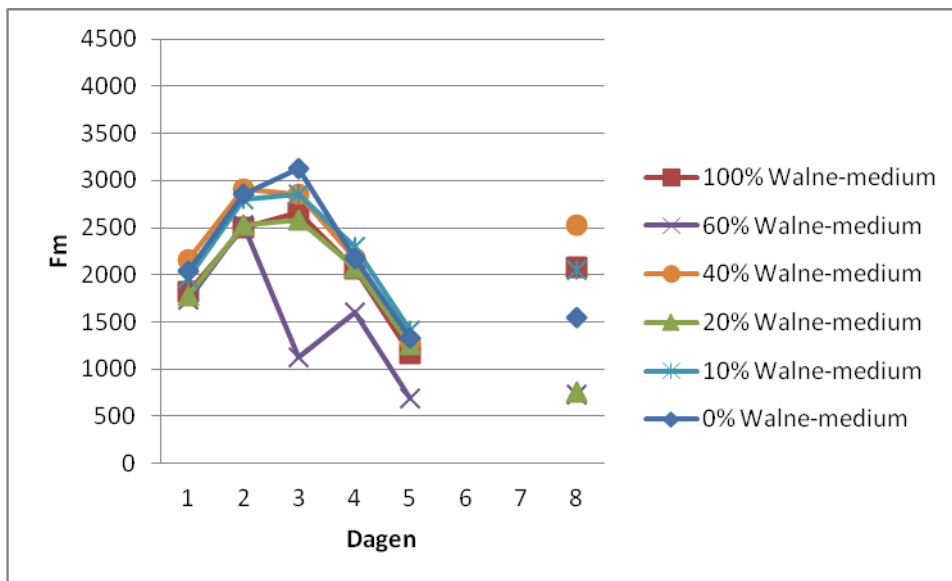


Fig. 28: Verloop Fm gedurende experiment 1 bij verschillende nutriënt behandelingen.

De Fm waarden laten gedurende het experiment een stijging zien waarna deze geleidelijk afneemt (fig 28). Op dag 8 (na het weekend) waar de cultures aan het instorten zijn laten deze onderling meer verschil zien. De cultuur met 60% Walne-medium wijkt af van de overige cultures, deze culture groeide onder andere omstandigheden.

#### 4.1.6 Abiotische factoren

Temperatuur, zuurstofgehalte, zuurstofverzadiging, saliniteit en de pH laten geen opmerkelijke resultaten zien (Bijlage 4). Het verloop van de temperatuur bij de verschillende cultures komt overeen. De temperatuur is in het begin rond de 8 graden, waarna er een dal van ongeveer 6 graden wordt bereikt. Gedurende de rest van het experiment stijgt de temperatuur als gevolg van het warmere weer en schommelt rond de 10 graden. Doordat de algen aan fotosynthese doen en dus zuurstof produceren is er gedurende het experiment een oververzadiging van zuurstof gemeten (boven de 100%) voor alle cultures. De zuurstofconcentratie lag tussen de 12 en 14,5 mg/l. De saliniteit is gedurende het experiment van rond de 30,8 gestegen naar de 31,5 als gevolg van verdamping. De pH laat een lichte stijging zien (van 8,5 naar 9,0). Als gevolg van de algengroei wordt er steeds meer CO<sub>2</sub> opgenomen, CO<sub>2</sub> heeft een afnemend effect op de pH. Dus door opname (en dus afname van CO<sub>2</sub>) stijgt de pH.

## 4.2 experiment 1: nutriënt limitatie proef

Experiment 2 is uitgevoerd van 7 tot en met 13 mei. Bij het experiment is bij de gelimiteerde cultures gekozen om geen Walne-medium toe te voegen. Bij experiment 1 liet de cultuur zonder toevoeging van Walne-medium en dus het meest gelimiteerd aan nutriënten ook groei zien. Met deze uiterste behandeling van nutriënt limitatie zouden mogelijke indicatoren voor groei limitatie kunnen gaan verschillen met die van de controle cultures. De controle cultures met 100% van de gebruikelijke toegevoegde hoeveelheid Walne-medium en de cultures waar geen Walne-medium aan wordt toegevoegd zijn in triplo uitgevoerd. Doordat de cultures duplicaten van elkaar zijn, is er in de resultaten (grafieken) gebruik gemaakt van gemiddelden met de bijbehorende standaarddeviaties.

### 4.2.1 Groei

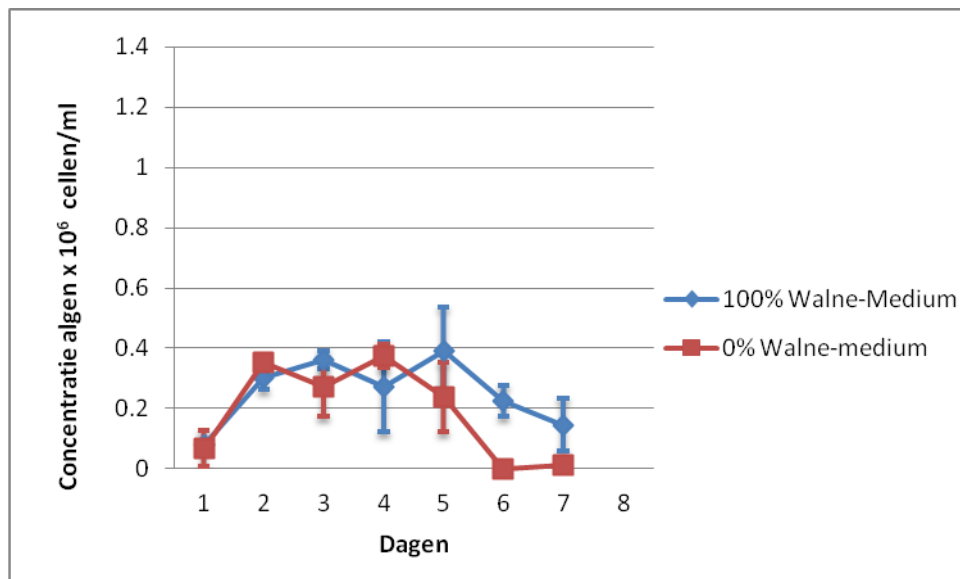


Fig. 29: Verloop algenconcentratie gedurende experiment 2 bij 100%- en 0% Walne -medium.

De groei van de cultures met verschillende behandelingen gaan in het begin gelijk op (fig. 29). Er is geen significant verschil in algenconcentratie waargenomen voor de verschillende behandelingen (ANOVA,  $P=0.112$  zie bijlage 5). De cultures zonder toevoeging van het Walne-medium laten eerder een duidelijke afname zien (crash). Op dag 6 en 7 worden er in de meeste cultures waaraan geen Walne-medium is toegevoegd geen *Skeletonema costatum* meer aangetroffen. Op dag 6 en 7 laten ook de cultures met 100% Walne-medium een duidelijke afname zien. De maximale gemiddelde algenconcentratie bedraagt slechts  $0,4 \cdot 10^6$  cellen/ml, terwijl andere experimenten een maximale groei van boven de  $1 \cdot 10^6$  cellen/ml hebben laten zien. Bij dag drie waren bij zowel bij de cultures zonder- en met 100% Walne-medium ciliaten aanwezig in de cultures. Gedurende het experiment was een andere diatomee aanwezig. Deze was niet dominant in de cultures en is niet boven een concentratie van  $0,1 \cdot 10^6$  cellen/ml gekomen (bijlage 4).

## 4.2.2 Absorptieratio

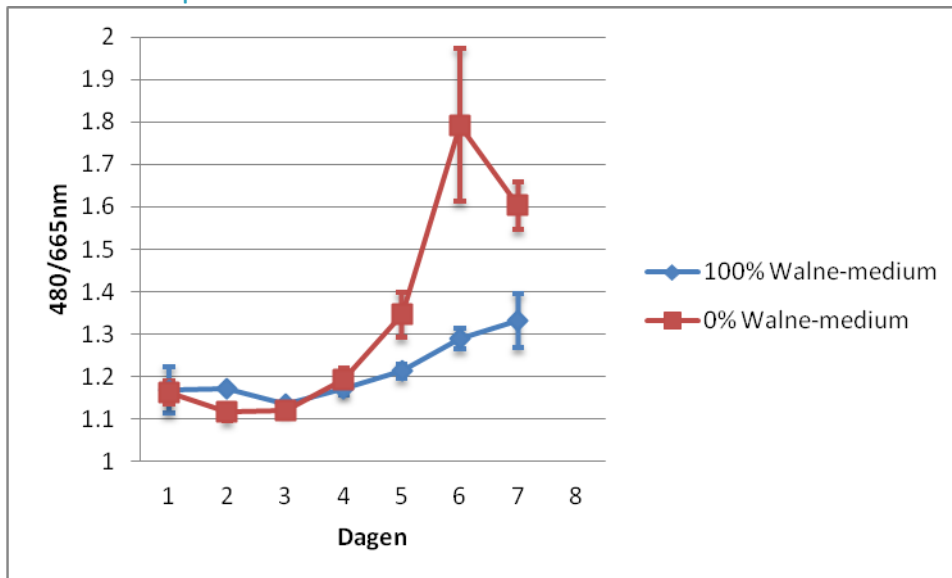


Fig. 29: Verloop absorptieratio gedurende experiment 2 bij 100%- en 0% Walne -medium.

De absorptieratio ligt voor beide behandelingen op het begin van het experiment rond de 1,15 (fig. 29). De eerste vier dagen blijft de absorptieratio voor beide behandelingen redelijk gelijk en schommelt tussen de 1,1 en de 1,2. Vanaf dag 4 is voor beide behandelingen een duidelijke stijging te zien. Het verschil in absorptieratio is significant te noemen (ANOVA,  $P=0,046$  zie bijlage 5). De cultures met 100% toegevoegd Walne-medium laten een geleidelijk stijging zien richting de 1,35. De cultures zonder toevoeging van het Walne-medium laten vanaf dag 4 een sterke stijging zien met een piek van gemiddeld een ratio van 1,8, een indicatie van nutriënten limitatie.

## 4.2.3 Nutriënten

Bij het experiment is gebruikt gemaakt van twee behandelingen 0% en 100% toevoeging van het Walne-medium. De weergegeven concentraties aan nutriënten bij de behandeling van 0% Walne-medium zijn afkomstig uit de Oosterschelde.

### Silicaat

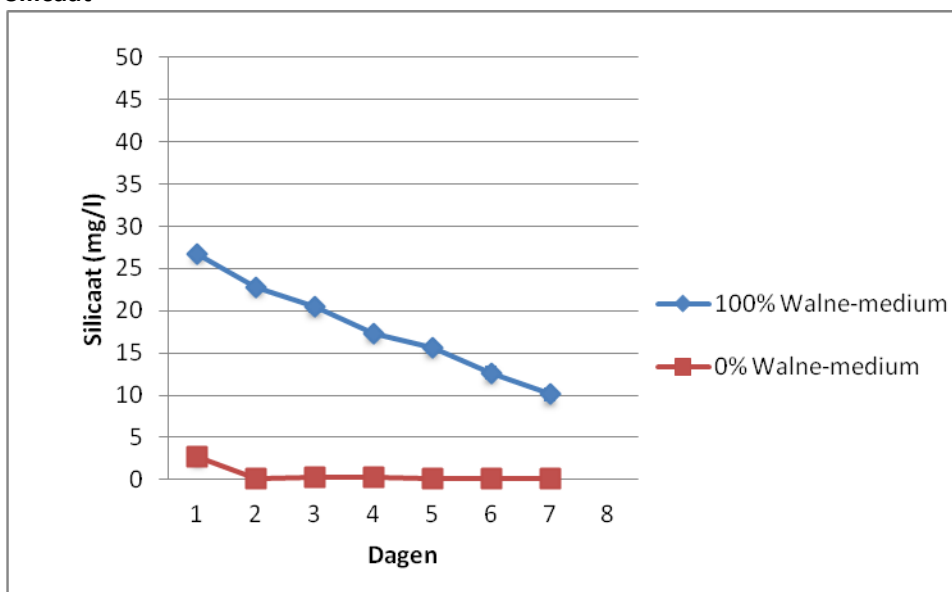


Fig. 30: Verloop concentratie silicaat gedurende experiment 2 bij 100%- en 0% Walne -medium.

Het verschil in toevoegingen van het Walne-medium is duidelijk terug te zien in figuur 30. De cultures zonder toevoeging van het Walne-medium hebben een gemiddelde begin concentratie van 2,7mg/l. Deze 2,7 mg/l is te wijten aan de achtergrondconcentratie uit de Oosterschelde. Na dag drie is al het aanwezige silicaat opgenomen door de algen. Bij de cultures met toevoeging van het Walne-medium ligt de begin concentratie op 26,5 mg/l waarna deze geleidelijk afneemt tot een concentratie van 10 mg/l.

### Fosfaat

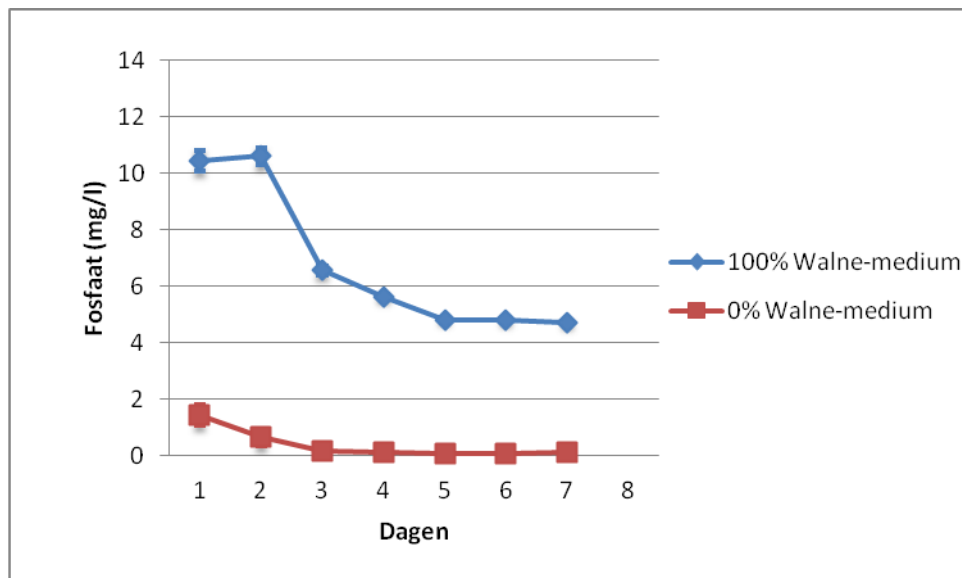


Fig. 31: Verloop concentratie fosfaat gedurende experiment 2 bij 100%- en 0% Walne -medium.

Het verloop van de concentratie fosfaat laat bij de cultures met Walne-medium een sterke afname zien van dag 2 naar dag 3, waarna de afname geleidelijk minder wordt (fig. 31). In deze periode is de algenconcentratie redelijk stabiel. Totaal is de afname van fosfaat van 10,5 mg/l naar 4,7 mg/l. De cultures zonder toevoeging hebben een begin concentratie fosfaat van 1,5 mg/l die te wijten is aan de concentratie fosfaat aanwezig in de Oosterschelde. Op dag vier is het fosfaat op en nemen de cultures in concentratie af.

### Nitraat

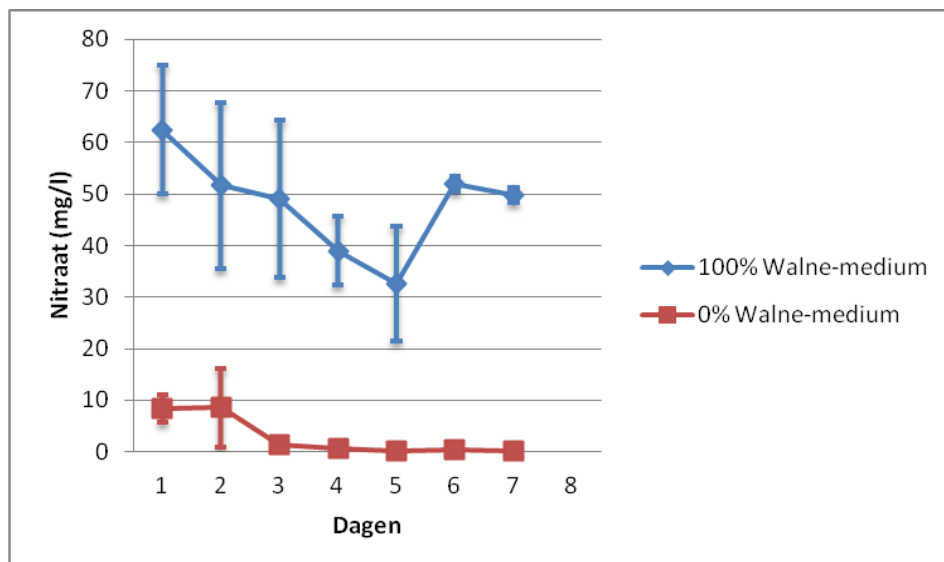


Fig. 32: Verloop concentratie nitraat gedurende experiment 2 bij 100%- en 0% Walne -medium.

Vanaf dag 1 is voor beide behandelingen een afname in nitraat te zien (fig. 32). Op dag 4 is het nitraat voor de cultures zonder toevoeging van het Walne-medium op. Voor de cultures met 100% van het toegevoegde Walne-medium neemt de concentratie de eerste 5 dagen af van gemiddeld 62- naar 32 mg/l. Op dag 6 en 7 wanneer er een afname in concentratie aan algen plaatsvindt stijgt de concentratie nitraat.

### Nitriet

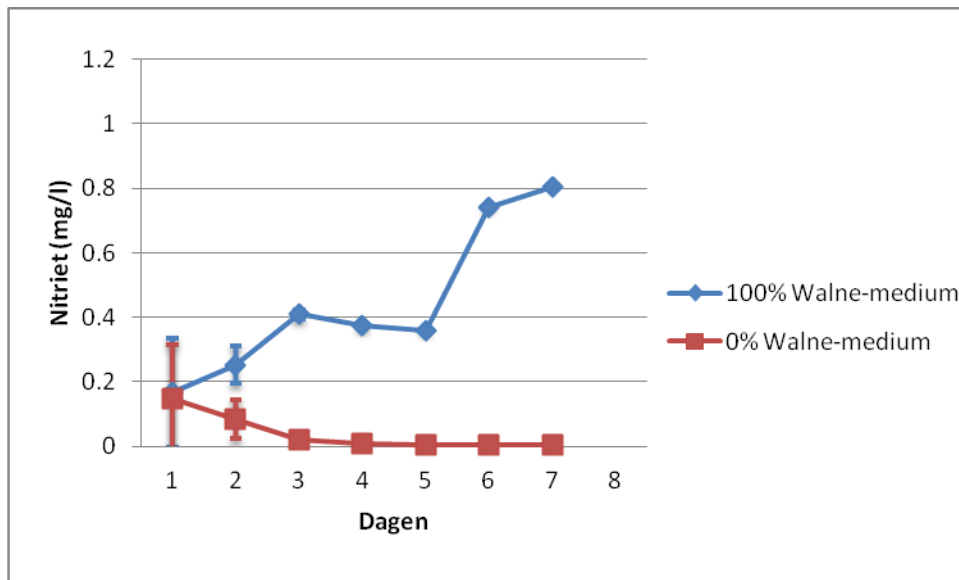


Fig. 33: Verloop concentratie nitriet gedurende experiment 2 bij 100%- en 0% Walne -medium.

De concentratie nitriet begint voor beide cultures rond de 0,18 mg/l (fig. 33). De concentratie van het nitriet van de cultures zonder toegevoegd medium daalt geleidelijk naar 0 mg/l op dag 4, waarna deze 0 blijft. De cultures met Walne-medium laten gedurende het experiment een stijging van nitriet zien naar 0,8 mg/l.

### Ammonia

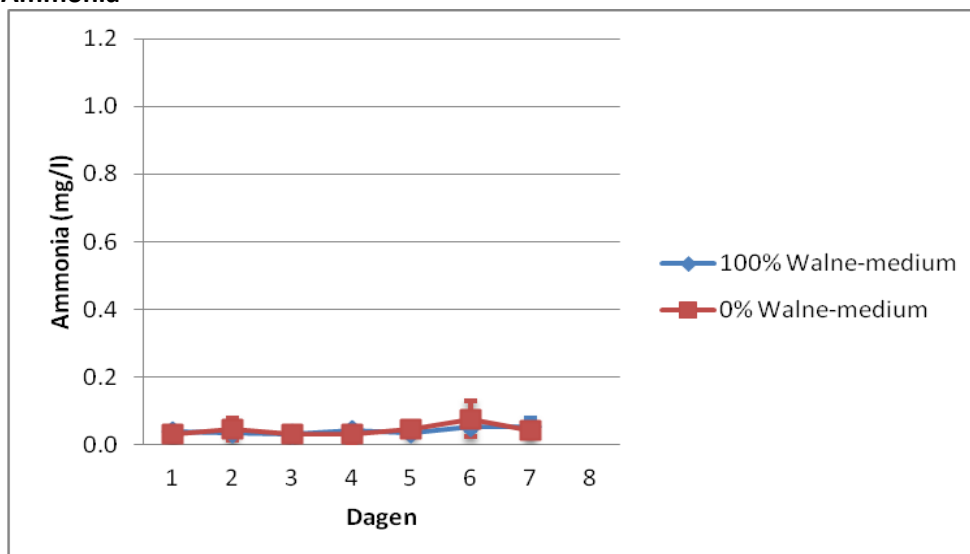


Fig. 34: Verloop concentratie ammonia gedurende experiment 2 bij 100%- en 0% Walne -mediu.m

De concentratie aan ammonia blijft voor beide behandelingen constant rond de 0,05 mg/l (fig. 34).

#### 4.2.4 Fm/Fv

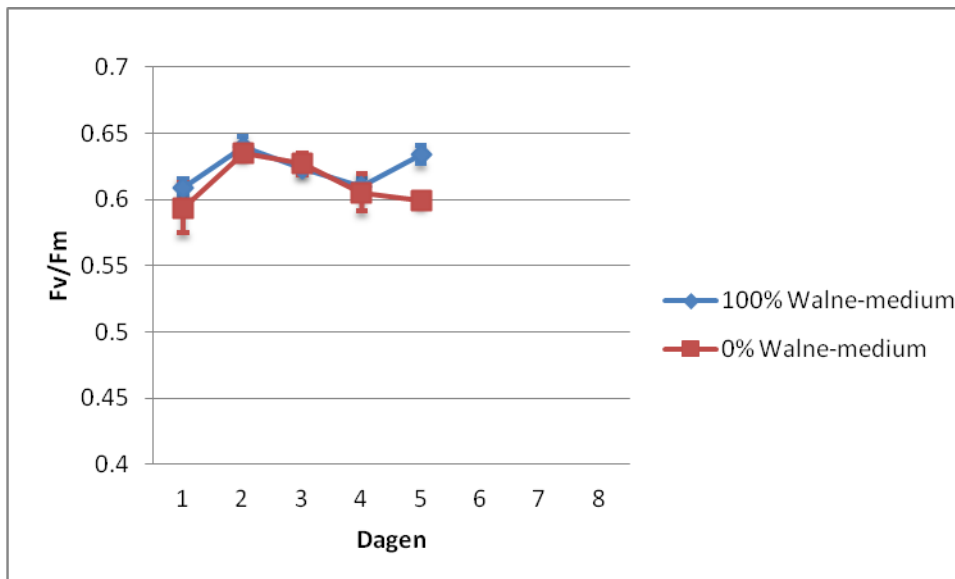


Fig. 35: Verloop Fm gedurende experiment 2 bij 100%- en 0% Walne -medium.

De Fv/Fm ratio laat ongeveer hetzelfde zien als bij experiment 1 (fig. 35). De limitatie van nutriënten is op deze korte termijn bij de cultures met 0% Walne-medium niet terug te zien in de Fv/Fm ratio, die onder de nutriënt gelimiteerde omstandigheden nog geen stress aangeeft voor de fotosysteem II efficiëntie. Er is geen significant (ANOVA,  $P=0,080$  zie bijlage 5) verschil tussen de behandelingen.

#### 4.2.5 Fm

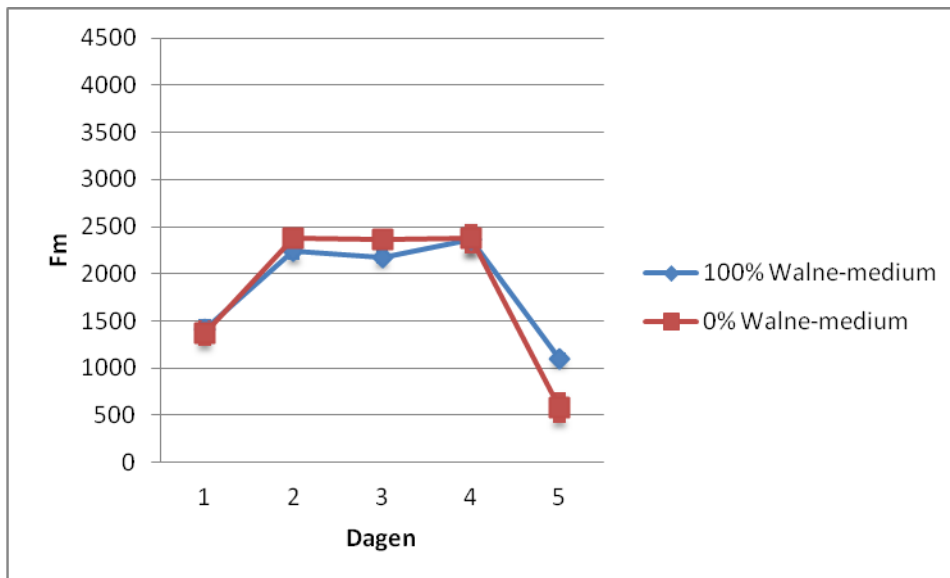


Fig. 36: Verloop Fm gedurende experiment 2 bij 100%- en 0% Walne -medium.

De Fm waarden laten gedurende het experiment een stijging zien waarna deze op dag 5 weer afneemt (fig. 36). Het verloop is te vergelijken met die van de eerste 5 dagen van de cultures van experiment 1. Er is geen significant (ANOVA,  $P=0,854$  zie bijlage 5) verschil in de verschillende behandelingen te zien.

#### 4.2.6 Abiotische factoren

Temperatuur, zuurstofgehalte, zuurstofverzadiging, saliniteit en de pH hebben geen opmerkelijke resultaten laten zien (Bijlage 4). Door de hoge buitentemperatuur is de temperatuur de eerste vijf dagen gestegen van 11 naar 17 graden. De temperatuur daalde hierna met name 's nachts waardoor de temperatuur in twee dagen tijd afnam tot 9 graden Celsius. Het zuurstofgehalte is gelijk met de temperatuur veranderd. Bij koudere water temperaturen kan er meer zuurstof in het water oplossen voordat verzadiging bereikt is. De laatste twee dagen, wanneer de algencultures zonder toevoeging van het Walne-medium ingestort zijn, laat deze een lager zuurstofgehalte zien. Dit doordat er minder fotosynthese plaats vindt en er dus minder zuurstof geproduceerd wordt. De pH neemt gedurende het experiment toe van 8,4 naar 9,0 als gevolg van CO<sub>2</sub> opname van de algen. De laatste 2 dagen bij de ingestorte cultures met 0% van het Walne-medium daalt de pH, doordat het CO<sub>2</sub> niet of gering wordt opgenomen door de algen. De saliniteit neemt gedurende het experiment iets af (0,5 psu) als gevolg van regen.

### 4.3 experiment 3: licht limitatie gradiënt

Experiment 3 is uitgevoerd van 2 tot en met 9 april 2012. Bij het experiment is voor de zes raceways voor verschillende percentages van het aanwezige buitenlicht gezorgd: 100%, 50%, 25%, 12,5%, 6,25% en 0%. Het doel van het experiment was om licht opzettelijk te limiteren om te achterhalen bij welke percentages van het buitenlicht een limitatie in de groei waar te nemen is en waar de indicatoren die limitatie aan kunnen geven, gaan verschillen van de controle.

#### 4.3.1 Groei

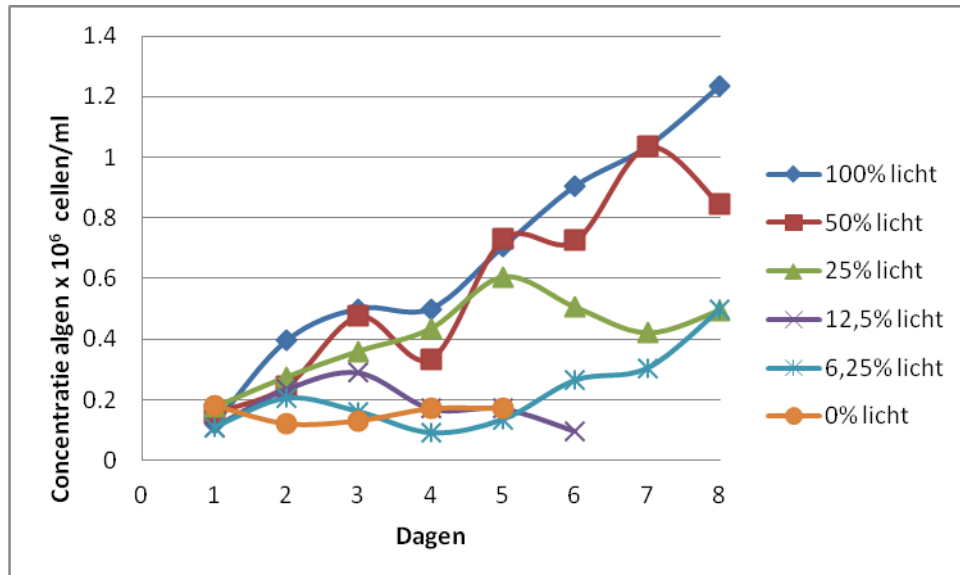


Fig. 37: Verloop algenconcentratie experiment 3 bij verschillende lichtbehandelingen

De limitatie van licht is direct terug te zien in de groei van de algen (fig. 35). De hoogste concentratie aan algen wordt bereikt bij de cultuur met 100% licht met een concentratie van  $1,235 \cdot 10^6$  cellen/ml. Afhankelijk van de hoeveelheid licht laten de cultures een hogere groei zien. Alleen de cultuur zonder licht laat geen groei zien, maar weet zich de eerste vijf dagen wel te handhaven.



### 4.3.2 Absorptieratio

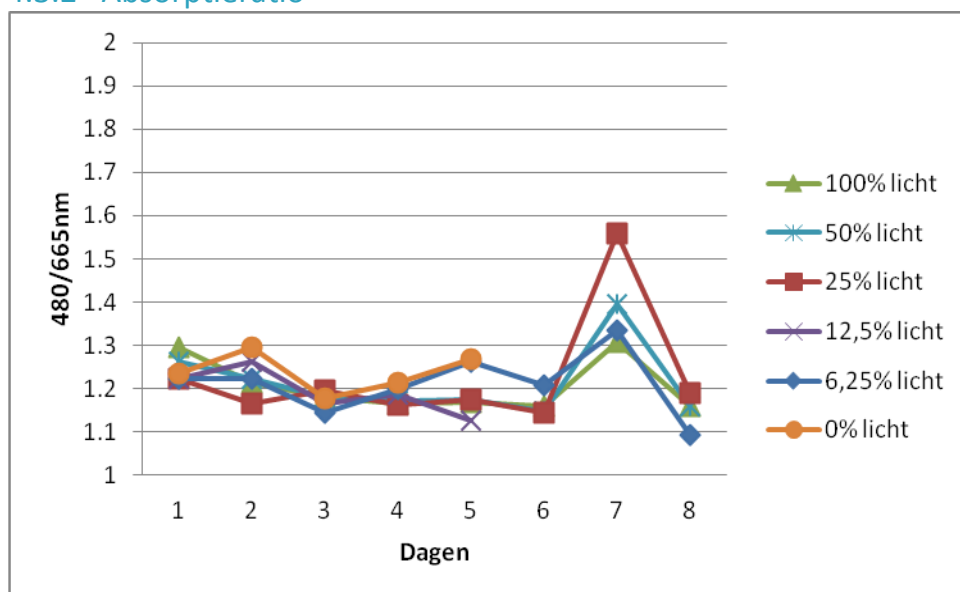


Fig. 38: Verloop absorptieratio gedurende experiment 3 bij verschillende lichtbehandelingen.

De absorptieratio is voor alle cultures bij de start van het experiment rond de 1,25 (fig. 38). Gedurende het experiment is er geen verschil in verloop van absorptieratio bij de verschillende behandelingen. De limitatie van licht die bij de groei curves (fig. 39) duidelijk zichtbaar is uit zich niet in de absorptieratio. Tijdens het experiment neem de ratio voor alle cultures iets af naar 1,1 à 1,2. Op dag 7 is een piek in de ratio te zien die niet in de trend van de grafiek past.

### 4.3.3 Nutriënten

Bij het experiment is de opzet om licht te limiteren, vandaar dat bij alle cultures 100% van de standaard gebruikelijke hoeveelheid van het Walne-medium wordt toegevoegd. Dit om uit te sluiten dat de cultures beïnvloed worden door mogelijke nutriënt limitatie. De cultures die de hoogste groei laten zien, laten de grootste afname van nutriënten zien als gevolg van opname door de algen om groei te realiseren (bijlage 4). De minimale concentratie aan silicaat gedurende het experiment is 11 mg/l, fosfaat 6 mg/l en nitraat 32 mg/l. De concentratie ammonia komt niet boven de 0,55 mg/l en nitriet komt niet boven de 0,7 mg/l. De waarden van de analyses van ammonia waren zo laag dat de meerderheid onder de limitatie limiet lag en zijn daarom niet in de bijlage weergegeven.

#### 4.3.4 Fv/Fm

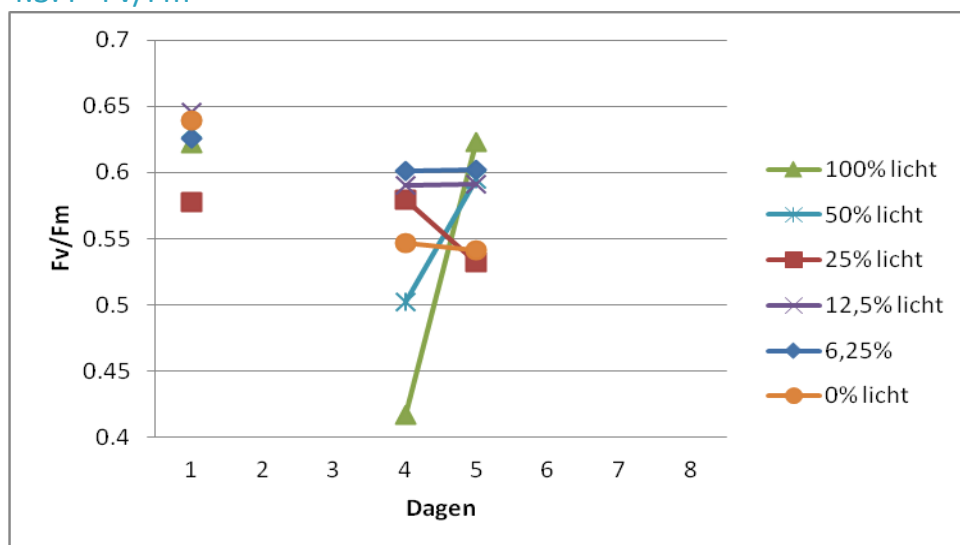


Fig. 39: Verloop Fv/Fm gedurende experiment 3 bij verschillende lichtbehandelingen.

De Fv/Fm ratio geven mede door het gebrek aan gegevens geen duidelijke trend (fig. 39). De metingen met PAM zijn verricht in het NIOZ (Koninklijk Nederlands Instituut voor Zeeonderzoek) dat gedurende de week van het experiment twee dagen niet toegankelijk was om metingen te verrichten. Op dag 4 zijn voor de cultures met het meeste beschikbare licht (50- en 100%) de laagste waarden gemeten. Dit zou erop moeten duiden dat deze cultures het meest te lijden hebben aan licht- of nutriënten stress.

#### 4.3.5 Fm

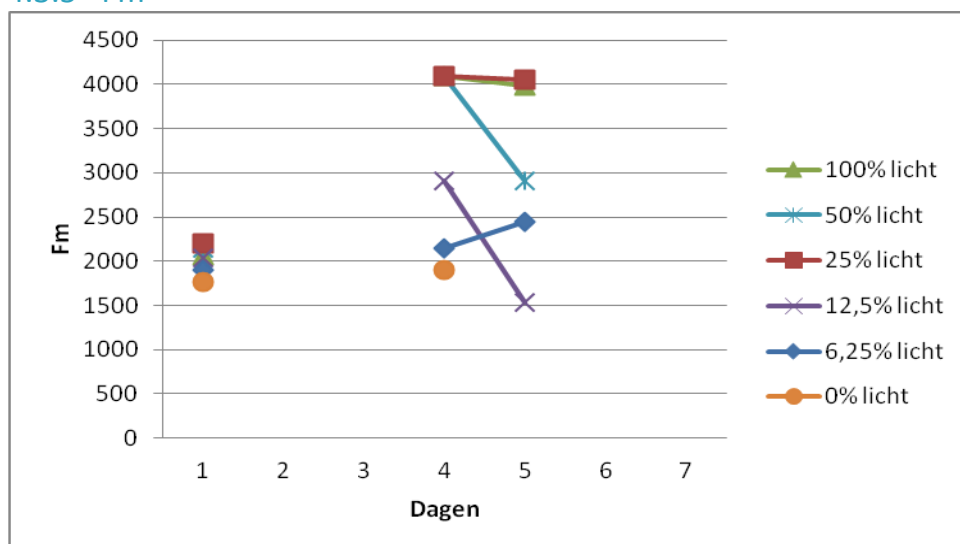


Fig. 40: Verloop Fm gedurende experiment 3 bij verschillende lichtbehandelingen

De metingen met PAM zijn bij experiment 3 slechts drie keer gedaan, waardoor voor zowel Fm en Fv/Fm per cultuur slechts drie waarden bekend zijn (fig. 40). Te zien is dat de cultures die groeien onder slechtere lichtomstandigheden een lagere Fm laten zien dan de cultures met hogere percentages beschikbaar buitenlicht.

### 4.3.6 Abiotische factoren

Temperatuur, zuurstofgehalte, zuurstofverzadiging, saliniteit en de pH hebben geen opmerkelijke resultaten laten zien (Bijlagen 4). De verschillende lichtbehandelingen hebben geen invloed gehad op de temperatuurveranderingen. Deze hebben zich synchroon gedragen afhankelijk van de buitentemperatuur. De temperatuur schommelt tussen ongeveer 7 en 10 °C. De cultures met een grotere groei en dichtere algenconcentratie laten hogere zuurstofgehalten en pH zien. Dit als gevolg van een hogere groei waarbij CO<sub>2</sub> wordt opgenomen waardoor de pH stijgt en er meer zuurstof wordt geproduceerd. Als gevolg van verdamping stijgt de saliniteit licht en blijft tussen de 30,5 en 32 psu.

## 4.4 experiment 4: licht limitatie proef

Experiment 4 is uitgevoerd van 23 tot en met 30 april. Bij het experiment is voor de aangepaste cultuur gekozen om 6,25% van het aanwezige buitenlicht te gebruiken. Bij experiment 3 liet de cultuur met 6,25% licht een duidelijke limitatie in groei zien in verhouding met de 100% licht cultuur. De cultuur met 6,25% is de uiterste behandeling waarbij er nog groei zichtbaar was. De controle cultures met 100% licht en de aangepaste cultures met 6,25% licht zijn in triplo uitgevoerd. Doordat de cultures duplicaten van elkaar zijn is er in de resultaten (grafieken) gebruik gemaakt van gemiddelden met de bijbehorende standaarddeviaties.

### 4.4.1 Groei

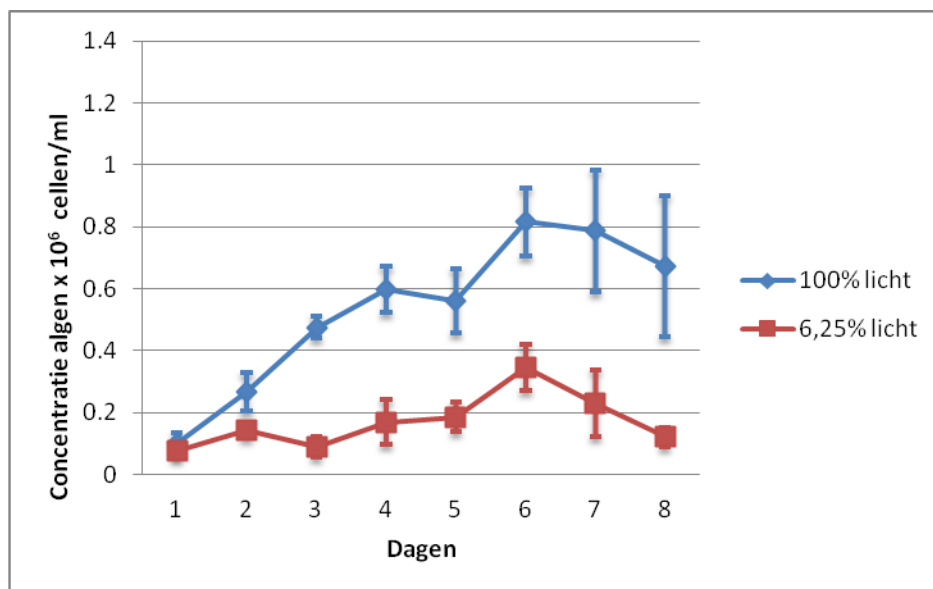


Fig. 41: verloop algenconcentratie experiment 4 bij 100- en 6,25% van het beschikbare daglicht

Vanaf dag 1 is er een duidelijk significant verschil in groei en algen concentratie zichtbaar (fig. 39, ANOVA, P=0.000 zie bijlage 5.2). De gelimiteerde cultures (6,25% licht) laten een geringe groei zien en bereiken gemiddeld genomen een maximale concentratie van  $0,35 \cdot 10^6$  cellen/ml. De controle cultures (100% licht) hebben een piek rond de  $0,8 \cdot 10^6$  cellen/ml. Bij beide cultures neemt de algenconcentratie af na zes dagen. Bij deze cultures is er sinds het begin van het experiment een andere alg aanwezig. Dit is dezelfde die is waargenomen bij experiment 2. Deze alg vertoont een overeenkomende groei met *Skeletonema costatum*, maar blijft op het gebied van groei achter (bijlage 4). Deze alg haalt maximaal een concentratie van  $0,16 \cdot 10^6$  cellen/ml bij de cultures met 100% licht en  $0,06 \cdot 10^6$  cellen/ml bij 6,25% licht.

#### 4.4.2 Absorptieratio

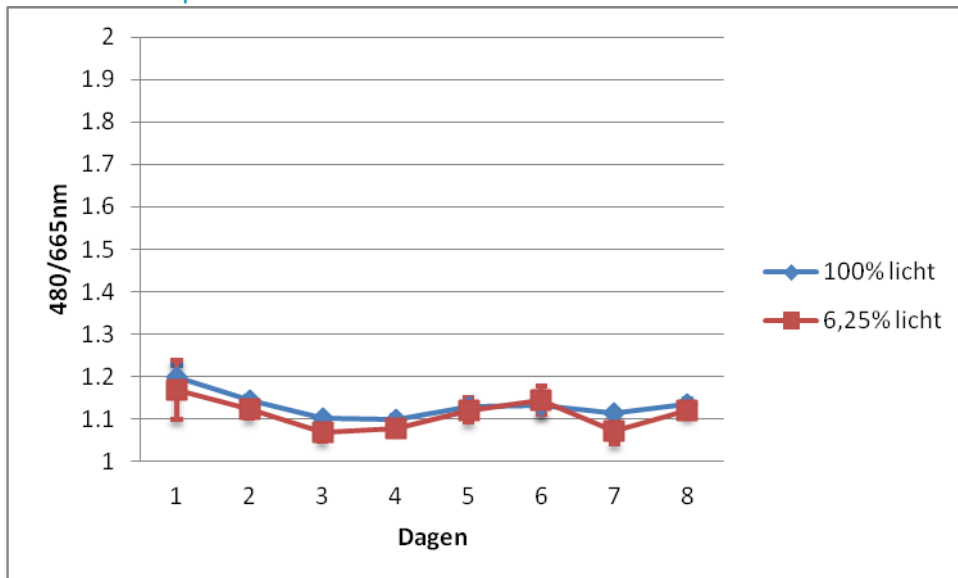


Fig. 42: verloop absorptieratio gedurende experiment 4 bij 100- en 6,25% van het beschikbare daglicht

De absorptieratio begint voor beide behandelingen rond de 1,2 en beiden hebben ongeveer dezelfde trend tijdens het experiment (fig. 42). De absorptieratio zakt gedurende het experiment licht en eindigt op een ratio van 1,1. De limitatie van licht bij de 6,25% cultures die duidelijk resulteert in een geringere groei laat ten opzichte van de 100% licht cultures geen significant (ANOVA,  $P=0,064$  zie bijlage 5) verschil zien.

#### 4.4.3 Nutriënten

Beide behandelingen zijn voorzien van de standaard gebruikelijke hoeveelheid van het Walne-medium om limitatie van nutriënten te doen voorkomen. Dat de cultures met 100% licht een hogere groei laten zien dan de cultures met 6,25% licht resulteert in een sterkere afname van nutriënten als gevolg van hogere opname door de algen (bijlage 4). De minimale concentratie aan nutriënten voor de cultures met 100% licht was: 4 mg/ silicaat, 5 mg/l fosfaat en 35 mg/l nitraat. Ammonia komt gedurende het experiment niet boven de 0,56 mg/l en nitriet niet boven de 0,6 mg/l. Een groot deel van de ammonia bepalingen lag onder de detectie limit, vandaar zijn deze resultaten niet in de bijlage weergegeven.

#### 4.4.5 Fv/Fm

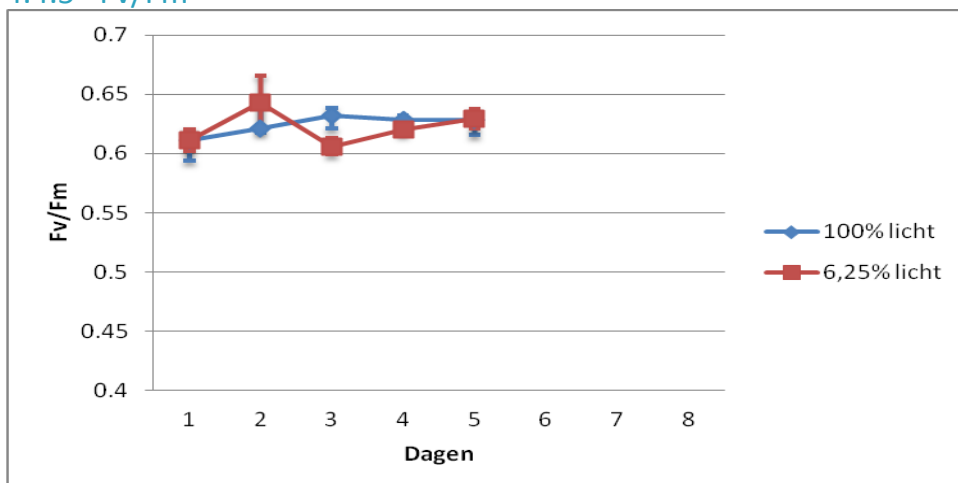


Fig. 43: Verloop Fv/Fm gedurende experiment 4 bij 100- en 6,25% van het beschikbare daglicht

De gemiddelde Fv/Fm ratio blijft voor beide cultures tussen de 0,6 en de 0,65 (fig. 43). Het verloop van de Fv/Fm ratio laat voor de verschillende behandelingen geen significant (ANOVA, P=0,126 zie bijlage 5) verschil zien. De Fv/Fm ratio vormt voor het experiment geen indicator voor mogelijke licht of nutriënt stress.

#### 4.4.4 Fm

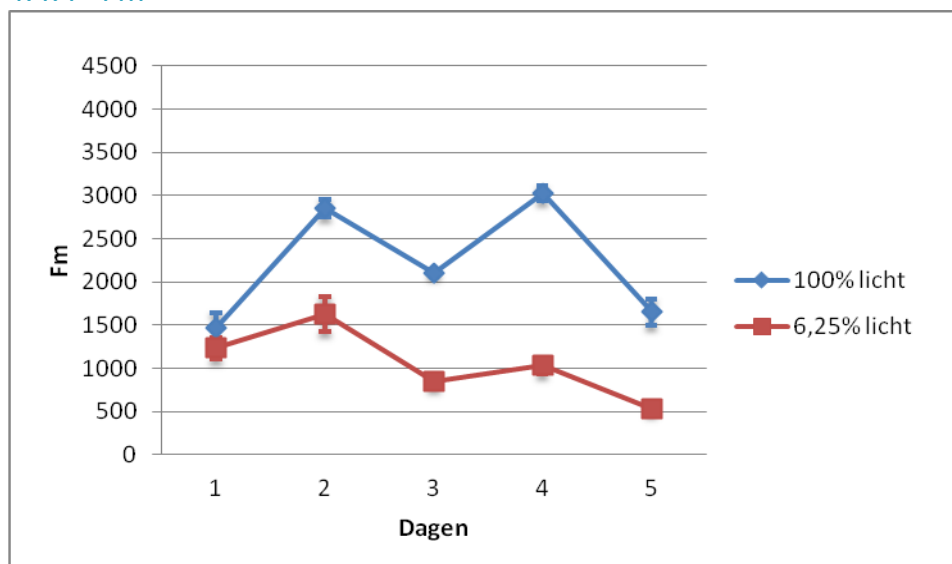


Fig. 44: Verloop Fm gedurende experiment 4 bij 100- en 6,25% van het beschikbare daglicht

De Fm ratio voor beide behandelingen van de cultures is op dag 1 gelijk (fig. 44). De Fm gaat vanaf dag 1 per behandeling een andere trend aannemen, het verschil in tussen de Fm waardes voor de verschillende behandelingen is significant (ANOVA, P=0,000 zie bijlage 5). De Fm voor de licht gelimiteerde cultures daalt langzaam tot uiteindelijk een minimum van 500. De cultures met meer licht laten vanaf dag 1 een stijging zien die tussen de 2000 en de 3000 schommelt en uiteindelijk afneemt tot ongeveer 1500, dezelfde waarde waarmee de cultures begonnen.

#### 4.4.6 Abiotische factoren

Temperatuur, zuurstofgehalte, zuurstofverzadiging, saliniteit en de pH hebben geen opmerkelijke resultaten laten zien (Bijlagen 4). De temperatuur bij de cultures met 100% licht ligt gedurende het experiment ongeveer 0,8 graden hoger dan bij de cultures met 6,25% licht. De temperatuur schommelt tussen de 9 en 13,5 °C. Als gevolg van een hogere groei bij de cultures met 100% licht wordt er meer zuurstof geproduceerd en meer CO<sub>2</sub> opgenomen wat het zuurstofconcentratie en de pH hoger doet uitkomen dan de cultures met 6,25% licht. De pH ligt op het begin rond de 9 en blijft rond deze waarde voor de cultures met 100% licht. Voor de cultures met 6,25% licht daalt de pH naar de 8. Van de cultures met 100% licht is er één cultuur waarbij gedurende het experiment de saliniteit ongeveer 1 psu lager ligt. Dit zorgt voor een gemiddeld lagere saliniteit en een hoge standaarddeviatie.

## 4.5 Uitdoving

Doordat de cultures dichtere concentraties aan cellen krijgen gedurende de groei worden de cultures steeds donkerder van kleur. De hogere concentratie aan cellen zorgt ervoor dat er meer licht wordt weggevangen naarmate de cultures dichter worden (fig. 45).

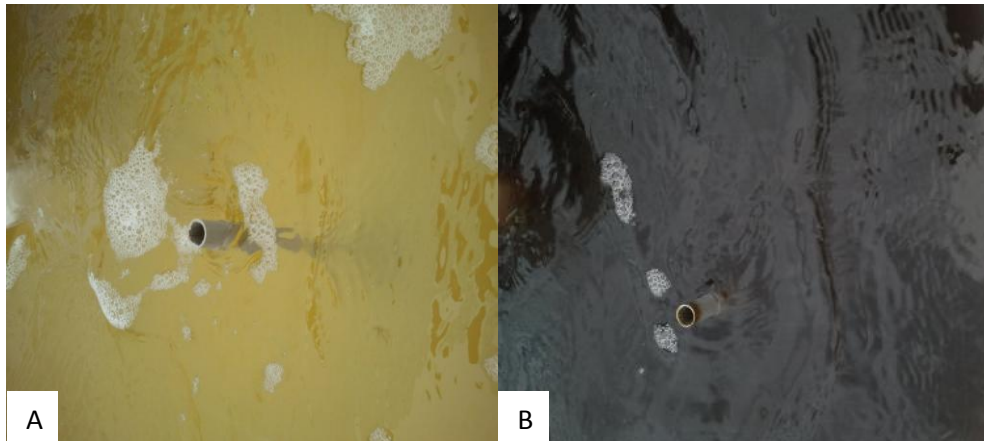


Fig. 45: Het donkerder worden van cultures tijdens de groei. Bij het enten zijn het lichte cultures (A). Naarmate de crash fase nadert worden de cultures donkerder (B)

Om te kijken hoeveel licht er nog beschikbaar is op 20- en 40 cm diepte is m.b.v. een licht meter de hoeveelheid licht uitgedrukt in PAR gemeten. Door de hoeveelheid licht op deze dieptes te vergelijken met de hoeveelheid licht aan het wateroppervlakte kan deze uitdoving op 20- en 40 cm diepte uitgedrukt worden in percentages van het beschikbare licht ten opzichte van de lichtconcentratie aan het wateroppervlak. Deze uitdoving uitgedrukt in percentages is gerelateerd aan de concentratie van de algen in de cultures. Door de uitdoving van licht uit te zetten tegen de dichtheid van de cultures kan het verband tussen concentratie en uitdoving weergegeven worden (fig. 46). Door deze metingen is er meer kennis verkregen in het beschikbare licht op een diepte van 20- en 40 cm diepte in de cultures.

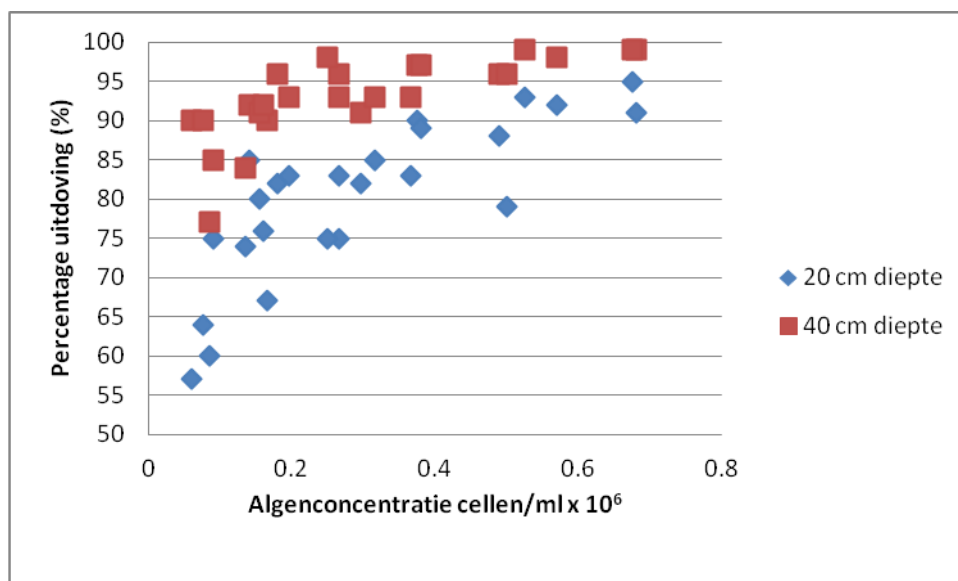


Fig. 46. De uitdoving van licht in percentages bij verschillende algenconcentraties op 20- en 40 cm diepte

Te zien is dat zelfs voor relatief lage concentraties aan cellen de uitdoving na 20 cm al minimaal 50% bedraagt. Naarmate de cultures dichter worden vakt de uitdoving af richting 100% waar de uitdoving vrijwel maximaal is. Op 40cm diepte is de uitdoving al snel hoger dan 90%. Door de hoge uitdoving is er op grotere diepte minder licht beschikbaar voor fotosynthese en dus groei. De algen bewegen door de turbulentie over de gehele waterkolom en zullen dus slechts gedeeltelijk aan relatief lage lichtcondities blootgesteld worden.

#### 4.6 Drooggewicht

Naarmate de cultures dichter worden vindt er meer concurrentie tussen de algen plaats, bijvoorbeeld licht en nutriënten. De moeilijkere groeiomstandigheden kunnen zich uiten in kwalitatief slechtere en lichtere alg (Michels et al, 2010). Het drooggewicht van de algencultuur is gemeten bij verschillende algenconcentraties, waardoor het effect van het dichter worden van de cultures te zien is (fig. 47).

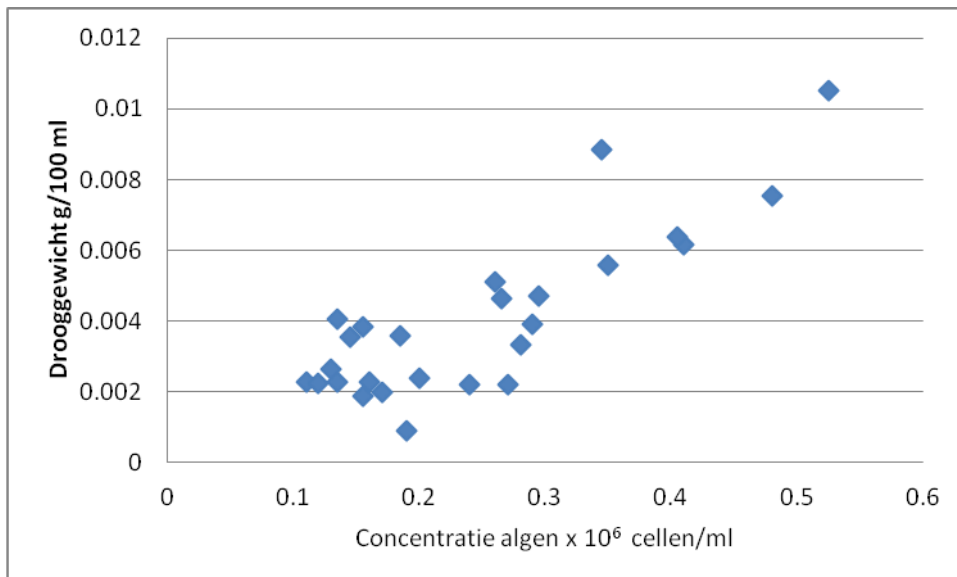


Fig. 47: Drooggewicht aan algen per 100ml bij verschillende concentraties aan algen

Te zien is dat naarmate de algenconcentratie toeneemt het drooggewicht per 100 ml hoger wordt. De trend van het hoger worden van het drooggewicht naarmate de concentratie aan algen hoger wordt is evenredig. De cellen gaan in gemiddeld gewicht niet achteruit als gevolg van het dichter worden van de cultures (fig. 48)

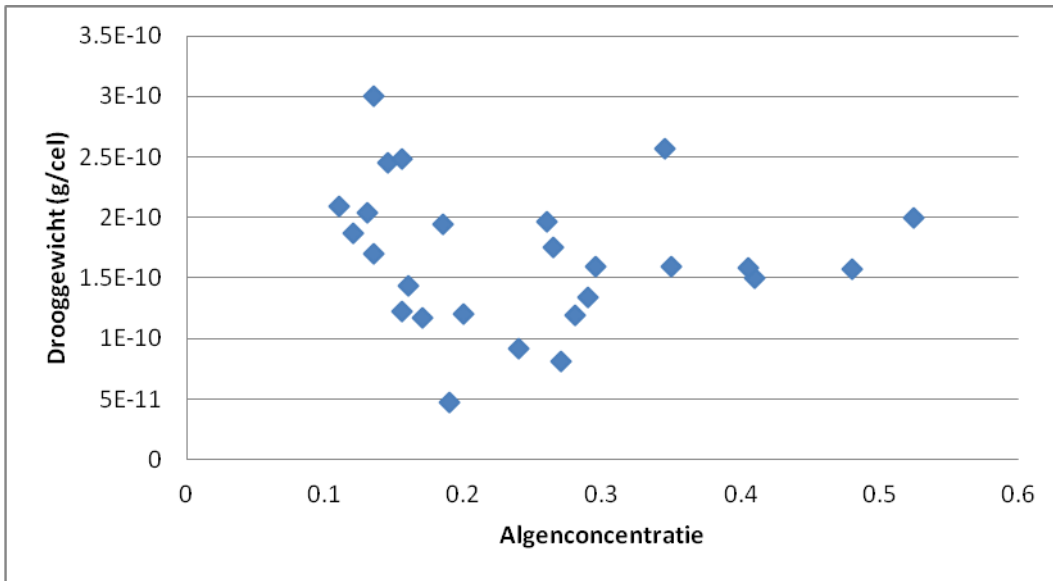


Fig. 48: Gemiddeld gewicht per alg bij verschillende concentraties aan algen

Bij de lage concentraties is de afwijking in gewicht per cel het grootst. Het gemiddelde gewicht per cel bedroeg  $1.673 \cdot 10^{-10}$  gram.

#### 4.7 Flow cyto meter

Gedurende alle experimenten zijn de samples dagelijks gemeten met de flow cyto meter. Met deze flow cyto meter zijn per dag per cultuur 10.000 deeltjes geteld. Deze deeltjes bestaan naast algen ook uit andere deeltjes zoals zwevend stof etc., dit wordt ruis genoemd. Met de flow cyto meter software is het mogelijk om de gemeten resultaten te plotten waarbij gebruik gemaakt kan worden van verschillende parameters op de assen. Door deze te plotten ontstaan figuren zoals weergegeven in figuur 49. De deeltjes en algen met overeenkomende eigenschappen zijn dan als wolkjes terug te vinden. Met de software is het vervolgens mogelijk deze wolken te selecteren waarbij de eigenschappen afgelezen kunnen worden. Echter, er waren problemen met de software. Het was mogelijk de juiste assen tegenover elkaar te plotten, alleen was er dan slechts een weergave van ongeveer 5% van de deeltjes. De assen konden niet aangepast worden tot het totaal beeld te zien was en de juiste gegevens geselecteerd konden worden. De resultaten zijn daarom met een andere software geplott waarna de juiste grafieken ontstonden, hier was het echter niet mogelijk een wolk met de bijbehorende gegevens te selecteren. Hierdoor kunnen er geen resultaten weergegeven worden van de metingen met de flow cyto meter.

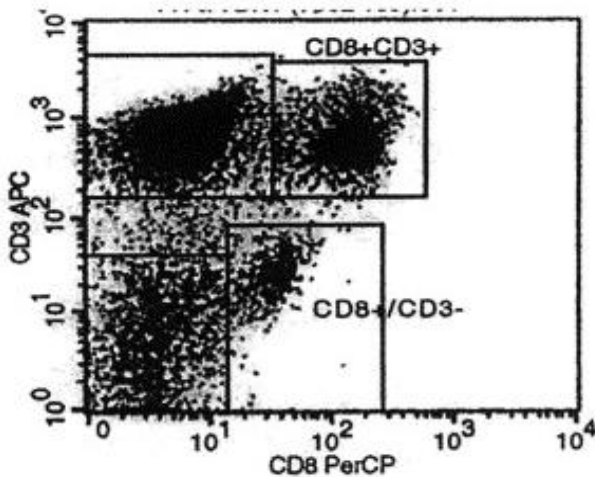


Fig. 49: weergegeven analyse met de flow cyto meter



# 5 Discussie en conclusie

---

## Experiment 1 nutriënt gradiënt

Door het niet functioneren van een schoepenrad is in de cultuur waaraan 60% van het Walne-medium is toegevoegd niet op dezelfde manier voor waterbeweging gezorgd. In plaats van door het schoepenrad is de cultuur op drie plaatsen belucht d.m.v. slangetjes. Deze cultuur laat een lagere groei zien ten opzichte van de overige culturen, hier kan de manier van beluchten een oorzaak van zijn. Bij deze cultuur was er horizontaal een lichte waterbeweging te zien, terwijl bij de overige cultures een duidelijke sterke stroming te zien was. Door de geringe beweging is er wellicht minder contact tussen de algen en de nutriënten, waardoor deze minder goed opgenomen konden worden wat resulteerde in een lagere groei. Bij de cultures met de verschillende percentages van het Walne-medium is geen trend in groei te zien. De cultures met slechts toevoeging van 20% Walne-medium liet de hoogste groei zien. Bij de groei van de cultures is de hoeveelheid Walne-medium niet terug te zien als bepalende factor voor de maximale concentratie aan algen groei.

Verwacht zou zijn volgens Riegman & Rowe (1994) dat wanneer de nutriënten gaan limiteren de absorptieratio 480/665nm zou stijgen richting de 2. De ratio blijft rond de 1,2 wat zou duiden op licht limitatie. Terwijl bij de cultures met 0, 10 en 20% Walne-medium een duidelijk gebrek aan nutriënten zichtbaar is (fig. 22,23 en 24) wat zich ook uit in een afname van groei. Volgens Riegman & Rowe (1994) zou de ratio bij nutriënt limitatie, wat bij boven genoemde cultures het geval is, stijgen richting de 2. Dit is hier niet het geval en de absorptieratio lijkt in dit geval niet te duiden op een limitatie van nutriënten.

De resultaten van de Fv/Fm waarden blijven stabiel, op de uitschieter van dag drie na blijft deze rond de 0,6. Dit duidt erop dat de cultures in geval van de Fv/Fm als indicator voor fotosysteem II efficiënte prima heeft kunnen functioneren ongeacht de behandeling (Parkhill, 2001). De Fm laat in het begin een stijging zien, dit duidt op voldoende licht. Naarmate de cultures dichter worden en er dus minder licht beschikbaar komt voor de algen neemt deze Fm weer af. Als gevolg van de slechter wordende lichtomstandigheden gaan de cultures meer energie stoppen in het optimaliseren van hun lichtsystemen zodat ze effectiever het beschikbare licht kunnen opnemen. Hierdoor wordt het verlies in de vorm van fluorescentie minder en daalt de Fm. Wanneer de Fm daalt gaan de cultures in groei ook afnemen, mogelijk doordat er meer energie in de fotosystemen gestopt wordt i.p.v. de groei.

## Experiment 2 nutriënt proef

Door de aanwezigheid van ciliaten is de groei in de cultures geremd en hebben ze in verhouding met de andere experimenten een lagere concentratie aan cellen behaald. Ook was er sinds het begin van het experiment een andere diatomee aanwezig in de cultures, deze is ook waargenomen in de cultures bij experiment 4. Deze hebben gedurende het experiment ook groei laten zien, maar zijn in verhouding met *Skeletonema costatum* op de achtergrond gebleven. Deze kunnen een rol gespeeld hebben bij de gedane metingen zoals PAM en drooggewicht bepalingen. De genoemde absorptieratio 480/665nm van Riegman & Rowe (1994) zou gelden voor alle algen in het watersysteem aanwezig. De ratio zou dan niet beïnvloed worden door de soort algen maar door de aard van de limitatie van de algengroei. De groei van de cultures liet onderling geen significant (ANOVA,  $P=0,112$ ) verschil zien, dit komt waarschijnlijk door de besmettingen met ciliaten waardoor beide cultures niet goed hebben kunnen groeien en niet hun maximale groei hebben kunnen behalen. Bij de cultures zonder Walne-medium is vanaf dag drie duidelijke limitatie in nutriënten te zien waarna de groei ook afneemt (fig. 29). Op dag 3 bedraagt zowel de concentratie silicaat en fosfaat 0 mg/l (fig. 30 en 31) en op dag 4 is de concentratie aan nitraat ook 0 mg/l (fig. 32).

De absorptieratio voor beide behandelingen (100%- en 0% Walne-medium) ligt gedurende de eerste vier dagen van het experiment tussen de 1,1 en 1,2. Dit duidt op een limitatie van licht aldus Riegman & Rowe (1994). Na dag vier is er voor beide behandelingen een duidelijke stijging te zien die aangeeft dat de limitatie van nutriënten een grotere rol begint te spelen. De cultures zonder toevoeging van het Walne-medium laten de sterkste stijging van de ratio zien met een piek van 1,8. De nutriënten hebben op dag 4 al hun maximale limitatie bereikt terwijl de sterkste stijging van de absorptieratio op dag 6, 7 en 8 plaatsvindt. Bij de controle cultures met 100% toegevoegd Walne-medium stijgt de absorptieratio naar de 1,35 terwijl de resultaten van nutriënten geen tekort laten zien en de minimale concentratie boven de begin concentraties blijft van de cultures zonder toevoeging van Walne-medium. Het verschil tussen de behandelingen is significant (ANOVA,  $P=0,046$ ), dit is waarschijnlijk te wijten aan de stijging van de laatste drie dagen. Een absorptieratio van 2,0 wordt gezien als uiterste van extreme nutriënt limitatie waar de ratio van de cultures zonder toevoeging van Walne-medium naar neigt.

Nitriet laat bij de cultures met 100% Walne-medium een stijging zien, terwijl de cultures zonder toevoeging van het Walne-medium een afname naar 0 mg/l laten zien (fig. 33). Een verklaring voor deze stijging zou denitrificatie zijn waarbij nitraat door bacteriën wordt omgezet tot nitriet.

De resultaten van de Fv/Fm waarde blijven tussen de 0,6 en de 0,65. Dit duidt erop dat de cultures voor de Fv/Fm prima omstandigheden hebben en de fotosystemen prima kunnen functioneren (Parkhill, 2001). De behandelingen laten onderling geen significant (ANOVA,  $P=0,080$ ) verschil zien. De limitatie van nutriënten die duidelijk zichtbaar is in de groei heeft geen invloed. Het verloop van Fm komt overeen met het verloop van de eerste vijf dagen bij experiment 1. Dit ondersteunt de verklaring gegeven bij experiment 1.

### **Experiment 3 licht gradiënt proef**

De limitatie van licht is duidelijk terug te zien aan de groei curves van de algen. De cultuur met 50% van het buitenlicht laat al een verschil zien met de cultuur van 100%. Dit laat zien dat de cultures met relatief veel licht al te lijden hebben aan licht limitatie. Mogelijk is de cultuur met 100% van het buitenlicht ook gelimiteerd aan licht. De absorptieratio blijft redelijk stabiel en laat een lichte daling zien. De absorptieratio wordt niet beïnvloed door de aanwezige limitatie van licht. De ratio blijft rond de 1,2. Volgens Riegman & Rowe (1994) duidt dit op een limitatie van licht voor alle cultures. Op dag 7 is een piek in de ratio te zien, deze piek past niet in de trend van de grafiek en laat op dag 8 direct weer lagere waarden zien. Gedurende het experiment is er minimaal 11 mg/l silicaat, 6 mg/fosfaat en 32 mg/l fosfaat beschikbaar geweest voor opname door de algen. Dit maakt nutriënt limitatie onwaarschijnlijk.

De Fm waarden zijn beperkt gemeten, maar doen vermoeden dat voor de meer gelimiteerde cultures de Fm waarde lager ligt en dat deze dus effectiever het licht opnemen. Doordat de Fm lager ligt voor deze cultures wordt er meer energie gestoken in de fotosystemen waardoor deze beter functioneren en de Fm lager uitvalt (Parkhill, 2001). De groei van de cultures met een grotere limitatie aan licht blijft ook achter, mede doordat er meer energie in het fotosysteem gestopt wordt. De Fv/Fm ratio geeft op dag 4 voor de cultures met 50- en 100% licht een beduidend lagere ratio. Dit zou er op duiden dat deze cultures het meest te lijden hebben van licht limitatie. Terwijl de overige cultures (25, 12,5, 6,25 en 0% licht) duidelijk minder licht kregen en deze limitatie van licht ook terug te zien is in de groei. Dit maakt de gemeten ratio bij dag 4 onverklaarbaar.

#### **Experiment 4 licht proef**

De limitatie van licht (6,25%) resulteert duidelijk in een significant lagere groei ten opzichte van de controle cultures (100%) (fig. 41). De absorptieratio van beide cultures is aan het begin rond de 1,2 en geeft volgens Riegman & Rowe (1994) een limitatie van licht aan. Naarmate het experiment vordert en de limitatie van licht bij de cultures met 6,25% steeds duidelijker zichtbaar wordt gaat de absorptieratio voor deze cultures niet afwijken van de controle cultures (100%). Het zou kunnen zijn dat beide cultures van begin af aan gelimiteerd zijn aan licht en vandaar lage absorptieratio's laten zien. Maar de cultures met 6,25% licht hebben, gezien het verloop van de algenconcentraties, meer te lijden van een gebrek aan licht. Dit zou zich moeten uiten in een lagere ratio dan bij de cultures met 100% licht, wat niet het geval is.

De Fm die voor beide cultures op dag 1 gelijk is, laat een duidelijk significant (ANOVA, P=0,000) verschil zien. Doordat de cultures met 6,25% licht te maken hebben met slechtere lichtomstandigheden dan de cultures met 100% licht wordt er meer energie gestoken in het verbeteren van de fotosystemen. Door het verbeteren van de fotosystemen kan het licht dat beschikbaar is efficiënter opgenomen worden. Hierdoor wordt het rendement hoger en het verlies in de vorm van fluorescentie lager wat resulteert in een lagere Fm waarde dan de cultures met 100% licht. De Fv/Fm ratio laat in tegenstelling tot de Fm geen verschil zien in de verschillende behandelingen. Deze Fv/Fm blijft stabiel en geeft aan dat de cultures onder prima omstandigheden functioneerden (Parkhill, 2001).

#### **Algemeen**

De absorptieratio's 480/665nm liggen bij het begin van de experimenten rond de 1,2, dit zou duiden op limitatie van licht (Riegman & Rowe, 1994). Deze waarde (1,2) laat geen duidelijke veranderingen zien. Enkel bij de nutriënt proef is er op het einde van het experiment een duidelijke stijging van de ratio te zien richting de 1,8 die zou moeten duiden op nutriënt limitatie. De hoge waarden van de absorptieratio voor de cultures zonder toevoeging van Walne-medium worden gemeten wanneer de cultures van *Skeletonema costatum* zijn ingestort en zelden worden gezien in de cultures. In dit stadium bestaan de cultures vrijwel enkel uit ciliaten. Doordat absorptieratio een limitatie van nutriënten aangeeft wanneer de algen cultures vrijwel verdwenen zijn, is deze in dit geval wellicht niet zo representatief voor de algen cultures. Als deze absorptieratio toegepast zou worden in de praktijk is het van belang dat deze iets over de limitatie van enerzijds licht en anderzijds nutriënten kan zeggen gedurende de exponentiële fase, zodat het management van de cultures tijdig aangepast kan worden. Als de ratio echter pas verandering laat zien die duidt op limitatie van licht of nutriënten als de cultures aan het instorten zijn en dus in de crash fase verkeren, zijn aanpassingen van het kweekstelsel te laat. Ingestorte culturen kunnen niet opnieuw opgestart worden. Bij het gebruik van continue culturen wil men oogsten tijdens de exponentiële fase waar de groei het hoogst is. Als de absorptieratio tijdens deze fase geen duidelijke veranderingen laat zien kan deze hierop niet toegepast worden, wat in dit onderzoek het geval is.

De Fv/Fm ratio is tijdens de experimenten niet gaan afwijken bij verschillende behandelingen in de verschillende cultures. In het experiment worden door andere parameters enkele keren duidelijk nutriënt en licht limitatie weergegeven. Hierbij laat de Fv/Fm ratio met de controle behandelingen geen verschil zien met de gelimiteerde behandelingen. De Fv/Fm ratio blijkt uit de verschillende experimenten niet geschikt om een mogelijke limitatie in licht of nutriënten weer te geven. Mogelijk is de Fv/Fm niet geschikt door de korte duur van het experiment en dus voor batch kweken. Parkhill et al (2001) laat als gevolg van N-limitatie een afname van de Fv/Fm ratio zien. Deze uit zich echter pas duidelijk na een dag of negen waarna deze sterk afneemt richting de 0,2, hier waren de cultures

nog niet volledig ingestort. Mogelijk reageert de efficiëntie van het fotosysteem pas als deze gedurende langere tijd te lijden hebben onder stress van nutriënten en licht.

De Fm lijkt vrij direct te reageren op de lichtomstandigheden. Het verschil in onderlinge lichtomstandigheden bij de cultures gedurende de experimenten is terug te zien in deze Fm. Ook is te zien dat de Fm gedurende de bloei van een cultuur verandert. In het begin van de experimenten komen de algen uit relatief dichte en cultures. Door het over enten worden de cultures relatief dun, waardoor er veel licht in de cultures kan schijnen en in verhouding met de ent cultuur er veel licht beschikbaar is. De cultures kunnen dan meer energie stoppen in de groei doordat er voldoende licht is. Naarmate de cultures groeien en de cultures dichter worden kan er minder licht doordringen in de cultures en wordt de opname van licht belangrijker. Doordat de vraag naar licht groter wordt gaan de algen waarschijnlijk meer energie stoppen in fotosystemen waardoor deze efficiënter te werk gaan, zodat het verlies van licht in de vorm fluorescentie uitgedrukt als Fm minder wordt.

Ammonia wordt komt vrij door afbraak van organische stikstofhoudende verbindingen. Meestal gaat de voorkeur van micro organismen uit naar ammonia als N bron, waardoor deze waarschijnlijk in lage concentraties voor kwam, doordat deze eerder worden opgenomen (Richmond, 2004). Ammonia kan in hoge concentraties toxisch zijn voor algen. Bij een concentratie hoger dan 38 mg/l wordt ammonia toxisch voor algen en kan het een nadelig effect hebben op de algengroei (Abeliovich, 1975). Uit onderzoek is gebleken dat een concentratie van 50 mg/l nitriet geen significante invloed heeft op de groei van algen cultures (Chen, 2012). Zowel voor ammonia als nitriet blijven de concentraties van alle experimenten ruim onder deze toxische limieten en dit zal de groei dus niet nadelig beïnvloed hebben.

Bij het drooggewicht is te zien dat naarmate de cultures dichter worden het drooggewicht evenredig toeneemt. Zo blijft het gewicht per cel ongeveer gelijk naarmate de cultures dichter worden met een gemiddeld gewicht van  $1.673^{-10}$  gram. Bij de lage concentraties aan algen is de onderlinge afwijking in gewicht per cel het grootst doordat er met lichtere gewichten gewerkt wordt en de onnauwkeurigheid in het wegen groter wordt. Als tijdens de kweek van algen geoogst wordt, wil men een zo hoog mogelijk drooggewicht behalen. Mocht er naarmate de cultures dichter worden een afname aan drooggewicht zijn per alg, zou men ervoor kunnen kiezen om de cultures eerder te oogsten. Het moment van oogsten zou bij dit experiment niet uitmaken, doordat de verhouding algenconcentratie en drooggewicht gelijk blijft.

Gekeken naar de uitdoving in percentages lijkt dit erg hoog. Bij dichte cultures is op 40cm diepte een uitdoving van rond de 97%, dit is ongeveer 25 PAR. De uitdoving is percentueel gezien hoog maar door de hoge lichtstraling aan het oppervlak blijft er nog relatief gezien veel licht over dat wel duidt op licht limitatie op grotere dieptes, maar de groei niet onmogelijk maakt. Ook worden de algen niet continu aan de lage lichtcondities blootgesteld, maar bewegen als gevolg van de waterbeweging door de waterkolom waar dichter aan het wateroppervlak meer licht beschikbaar is. Bij onderzoek van Norici et al (2011) is er net als in dit onderzoek opzettelijk licht gelimiteerd. Hier werd als laag licht regime gebruikt gemaakt van 25 PAR licht en als hoog licht regime 200 PAR. De laagst gemeten waarde in het huidige onderzoek komt overeen met het lage licht regime bij Norici et al (2001), waar limitatie zichtbaar was maar wel handhaving van de cultures mogelijk was. De raceways waar de cultures in gekweekt zijn, zijn diep voor raceway kweeksystemen. Meestal bedraagt de diepte van raceways slechts 15 t/m 25 cm (Richmond, 2004). Doordat de cultures voor raceways systemen erg diep zijn zullen deze eerder gelimiteerd zijn aan licht als gevolg van uitdoving.

### Controle spectrometer

Omdat de absorptieratio 480/665 niet de verwachte resultaten liet zien, is om uit te sluiten dat de spectrometer slecht functioneert de gebruikte spectrometer gecontroleerd. De werking is gecontroleerd door metingen te doen met de Well Plate Reader en deze waarden te vergelijken met de metingen met de spectrometer. Deze Well Plate Reader kan net als de spectrometer de absorptie op verschillende golflengten meten. Het verschil in meten is dat de Well Plate Reader met verticale lichtstralen meet en de spectrometer met horizontale. Voor deze controle zijn vier monsters van verschillende culturen gemeten. Deze zijn weergegeven in onderstaande tabel

Tabel 3: Absorptieratio

	Absorptieratio 480/665nm	
	Well Plate Reader	Spectrometer
Monster 1	1,262	1,222
Monster 2	1,257	1,303
Monster 3	1,289	1,241
Monster 4	1,291	1,368

De metingen met de Well Plate Reader zijn in triplo uitgevoerd. De waarden in de tabel betreffen het gemiddelde van deze drie. Te zien is dat de verschillende apparaten onderling een kleine afwijking laten zien. Twee waarden van de Well Plate Reader vallen hoger uit en er vallen er ook twee lager uit. Het verschil is niet zodanig dat beide meetapparatuur aan de hand van de absorptieratio een andere limitatie aangeven.

### Samengevat

*In de inleiding werd de volgende hoofdvraag gesteld: Hoe valt te meten wat limiterend is voor de buitenkweek van *Skeletonema costatum* in raceways? Door het onderzoek is het mogelijk om de bijbehorende deelvragen te beantwoorden en antwoord te geven op de hoofdvraag van het onderzoek. Bij de deelvragen werd de vraag gesteld: wat is het effect van vermindering van nutriënten en licht op de absorptieratio voor pigment? De resultaten laten zien dat de vermeende absorptieratio voor pigment 480/665nm voor dergelijke kweken geen geschikte indicator is om mogelijke licht- en nutriënt limitatie aan te geven. Ook werd de deelvraag: wat is het effect van vermindering van licht op de fotosynthese efficiëntie? gesteld, waar de Fv/Fm en de Fm informatie geeft over de fotosynthese efficiëntie. De Fv/Fm liet geen significant verschil zien ten opzichte van de controle cultures en geeft geen indicatie van licht- en/of nutriënten limitatie. De Fm waarde kan alleen gebruikt worden om licht limitatie aan te geven. Deze liet in vergelijking met de controle cultures een significant verschil zien bij licht gelimiteerde cultures. Op de gestelde hoofdvraag kan geen gesloten antwoord gegeven worden. Aan de hand van de resultaten is het niet mogelijk om een manier aan te geven waarop de limiterende factor gemeten kan worden. Er kan voor dergelijke kweken gezegd worden dat de absorptieratio en de Fv/Fm ongeschikt zijn als indicator voor een mogelijke nutriënt- en licht limitatie. De Fm waarde kan gebruikt worden om tussen verschillende cultures aan te geven welke cultuur meer lijdt onder de huidige licht conditie. Met deze Fm kan geen concrete waarde aangegeven worden waarbij licht of het gebrek aan nutriënten de limiterende factor is.*

## 6. Aanbevelingen

---

De Fm is gedurende het onderzoek naar voren gekomen als mogelijke indicator voor licht limitatie. Op voorhand werd de Fm waarde niet gezien als mogelijke indicator voor licht limitatie. Toen gedurende het onderzoek bleek dat de Fv/Fm ratio onder de heersende omstandigheden geen verandering aan gaf, viel op dat bij de experimenten waarbij licht gelimiteerd was, verschil zat in de Fm waarde. Deze waarde bleek lager te zijn voor cultures die onder lage lichtomstandigheden groeide.

Bij vervolg onderzoek kan er wellicht meer onderzoek gedaan worden naar de Fm waarde. Uit het onderzoek blijkt dat een in verhouding lagere Fm een grotere limitatie aan licht aangeeft, maar een exacte grenswaarde voor wel of geen licht limitatie is er niet uit naar voren gekomen. Door de Fm bij cultures dagelijks te meten kan gekeken worden of de lichtomstandigheden gunstiger (Fm gaat omhoog) worden of nadeliger (Fm daalt). De gebruikte PAM is vrij lastig te handteren, niet snel in gebruik en duur in aanschaf. Wellicht zou een field PAM hierbij uitkomst kunnen bieden, dit is een draagbare meer hanteerbaar apparaat.

Dat de absorptieratio en de Fv/Fm geen limitatie voor cultures die voor korte duur groeien kan weergeven, zoals in de uitgevoerde experimenten, wil niet uitsluiten dat deze geen mogelijke limitatie van licht en nutriënten kan aangeven. Bij het gebruik van een continu kweek kunnen de cultures voor langere tijd blootgesteld worden aan limiterende omstandigheden, waardoor de Fv/Fm en de absorptieratio mogelijke veranderingen laat zien. Om dit uit te sluiten zouden dergelijke testen bij continu cultures uitgevoerd moeten worden. Mochten de Fv/Fm en de absorptieratio bij continu cultures wel limitatie aan kunnen geven, kan men zich af vragen of deze hiervoor wel geschikt zijn, als er geruime tijd spraken moet zijn van een limitatie, wil men dit terug kunnen zien in de absorptieratio en/of de Fv/Fm.

Er kan niet uitgesloten worden dat de cultures met 100% licht, licht gelimiteerd waren tijdens de experimenten. De behandeling met 100%- en 50% licht gaf onderling verschil aan in groei. Het zou mogelijk kunnen zijn dat cultures met nog meer licht dan de 100% licht behandeling een betere groei zou laten zien. De absorptieratio gaf van het begin af aan voor alle culturen een indicatie van licht limitatie. Bij nieuwe experimenten zouden experimenten gedaan kunnen worden met ondiepere cultures waardoor de lichtomstandigheden beter zijn. Hierdoor kan mogelijke lichtlimitatie uitgesloten worden, als cultures met verschillende lichtbehandelingen dezelfde groei laten zien, waarbij de absorptieratio wellicht hoger uitvalt en geen lichtlimitatie meer aangeeft.

# Referenties

---

## Internet bronnen:

- REPROSEED: <http://www.reproseed.com> , geraadpleegd februari 2012
- Algeabase: <http://www.algaebase.org> , geraadpleegd februari 2012

## Literatuur:

Abeliovich A., Azov Y. (1975) Toxicity of Ammonia to Algae in Sewage Oxidation Ponds. Applied and Environmental Microbiology, june 1976 p. 801-806.

Aquaculture and consumer protection (1997). Renewable biological systems for alternative sustainable energy production. FAO corporate document repository, Chapter 1 - Biological energy production, version 128.

Chena W., H. Tonga & H. Liub (2012). Effects of nitrate on nitrite toxicity to *Microcystis aeruginosa*, Marine Pollution bulletin 2012.

Cleve A, (1878). Catalogue of Life: 2010 Annual Checklist, AlgaeBase 3.0 (Dec 2004)

Fisheries and Aquaculture Department (1996). Manual on the Production and Use of Live Food for Aquaculture.

Glenn E.B & P.A. Scolnik, (1995). Plant Carotenoids: Pigments for Photoprotection, Visual Attraction, and Human Health. The Plant Cell, Vol. 7, 1027-1038,

Guiry, M.D, (2011). *Skeletonema costatum* (Greville) Cleve, 1873. AlgaeBase, World-wide electronic publication, National University of Ireland, Galway.

Heath, M.R., K. Richardson & T. Kiørboe (1990). Optical assessment of phytoplankton in plankton in freshwater and marine environment: review of recent evidence on the effects of enrichment. -limnol. Oceanogr. 33: 796-822.

Hoff F.W. & T.W. Snell, (2001) Plankton culture manual, 5th ed. Florida aqua farms. Inc., Dade city, Florida (USA).

Janknegt P.J, (2008). Oxidative stress responses in the marine antarctic diatom *Cheatoceeros Brevis* (bacillariophyceae) during photoacclimation, Journal of Phycology, Volume 44, pages 957-966.

Kamermans P, M.A. Hemminga, D.J. de Jong (1999). Significance of salinity and silicon levels for growth of a formerly estuarine eelgrass (*Zostera maringa*) population (Lake Grevelingen, The Netherlands), Marine Biology 133: 527-539.

Maxwell K., Johnson G. N, (2000) Chlorophyll fluorescence – a practical guide. Journal of Experimental Botany Vol. 51, No. 345, pp. 659-668- April 2000.

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.

Miles B.W. (2003). Photosystems I and II. Texas A&M University, Department of Biochemistry and Biophysics.

Norici A., Bazzoni A.M., Pugnettie A., Raven J.A. & M. Giordano (2011). Impact of irradiance on the C allocation in the coastal marine diatom *Skeletonema marinoi* Sarna and Zingone. Plant, Cell and environment 34, 1666-1566.

Otero A. (2010). Producing more and better microalgae for aquaculture, Dpto. Microbiología y Parasitología (presentatie).

Parkhill J., Maillet G, & Cullen J.J. (2001). Fluorescence-based maximal quantum yield for PSII as diagnostic of nutrient stress. J. phycol. 37 517-529.

Pirastu L. (2010). Carotenoid production and change of photosynthetic functions in *Scenedesmus* sp. Exposed to nitrogen limitation and acetate treatment, J Appl Phycol 24:117-124, Université du Québec a Montréal (UQAM), Canada.

Rahman M. (2006). Introduction to Flow Cytometry. Published by Serotec Ltd, Oxford.

Ralph P. (2005). Introduction to PAM fluorometry, Department of Environmental Sciences, University of Technology, Sydney Cnr Westbourne Street & Pacific Highway, GORE HILL NSW 2065.

REPROSEED (2009). Seventh Framework Programme: Cooperation Work Programme Theme 2: Food, Agriculture and Fisheries, and Biotechnology Call identifier: FP7-KBBE-2009-3.

Richmond A. (2004). Handbook of microalgal Culture: Biotechnology and Applied Phycology. ISBN 0-632-05953-2

Riegman R & Rowe A. (1994). Nutritional status and pigment composition of phytoplankton during spring and summer Pheocystis blooms in dutch coastal waters (Marsdiep Area). Netherlands Journal of Sea Research 32 (1), 13-21.

Rosema A. & de Vries G. (2011). Meting van Bladgroenfluorescentie en Fotosynthese. EARS Plant Photosynthesis Monitoring BV ([www.ears.nl/pmm](http://www.ears.nl/pmm)).

Speer B. R. (1997). "Photosynthetic Pigments". UCMP Glossary (online). University of California Museum of Paleontology.

Stibal M, Elster J, Sabacká M, Kastovská K. (2007). Seasonal and diel changes in photosynthetic activity of the snow alga *Chlamydomonas nivalis* (Chlorophyceae) from Svalbard determined by pulse amplitude modulation fluorometry. FEMS Microbiol Ecol. 59(2):265-73.

Walne P.R. (1970). Studies on the food value of nineteen genera of algae to juvenile bivalves of the genera *Ostrea*, *Crassostrea*, *Mercenaria*, and *Mytilis*. Fish. Invest. 26, 162.



Watson R.A & P.L. Osborne, (1979). An algal pigment ratio as an indicator of the nitrogen supply to phytoplankton in three Norfolk broads. *Freshwater Biology* 9, 585-594.

Yael F.F. (1961). The derivative absorption spectra of chlorophyll in algae and leaves at low temperatures. *Carnegie institution of Washington, Department of Plant Biology, Stanford. Calif. (USA), Biochim. Biophys. Acta*, 57 77 -82.

# Bijlagen

---

## Bijlage 1: Walne-medium

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.

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

## Bijlage 2: 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 haemacytometer 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>

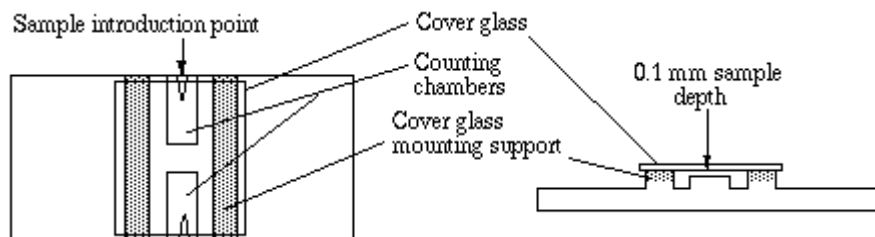


Figure 1. Hematocytometer

#### 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, Figure A1); on each square, the cells on the center and two borders (upper and left or lower and right border, Figure B)
- 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)

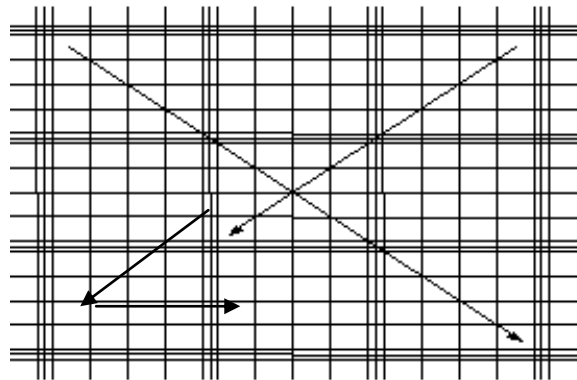


Figure 2 Diagonal counting of the squares (plus one square, follow arrows) in Bürker chamber

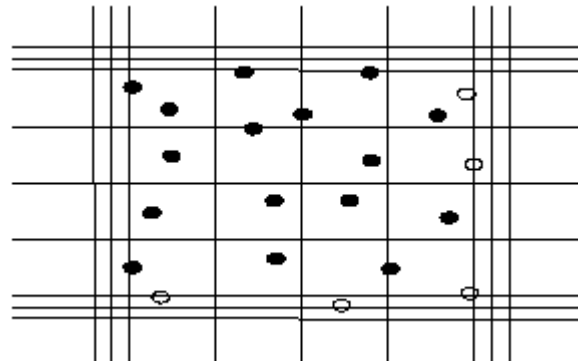


Figure 3 Counting of the cells in center of squares and on two borders (upper and left or lower and right)

### Bijlage 3: protocol drooggewicht bepaling

#### **Determination dry weight and ash-free dry weight of algae**

Dry weight of algal cells can be determined by filtering and drying algae from aliquots of culture of known concentration

- determine accurately the concentration of the algal culture to be sampled for dry weight analysis
- filter an exact volume of culture on pretared glass-fiber filters (1 µm pore size) using a Büchner setup connected to a vacuum pump (triplicate). Wash the filter with a solution of ammonium formate (0.5 M) to remove salts
- follow the same procedure with control filters on which an equal volume of 0.22- µm filtered seawater is filtered (triplicate). The strength of the applied vacuum will determine the amount of salts retained on the control filters.
- dry the filters at 104°C for 4 h to volatilize the ammonium formate
- weigh on an analytical balance

calculate the dry weight per algal cell according to the formula:

$$DW \text{ (g.cell}^{-1}\text{)} = (DW_A - DW_C) / (N.V)^{-1}$$

$DW_A$  = average dry weight retained on algal filter (g)

$DW_C$  = average dry weight retained on control filter (g)

$N$  = algal concentration (cells.ml<sup>-1</sup>)

$V$  = volume of algal culture and filtered seawater filtered on algal and control filter, respectively (ml)

## Bijlage 4: Resultaten experimenten

Alle resultaten van de in totaal vier experimenten die niet in het rapport bij de resultaten zijn getoond zijn hier per experiment weergegeven.

### Experiment 1: Nutriënt gradiënt

#### Temperatuur

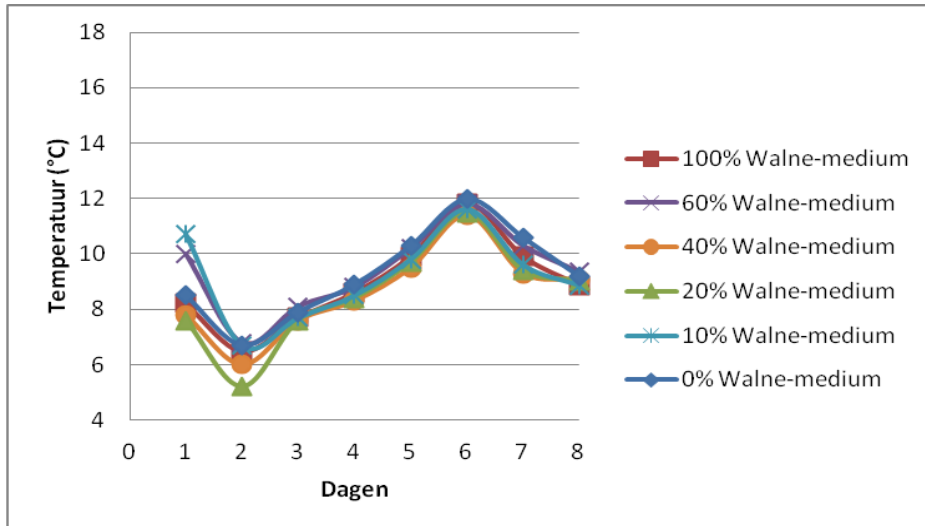


Fig. 50: Verloop temperatuur gedurende experiment 1 bij verschillende nutriënt behandelingen

De temperatuur gedraagt zich voor de cultures met de verschillende behandelingen hetzelfde (fig. 50). De temperatuur schommelt gedurende het experiment tussen de 5 en 12 °C.

#### Temperatuur (logger)

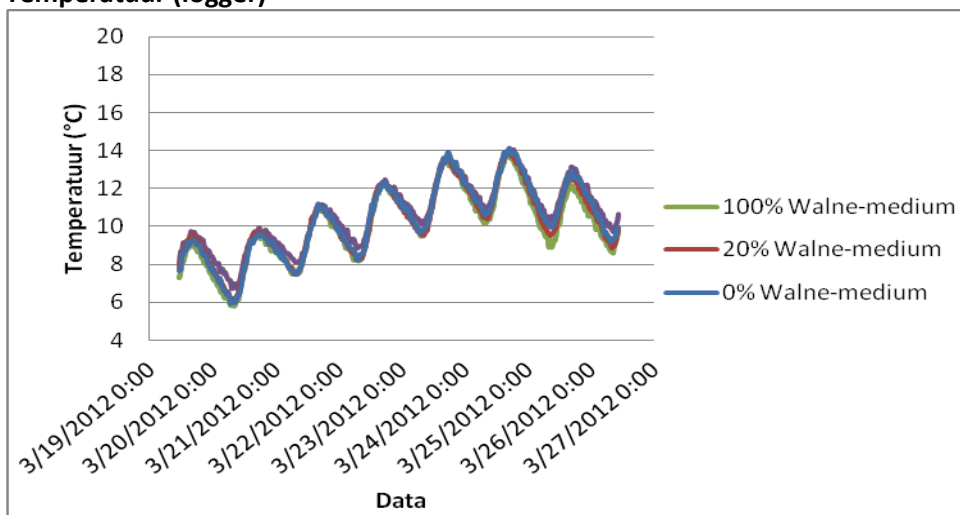


Fig. 51: Verloop temperatuur gedurende experiment 1 bij verschillende nutriënt behandelingen

De schommelingen van temperatuur gedurende de dag is goed terug te zien in figuur 51. De laagst gemeten temperatuur bedraagt 6 °C, de hoogste pieken geven een temperatuur van 14 °C aan.

## Saliniteit

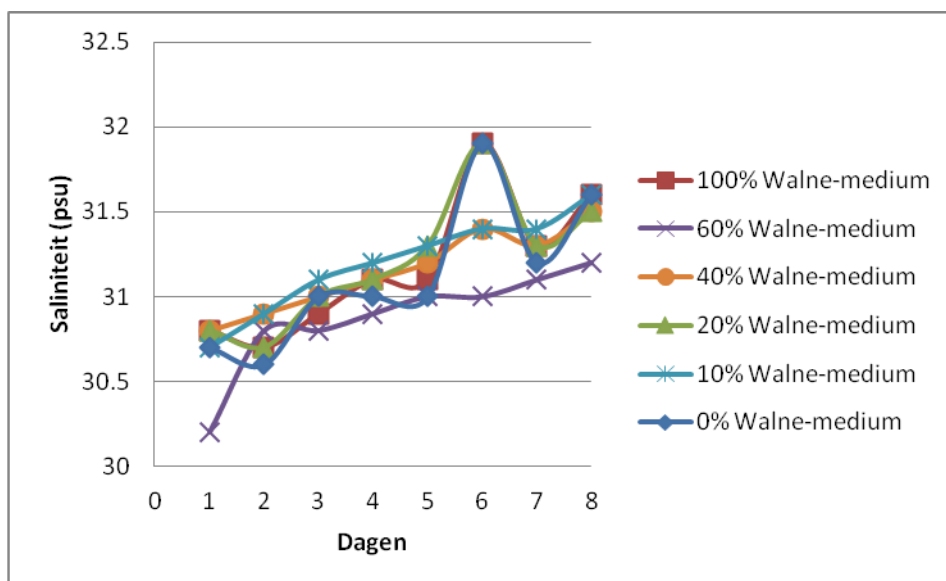


Fig. 52: Verloop saliniteit gedurende experiment 1 bij verschillende nutriënt

Als gevolg van verdamping in de cultures stijgt de saliniteit geleidelijk van gemiddeld 30,8- naar 31,5 psu met opmerkelijke pieken op dag 6 (fig. 52).

## pH

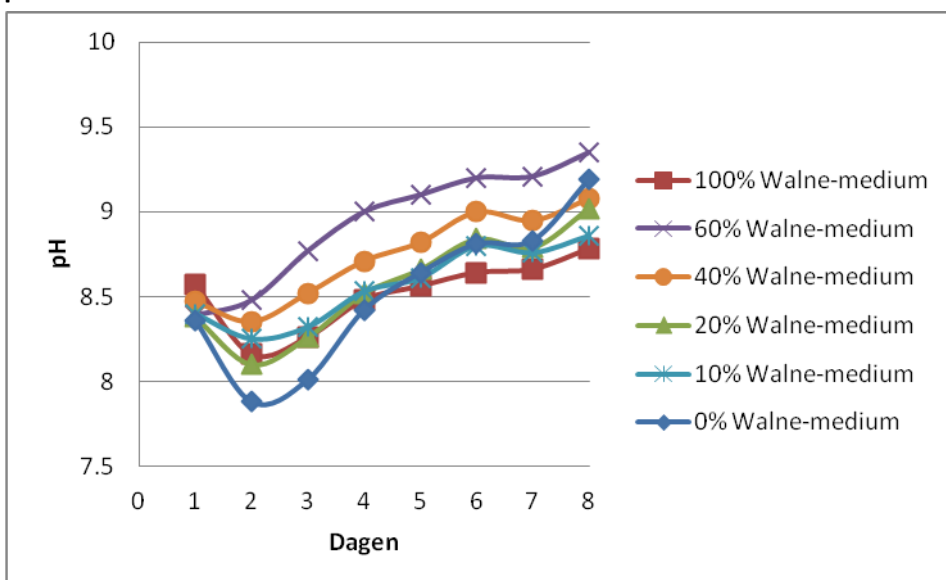


Fig. 53: Verloop pH gedurende experiment 1 bij verschillende nutriënt behandelingen

De pH begint voor alle cultures rond de 8,5 waarna deze na een korte daling op dag 2 en 3 een stijging naar ongeveer 9 laat zien (fig. 53).

## Zuurstofgehalte

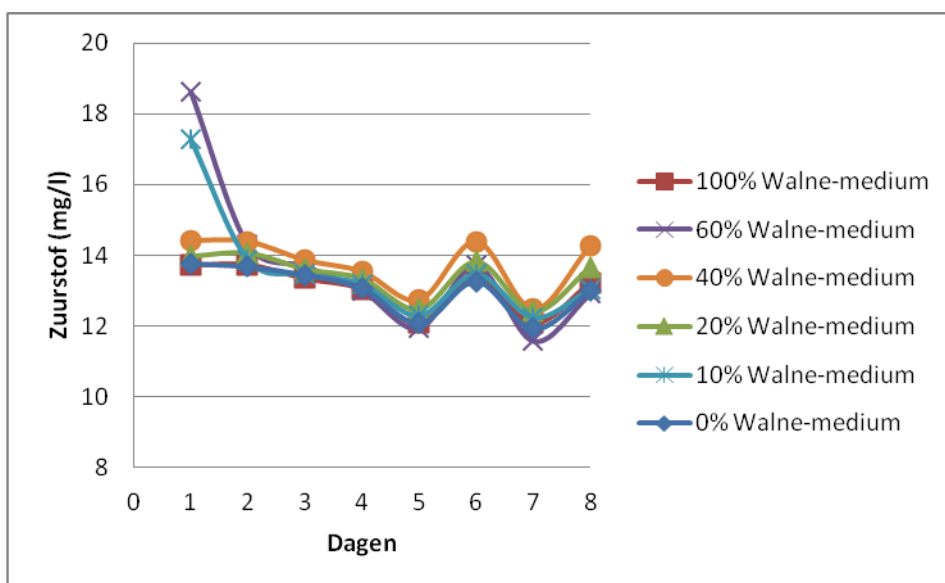


Fig. 54: Verloop zuurstofgehalte gedurende experiment 1 bij verschillende nutriënt behandelingen

Het zuurstofgehalte laat voor de cultures met 60- en 10% Walne-medium op dag 1 een hogere concentratie zien dan de overige cultures (fig. 54). De cultures met 60- en 10% Walne-medium zijn op dag 1 later gemeten, door de zuurstofproductie van de algen gedurende de dag ligt het zuurstofgehalte hoger. Het zuurstofgehalte komt gedurende het experiment niet onder de 11,5 mg/l

## Zuurstofverzadiging

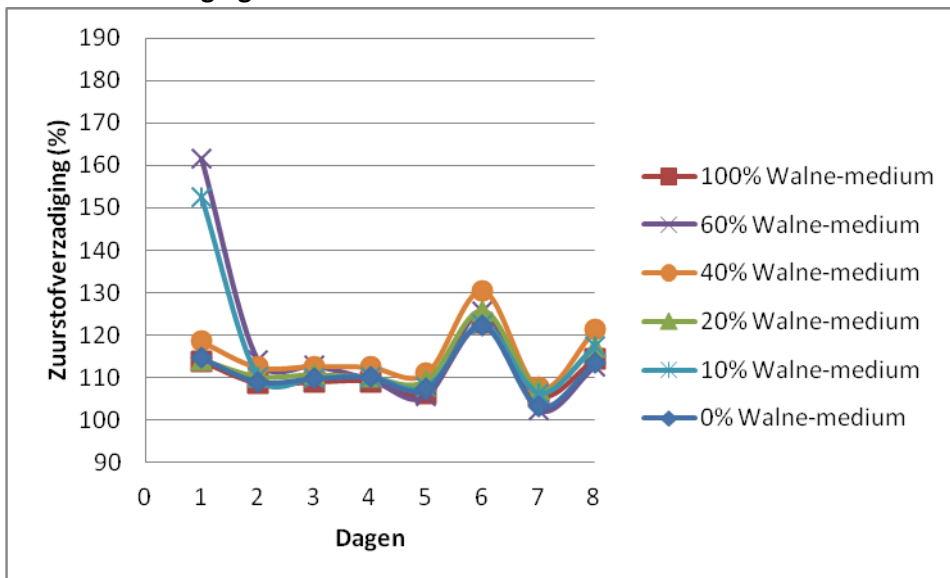


Fig. 55: Verloop zuurstofverzadiging gedurende experiment 1 bij verschillende nutriënt behandelingen

Het verloop van de zuurstofverzadiging (fig. 55) komt overeen met het verloop van het zuurstofgehalte. Gedurende het hele experiment is er een oververzadiging aan zuurstof gemeten (<100).



## Experiment 2: Nutriënt proef

### Temperatuur

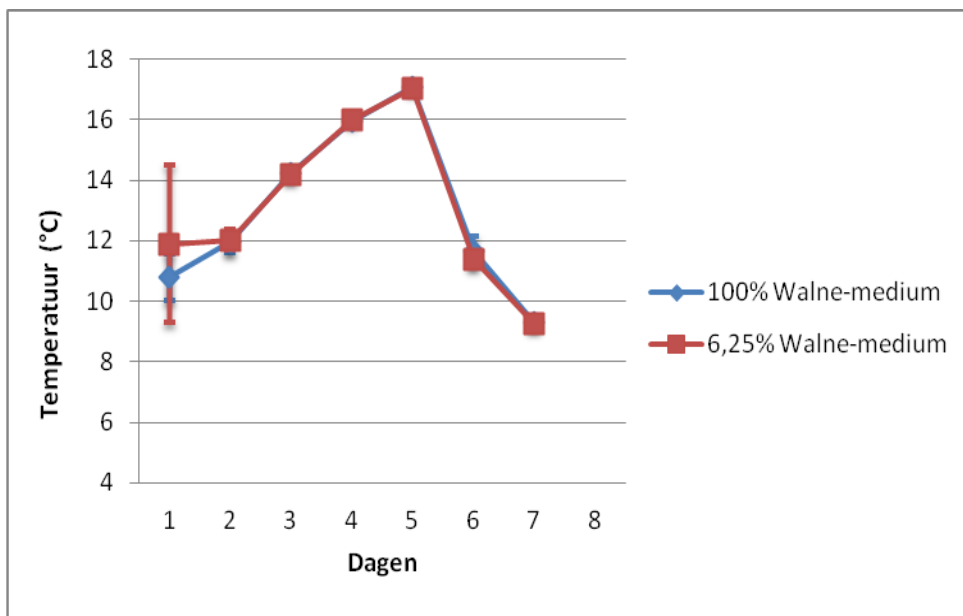


Fig. 56: Verloop temperatuur gedurende experiment 2 bij 100%- en 0% Walne -medium.

Het verloop van de temperatuur van beide behandeling komt overeen. De temperatuur komt niet onder de 9 °C en heeft een piek op dag 5 van 17 °C.

### Temperatuur (logger)

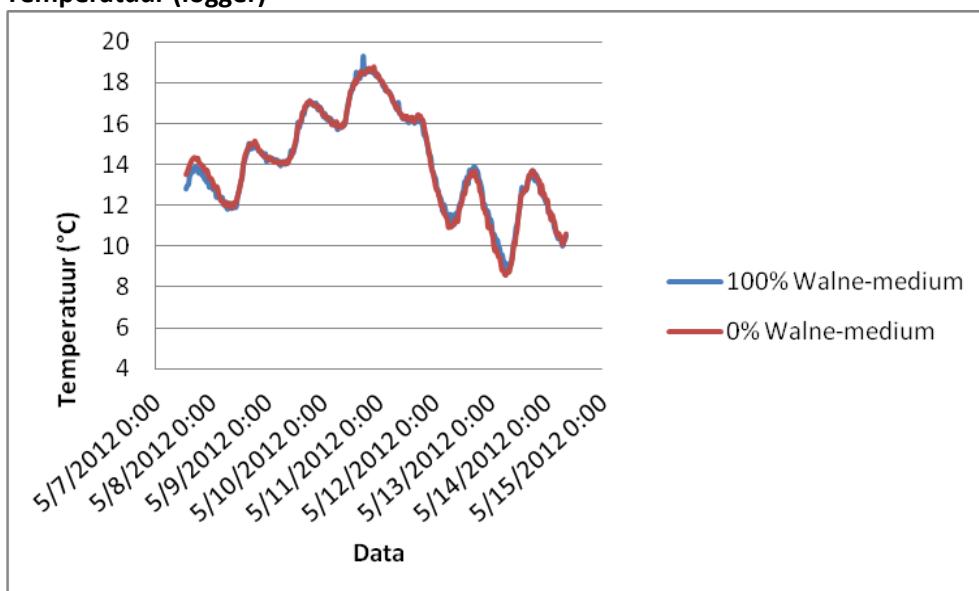


Fig. 57: Verloop temperatuur gedurende experiment 2 bij 100%- en 0% Walne -medium.

De temperatuurlogger geeft de dagelijkse schommeling van de temperatuur weer (fig. 57). De temperatuur varieert tussen de 8 en 19 °C.

## Saliniteit

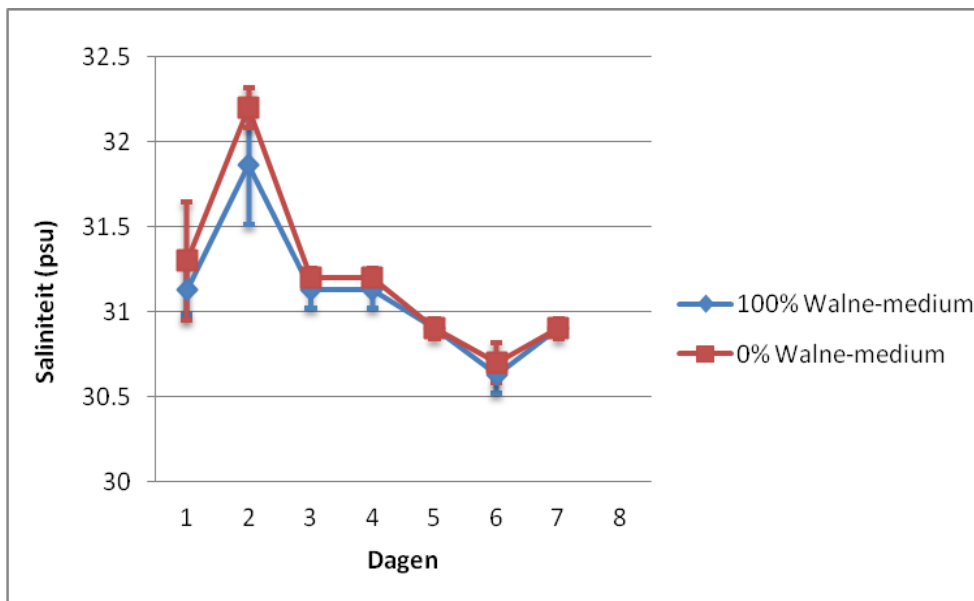


Fig. 58: Verloop saliniteit gedurende experiment 2 bij 100%- en 0% Walne -medium

De saliniteit laat op dag 2 een stijging zien waarna deze daalt als gevolg van neerslag. De saliniteit blijft tussen de 30,5- en 32,4 psu.

## pH

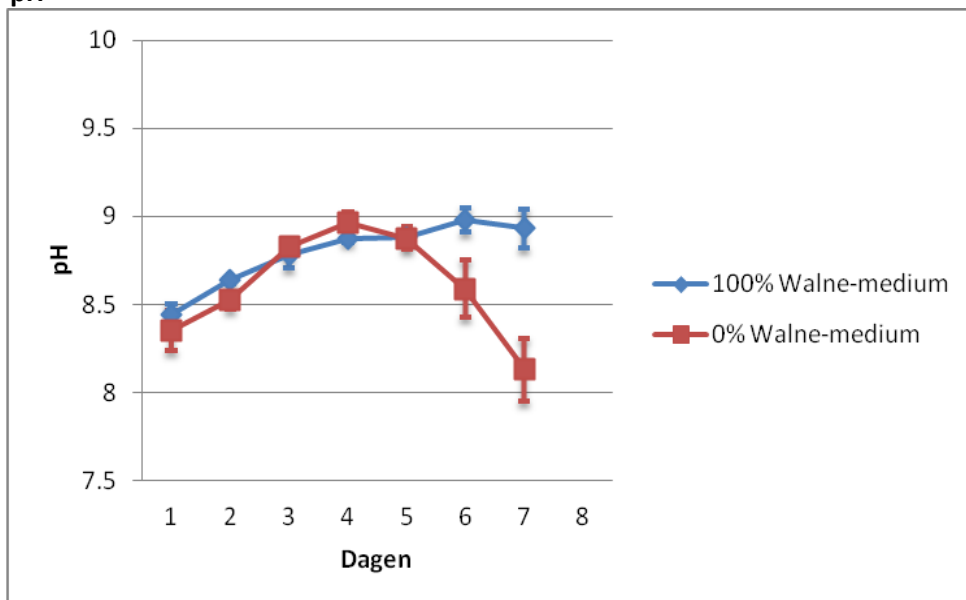


Fig. 59: Verloop pH gedurende experiment 2 bij 100%- en 0% Walne -medium

Als gevolg van CO<sub>2</sub> opname gedurende de eerste dagen stijgt de pH licht (fig. 59). Door het crashen van de cultures zonder toevoeging van het Walne-medium, wordt er geen CO<sub>2</sub> meer opgenomen waardoor de pH daalt.

## Zuurstofgehalte

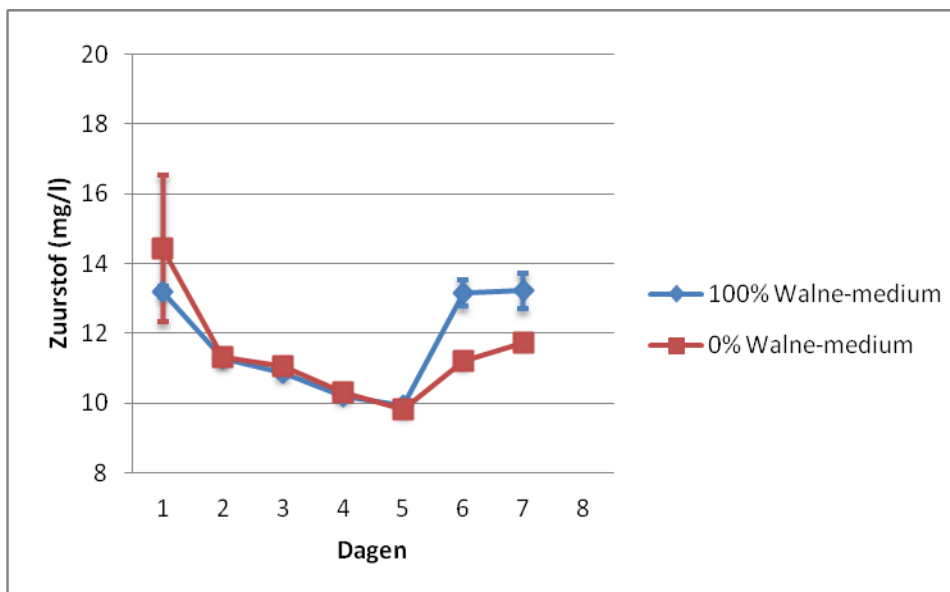


Fig. 60: Verloop zuurstofgehalte gedurende experiment 2 bij 100%- en 0% Walne -medium.

Het zuurstofgehalte neemt de eerste dagen geleidelijk af naar 10 mg/l(fig. 60). Als gevolg van de dalende temperatuur op dag 6, 7 en 8(fig. 56) stijgt het zuurstofgehalte gedurende deze dagen.

## Zuurstofverzadiging

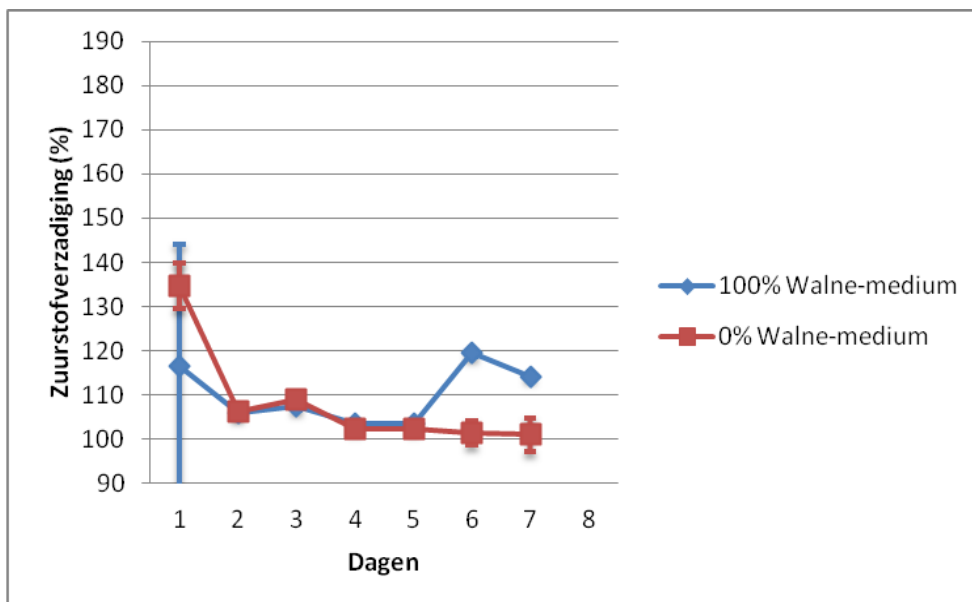


Fig. 61: Verloop zuurstofverzadiging experiment 2 bij 100%- en 0% Walne -medium.

De zuurstofverzadiging blijft gemiddeld genomen boven de 100% ongeacht de behandeling (fig. 61). Op dag 1 zijn de cultures met 100% toegevoegd Walne-medium niet op allemaal op het zelfde tijdstip gemeten en laat deze een grote standaarddeviatie zien.

## Algenconcentratie

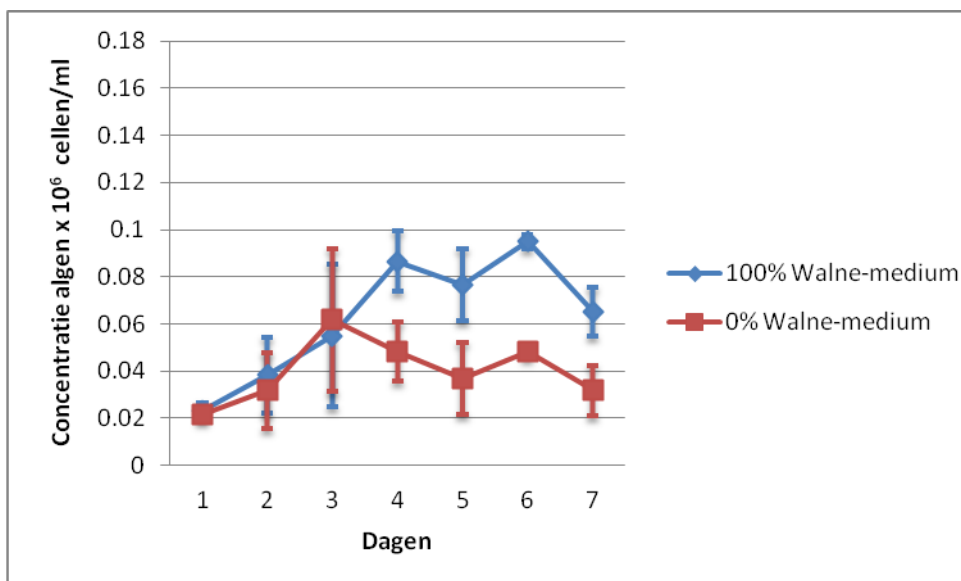


Fig. 62: Verloop concentratie algencellen onbekende diatomee experiment 2 bij 100%- en 0% Walne -medium.

De concentratie van de onbekende diatomee die gedurende experiment 2 en 4 te vinden was in de cultures komt gedurende experiment 2 niet boven een concentratie van  $0,1 \times 10^6$  cellen (fig. 62).

## Experiment 3: Licht gradiënt

### Temperatuur

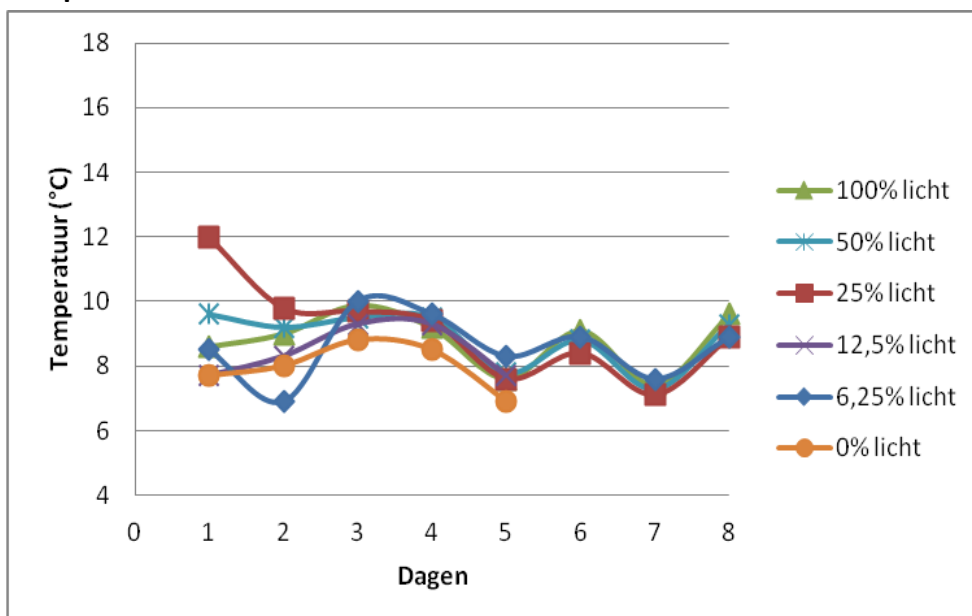


Fig. 63: Verloop temperatuur gedurende experiment 3 bij verschillende lichtbehandelingen.

De cultures gaan zich synchronoos gedragen waarbij de temperatuur gaat schommelen tussen de 6 en  $10\text{ }^{\circ}\text{C}$  (fig. 63).

## Temperatuur (logger)

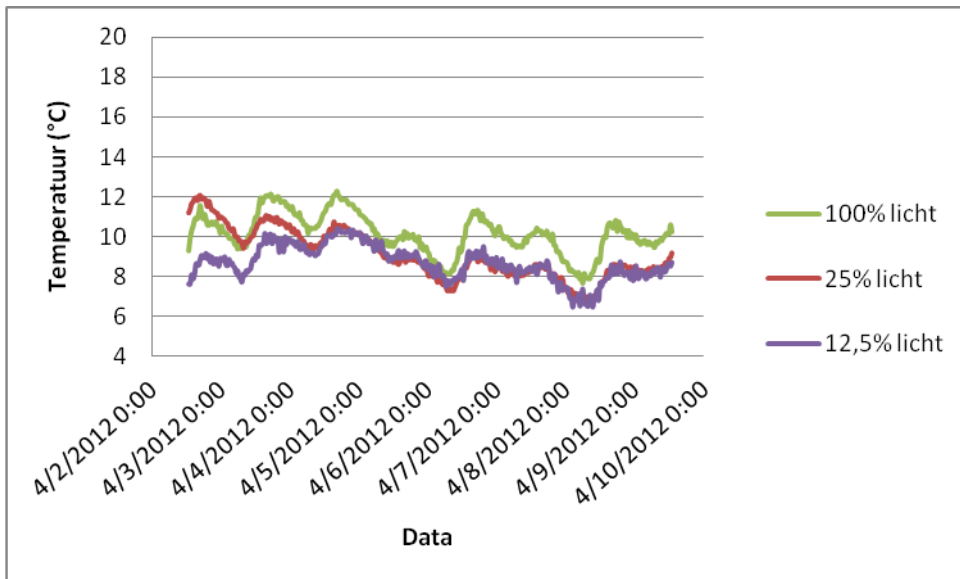


Fig.64: Verloop temperatuur gedurende experiment 3 bij verschillende lichtbehandelingen.

De temperatuur schommelt tussen de 6 en 12 °C (fig. 64). De cultuur met 100% licht laat gedurende het experiment een gemiddeld hogere temperatuur zien.

## Saliniteit

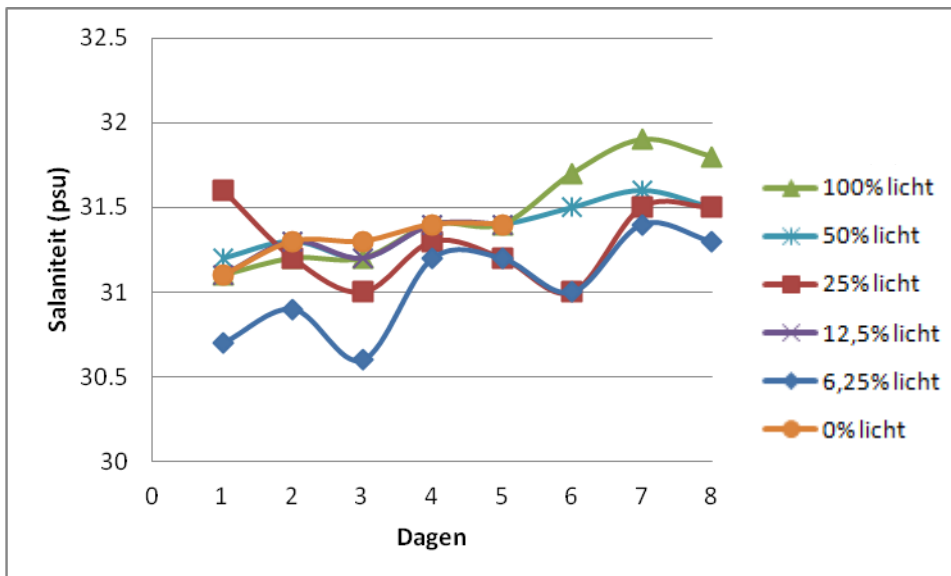


Fig. 65: Verloop saliniteit gedurende experiment 3 bij verschillende lichtbehandelingen.

De saliniteit neemt als gevolg van verdamping voor de meeste cultures toe met uitzondering van de cultuur met 25% licht (fig. 65). De saliniteit ligt op het begin tussen de 30,6- en 31,6 psu en eindigt rond de 31,5 psu.

## pH

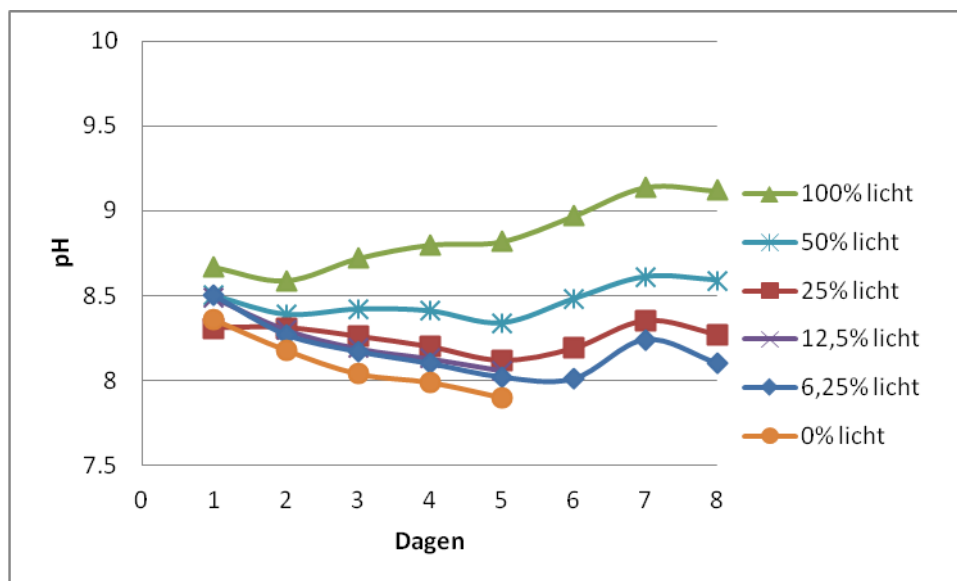


Fig. 66: Verloop pH gedurende experiment 3 bij verschillende lichtbehandelingen

De pH ligt op het begin van het experiment rond de 8,5 (fig. 66). De cultures met het meeste licht laten de hoogste pH stijging zien, bij deze cultures is de groei het hoogst (fig. 47) en wordt er meer CO<sub>2</sub> opgenomen waardoor de pH stijgt.

## Zuurstofgehalte

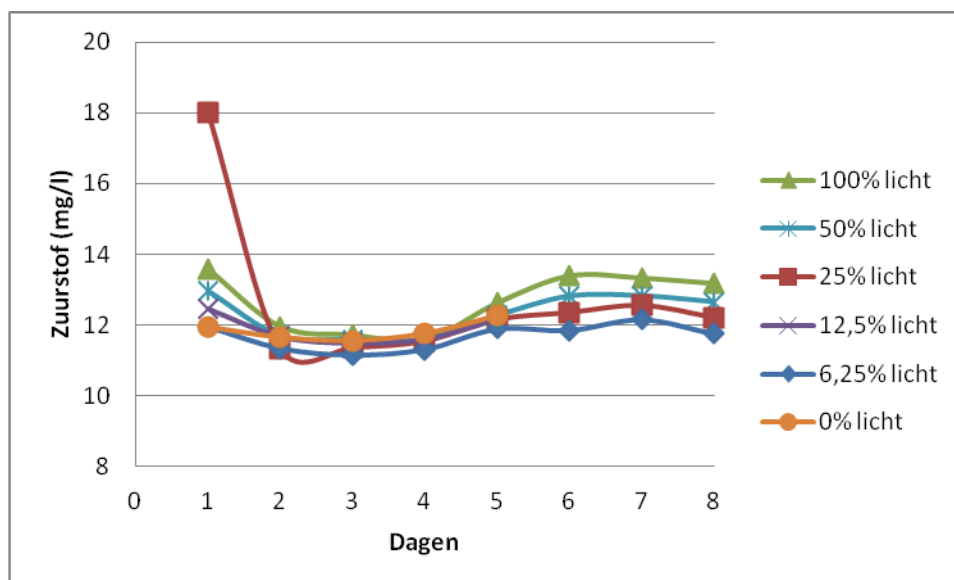


Fig. 67: Verloop zuurstofgehalte gedurende experiment 3 bij verschillende lichtbehandelingen

Het zuurstofgehalte schommelt rond de 12 mg/l gedurende het experiment (fig. 67). Te zien is dat het zuurstofgehalte voor de cultures met het meeste licht het hoogst is en dat dit geleidelijk afneemt bij daling van het licht percentage.

## Zuurstofverzadiging

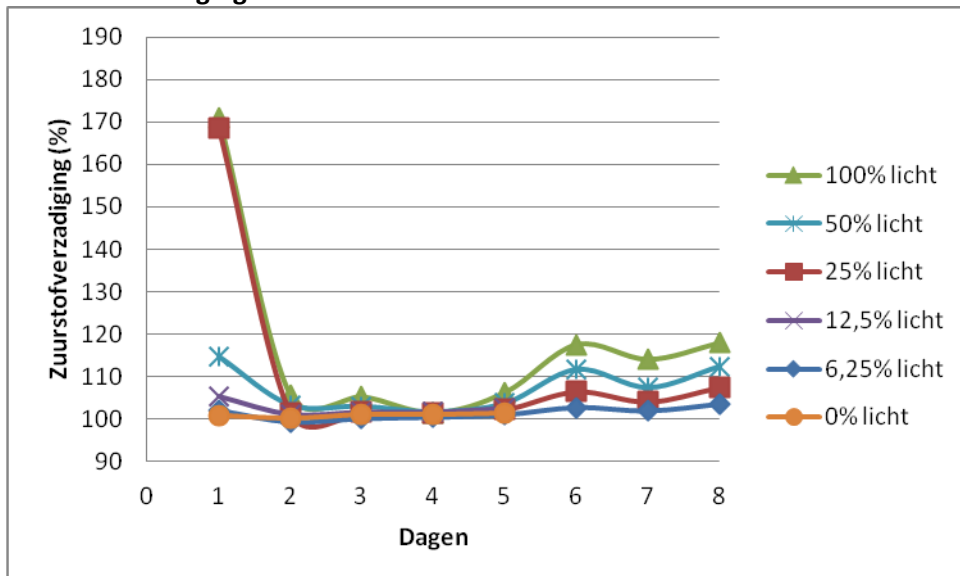


Fig. 68: Verloop zuurstofverzadiging gedurende experiment 3 bij verschillende lichtbehandelingen

De zuurstofverzadiging laat gedurende het experiment een lichte oververzadiging zien (fig. 68). Op dag 1 laten de cultures die later op de dag gemeten zijn (100- en 25%) een beduidend hogere verzadiging zien doordat het al langere tijd licht is en de algen meer zuurstof hebben kunnen produceren voordat deze gemeten zijn.

## Silicaat

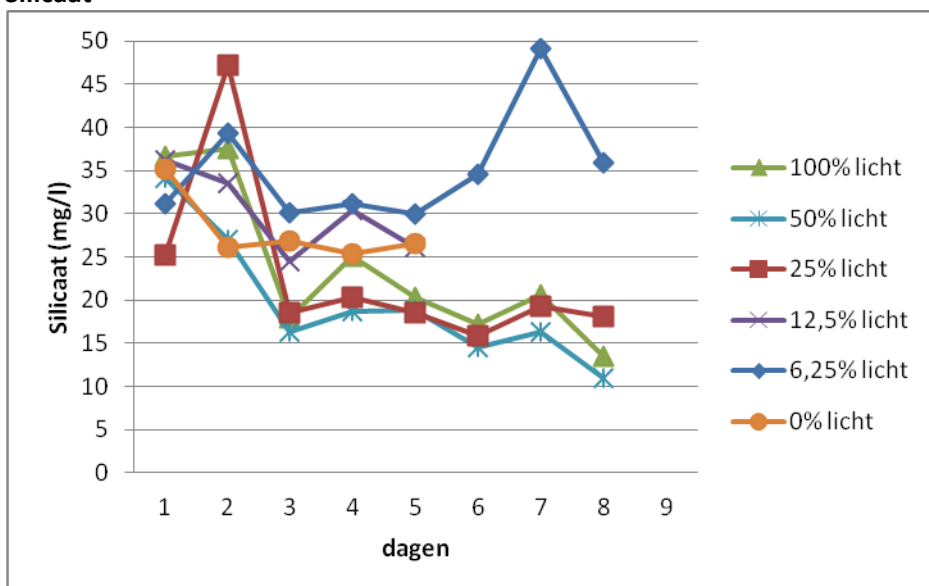


Fig. 69: Verloop concentratie silicaat gedurende experiment 3 bij verschillende lichtbehandelingen

De beginconcentratie aan silicaat bedraagt ongeveer 35 mg/l (fig, 69). Als gevolg van opname door de algen neemt de concentratie silicaat af met de laagst gemeten concentratie van 10,5 mg/l bij de culture met 50% licht.

## Fosfaat

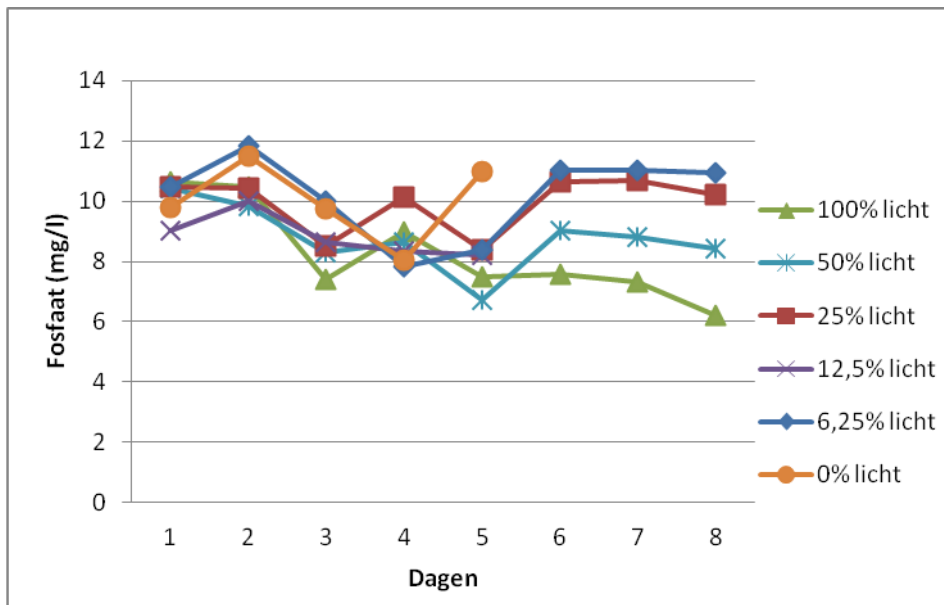


Fig. 70: Verloop concentratie fosfaat gedurende experiment 3 bij verschillende lichtbehandelingen

De beginconcentratie van fosfaat ligt rond de 10 mg/l (fig. 70) en neemt gedurende het experiment maximaal af tot een concentratie van 6 mg/l bij de cultuur met 100% licht.

## Nitraat

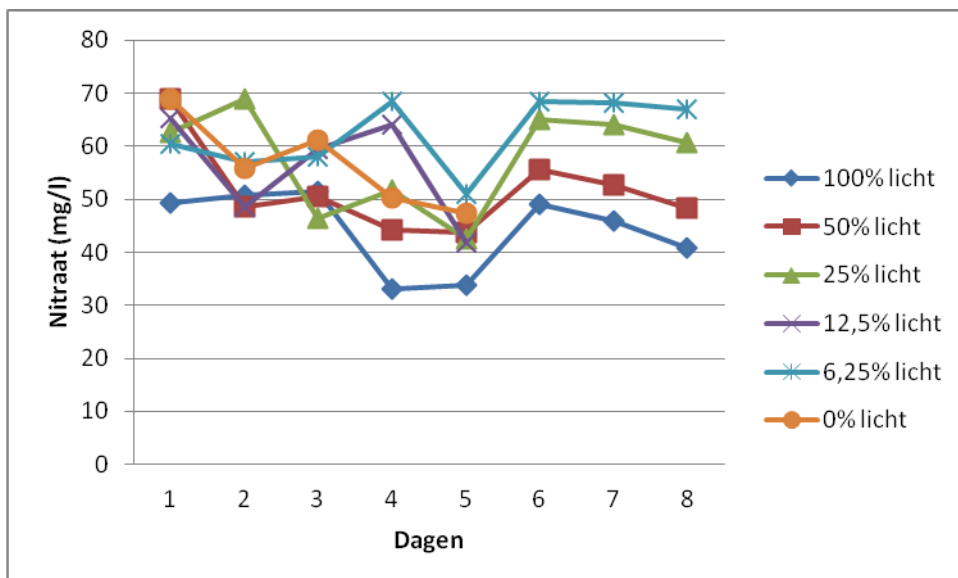


Fig. 71: Verloop concentratie nitraat gedurende experiment 3 bij verschillende lichtbehandelingen

De beginconcentratie nitraat ligt gemiddeld rond de 64 mg/l (fig. 71) met een uitschieter op 50 mg/l voor de cultuur met 100% van het beschikbare licht. De concentratie nitraat neemt gering af, de laagst gemeten concentratie is 32 mg/l.



## Nitriet

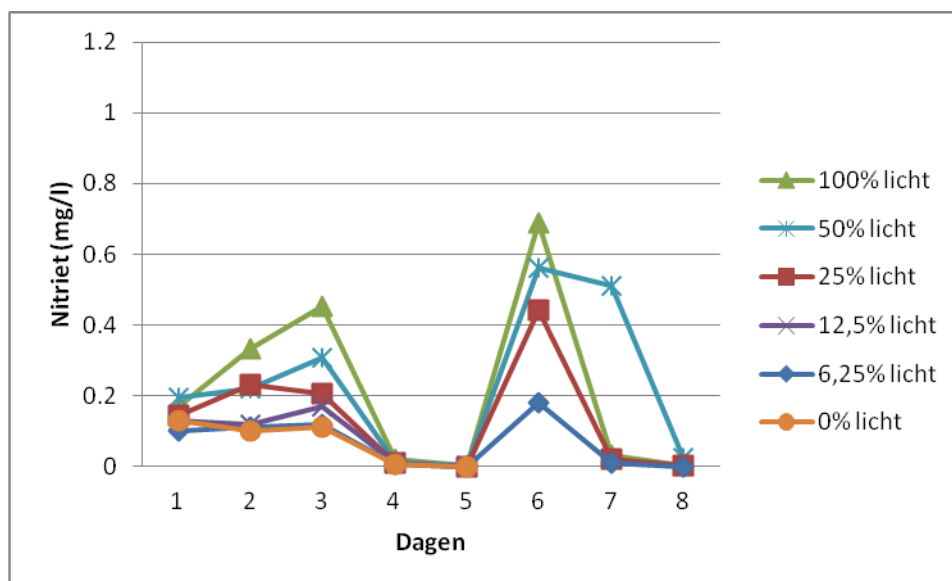


Fig. 72: Verloop concentratie nitriet gedurende experiment 3 bij verschillende licht behandelingen

De hoogst gemeten concentratie aan nitriet bedraagt 0,7 mg/l (fig. 72). Op dag vier en vijf wordt er vrijwel geen nitriet gemeten. Gedurende het experiment blijft de concentratie nitriet ruim onder de toxische limiet van 50 mg/l (Chen, 2012).

## Experiment 4: Licht proef

### Temperatuur

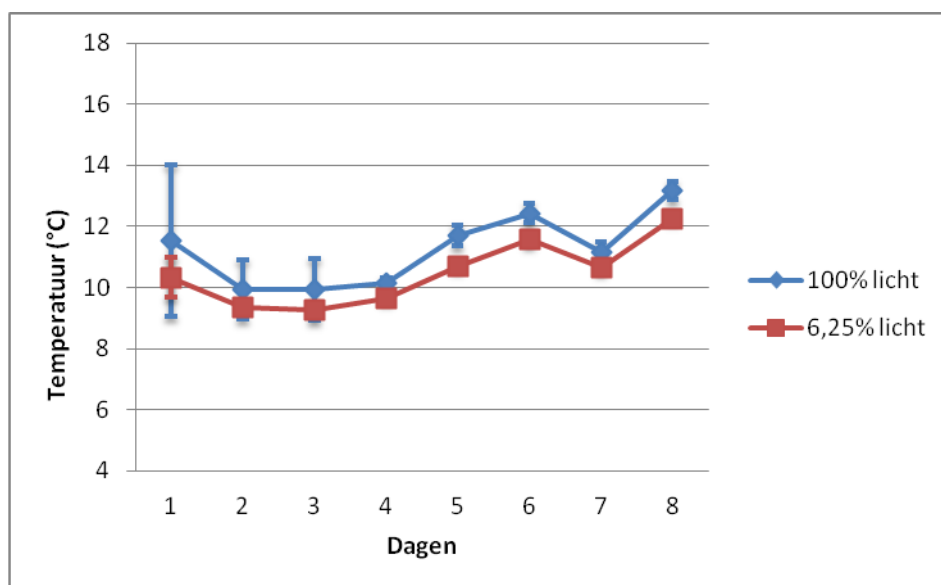


Fig. 73: verloop temperatuur gedurende experiment 4 bij 100- en 6,25% van het beschikbare daglicht

De gemiddelde temperatuur van de cultures met 100% van het beschikbare daglicht, ligt gedurende het experiment ongeveer 0,4 °C hoger. De temperatuur stijgt gedurende het experiment licht van ongeveer 10 naar 12 °C.

### Temperatuur (logger)

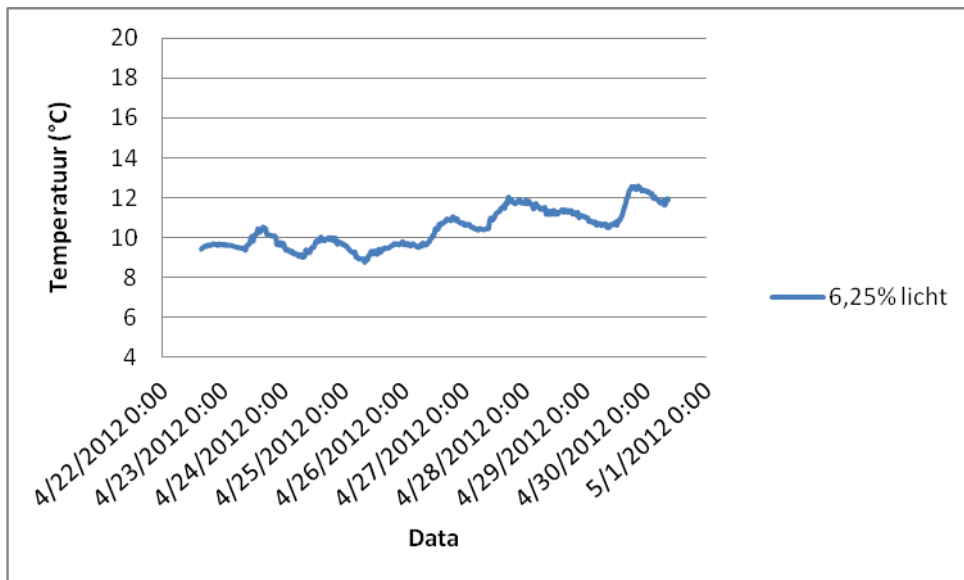


Fig. 74: verloop temperatuur gedurende experiment 4 bij 100- en 6,25% van het beschikbare daglicht

Er is een lichte temperatuur stijging tijdens het experiment te zien van ongeveer 10 naar 12 °C (fig. 74). Het weergegeven verloop komt overeen met figuur 73.

### Saliniteit

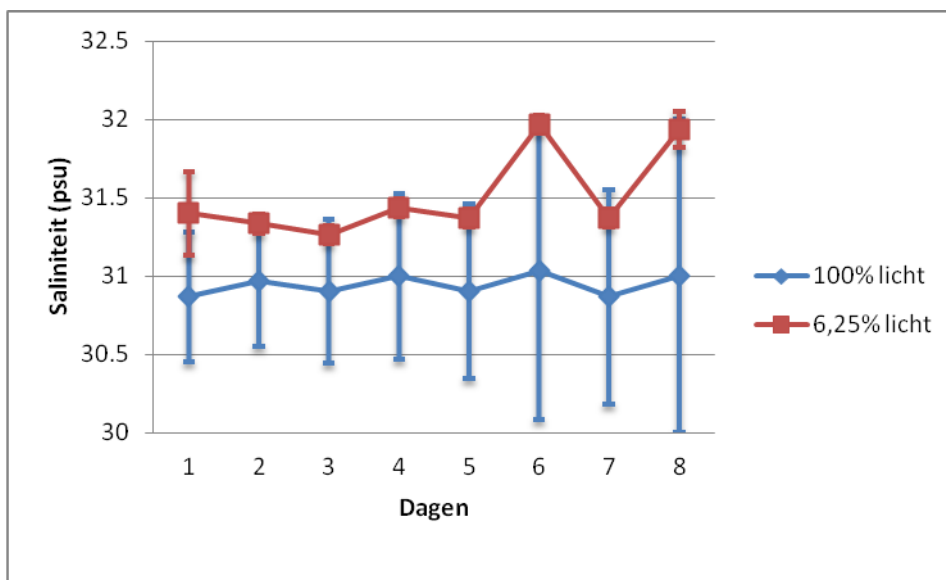


Fig. 75: verloop saliniteit gedurende experiment 4 bij 100- en 6,25% van het beschikbare daglicht

Bij de cultures met een 100% licht behandeling is een grote standaarddeviatie te zien (fig. 75), doordat een cultuur met 100% licht in verhouding een relatief lage saliniteit had. Bij de cultures met 100% van het beschikbare daglicht blijft de saliniteit gemiddeld rond de 31 psu, voor de cultures met 6,25% licht stijgt deze van 31,5- naar 32 psu.

## pH

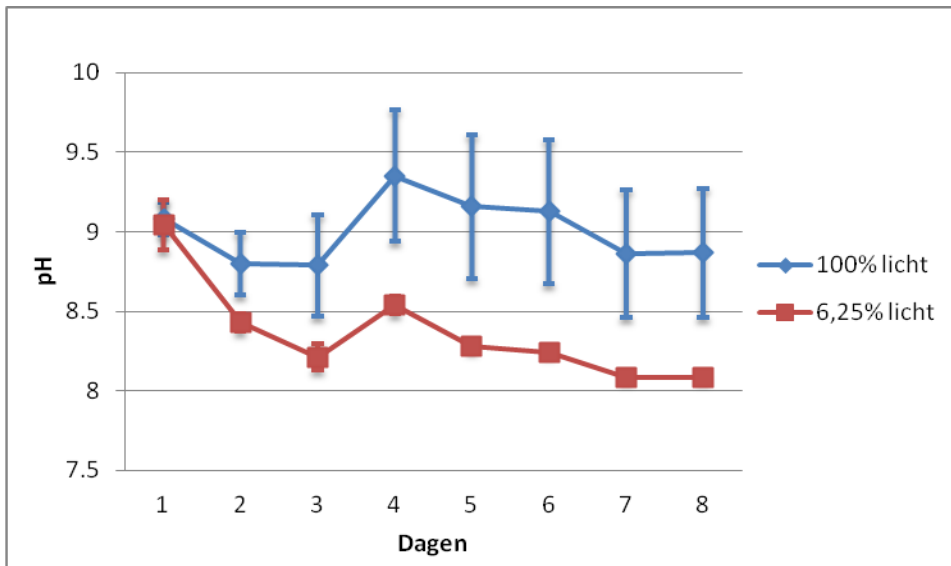


Fig. 76: verloop pH gedurende experiment 4 bij 100- en 6,25% van het beschikbare daglicht

Als gevolg van een hogere groei bij de cultures met 100% licht (fig.) wordt er meer CO<sub>2</sub> opgenomen, dat resulteert in een hogere pH (fig. 76). De pH bij de cultures met 6,25% daalt van 9 naar 8 terwijl de pH voor de cultures met 100% licht rond de 9 blijft.

## Zuurstofgehalte

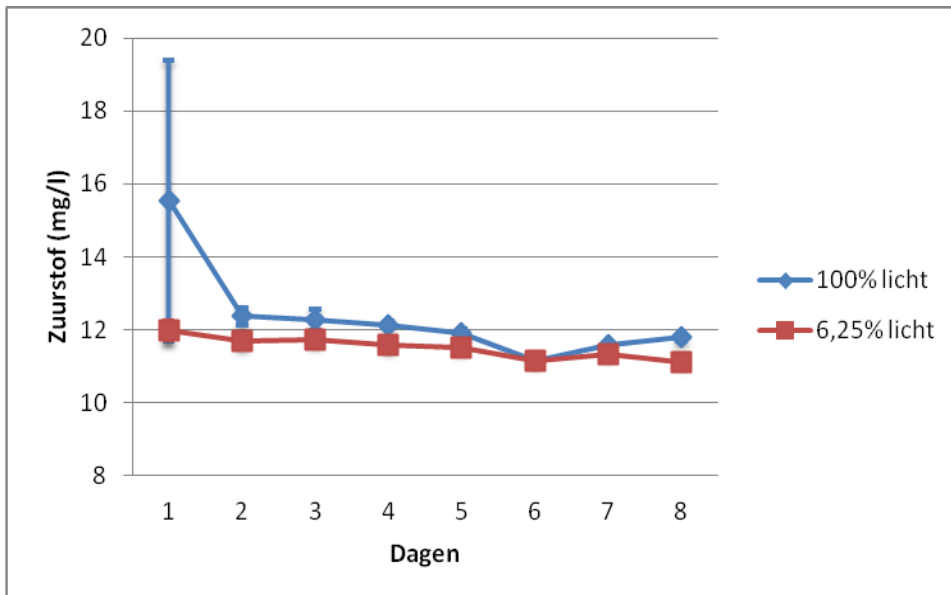


Fig. 77: verloop zuurstofgehalte gedurende experiment 4 bij 100- en 6,25% van het beschikbare daglicht

Het zuurstofgehalte ligt voor beide cultures op het begin rond de 12 waarna deze geleidelijk afneemt naar een concentratie van ongeveer 11,5 mg/l (fig. 77). Op de eerste dag ligt het zuurstofgehalte bij de cultures met 100% licht beduidend hoger. Dit komt doordat de cultures met 100% een cultuur bevat die later op de dag gemeten is.

## Zuurstofverzadiging

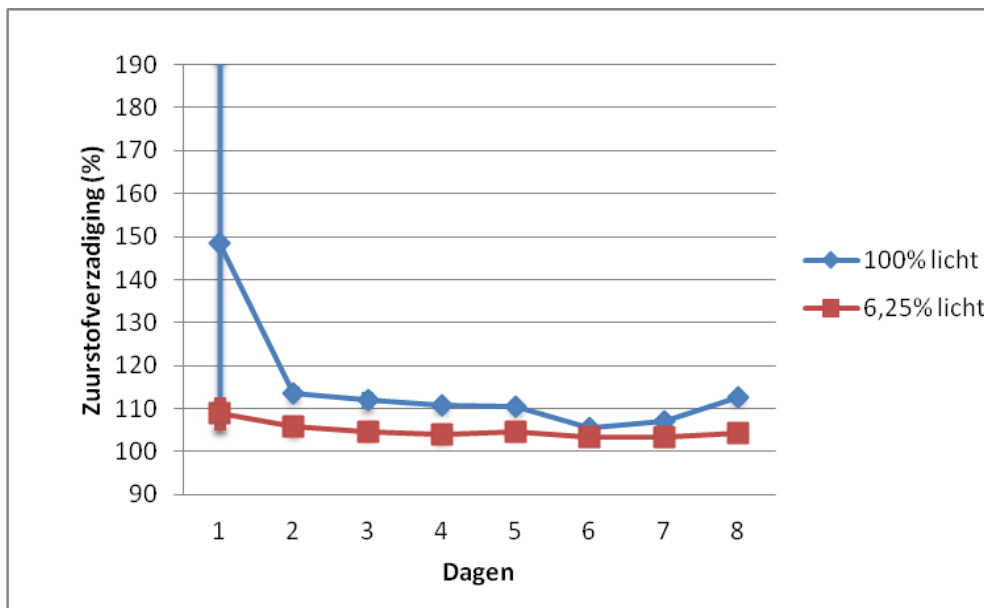


Fig. 78: verloop zuurstofverzadiging gedurende experiment 4 bij 100- en 6,25% van het beschikbare daglicht

Het verloop van de zuurstofverzadiging (fig. 78) komt overeen met het verloop van het zuurstofgehalte (fig. 77). Alle cultures hebben gedurende het experiment een oververzadiging aan zuurstof.

## Silicaat

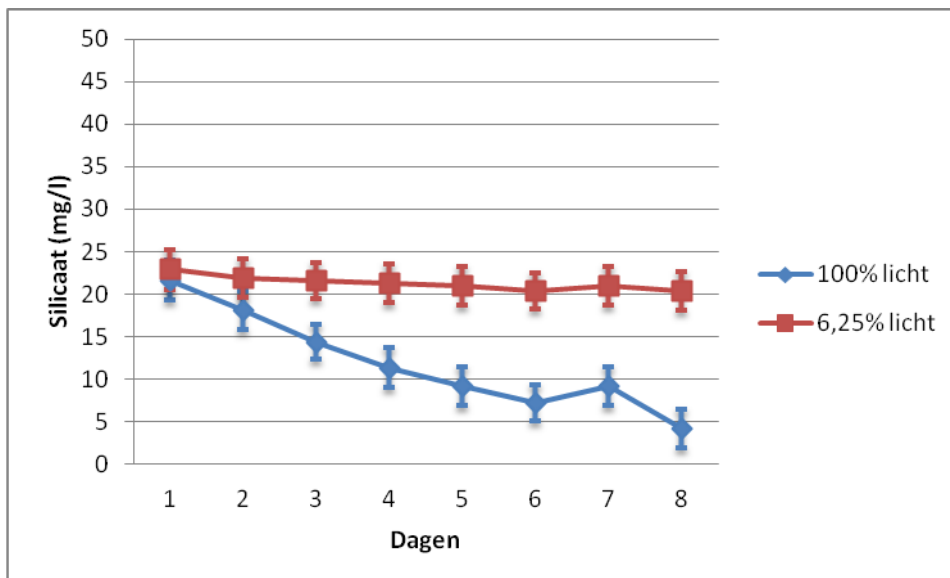


Fig. 79: verloop concentratie silicaat gedurende experiment 4 bij 100- en 6,25% van het beschikbare daglicht

De beginconcentratie aan silicaat ligt rond de 23 mg/l (fig. 79). Als gevolg van een hogere groei bij de cultures met 100% licht (fig. 41) wordt er meer silicaat opgenomen en neemt de concentratie af tot 4 mg/l.

## Fosfaat

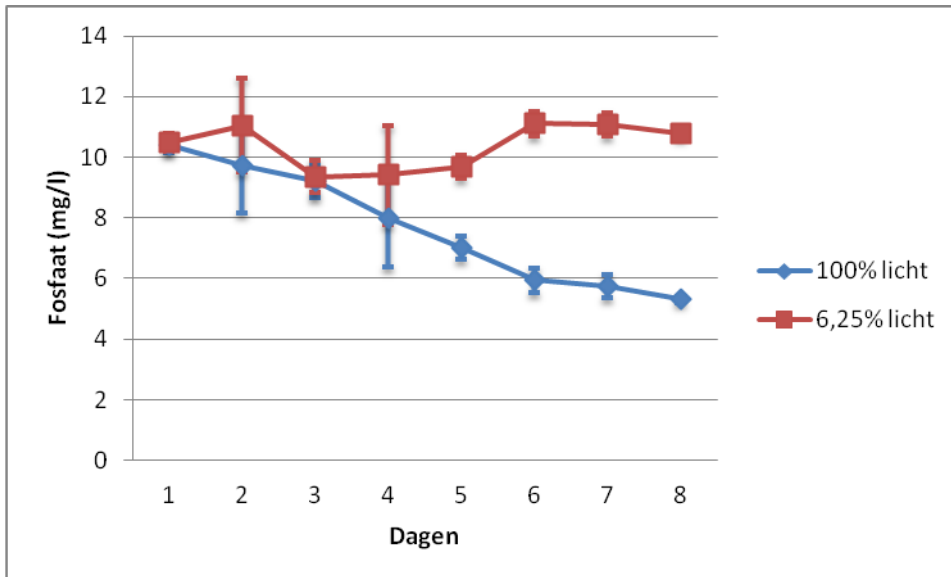


Fig. 80: verloop concentratie fosfaat gedurende experiment 4 bij 100- en 6,25% van het beschikbare daglicht

De beginconcentratie fosfaat bedraagt 10,5 mg/l (fig. 80). De grootste afname aan fosfaat vindt plaats bij de cultures met 100% licht met een minimum van 5,2 mg/l.

## Nitraat

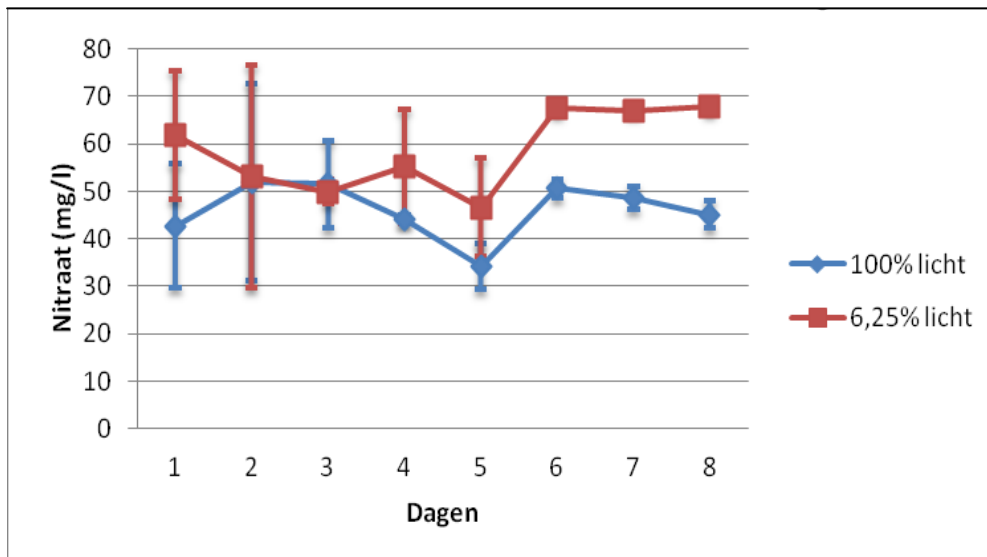


Fig. 81: verloop concentratie fosfaat gedurende experiment 4 bij 100- en 6,25% van het beschikbare daglicht

De beginconcentratie nitraat laat een grote standaarddeviatie zien met een gemiddelde van 42 mg/l voor de cultures met 100% licht en 62 mg/l voor de cultures met 6,25% licht (fig 81.). De concentratie nitraat blijft redelijk stabiel en komt niet onder de 30 mg/l.

## Nitriet

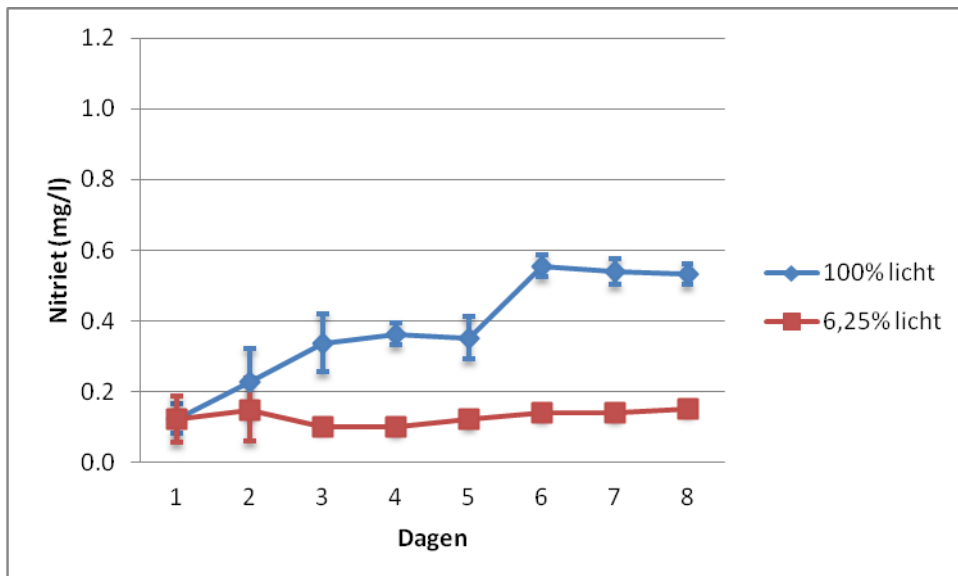


Fig. 82: verloop concentratie fosfaat gedurende experiment 4 bij 100- en 6,25% van het beschikbare daglicht

De beginconcentratie nitriet ligt rond de 0.1 mg/l (fig. 82) waarna deze voor de cultures met 100% licht stijgt naar e 0,55 mg/l. De concentratie nitriet bij de cultures met 6,25% blijft stabiel en komt niet boven de 0,2 mg/l. De gemeten waarden blijven ruim onder de toxische limiet van 50 mg/l (Chen, 2012).

## Algenconcentratie

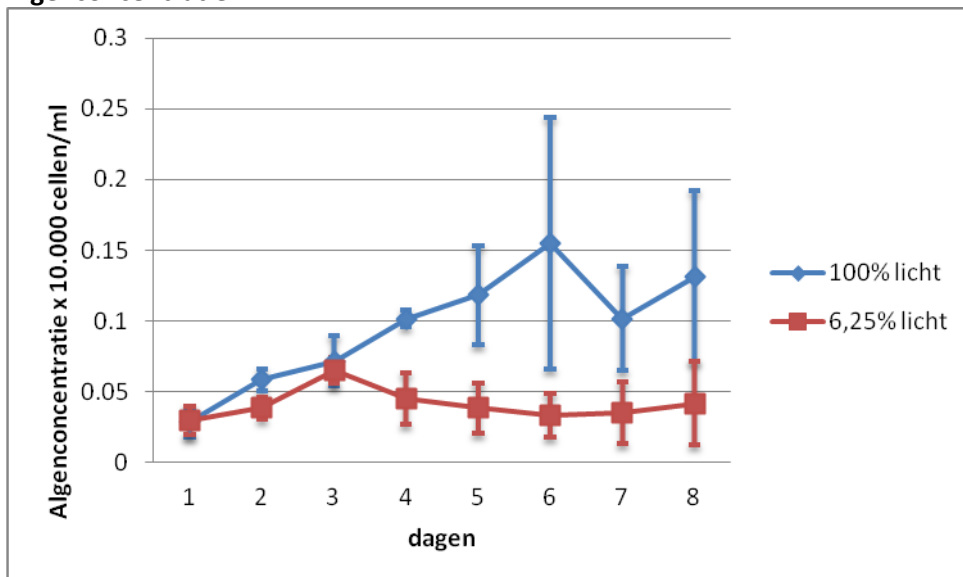


Fig 83: Verloop concentratie algencellen onbekende diatomee experiment 4 bij 100- en 0% van het beschikbare daglicht.

Het verloop van de onbekende aanwezige algensoort (fig. 83) vertoont hetzelfde verloop als *Skeletonema costatum* gedurende experiment 4 (fig. 41). De gemiddelde concentratie algen cellen komt niet boven de  $0.16 \times 10^6$  cellen/ml.

## Bijlage 5: Resultaten Statistische toetsing

### Statistische toetsing nutriënt proef (experiment 2)

Tabel 4: effect van behandeling op algenconcentratie

**Tests of Between-Subjects Effects**

Dependent Variable: algenconcentratie

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	.054 <sup>a</sup>	1	.054	2.635	.112
Intercept	1.988	1	1.988	96.333	.000
behandeling	.054	1	.054	2.635	.112
Error	.826	40	.021		
Total	2.868	42			
Corrected Total	.880	41			

a. R Squared = .062 (Adjusted R Squared = .038)

Te zien is dat het effect van de behandeling (cultures zonder Walne-medium en cultures met Walne-medium) geen significant verschil laat zien op de groei. De significantie bedraagt 0.112 en ligt dus boven de grens van significantie (< 0.050)

Tabel 5: effect van behandeling op de absorptieratio

**Tests of Between-Subjects Effects**

Dependent Variable: absorptieratio

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	.156 <sup>a</sup>	1	.156	4.245	.046
Intercept	67.991	1	67.991	1854.235	.000
behandeling	.156	1	.156	4.245	.046
Error	1.467	40	.037		
Total	69.614	42			
Corrected Total	1.622	41			

a. R Squared = .096 (Adjusted R Squared = .073)

Het effect van cultures met en zonder toevoeging van het Walne-medium uit zich in een significant verschil voor de absorptieratio (P = 0.046)

Tabel 6: effect van behandeling op de Fv/Fm

**Tests of Between-Subjects Effects**

Dependent Variable: FvFm

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	.001 <sup>a</sup>	1	.001	3.270	.081
Intercept	11.448	1	11.448	40753.436	.000
behandeling	.001	1	.001	3.270	.081
Error	.008	28	.000		
Total	11.457	30			
Corrected Total	.009	29			

a. R Squared = .105 (Adjusted R Squared = .073)

Het verschil in toevoeging van Walne-medium heeft geen significant effect op de Fv/Fm ratio (P = 0.081).

Tabel 7: effect van behandeling op de Fm

**Tests of Between-Subjects Effects**

Dependent Variable: Fm

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	16661.633 <sup>a</sup>	1	16661.633	.039	.845
Intercept	1.013E8	1	1.013E8	236.243	.000
Behandeling	16661.633	1	16661.633	.039	.845
Error	12009698.533	28	428917.805		
Total	1.134E8	30			
Corrected Total	12026360.167	29			

a. R Squared = .001 (Adjusted R Squared = -.034)

Het verschil in toevoeging van Walne-medium heeft geen significant effect op de Fm (P= 0.845).



## Statistische toetsing nutriënt proef (experiment 4)

Tabel 8: effect van behandeling op de algenconcentratie

### Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable: sqrt algenconcentratie

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	1.112 <sup>a</sup>	1	1.112	42.207	.000
Intercept	14.647	1	14.647	556.049	.000
behandeling	1.112	1	1.112	42.207	.000
Error	1.212	46	.026		
Total	16.970	48			
Corrected Total	2.323	47			

a. R Squared = .478 (Adjusted R Squared = .467)

Het effect van de verschillende behandelingen (100- en 6,25% licht) laat een significant verschil zien op de groei

Tabel 9: effect van behandeling op de absorptieratio

### Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable: log absorptieratio

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	.001 <sup>a</sup>	1	.001	3.592	.064
Intercept	.120	1	.120	577.622	.000
behandeling	.001	1	.001	3.592	.064
Error	.010	46	.000		
Total	.131	48			
Corrected Total	.010	47			

De behandelingen van 100- en 6,25% laten geen significant verschil zien op de absorptieratio (P= 0.064)

Tabel 10: effect van behandeling op de Fv/Fm

**Tests of Between-Subjects Effects**

Dependent Variable: FvFm

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	.001 <sup>a</sup>	1	.001	2.490	0.126
Intercept	11.400	1	11.400	35040.623	0.000
behandeling	.001	1	.001	2.490	0.126
Error	.009	27	.000		
Total	11.417	29			
Corrected Total	.010	28			

a. R Squared = .084 (Adjusted R Squared = .051)

Het verschil in lichtbehandeling heeft geen significant verschil op de Fv/Fm ratio (P=0.126)

Tabel 11: effect van behandeling op de Fm

**Tests of Between-Subjects Effects**

Dependent Variable:sqrt Fm licht

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	1704.911 <sup>a</sup>	1	1704.911	40.287	.000
Intercept	45373.712	1	45373.712	1072.168	.000
behandeling	1704.911	1	1704.911	40.287	.000
Error	1142.628	27	42.320		
Total	47670.000	29			
Corrected Total	2847.540	28			

a. R Squared = .599 (Adjusted R Squared = .584)

Het verschil in lichtbehandeling laat een duidelijk significant verschil zien op de Fm (P= 0.000)