

# Groei en gedrag van schelpdieren in vijverteelt , samenvattend eindrapport Zeeuwse Tong werkpakket 2

A.C. Smaal, H. Jansen, P. Kamermans & T. Schellekens

Rapport C018/14



**IMARES** Wageningen UR

(IMARES - Institute for Marine Resources & Ecosystem Studies)

Opdrachtgever:

Stichting Zeeuwse Tong

p/a ZLTO - Goes

Publicatiedatum:

6 februari 2014

**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).

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

# Inhoudsopgave

<b>SAMENVATTING</b> .....	<b>5</b>
<b>1. Inleiding</b> .....	<b>7</b>
<b>2. Methoden</b> .....	<b>9</b>
<b>3. VOEDING: Factoren van invloed op algenproductie</b> .....	<b>11</b>
3.1    Systeem vereisten .....	11
3.1.1    Keuze algensoorten .....	11
3.1.2    Design kweekstelsel .....	11
3.2    Abiotische factoren .....	12
3.2.1    Temperatuur .....	12
3.2.2    Nutriënten .....	12
3.2.3    Waterbeweging .....	14
3.2.4    Waterversing .....	14
3.3    Biotische factoren .....	15
3.3.1    Voedselkwaliteit en - samenstelling .....	15
3.3.2    Predatie .....	17
3.3.3    Concurrentie .....	17
3.3.4    Ziektes .....	18
<b>4. GROEI: Factoren van invloed op schelpdiergroei</b> .....	<b>19</b>
4.1    Systeem vereisten .....	19
4.1.1    Algenconcentratie .....	19
4.1.2    Hergebruik van water en nutriënten .....	19
4.1.3    Keuze schelpdiersoort .....	19
4.1.4    Temperatuur .....	19
4.1.5    Watertoevoer en menging .....	20
4.2    Abiotische factoren .....	21
4.2.1    pH & Alkaliniteit .....	21
4.2.2    Saliniteit .....	22
4.3    Biotische factoren .....	22
4.3.1    Voedselaanbod .....	22
4.3.2    Food conversion ratio FCR .....	22
4.3.2    Effect van reproductie op schelpdiergroei .....	23
<b>5. GROEI EN PRODUCTIE</b> .....	<b>24</b>
5.1    Karakteristieken van de pilots .....	24
5.2    Schelpdier groei .....	24
5.2.1    Groei op basis van empirische gegevens .....	24
5.2.2    Groei gesimuleerd met het DEB model .....	27
5.2.3    Mogelijke oorzaken voor achterblijvende groei .....	30
5.3    Groei scenarios .....	33
5.4    Schelpdierproductie .....	34
<b>6. Conclusies</b> .....	<b>36</b>

Kennislacunes.....	37
<b>7. Referenties.....</b>	<b>39</b>
<b>8. Overzicht studentenrapporten .....</b>	<b>41</b>
<b>Verantwoording .....</b>	<b>42</b>
<b>BIJLAGE I - PROTOCOL OUTDOOR ALGENKWEEK ALS VOEDSEL VOOR SCHELPDIEREN .....</b>	<b>43</b>
<b>BIJLAGE II – VOORTGANGSRAPPORT 2012 (voortbouwend op 2010 en 2011).....</b>	<b>59</b>
<b>Werkpakket 2. Schelpdieren: groei en gedrag van schelpdieren in vijverteelt; resultaten 2012.....</b>	<b>59</b>
2.1 Voeding van schelpdieren in vijverteelt.....	59
2.2 Groei en gedrag van schelpdieren in vijverteelt .....	59
2.2.1. Doel & Aanpak .....	59
2.2.3 Resultaten .....	60
Resultaten Pilot Zeeland Aquacultuur .....	60
(1) Monitoring schelpdiergroei en algenconcentraties .....	60
(2) Eco-fysiologie irt optimalisatie schelpdiergroei .....	64
(3) Spatiële en temporele variatie in algenconcentraties.....	66
Resultaten Pilot Colijnsplaat.....	68
(1) Relatie voergift Chla en nutriënten concentraties .....	68
(2) Monitoring Nutriënten en algen concentraties in 2012.....	69
(3) Dagelijkse variatie in algen en nutriënten concentraties .....	71
Resultaten Pilot Wilhelminapolder .....	73
2.2.4 Conclusies & Aanbevelingen .....	74
<b>BIJLAGE III OVERZICHT VAN GEGEVENS IN DE DATABASE .....</b>	<b>76</b>

## SAMENVATTING

De binnendijkse kweek van schelpdieren en micro-algen is in het kader van het project Zeeuwse Tong onderzocht en uitgetest op verschillende schaalniveaus. In de pilots is op praktijkschaal getest wat er nodig is voor een commercieel haalbare productie. In één van de pilots (Colijnsplaat) zijn de algen en schelpdieren gekweekt in samenhang met zager en tong kweek, in de andere pilots (Zeeland Aquacultuur en Wilhelminapolder) was de kweek gericht op algen en schelpdieren. In het laboratorium en in nagebootste ecosystemen (mesocosms) is een reeks deelvragen onderzocht, onder meer wat betreft de behoeftes voor algenkweek en de kwaliteit van algen voor schelpdieren. In de pilots zijn specifieke proces metingen uitgevoerd. De resultaten van de procesmetingen en de lab en mesocosm experimenten worden in onderhavig rapport samengevat. De ervaringen bij de pilots worden in desbetreffende verslagen gerapporteerd, waar ook wordt ingegaan op de economische haalbaarheid. De pilots verschillen onder meer wat betreft de algenkweek: bij Zeeland Aquacultuur gaat het om gecontroleerde kweek van geselecteerde algen, bij de andere pilots is er spontane groei van algen, al dan niet bevorderd via bemesting. In de extensieve systemen kunnen er problemen ontstaan met de ontwikkeling van ongewenste soorten, of blijft de algenproductie achter bij tekort aan mineralen, bij de intensieve systemen komt er meer arbeid aan te pas. De pilots verschillen verder wat betreft de gekozen schelpdier soorten: bij Colijnsplaat en Zeeland Aquacultuur is de aandacht vooral gericht op Tapijtschelpen, bij Wilhelminapolder/Neeltje Jans gaat het om mosselen.

Een belangrijke vraag bij de kweek van schelpdieren betreft de voedingswaarde van algen voor schelpdieren en hoe hoogwaardige algen kunnen worden geproduceerd. Onderzocht is welke factoren de voedingswaarde voor schelpdieren bepalen. De hypothese was dat met name de omega 3 en 6 vetzuren de kwaliteit bepalen; het gaat dan om EPA, DHA en ARA. Uit het promotieonderzoek van I. Batista komt naar voren dat met name EPA essentieel is voor schelpdiergroei, gemeten aan kokkels, en dat DHA wat minder van belang is, terwijl ARA niet essentieel is. Diatomeeën zoals *Skeletonema costatum*, *Chaetoceros muelleri* en *Phaeodactylum tricornutum* en ook de flagellaat *Tetraselmis suecica* bevatten relatief veel EPA. Uit aanvullende experimenten is gebleken dat de soorten *Skeletonema* en *Tetraselmis* goed voldoen als schelpdiervoedsel. De algenkweek in open raceway systemen heeft zowel in batch als in doorstroom een gemiddelde levensduur van enkele weken, alvorens de kweek instort. Uit de ervaringen bij de pilots blijkt eveneens dat het goed mogelijk is algen te kweken in open systemen maar dat levensduur beperkt is. Dit betekent dat het in stand houden van algencultures in de bestaande systemen nog (te) veel tijd kost.

De groei van tapijtschelpen en mosselen is gemeten onder de omstandigheden zoals die zich in de pilots hebben voorgedaan, dat wil zeggen met het gegeven voedselaanbod van de pilots. Gebleken is dat de groei van tapijtschelpen en mosselen in gestandaardiseerde monitorsystemen niet sterk verschilde tussen de pilots. De metingen in de monitoring systemen lieten voor tapijtschelpen daarentegen een hogere groeisnelheid zien dan in de bodem van de vijvers. Dit geeft aan dat er potentieel een hogere groeisnelheid mogelijk is, mits de voedseltoevoer maximaal is, in relatie tot de dichtheid en de onderlinge competitie. Met behulp van een groei-model is berekend dat de groei bij de bodem wordt geremd door tekort aan voedsel. Door een combinatie van betere menging en lagere dichtheid zou er een hogere groeisnelheid mogelijk zijn, waardoor een marktwaardig formaat eerder wordt bereikt. Uit de modelberekeningen bleek tevens dat temperatuurverhoging in de wintertijd en het voorkomen van lage voedselconcentraties in de zomer kan leiden tot een hogere schelpdiergroei. Dit biedt mogelijkheden voor optimalisatie van de kweek waardoor de productiecycclus verkort kan worden.

De opbrengst aan schelpdieren – met name tapijtschelpen - wordt in de eerste plaats bepaald door de groei, aangezien er weinig sterfte is opgetreden in de vijversystemen, behoudens incidentele sterfte in enkele vijvers. De gemeten groei bij de pilots is gerelateerd aan de voedseltoevoer, en de opbrengst verhoudt zich tot voedsel met een food conversion ratio (FCR) = 0.2 bepaald voor totaal vers gewicht; dit is een FCR van ca 1 voor het vleesgewicht. De totale productie bedroeg in de afgelopen 3 jaar 5 – 8 kg/m<sup>2</sup> op basis van een uitzaaidichtheid van 1000/m<sup>2</sup> en na een kweekperiode van > 1 jaar per cohort. De groei in de waterkolom heeft laten zien dat bij betere voedseltoevoer een opbrengst van 10 kg/m<sup>2</sup> haalbaar is binnen een jaar.

De ontwikkeling van een succesvolle binnendijkse schelpdierproductie vergt dat praktische problemen worden opgelost en er meer detail informatie is over algen- en schelpdierproductie. Zo zal de levensduur van intensieve algen productiesystemen verlengd dienen te worden waarvoor meer inzicht in het optreden en voorkomen van infecties nodig is. Ook over de samenstelling en kwaliteit van de algen in relatie tot het kweekstelsel en leeftijd van de cultures is nog niet veel bekend. De effectiviteit van bemestingsprotocollen op basis van kunstmatige media en nutriënten teruglevering door schelpdieren kan verder geoptimaliseerd worden. De bloei van andere soorten, zoals bijvoorbeeld draadwier, roept de vraag op hoe deze ongewenste bloeien te bestrijden zijn.

Om een betere benutting van algen door schelpdieren te realiseren is nader onderzoek nodig naar het voorkómen van voedseluitputting dicht bij de bodem, en wat de optimale dichtheid is bij een bepaalde menging. Daarnaast bieden de kweek van andere hoogwaardige soorten, verbeterd uitgangsmateriaal (dmv selectie) en aangepaste kweekmethoden (bijv. gecombineerde binnendijkse en buitendijkse kweek) mogelijkheden voor een beter rendement, maar dat zal verder onderzocht moeten worden.

Samengevat is de conclusie uit het huidige onderzoek dat binnendijkse schelpdierkweek in de praktijk uitvoerbaar is. De commerciële haalbaarheid is afhankelijk van de efficiëntie van de algencultuur, en de beschikbaarheid van de algen voor de schelpdieren. Betere beschikbaarheid van de algen voor schelpdieren kan mogelijk gerealiseerd worden door een goede menging in de kweeksystemen ter voorkoming van voedsel uitputting bij de bodem, en door de voedseltoevoer beter af te stemmen op de behoefte van de schelpdieren.

# 1. Inleiding

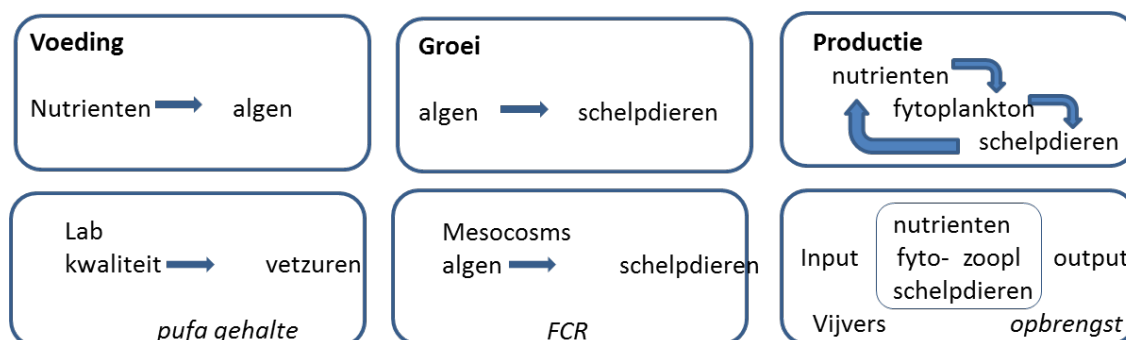
Voor een economisch renderende groei van het uitgangsmateriaal van schelpdieren tot marktgrootte is de garantie van een stabiele productie van algen van hoge kwaliteit op grote schaal tegen een lage kostprijs noodzakelijk. Onderzocht is in hoeverre vijverteelt geschikt is voor binnendijkse algen en schelpdierproductie. Voor het onderzoek is gebruik gemaakt van de Zeeuwse Tong pilots Colijnsplaat (CP), Zeeland Aquacultuur (ZA) en Wilhelminapolder/Neeltje Jans (WP), en van de faciliteiten bij IMARES. In de pilots is via leren door doen ervaring opgedaan met binnendijkse kweek. Parallel daar aan is gericht onderzoek uitgevoerd naar de factoren die voor een effectieve binnendijkse kweek van belang zijn. Onderhavig rapport betreft werkpakket 2, dat gaat over het onderzoek naar de kweek van schelpdieren en de daarvoor benodigde algen. In werkpakket 1 is onderzoek gedaan naar de factoren van belang voor de kweek van Tong, en in werkpakketten 3 – 6 is gekeken naar de binnendijkse teelt van zilte gewassen, de kweek van algen in een fotobioreactor en naar de geïntegreerde kweek van zagers, tong, algen en schelpdieren op praktijkschaal.

In werkpakket is de aandacht gericht op de condities voor maximale algenproductie van goede kwaliteit. Verder is de respons van de schelpdieren onderzocht in termen van groei en overleving als functie van dieet; dit is de basis voor de berekening van het maximaliseren van de productie als functie van de kweekcondities. Dit is uitgevoerd in 2 fasen (fase 1: 2007-2009) en fase 2 (2010 – 2013) waarover hier wordt gerapporteerd. In fase 1 is de aandacht vooral gericht op voeding en groei, in fase 2 is dit uitgebreid naar productie, onder meer met gebruik van de ervaringen in de pilots die in fase 2 operationeel waren.

Het project is opgezet langs de volgende lijnen:

- = voeding: wat bepaalt de voedingswaarde van algen voor schelpdieren en hoe kunnen hoogwaardige algen worden geproduceerd,
- = groei schelpdieren: wat is de respons van schelpdieren op diverse diëten, en
- = productie : wat bepaalt de opbrengst van algen- en schelpdierkweek onder praktijkomstandigheden in de pilots.

In schema: cursief zijn de belangrijkste indicatoren aangegeven.



(pufa=poly-unsaturated fatty acids; FCR=food conversion ratio)

## Samenvatting eerste fase

In de eerste fase van het Zeeuwse Tong project (2007-2008) zijn 6 inheemse algensoorten geselecteerd op basis van hun grootte, vetzuurgehalte en tolerantie voor zoutgehalte en temperatuur (3 flagellaten *Dunaliella tertiolecta*, *Tetraselmis suecica*, *Pyramimonas parkae* en 3 diatomeeën *Phaeodactylum tricornutum*, *Thalassiosira pseudonana* en *Skeletonema costatum*). De geschiktheid van de algensoorten als voer voor kokkels is getest met behulp van dieet testen. De beste groei werd gevonden bij een dieet van *Thalassiosira* en *Pyramimonas*. De kweekmogelijkheden van de soorten onder vijvercondities is onderzocht in 1800 liter race-ways. Alleen de cultuur van *Phaeodactylum* heeft geleid tot een betrouwbare kweek. Stabiele continue cultures zijn in de periode september/november behaald, toen was

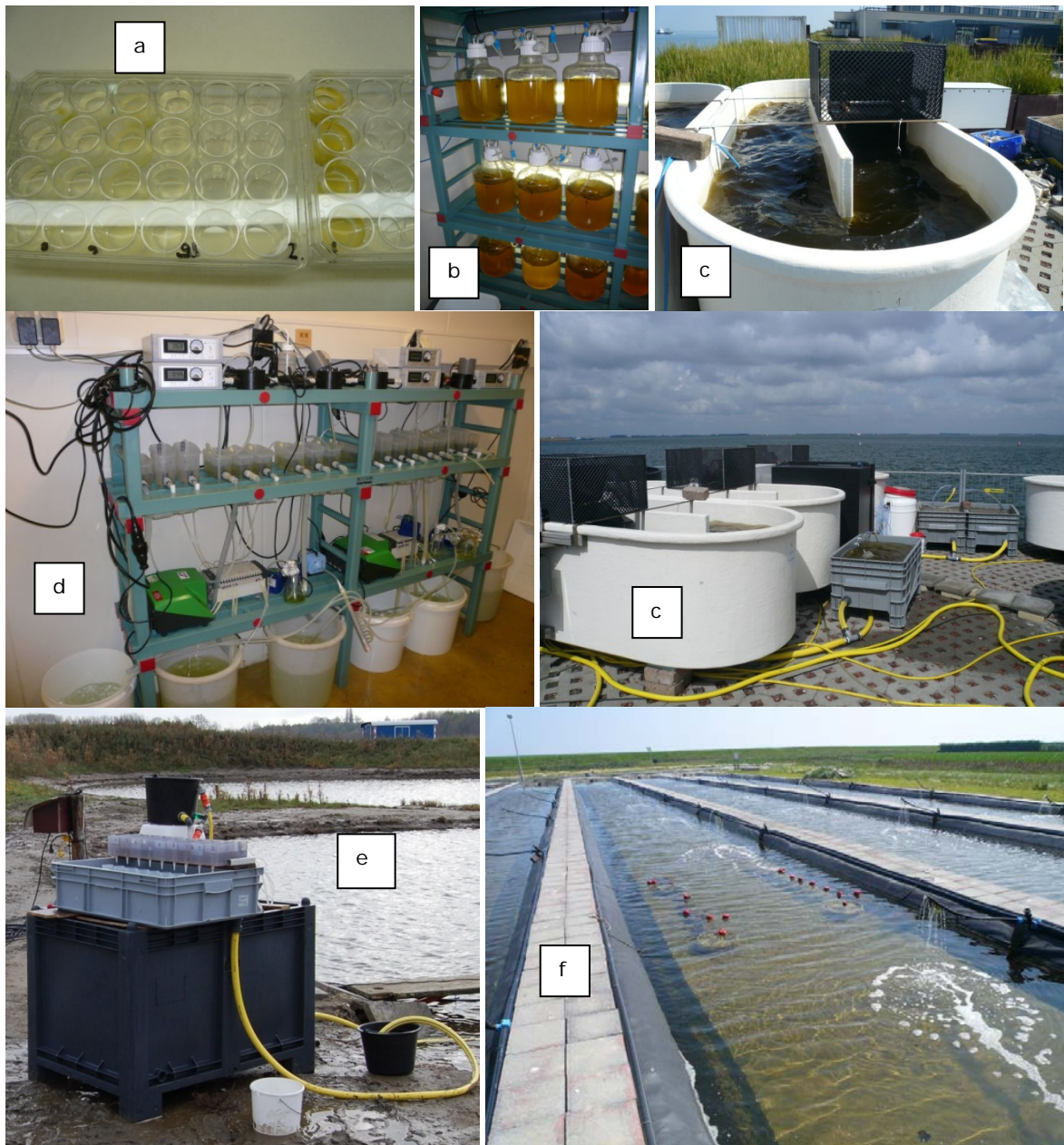
de productie het hoogst bij 40% verversing met 9 g drooggewicht per m<sup>2</sup> per dag. Met behulp van een model zijn deze productie gegevens doorvertaald naar andere seizoenen: in de winter 5 gram drooggewicht per m<sup>2</sup> per dag, voorjaar 20 gram en zomer 30 gram drooggewicht per m<sup>2</sup> per dag. Een kokkelgroeioproef met als voer *Phaeodactylum* liet de eerste 8 weken 2.5 % versgewicht toename per dag zien. De volgende 6 weken is de groei afgenomen tot 0.4 % versgewicht toename per dag. Een mogelijke verklaring kan zijn dat een dieet van uitsluitend *Phaeodactylum* te eenzijdig is om voor een langere periode groei van kokkels te realiseren. Bij een groei van 2.5 % per dag kan een hatchery kokkel van 5 mm uitgroeien tot een marktwaardig product van 10 gram versgewicht in 7.5 maanden. De conclusie uit fase 1 was dat gecontroleerde groei van schelpdieren in de eerste plaats afhankelijk is van een betrouwbaar productiesysteem van algen.



## 2. Methoden

Het onderzoek is uitgevoerd door een team van onderzoekers, assistent-onderzoekers en studenten, die met de faciliteiten van IMARES en bij de pilots experimenten hebben uitgevoerd en gegevens hebben verzameld. Het aio onderzoek van Isabel Batista maakte eveneens deel uit van onderhavig werkpakket.

Er zijn experimenten uitgevoerd op verschillende schaal (Figuur 2.1). Het aio onderzoek, gericht op het effect van een bepaald algendieet op de groei, overleving en vetzuurgehalte van kokkels is uitgevoerd bij IMARES. Hierbij is de kokkel gekozen als proefdier, als representant van de groep ingegraven schelpdieren; in de loop van het project is ook de tapijtschelp in de proeven geïntroduceerd, als 2<sup>e</sup> ingegraven soort. Verder zijn er proeven gedaan met mosselen, als voorbeeld van schelpdieren die niet zijn ingegraven.



FIGUUR 2.1. Experimenten op verschillende schaal : 2-ml well plates (a), 10-liter cultures (b), 1800-liter raceways (c), dieet test set-up (d), schelpdier groei bij raceways, portable test-kit (e), monitoren groei bij schelpdier pilots (f).

Teneinde een goedkoper medium voor de teelt van algen te vinden is algengroei op verschillende combinaties van nutriënten getest in 2-ml well plates. Veelbelovende media zijn vervolgens opgeschaald tot 10-liter cultures waarna het eiwit en vetzuurgehalte van de algen wordt bepaald.

In zes 1800-liter raceways van IMARES is onderzocht of de diatomee *Chaetoceros muelleri* (een inheemse soort die veel wordt gebruikt in schelpdier nurseries vanwege zijn hoge voedingswaarde) kan worden gekweekt in continu cultuur met het eerder geteste medium. De algen die in de raceways zijn geproduceerd zijn gevoerd aan schelpdieren in een test opstelling van IMARES om een indruk te krijgen van de voedingswaarde.

In het laboratorium van IMARES is een portable testkit ontwikkeld voor het meten van de respons van schelpdieren op verschillende voedseltypen en onder verschillende omstandigheden. Bij alle drie de pilot locaties (het Proefbedrijf Zeeuwse Tong in Colijnsplaat (CP), Zeeland Aquacultuur in Yerseke (ZA) en Koninklijke Maatschap Wilhelminapolder – Neeltje Jans in Wilhelminapolder (WP) zijn vanaf 2011 tapijtschelpen en mossels uitgezet en verschillende variabelen gemonitord (voedsel hoeveelheid en samenstelling en schelpdiergroei) met als doel de groeisnelheid en –efficiëntie in de verschillende locaties met elkaar te kunnen vergelijken (zie voortgangsrapportages).

Bij de pilots WP en CP is naast schelpdiergroei ook de fyto- en zooplankton samenstelling gemonitord; dit is gerapporteerd in de pilot rapportages.

De gegevens van de metingen en de data die zijn ingewonnen door de pilots zijn gebruikt voor het opstellen van balansen van toe en afvoer van water en voedsel, gekoppeld aan productie gegevens. De groei data zijn gebruikt voor ontwikkeling, ijking en validatie van groei modellen.

### 3. VOEDING: Factoren van invloed op algenproductie

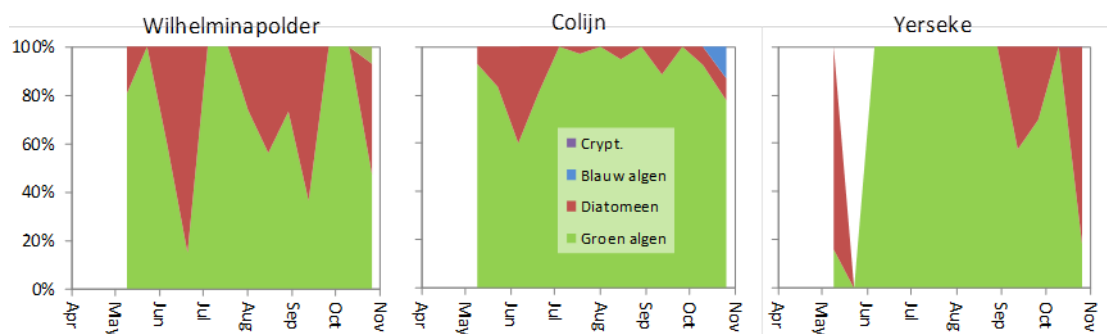
#### 3.1 Systeem vereisten

Een protocol voor het kweken van algen is in 2012 opgeleverd (Dedert, 2012, bijlage I). In de volgende paragrafen wordt achtergrond informatie weergegeven voor de gecontroleerde kweek van algen.

##### 3.1.1 Keuze algensoorten

Schelpdieren voeden zich door met hun kieuwen eencellige algen uit het water te filtreren. De samenstelling van het voer moet voor minimaal 20% uit levende eencellige algen bestaan (Spencer 2002). Alternatieven zijn getest en laten zien dat algen gedeeltelijk kunnen worden vervangen voor de tapijtschelp *Tapes decussatus* (kaas wei, Enes & Borges 2003), oesters *Crassostrea gigas* (micro deeltjes, Badillo-Salas et al. 2009) en mosselen *Mytilus galloprovincialis* (droge microdeeltjes met een specifieke samenstelling (INVE), Nevejan et al. 2009). Wanneer het voer volledig bestaat uit gedroogde algen treedt een vermindering van groei en vitaliteit op bij de Amerikaanse venusschelp *Mercenaria mercenaria* (Espinosa & Allam, 2006). Een van de belangrijkste componenten van het algendieet betreft de voedingswaarde (Webb and Chu, 1983 ; Brown et al., 1997, Knauer and Southgate, 1999; Muller-Feuga et al., 2003b; Robert et al., 2004). Het vetzuur eicosapentaenoisch zuur (EPA) is belangrijk voor groei en energievoorziening en docosahexaenoisch zuur (DHA) is belangrijk voor ontwikkeling zoals de metamorfose van larf naar broed (Langdon & Waldock 1981, Chu & Webb 1984, Enright et al. 1986). Diatomeeën of algen met een kiezelskelet, bevatten veel EPA, terwijl flagellaten, algen met een zweepstaart, veel DHA bevatten. De te kiezen algensoorten moeten naast een goede voedingswaarde ook een dunne celwand hebben voor goede vertering (Robert 1998; Muller-Feuga et al., 2003a), niet toxisch zijn en het juiste formaat hebben (niet groter dan 30 µm) (e.g. de Pauw et al. 1984). Daarnaast is het belangrijk dat de algen relatief makkelijk in grote hoeveelheden te produceren zijn (Day et al., 1991; Donalson, 1991; Robert & Trintignac, 1997). In het geval van binnendijkse teelt moet de soort van nature voorkomen in de omgeving zodat introductie van een exoot wordt voorkomen. Ook is van belang dat de soort tolerant is voor fluctuaties in temperatuur. De volgende soorten voldoen aan boven gestelde criteria en zijn gedurende het Zeeuwse Tong project met succes buiten gekweekt: de diatomeeën *Skeletonema costatum*, *Skeletonema* sp., *Chaetoceros muelleri*, *Phaeodactylum tricorneratum* en de flagellaat *Tetraselmis suecica*.

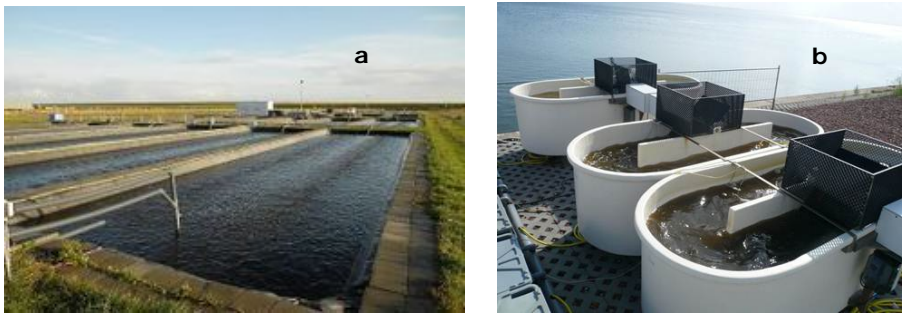
In de pilots W en CP is er sprake van spontane ontwikkeling van algen; bij ZA zijn de vijvers beënt met onder andere *Skeletonema*. De samenstelling van de phyto- en zooplankton gemeenschap werd gemonitord door Grontmij (data niet gepresenteerd in huidige rapport). De resultaten voor de samenstelling van de algenpopulaties in 2011 zijn samengevat in fig 3.1, waaruit blijkt dat de groenalgen dominant zijn.



Figuur 3.1: Samenstelling van de algenpopulatie in de schelpdiervijvers in de periode mei – november 2011. Onderverdeling naar groen algen, diatomeeën, blauw algen en cryptophycen

##### 3.1.2 Design kweekstelsel

Over het algemeen worden langgerekte ondiepe (60 cm tot 1 m) systemen gebruikt (Figuur 3.1).



FIGUUR 3.1: Voorbeelden van outdoorkweek van algen. a) Algenvijver bij Zeeland Aquacultuur, b) raceways IMARES te Yerseke, met schoepenrad in houten frame

In het Zeeuwse Tong project zijn de vijverbodems bedekt met folie (ZA en CP), of hebben ze een aarden bodem (WP). Er wordt gebruik gemaakt van grondwater of zeewater. Het zeewater wordt gefiltreerd over 50  $\mu\text{m}$  om te voorkomen dat er zooplankton wordt geïntroduceerd. Zie pilots rapporten voor meer uitgebreide omschrijving (zie ook tabel 5.1)

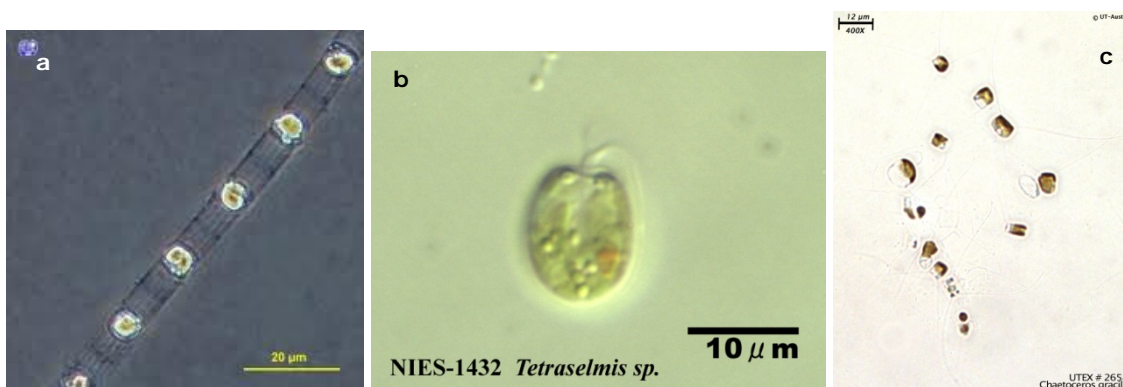
## 3.2 Abiotische factoren

### 3.2.1 Temperatuur

Temperatuur en licht zijn de belangrijkste factoren die de maximale groeisnelheid van buiten gesitueerde algencultures beïnvloeden (Eppley, 1972). Deze factoren zijn buiten moeilijk te controleren wat tot onvoorspelbaar gedrag van de cultures leidt (De Pauw et al., 1983). Ervaringen opgedaan gedurende het Zeeuwse Tong project geven aan dat *Skeletonema* het best groeit bij temperaturen onder de 25  $^{\circ}\text{C}$ . Dit is in overeenstemming met Suzuki & Takahashi (1995). De andere soorten (*Chaetoceros muelleri*, *Phaeodactylum tricornutum* en *Tetraselmis suecica*) groeien ook boven deze temperatuur. *Phaeodactylum* overleeft bij temperaturen onder 0  $^{\circ}\text{C}$ .

### 3.2.2 Nutriënten

Binnen de grenzen van temperatuur en licht bepalen de voedingsstoffen (nutriënten) de groei van de algen (Lefebvre et al., 2004). Dit betreft stikstof (N), fosfaat (P), spore elementen en vitaminen. Diatomeeën of kiezelwieren hebben daarnaast ook silicaat (Si) nodig voor hun kiezelskelet (Figuur 3.2). Zeewater bevat deze voedingsstoffen van nature, maar voor een cultuur zijn extra nutriënten nodig zodat de concentratie aan algencellen hoger kan zijn dan in zeewater.



FIGUUR 3.2: De algensoorten a) *Skeletonema costatum* (planktonnet.awi.de), b) *Tetraselmis* sp. en c) *Chaetoceros*

Grondwater bevat vaak veel hogere concentraties aan nutriënten en is daardoor geschikt voor algenkweek. Grondwater bevat echter ook veel ijzer, wat het water troebel maakt. Reis Batista (2006) heeft *Skeletonema costatum* succesvol gekweekt met grondwater van het schelpdierbedrijf Roem van Yerseke, maar voor *Chaetoceros muelleri* was de hoeveelheid licht te laag. Een trickling of een zandbed filter kan de hoeveelheid ijzer verlagen. Zeeland Aquacultuur en Wilhelminapolder-Neeltje Jans maken

ook gebruik van grondwater voor de teelt van algen. Zeeland Aquacultuur kweekt de startcultures voor de algenvijvers met 50 µm gefiltreerd zeewater waaraan 25% nutriëntrijk grondwater wordt toegevoegd.

Walne (1970) heeft een nutriëntenoplossing (ook wel medium genaamd) ontwikkeld dat geschikt is voor een groot aantal algensoorten die zich lenen voor productie in grote hoeveelheden. Dit complete medium is echter duur. Walne medium voor 1000 liter cultuur kost €9.91 aan ingrediënten terwijl een simpel medium dat alleen stikstof en fosfaat bevat €0.73 kan kosten (van Dalen, 2011 studentenrapport). Zeeland Aquacultuur gebruikt een medium met de volgende eindconcentraties N= 1.22, mg/L; P = 0.135 mg/L; Si = 2 mg/L. Experimenten met *Chaetoceros muelleri* laten zien dat een simpel medium met stikstof, fosfaat, silicaat, ijzer, mangaan en vitamines vergelijkbare cel concentraties oplevert als het Walne medium (Reis Batista, submitted b). Cultures waarbij de stikstof bron uit ammonium bestaat hadden een langere levensduur. Een verhouding van NH<sub>4</sub> : P= 9:1 gaf een toename in vetgehalte van de algen. Deze toename in vetgehalte komt overeen met eerdere studies uitgevoerd met deze soort bij een lage N:P verhouding (McGinnis et al. 1997).

Bij het proefbedrijf in Colijnsplaat wordt het water verrijkt met nutriënten door de teelt van zagers en tong. Dit water krijgt in aparte vijvers de gelegenheid om algengroei te stimuleren. Een dergelijke geïntegreerde teelt is al eerder toegepast, o.a. door Lefebvre et al. (2004). De afstemming van nutriënten aanbod op algenproductie is moeilijker te sturen en ook de soort die gaat domineren is van toeval afhankelijk.

Hergebruik van kweekwater van algen kan een kostenbesparing zijn. Hoe vaak het water kan worden hergebruikt en of toevoeging van spore elementen of zeewater de kwaliteit van het gebruikte water verbeterd is op labschaal onderzocht (Ghourabi, 2013 studentenrapport). *Skeletonema* sp. is gekweekt met medium dat wordt gebuikt door Zeeland Aquacultuur. Hierbij wordt uitsluitend stikstof, fosfaat en silicaat aan gefiltreerd zeewater toegevoegd. Nadat batch cultures een dichtheid van 1 miljoen cellen per ml hadden behaald zijn de algen en het water van elkaar gescheiden met een filter en is het water opnieuw gebruikt. De eerste maal hergebruiken leverde vergelijkbare dichtheden op, maar na 2x en 3x hergebruik werd de maximaal behaalde dichtheid aanzienlijk lager (respectievelijk 600.000 en 200.000 cellen per ml). Toevoegen van ijzer, zink en mangaan kon maximale dichtheid van de algen in 3x gebruikt water verhogen tot 400.000 cellen per ml. Toevoegen van zeewater verhoogde de maximale dichtheid van de algen naar 500.000 cellen per ml (25% en 50% zeewater) of 700.000 cellen per ml (75% zeewater). Uit de experimenten blijkt dat bij de 1<sup>e</sup> maal hergebruik het water volledig hergebruikt kan worden, maar bij de 2<sup>e</sup> en 3<sup>e</sup> maal hergebruik slechts een gedeelte van het water kan worden hergebruikt. Hierbij geeft 25% hergebruik van water de hoogste algenopbrengst.

Anorganisch koolstof in de vorm van kooldioxide (CO<sub>2</sub>) is ook belangrijk voor de groei van algen (Gautier, 1994). Dit is aanwezig in de lucht en kan door middel van doorborreling of een schoepenrad in contact worden gebracht met de algen in het water. Gedurende de dag consumeren algen kooldioxide en produceren ze zuurstof (O<sub>2</sub>). Gedurende de nacht is dit proces omgekeerd en consumeren de algen O<sub>2</sub> en produceren ze CO<sub>2</sub> (Richmond, 1986). Opname van CO<sub>2</sub> verhoogt de zuurgraad van het water (pH) (Hansen, 2002).

Algen maken pigmenten aan hoofdzakelijk ten behoeve van fotosynthese. Kweekomstandigheden, zoals nutriënten beschikbaarheid en lichtintensiteit beïnvloeden de mate waarin deze pigmenten worden aangemaakt. Uit onderzoek van Riegman en Rowe (1994) is gebleken dat de ratio tussen bepaalde pigmenten; carotenoïde (400 tot 600nm, best meetbaar bij 480 nm) en chlorofyl a (665 nm) een indicatie geeft of een culture door licht of door nutriënten gelimiteerd is.

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

Riegman en Rowe (1994) hebben in natuurlijke populaties aangetoond dat bij een ratio van rond 1 de algen voldoende nutriënten tot hun beschikking hebben, maar licht gelimiteerd zijn. Naarmate de ratio verder oploopt naar 2 worden de algen in toenemende mate nutriënt gelimiteerd. Er wordt dan relatief minder chlorofyl aangemaakt. Met een spectrometer is de verhouding tussen deze pigmenten eenvoudig te bepalen en geeft direct inzicht in de limiterende factoren voor groei van de culture.

In verschillende tests is met behulp van 6 raceways een gradiënt in nutriënten of licht gecreëerd (studenten rapporten Maas, 2012; Quesnot, 2012 en Chivard, 2013). Hiermee is de bruikbaarheid van de ratio voor gecontroleerde algenkweek in buiten geplaatste open bassins bepaald. In de door Riegman en Rowe (1994) geanalyseerde watermonsters werden eerst de pigmenten geëxtraheerd. Een vergelijking van vers doorgemeten monsters en geëxtraheerde monsters liet zien dat extraheren niet nodig is (Chivard, 2013 studentenrapport). Door het meenemen van het achtergrondsignaal heeft Quesnot (2012) aangetoond dat nutriëntenlimitatie optreedt in raceway cultures, met een ~30% toename van de ratio ongeveer een dag voordat de culture in de crash fase kwam. Deze verandering in de ratio was in eerdere experimenten van Quesnot (2012 studentenrapport) en Maas (2012 studentenrapport) waarin het achtergrondsignaal niet in de berekening werd meegenomen, niet aangetoond. Resultaten van Chivard (2013 studentenrapport) geven echter aan dat een calibratie waarin het achtergrondsignaal bij 750nm wordt meegenomen niet nodig is. De ratio toont het effect van verminderde beschikbaarheid van nutriënten aan. Een batch culture zonder toevoeging van medium gaf van dag 4 naar dag 5 een toename van de ratio van 1.5 naar meer dan 2.5 terwijl de waarde van de ratio in batch cultures met toegevoegd medium onder 1.5 lag (Chivard, 2013 studentenrapport). In batch cultures met een diepte van 60 cm of 30 cm werden ratio's tussen de 1 en 1.5 gemeten wat aangeeft dat licht limitatie niet optrad (Chivard, 2013 studentenrapport). Het toevoegen van nutriënten in de algenvijvers van het Proefbedrijf in Colijnsplaat deed de ratio dalen, wat suggereert dat de algen nutriënt gelimiteerd waren (Dousson, 2013 studentenrapport). Dit bevestigt het beeld dat de algenproductie op Colijnsplaat stikstof gelimiteerd is gebaseerd op metingen van opgeloste anorganische nutriënten (ZT rapport 2012)

Bij een verandering van de ratio richting 2 moeten meer nutriënten worden toegevoegd. Bij een verandering van de ratio richting 1 is lichtlimitatie aan de orde. Verdunning van de culture is een manier op de lichtomstandigheden te verbeteren. Als de ratio ook bij lage celdichtheden rond de 1 is kan het bassin mogelijk te diep zijn, of is er te weinig waterbeweging waardoor de algen te weinig licht 'zien'.

### 3.2.3 Waterbeweging

De algen zijn uitgerust met stekels (diatomeeën) of een zweepstaart (flagellaten) om uitzinking naar de bodem te voorkomen. Desondanks zullen de algen na verloop van tijd naar beneden zinken als het water niet in beweging wordt gebracht. Daarnaast is beweging belangrijk om voor iedere algencel apart het contact met nutriëntrijk water, lucht voor CO<sub>2</sub> opname en een verblijf aan het wateroppervlakte voor blootstelling aan het licht te garanderen. Geschikte methoden hiervoor zijn doorborreling met lucht of beweging van het water met een schoepenrad.

### 3.2.4 Waterverversing

Voor het kweken van algen kunnen verschillende methoden toegepast worden. De meest eenvoudige is de batch culture. Tijdens een batchculture wordt een algensoort opgekweekt tot hoge celdichtheden in water waar eenmalig nutriënten aan zijn toegevoegd waarna de gehele culture geoogst wordt. Dit gebeurt voordat uitputting van nutriënten of lichtlimitatie optreedt en de cultuur instort. Als een cultuur is ingestort moet deze met een nieuwe cultuur gestart worden. Een kweekmethode waarbij een deel van culture wordt geoogst en het resterende deel wordt aangevuld met nieuw medium wordt een semi-batch culture genoemd. Hierbij is het noodzakelijk de celdichtheden en celkwaliteit te monitoren om het juiste tijdstip van oogsten te bepalen. Door tijdig te oogsten wordt voorkomen dat de culture in kwaliteit en dichtheid afneemt, d.w.z. in de stationaire fase komt. Het is belangrijk de culture regelmatig te controleren op contaminatie met andere algen of bacteriën. Een kweektechniek waarbij een culture langdurig in stand worden gehouden door voortdurend medium toe te voegen en een deel van de algen te oogsten (doorstroom) heet een continu culture. Afhankelijk van de groeisnelheid van de culture en resulterend de celdichtheid kan de doorstroom worden aangepast. Hiermee wordt voorkomen dat lichtlimitatie optreedt en een gebrek aan nutriënten de groei van de culture beperkt, en kunnen resulteren in een kwalitatief slechtere en lichtere alg (Michels et al. 2010). Daarnaast worden contaminaties zoals bacteriën en zoöplankton zodanig verdund dat zij in mindere mate de culture kunnen aantasten. Ook zal, net als in een semi-batch culture, bij voldoende doorstroom de gewenste algensoort in exponentiele fase gehouden kunnen worden en contaminatie met andere algen voorkomen kunnen worden. Langdurige continu cultures zijn alleen te realiseren onder gecontroleerde omstandigheden in gesloten systemen, de fotobioreactors. Proefondervindelijk is vastgesteld dat bij een doorstroom of verversingsnelheid van de raceways van 40% de hoogste productie wordt behaald. Daarentegen bleek dat de cultures bij een verversingsnelheid van 10% stabielier zijn (Kamermans et al., 2009). Aanpassing

van de stroomsnelheid gedurende de kweek zal gewenst zijn bij wisselende weersomstandigheden; dit is met name aan de orde bij variatie in de lichthoeveelheid.

### 3.3 Biotische factoren

#### 3.3.1 Voedselkwaliteit en -samenstelling

##### *Voedselkwaliteit*

In paragraaf 3.1.1 werd reeds aangegeven dat de algen *Skeletonema costatum*, *Skeletonema* sp., *Chaetoceros muelleri*, *Phaeodactylum tricornutum* en *Tetraselmis suecica* geschikt zijn als voedingsbron voor de schelpdieren en potentie hebben voor succesvolle kweek in de Zeeuwse Tong pilots. Uit het onderzoek van Ten Brinke (2012) en Debeuf (2012) bleek echter dat op momenten dat er tijdelijk *Chaetoceros muelleri* gevoerd werd de groei van tapijtschelpen achter bleef. Dit werd gerelateerd aan de mogelijkheid dat deze alg vrij klein is. In de literatuur (NCMA:

<https://ncma.bigelow.org/node/1/strain/CCMP1316>) wordt beschreven dat deze alg een grootte range heeft van circa 4-10 µm, er zijn echter indicaties vanuit de praktijk dat deze alg gekweekt bij ZA mogelijk kleiner is (2-6 µm) en de retentie daarom mogelijk gering geweest kan zijn. Het is inderdaad bekend dat schelpdieren kleine algen met een lagere retentie-efficiency uit het water filteren dan grotere algen (Newell 2004; Strohmeier et al. 2012). Dus niet alleen de voedingswaarde van de aangeboden algen maar ook de grootte van de alg is voor belang.

Daarnaast loopt de algenproductie soms niet parallel aan de behoefte van de schelpdieren. Om het gebruik van op een ander tijdstip geproduceerde algen te testen heeft Ghourabi (2013, studentenrapport) een experiment uitgevoerd bij Zeeland Aquacultuur. *Skeletonema* sp. is geoogst met een centrifuge en ingevroren. De algen zijn vervolgens 6 weken dagelijks gevoerd aan drie groepen jonge oesters. Drie andere groepen oesters kregen een zelfde hoeveelheid verse algen en drie groepen kregen geen voedsel toegediend. Er trad geen schelpgroei op bij de oesters die ingevroren algen kregen. Dit was vergelijkbaar met de oesters die niet werden gevoerd, terwijl de gevoerde oesters wel schelpgroei lieten zien.

##### Samenstelling

Onderzoek van Reis Batista et al. (2013, submitted en in prep) heeft uitgewezen dat geschikte diëten voor de kweek van schelpdieren (op basis van resultaten bij kokkels) bestaan uit algensoorten met hoge PUFA gehalten (EPA, DHA en ARA). Hiervoor is een dieet samengesteld van algen met ongeveer dezelfde grootte, met behulp van linear programming (Reis Batista et al submitted) en zijn twee voederproeven uitgevoerd met diëten van verschillende samenstelling (Reis Batista et al. 2013 en in prep). De diëten van het eerste voer experiment, bestaande uit algen met gebalanceerde vetzuurgehalten *Pyramimonas parkae* en *Chaetoceros muelleri* (EPA, DHA en ARA), en *Pyramimonas parkae* en *Phaeodactylum tricornutum* (wel EPA en DHA, maar geen ARA), laten de beste groei zien (Fig. 4.3.1a). Het dieet met een laag vetzuurgehalte, bestaande uit *Brachiomonas submarina* en *Tetraselmis suecica* (geen EPA, DHA of ARA) laten een lage groei zien en veroorzaakt daarnaast ook een hoge mortaliteit. Hieruit blijkt dat EPA en DHA belangrijk zijn voor groei en overleving van schelpdieren, terwijl een laag ARA gehalte niet leidt tot verminderde groei of overleving. Opgemerkt wordt dat in een later experiment in *Tetraselmis* wel een hoog EPA gehalte is gemeten. De experimenten zijn uitgevoerd met jonge kokkels; opgemerkt wordt dat de dieeteisen kunnen veranderen met de leeftijd.

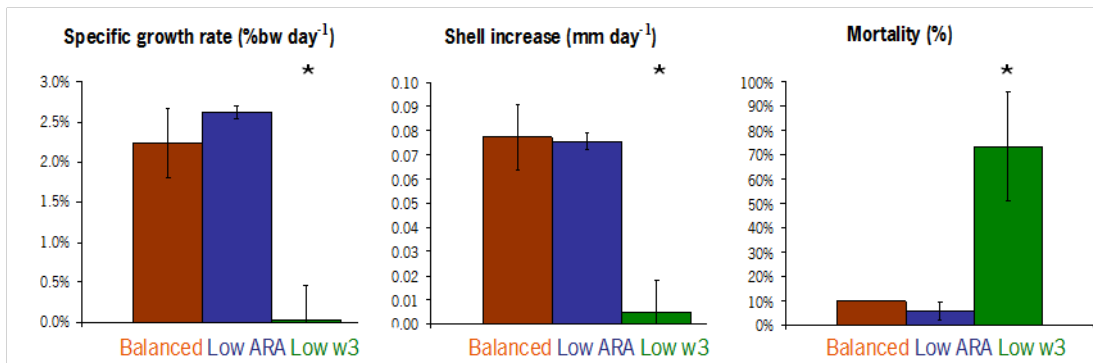


Fig. 4.3.1a Groeisnelheid en sterfte van kokkels aan het einde van het eerste voer experiment gevoerd met 3 diëten: Balanced = EPA, DHA en ARA; Low ARA = EPA en DHA en Low w3 = geen EPA, DHA of ARA). Gemiddelde met sd (n=3).

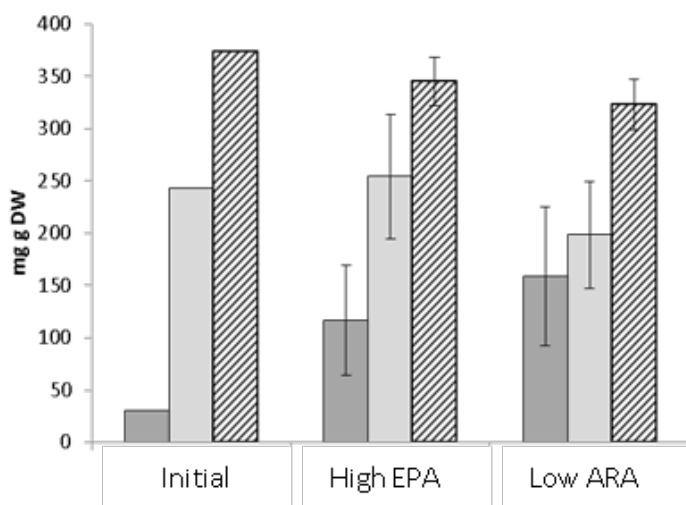


Fig. 4.3.1b. Koolhydraten (donker grijs), vet (licht grijs) en eiwit (schuin gestreept) concentratie (mg g<sup>-1</sup> drooggewicht van het vlees) van kokkels aan het begin van het experiment (initial) en aan het eind van het experiment. Vanwege lage overleving zijn geen gegevens beschikbaar voor de Low w3 behandeling. Gemiddelde met sd (n=3).

In een tweede experiment heeft Reis Batista et al (in prep) het belang van EPA en DHA afzonderlijk getest (Tabel 4.3.1). De algen werden toegediend met de algendoseerder. Dit is een apparaat dat meet hoe de algenconcentratie bij de kokkels afneemt en daar de toevoer op baseert. Er wordt dus zoveel gevoerd als de kokkels vragen.

Tabel 4.3.1. Aanwezigheid (+) of afwezigheid (-) van EPA en DHA in de diëten van het tweede voer experiment (Tetra = *Tetraselmis suecica*, Duna = *Dunaliella tertiolecta*, Pyra = *Pyramimonas parkae*, Chaeo = *Chaetoceros muelleri*)

	Tetra	Duna	Tetra+Pyra	Chaeo+Pyra	Pyra
EPA	+	-	+	+	-
DHA	-	-	+	+	+

De beste groei werd gevonden bij een dieet met veel EPA (Tetra) (Fig. 4.3.2a). De kokkels die gevoerd waren met dit dieet hadden ook de hoogste EPA gehalten (Fig. 4.3.2b). De hoeveelheid toegevoegde algen over de gehele periode van 28 dagen was met 25 mg per individu het hoogst bij het Tetra dieet. De andere diëten werden opgenomen met 14 mg per individu voor Duna, 10 mg per individu voor



Tetra+Pyra en voor Chaeo+Pyra en 9 mg per individu voor Pyra. Waarom de kokkels verschillende hoeveelheden hebben opgenomen van verschillende diëten is onduidelijk. Gemeten filtratiesnelheden en absorptie-efficiënties konden de verschillen niet verklaren, wat aangeeft dat de algen goed werden opgenomen en verteerd.

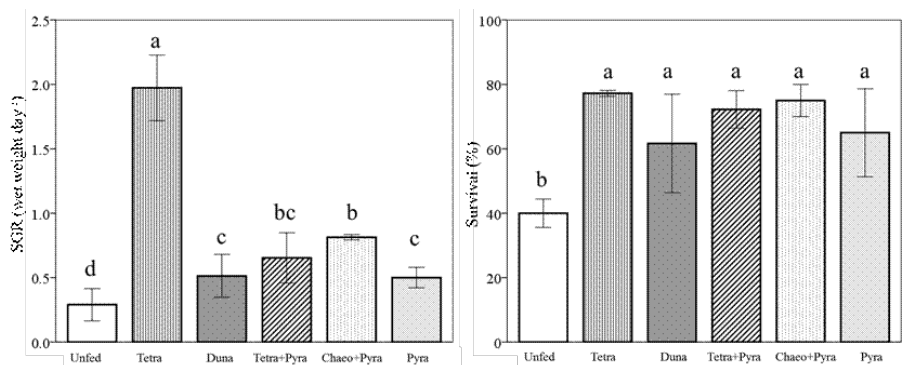


Fig. 4.3.2a. Groeisnelheid (SGR) en sterfte (survival) van kokkels van kokkels aan het einde van het tweede voer experiment: Ongevoerd/Unfed (wit), Tetra (vertikaal gestreept), Duna (zwart), Tetra+Pyra (schuin gestreept), Chaeo+Pyra (gestippeld), Pyra (licht grijs). Verschillen zijn significant wanneer letters niet overeenstemmen. Gemiddelde met sd.

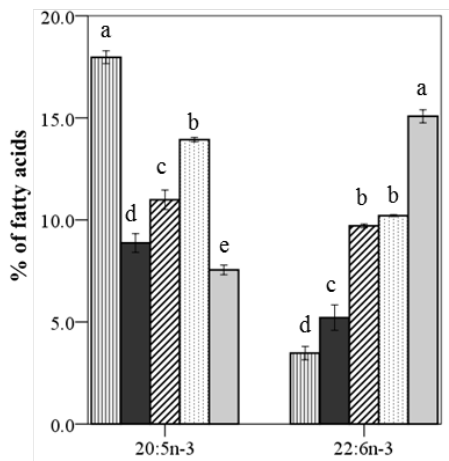


Fig. 4.3.2b. Vetzuurgehalte in % totaal PUFA (20:5n-3 = EPA en 22:6n-3 = DHA) van kokkels aan het einde van het tweede voer experiment: Tetra (vertikaal gestreept), Duna (zwart), Tetra+Pyra (schuin gestreept), Chaeo+Pyra (gestippeld), Pyra (licht grijs). Verschillen zijn significant wanneer letters niet overeenstemmen. Gemiddelde met sd.

Uit de voer experimenten blijkt dat EPA belangrijker is dan DHA voor groei van jonge kokkels en dat ARA niet belangrijk is. Hierbij moeten wel voldoende algen beschikbaar zijn.

### 3.3.2 Predatie

Filtratie van het inkomende water kan organismen tegen houden die algen kunnen eten. De Zeeuwse Tong pilots filteren het water tot 50 µm. Dit houdt copepoden en andere grazers buiten de deur.

### 3.3.3 Concurrentie

Het is van belang om de gewenste algensoort in cultuur te houden. Voor de kweek van diatomeeën moet er voldoende silicaat aanwezig zijn. Flagellaten hebben geen silicaat nodig en kunnen gaan domineren zodra het silicaat is uitgeput. De cultuur kan gestuurd worden door manipulatie van de waterkwaliteit. Om de omstandigheden ongunstiger te maken voor andere algensoorten is het effect getest van een lager zoutgehalte (25 psu in plaats van 32 psu), of het toevoegen van extra stikstof (N:P ratio 15:1 in plaats van 9:1) op de levensduur van een continu cultuur van *Chaeoceros muelleri* (Merel, 2011 studenten rapport). Dit leverde geen significante verlenging op.

Ook is getest wat het effect is van extra filtratie van het water (0.2  $\mu\text{m}$  in plaats van 5  $\mu\text{m}$ ) en afdekking van de open raceway cultures (op het platform bij Imares). Extra filtratie verminderde besmetting met andere algensoorten aanzienlijk, terwijl afdekking van de raceway geen effect had (Merel, 2011 studenten rapport). Dit betekent dat de belangrijkste weg voor besmetting via het water is en niet via de lucht.

#### **3.3.4 Ziektes**

In sommige gevallen kan de algencultuur instorten terwijl er geen aanwijsbare redenen zijn. Dit kan wijzen op de aanwezigheid van ziektes. In het Zeeuwse Tong project is dit niet verder onderzocht.

## 4. GROEI: Factoren van invloed op schelpdiergroei

### 4.1 Systeem vereisten

#### 4.1.1 Algenconcentratie

Het is de vraag in hoeverre algen- en schelpdiervijvers gecombineerd kunnen worden. Daarbij spelen 2 factoren een rol, nl hoe snel kunnen de schelpdieren een algenvijver uitputten, en bij welke concentratie in de vijver zullen de schelpdieren minder gaan eten omdat de kieuwen verstopten. Wat betreft de bovengrens van de algenconcentratie, kan gesteld worden dat de concentratie waarbij de schelpdieren pseudofaeces gaan produceren, de pseudofaeces drempel, in acht genomen zou moeten worden omdat er anders algen worden verspild omdat ze niet ingeslikt maar uitgespuugd worden. Dit ligt op 4 – 6 mg per liter. Groeiremming van de schelpdieren treedt echter pas bij veel hogere concentraties op, in de orde van 100 mg/l, en dit verschilt per soort (Prins & Smaal, 1989). Een beperkte overschrijding van de pseudofaeces drempel heeft geen groeiremmend effect; het is wel een kostenfactor omdat de algen dan niet maximaal benut worden.

#### 4.1.2 Hergebruik van water en nutriënten

Algen- en schelpdier vijvers zijn ruimtelijk gescheiden van elkaar binnen de huidige opzet van de verschillende pilots. Algenproductie vindt echter niet alleen plaats in de algenvijvers maar er kan ook interne productie in de schelpdiervijvers plaats vinden. Door metabolische activiteit van de schelpdieren en door afbraak van (pseudo)faeces komen er opgeloste nutriënten vrij in de water kolom. Deze zijn beschikbaar voor algen en kunnen de primaire productie stimuleren. Hoe groot, en of deze primaire productie gebaseerd op geregenereerde nutriënten van wezenlijk belang is (gezien de relatief korte retentietijd in de schelpdiervijvers) hangt af van de specifieke kweekomstandigheden. Het is bekend dat regeneratie van nutriënten van wezenlijke orde grote kan zijn. Uit een review van verschillende (natuurlijke) ecosystemen is gebleken 30-85% van de nutriënten opgegeten door mosselen weer vrijkomt als anorganische nutriënten en dus beschikbaar is voor algenproductie (Jansen et al, 2012).

Momenteel wordt het water alleen in WP teruggeleid naar de algenvijver, en in de andere pilots wordt het geheel of gedeeltelijk geloosd. Afhankelijk van de locatie moeten er lozingskosten betaald worden, welke afhankelijk zijn van de nutriëntenconcentratie. Hergebruik van het kweekwater is daarom interessant vanuit het lozingsperspectief als ook omdat er waardevolle nutriënten verloren gaan die mogelijk voor productie van micro- dan wel macro-algen gebruikt kan worden. Bij implementatie van een recirculerend vijversysteem waar water hergebruikt wordt moet er echter wel aandacht besteed worden aan pH, calcium concentraties (zie par 4.2.3), beschikbaarheid sporelementen voor algen productie, stoichiometrie van de nutriënten (C:N:P) voor algenproductie.

#### 4.1.3 Keuze schelpdiersoort

Er is door de deelnemers aan het project oorspronkelijk gekozen voor de kweek van mosselen en kokkels omdat dit inheemse soorten zijn waar relatief veel van bekend is. In de loop der tijd is de tapijtschelp in plaats van de kokkel gebruikt vanwege een betere overleving in de kweeksystemen, en is er aandacht besteed aan andere soorten zoals de Japanse oester en de platte oester en diverse clam soorten. In onderhavig werkpakket is het onderzoek gericht op mossel (epifauna), kokkel en tapijtschelp (infauna).

#### 4.1.4 Temperatuur

De watertemperatuur in de vijvers volgt de seizoenen en wordt voor algen en schelpdierenkweek niet bijgestuurd. Hoogstens kan in de CP en ZA systemen de doorspoeling worden gewijzigd om te koelen respectievelijk te verwarmen via toevoer buitenwater. Algenkweek is in de eerste plaats afhankelijk van licht, en dat correleert uiteraard met temperatuur in de loop der seizoenen. Wel zullen andere soorten tot bloei komen wanneer licht en temperatuur veranderen. Schelpdieren zijn in het algemeen goed bestand tegen lage temperaturen, er is in de afgelopen jaren geen noemenswaardige sterfte geweest bij vorst. Bij hogere temperaturen is risico op zuurstoftekort, hoewel er in de praktijk ook geen duidelijke zomersterfte is geweest in de pilots.

#### 4.1.5 Watertoevoer en menging

##### Debiet

De vereiste water/voedsel toevoer in relatie tot de schelpdier biomassa, kan worden berekend aan de hand van de clearance ratio: de verhouding tussen de filtratie capaciteit van de schelpdieren, de clearance time CT = de tijd die nodig is om de watermassa te filtreren, en de verblijftijd van het water, de residence time RT: Bij  $CT/RT < 1$  treedt er refillratie van het water op en kan er voedseluitputting optreden. De CT is direct gerelateerd aan de totale biomassa van de schelpdieren. Voor een vijver van ZA is de clearance ratio berekend op 0.12 onder de condities zoals weergegeven in tabel 4.1: bij een hogere dichtheid is er van meer verversing uitgegaan. De ratio geeft aan welke deel van het gefilterde water wordt verversed bij een gegeven debiet. De tapijtschelpen filteren het zelfde water in dit geval gemiddeld 8 x, dit betekent enerzijds een efficiënte benutting van het voedsel maar kan anderzijds ook tot tekort leiden.

TABEL 4.1. Clearance ratio CT/RT van tapijtschelpen bij verschillende dichtheden en 2 m3/kg/week waterverversing op basis van de vijvers van ZA

dichtheid		biomassa	clearance	filcap	verversing		vol	flow	RT	filcap	CT	CT/RT
n per m2	g/ind	kg/m2 eind situatie	l/ind/u	m3/m2/d	m3/kg/ week	m3/m2/ dag	m3	m3/d	d	m3/d	d	
500	10	5	1	12	2	1.43	80	142.86	0.56	1200	0.07	0.12
1000	10	10	1	24	2	2.86	80	285.71	0.28	2400	0.03	0.12
2000	10	20	1	48	2	5.71	80	571.43	0.14	4800	0.02	0.12

##### Menging

Voor soorten die op of boven de bodem leven, zoals de mossel en de oester, is de toevoer in relatie tot de schelpdierbiomassa van belang, voor de ingegraven soorten zoals de kokkel en de tapijtschelp is ook de menging van de waterkolom van belang teneinde voedseluitputting bij de bodem te minimaliseren. In de CP- en ZA-pilot is de stroming voornamelijk horizontaal gericht van ingang naar uitgang. Afhankelijk van de bodemruwheid treedt er turbulentie en verticale menging op. Dit is van belang omdat er bij te weinig verticale menging voedseluitputting bij de bodem kan optreden. Het optreden van voedseluitputting in de bodemgrenslaag (Benthic Boundary Layer, BBL) hangt af van de filtratiecapaciteit van de schelpdieren en de watertoevoer. Wanneer de doorstroming te laag is zal er bij de bodem uitputting van de algenhoeveelheid optreden en hebben de schelpdieren niet voldoende te eten (Wildish & Kristmanson, 1984). Er zijn metingen uitgevoerd in de schelpdiervijvers van CP mbv een fluorescentiemeter, zowel over de lengte van de vijver als over de waterkolom (Voortgangsrapport 2012, bijlage II; Dousson, 2013).

Deze metingen lieten geen duidelijke voedseluitputting bij de bodem zien, en ook geen uitputting over een horizontaal transect; dit kan ook komen doordat de laag dicht bij de bodem niet goed is doorgemeten omdat de probe niet tot vlak boven de bodem kan worden gebruikt.

Berekend is bij welke stroomsnelheid en dichtheid tapijtschelpen voedseltekort kan ontstaan, op basis van de volgende formule uit Smaal et al, 1986

$$C = 0.9(1 - e^{-P \cdot L/h}), \text{ waarbij}$$

C is de voedseldepletie ten opzichte van de voedseltoevoer :  $C = 1 - C(L)/C_0$ ,  $C(L)$ =voedsel op lengte L in de vijver,  $C_0$ =beginconcentratie

$$P = (CR \cdot N)/v$$

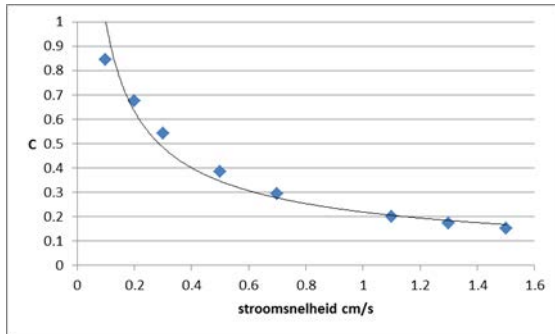
$CR \cdot N$  = filtratie per oppervlakte eenheid ( $\text{cm}^3/\text{aantal per cm}^2$ )

v = stroomsnelheid bij de bodem (cm/s)

L = lengte van de vijver (100 m)

h = diepte van de vijver (0.8 m)

Deze relatie is gebaseerd op veldomstandigheden in de Oosterschelde en kan alleen op vijvers worden toegepast onder de aanname dat er geen horizontale uitputting optreedt.



FIGUUR 4.1 Voedseluitputting (C) in relatie tot stroomsnelheid bij de bodem; bij 1000 tapijtschelp per m2 is er aan het eind van de vijver 50 % voedseldepletie bij een stroomsnelheid van 0.3 cm/s.

Naast verticale uitputting van algen (de BBL) kan er in de vijvers ook horizontale uitputting optreden. Omdat filtratie van algen leidt tot reductie van algenconcentratie zullen schelpdieren aan het begin van de vijver (dicht bij de algen invoer) de algen concentratie verminderen voor de rest van de vijver.

Om horizontale uitputting tegen te gaan kunnen er invoerpunten aangebracht worden langs de gehele lengte van de vijver. Uit de studie van Bezault (2012, zie ook Voortgangsrapport 2012 bijlage II) uitgevoerd op de ZA-pilot is gebleken dat er desalniettemin ruimtelijke uitputting op kan treden (1) als functie van de totale vijver lengte, dus afnemende concentratie van begin naar einde van de vijver, alsook (2) tussen de individuele invoerpunten. Het gevolg van deze twee typen variatie is een golvende afname in voedselconcentratie over de lengte van de vijver. Dit leidde ertoe dat de gemiddelde concentratie over de vijver ongeveer 66% van de maximale toevoer concentratie was. Daarnaast werd in deze studie aangetoond dat de horizontale-voedseldepletie-gradiënt afhankelijk is van het debiet van de afzonderlijke invoerpunten. In vijversystemen waarbij het water uit de schelpdiervijvers niet gerecirculeerd wordt zal men tevens de uitstroom van algen willen voorkomen. Het beheer zal zich daarom richten op het evenwicht tussen aanvoer van voldoende algen voor de schelpdieren aan het einde van de vijver en het voorkomen van uitspoeling van waardevolle algen.

## 4.2 Abiotische factoren

### 4.2.1 pH & Alkaliniteit

De term alkaliniteit wordt gebruikt om de zuurbufferende capaciteit van water te beschrijven. In zeewater wordt de alkaliniteit voor het grootste deel bepaald door de ionen carbonaat ( $\text{CO}_3$ ) en bicarbonaat ( $\text{HCO}_3$ ), welke dus pH schommelingen in het water kunnen voorkomen/verkleinen. Schelpen bestaan uit calciumcarbonaat ( $\text{CaCO}_3$ ) kristallen die ingebouwd zijn in een eiwit-matrix. De matrix is belangrijk om een sterke schelp te produceren, terwijl het schelpgewicht voor 95% uit calciumcarbonaat bestaat. Het calciumcarbonaat wordt gevormd door opname van mineralen uit het omringende water via het volgende proces:



waarbij oa de pH van het water effect heeft op de balans van dit proces (Gazeau et al. 2007); bij een lagere pH zal er minder calciumcarbonaat gevormd worden. Stabiliteit/variatie van de pH in het kweekwater is een complex proces waar, naast een tal van factoren, ook algen en de schelpdieren invloed op kunnen hebben. Door uitscheiding van  $\text{CO}_2$  door de schelpdieren zal de pH kunnen dalen, terwijl fotosynthese ( $\text{CO}_2$  opname door algen) een tegengestelde werking heeft.

pH metingen in de vijvers van de pilot Colijnsplaat laten inderdaad zien dat de pH in de algenvijvers (range 8.7-9.1) hoger is dan in de schelpdiervijvers (range 8.2-8.7). Daarnaast is er in de schelpdiervijvers echter een tendens dat de pH hoger is dicht bij de bodem in vergelijking met pH metingen hoger in de waterkolom. Dit is conform de zuurstof metingen, welke ook hogere zuurstof concentraties lieten zien dicht bij de bodem. Beide processen zijn echter tegengesteld aan de verwachting dat zowel pH als zuurstof concentratie afnemen als functie van de diepte van de vijver (dus lagere waarden bij de bodem) door zuurstofverbruik en uitscheiding van  $\text{CO}_2$  door de in de bodemlevende tapijtschelpen. Ondanks dat deze trends zichtbaar waren op verschillende dagen moet wel aangemerkt worden dat de dagelijkse variatie groter was dan de spatiële (verticale) variatie (Dousson, 2013).

Door de opname van calcium voor vorming van schelpen bestaat de mogelijkheid dat in vijversystemen, en met name in systemen waarbij water hergebruikt wordt, uiteindelijk de calcium concentratie (te) laag wordt, wat mogelijk de schelpdiergroei remt en zorgt voor 'dunne' schelpen die makkelijk beschadigen tijdens de oogst. Om dit te voorkomen kan er extra kalk toegevoegd worden aan het water. Schelpresten (dus de niet-levende organismen) kunnen daarbij mogelijk ingezet worden om de calcium beschikbaarheid in de water kolom te vergroten. Onder normale condities is calciumcarbonaat niet goed oplosbaar in water maar dit wordt versterkt door verhoogde CO<sub>2</sub> concentraties. Arruda & Lemos (2013, HZ studentenrapport) hebben laten zien dat resten van oesterschelpen betere resultaten gaven dan kokkelresten en kalk.. Zij berekenden dat het minimum volume aan oesterresten 0.166-0.325 m<sup>3</sup> moet betreffen om te voldoen aan de calcium behoefte voor de pilot Zeeland Aquacultuur (ZA).

#### 4.2.2 Saliniteit

Filtratieactiviteit van schelpdieren is afhankelijk van het zoutgehalte van het omringende water. Echter, de meeste schelpdieren tolereren een grote range aan saliniteit en effecten op voedselopname worden pas verwacht bij erg lage waardes. Zo heeft Riisgard et al. (2013) laten zien dat de voedselopname van mosselen vergelijkbaar is tussen 10 en 30 psu, en dat er pas lagere voedselopname waargenomen werd bij een waarde van 5 psu. Sterk wisselende zoutgehaltenes kunnen tijdelijk een afname van voedselopname tot gevolg hebben, maar de schelpdieren passen zich daar over het algemeen binnen enkele dagen op aan.

Er wordt dan ook aangenomen dat de zoutgehaltenes in de vijversystemen van de verschillende pilots (ZA, CP, WP) geen invloed heeft gehad op de groei van de schelpdieren.

### 4.3 Biotische factoren

#### 4.3.1 Voedselaanbod

Uit monitoring van de algenconcentraties in de Zeeuwse Tong pilots is gebleken dat het voedselaanbod in de schelpdiervijvers sterk kan verschillen over de dag, week en tussen weken (ZT 2012). Mogelijke oorzaken voor deze variatie in algen toevoer zouden zowel problemen met pompen als problemen met kweek van algen kunnen zijn (ZA), maar ook natuurlijke seizoensale variatie (CP, WP). Ondanks dat er in de literatuur veel beschreven staat over de pseudofaeces grens (Robson et al., 2010; Widdows et al., 1979; Clausen and Riisgård, 1996), de boven- (Clausen and Riisgård, 1996) en ondergrens (Riisgård et al., 2006; Pascoe et al., 2009) waarbij de mosselen stoppen met filtratie, en de optimum voedselconcentraties (Clausen and Riisgård, 1996), is er relatief weinig bekend over het effect van variabele voedselaanvoer op het voedselopnamegedrag en de groei van schelpdieren. Robert et al. (1993) stellen dat variabiliteit in o.a. voedselaanbod groei kan vertragen doordat schelpdieren eerder dicht gaan, waardoor er minder gefiltreerd kan worden. Uit experimenten met variabele voedseltoevoer uitgevoerd bij de ZA en WP pilot (Kamerik, in prep) bleek dat tapijtschelpen beter om kunnen gaan met sterk variërende voedselconcentraties in vergelijking met oesters en mosselen. Uit deze experimenten bleek echter niet dat de groei van schelpdieren die wekelijks aan sterk variërende voedselcondities blootgesteld werden, duidelijk achter bleef.

#### 4.3.2 Food conversion ratio FCR

In de visteelt wordt veel gebruik gemaakt van de FCR = hoeveelheid voedsel nodig voor de productie van 1 kg vers product. In de schelpdiercultuur is deze parameter minder gebruikelijk omdat er tot nu toe geen productie van schelpdieren plaats vindt die is gebaseerd op een volledig gecontroleerde kweekcyclus. Dat is bij onderhavig project wel het geval, dus is er de mogelijkheid de FCR te berekenen indien er gegevens zijn van de voergift en de oogst. Onder FCR wordt in dit geval verstaan de hoeveelheid droge stof in de vorm van algen, nodig voor de productie van 1 kg schelpdieren met schelp. Er kan worden overwogen de FCR uit te drukken per hoeveelheid vlees omdat de vergelijkbaarheid met viskweek mogelijk te maken, hoewel bij vis de graten ook worden meegeteld. Dit maakt echter een minder groot deel uit van het gewicht dan de schelpen, waarvan de bijdrage tot 85 % kan bedragen.

FCR data op basis van schelpdiergewicht met schelp zijn gerapporteerd in ZA 2013. Daarbij wordt wel het voorbehoud gemaakt dat er niet over de hele kweekcyclus betrouwbare data zijn en dat de

hoeveelheid algen niet geheel bekend is omdat er ook in de schelpdiervijvers algenproductie optreedt die niet is verdisconteerd in de algentoevoer uit de algenkweekvijvers.

Een FCR van ca 0.2 betekent dat er met 1 kg voer 5 kg schelpdieren met schelp kunnen worden gekweekt. Bij een vleespercentage van 20 % betekent dit een FCR =1 op basis van vlees, hetgeen een gangbare waarde is in de viskwekerij.

Tabel 4.2 FCR tapijtschelpen uit ZA (ZA, 2013)

ZA	2011	2012	2013
periode	mrt-sept	mrt-aug	feb-aug
kg algen	202	555	593
kg oogst	850	3116	2016
FCR	0.24	0.18	0.29

#### 4.3.2 Effect van reproductie op schelpdiergroei

In het eerste jaar van de productie van tapijtschelpen in de vijvers van de Zeeuwse Tong pilots werd aangenomen dat de tapijtschelpen nog niet reproductief zouden zijn. Echter, metingen van Ten Brinke (2012) laten een onbalans zien tussen de nutriënten (C:N) aanvoer dmv algen en nutriënten in het lichaam van tapijtschelpen. Bij nader onderzoek door dissectie van enkele tapijtschelpen bleek dat deze reproductief materiaal (gonaden) aan het aanmaken waren. Omdat gonaden rijk zijn aan N, wordt door de aanmaak van gonaden de vraag naar N ook hoger. Ontwikkeling van de gonaden zou ook kunnen betekenen dat energie dat normaal gebruikt wordt om te groeien in plaats daarvan wordt gebruikt om reproductieve massa te kweken.

Daarnaast is ook gebleken dat groeisnelheden van de schelp en het vlees verschillen, wat er toe leidt dat de conditie van de schelpdieren verandert gedurende het seizoen (ZT 2012; Ten Brinke 2012). Onafhankelijke schelp en tissue groei is vaker beschreven voor schelpdieren onder natuurlijke condities. Hilbish (1986), Witbaard et al. (2012) en Strohmeier et al (in press) lieten eerder zien dat seizoenale patronen in schelpgroei en tissuegroei niet aan elkaar gekoppeld waren en dat gedurende bepaalde periodes de energie die verkregen wordt met het voer eerder aan tissuegroei besteed wordt (inclusief reproductie) dan aan de groei van de schelp. De exacte sturende processen die zowel groei van de schelp als van de tissue beschrijven zijn (nog) niet geheel duidelijk.

## 5. GROEI EN PRODUCTIE

De groei van schelpdieren is bepaald op basis van gestandaardiseerde metingen uitgevoerd door IMARES en op basis van groei en oogst gemeten door de pilots. De gegevens zijn geïntegreerd in een dynamisch groeimodel (Dynamic Energy Budget (DEB) model). Groei is in dit model afhankelijk van voedselaanbod – en indirect van schelpdierbiomassa - en temperatuur. Aan de hand van dit model is de potentiële opbrengst gesimuleerd als functie van voedseltoevoer, dichtheid en temperatuur.

Op basis van de gegevens uit de pilots is er verder een budget opgesteld van schelpdier productie (overleving en groei) als functie van de toevoer van voedsel. Het budget beoogt de in en uitstroom van materiaal (m.n. voedsel) te koppelen aan de opbrengst van oogstbaar product. Dit levert een beschrijving op van de opbrengst in de verschillende pilots t.o.v de systeem karakteristieken.

### 5.1 Karakteristieken van de pilots

De ZT pilots bestaan uit Colijnsplaat (CP), Zeeland Aquacultuur (ZA) en Wilhelminapolder (WP). In CP zijn er 12 vijvers met foliebodem aangelegd van 100\*10 \* 0.8 m voor de kweek van tong, zagers, algen en schelpdieren (Ketelaars & Ruizeveld de Winter, 2013). Bij ZA zijn er 18 folievijvers aangelegd van 50\*1\*0.8 m voor de kweek van algen en schelpdieren (ZA, 2013). Bij WP is er een vijver uitgegraven van 0.5 ha met daaraan gekoppeld een aantal ingegraven bakken van 5 m<sup>3</sup> waarin mosselen aan touwen zijn uitgehangen (WP, 2013). In tabel 5.1 staan enkele karakteristieken weergegeven, ontleend aan de pilot rapportages voor zover beschikbaar.

Tabel 5.1: Karakteristieken van de pilots systemen

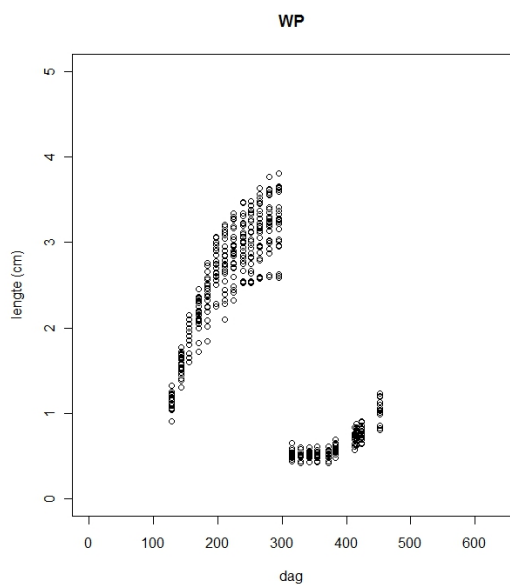
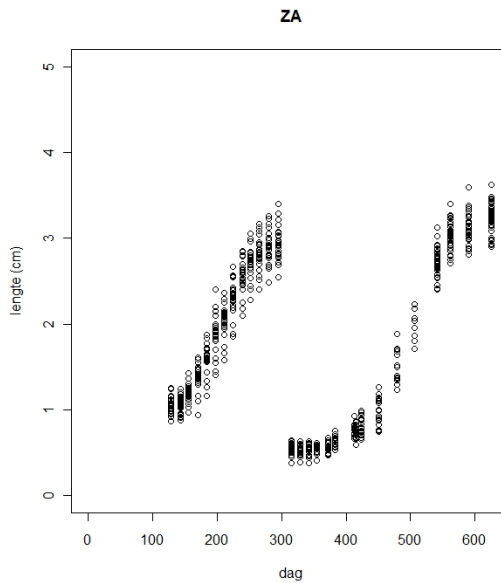
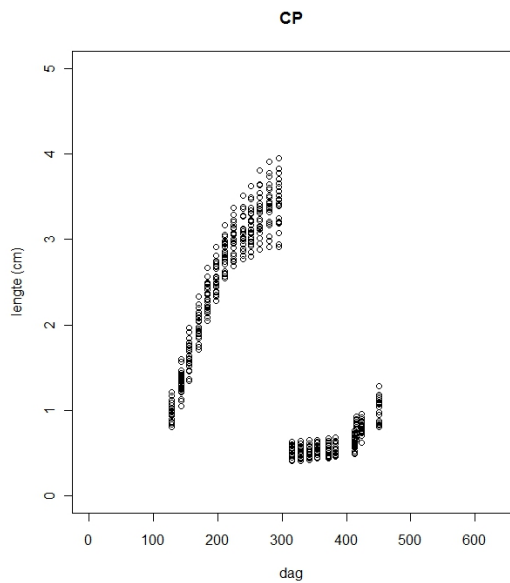
Parameter	Eenheden	CP	ZA	WP
oppervlakte per vijver	m <sup>2</sup>	1000	100	4500
diepte	m	1	0.8	1
Oppervlakte*diepte=volume	m <sup>3</sup>	1000	80	4500
aantal vijvers	n	12	18	1
aantal vijvers voor algenkweek	n	12	14	1
raceway vor algenent	m <sup>3</sup>	na	??	1*15
dominante kweeksoort	soort	tapijtschelp	tapijtschelp	mossel
aantal eenheden voor schelpdierkweek	n	4	8	2*4 bakken in serie
volume schelpdierkweek systeem	m <sup>3</sup>	12000	6400	1600
Totale verversing of doorstroom	m <sup>3</sup> /dag	??	50	2*1800
algenproductie	kg per jaar	??	1900	??
Dichtheid schelpdieren Start	n/m <sup>2</sup>	250	1000	xx touwen
Overleving	%	90	90	variabel
Biomassa schelpdieren oogst	kg/vijver	750	420-850	pm

### 5.2 Schelpdier groei

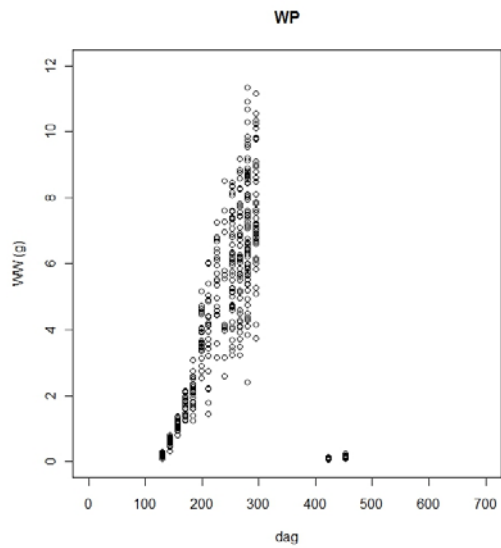
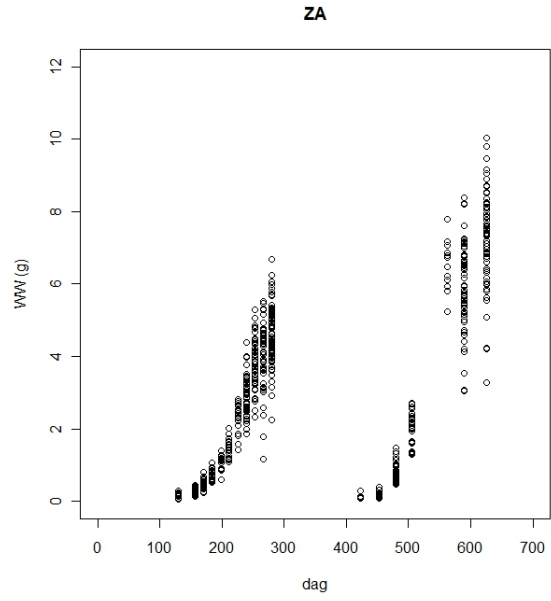
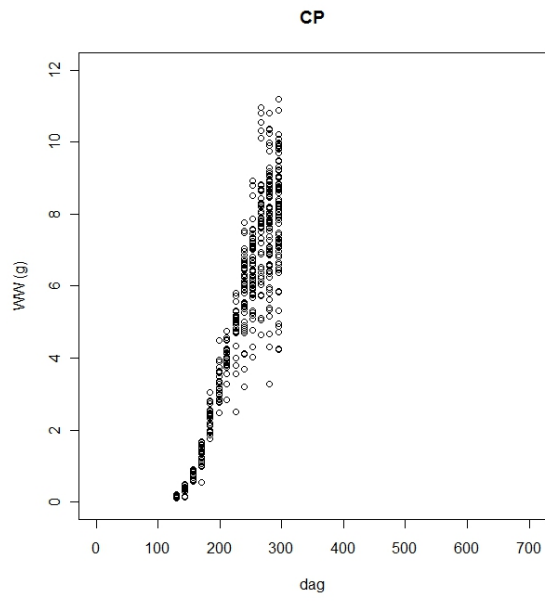
#### 5.2.1 Groei op basis van empirische gegevens

Door IMARES zijn gestandaardiseerde metingen uitgevoerd door tapijtschelpen in emmers op de bodem te plaatsen en met enige regelmaat lengte en natgewicht te bepalen. De groei in de pilots is gemeten op basis van bemonstering van dieren die ingegraven in de bodem leven. Voor de vergelijking van groeisnelheden in de pilots is ook gebruik gemaakt van mosselen; dit is gerapporteerd in bijlage 2; mosselen worden alleen in WP gekweekt. Voor de vergelijking van de gestandaardiseerde schelpdiergroei met de groei in de pilots wordt hier nader ingegaan op de tapijtschelp omdat die in CP en ZA zijn opgekweekt.

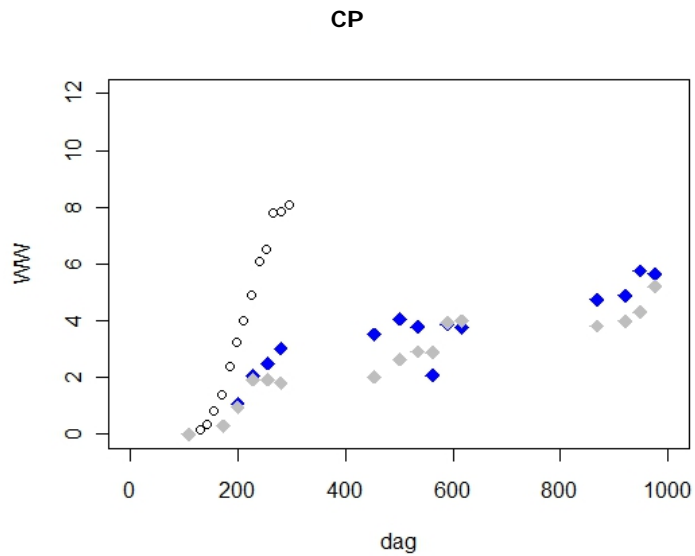




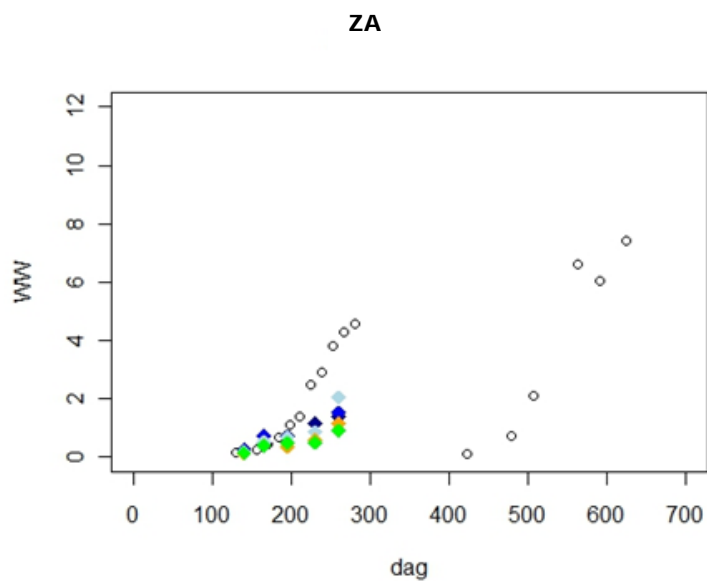
FIGUUR 5.5a: Metingen van **lengte** per individu (elke cirkel is een individu) verricht door IMARES bij de verschillende pilots (dag 0 = 1 januari 2011). Op 9 mei 2011 (dag 129) zijn op alle pilots jonge schelpdieren in emmers geplaatst. De groei van deze schelpdieren zijn tot 25 oktober 2011 (dag 295) gevolgd. Op 14 november 2011 is een nieuwe groep jonge schelpdieren uitgezet welke in de ZA-pilot tot 22 oktober 2012 (dag 625) zijn gevolgd, in de CP- en WP-pilot tot 1 mei 2012 (dag 451). De looptijd verschilt omdat in 2012 de aandacht is gericht op ZA vanwege beschikbare capaciteit.



FIGUUR 5.5b: Idem **natgewicht** (g) per individu (elke cirkel is een individu)



FIGUUR 5.6: Gemiddeld **natgewicht** (g) gemeten door IMARES (open cirkels), en de CP-pilot met steekbuis bemonstering in twee verschillende vijvers (vijver 1: blauw (dezelfde vijver als de emmers van IMARES) vijver 7: grijs). dag 0 = 1 januari 2011



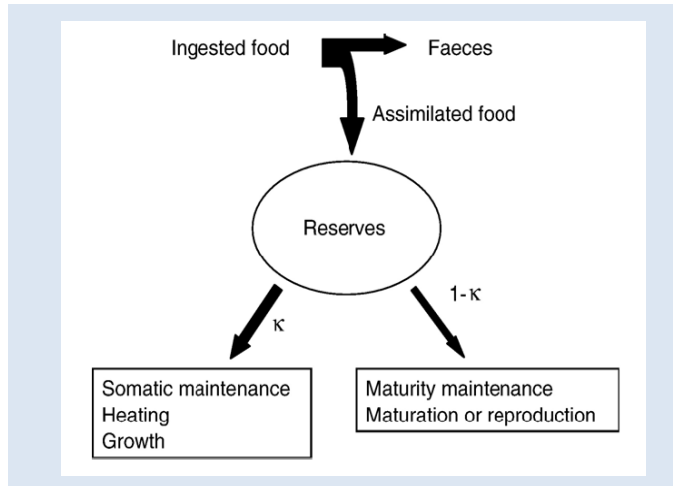
FIGUUR 5.7: Gemiddeld **natgewicht** (g) gemeten door IMARES (open cirkels), en de ZA-pilot met steekbuis bemonstering in 5 verschillende vijvers (dag 0 = 1 januari 2011).

Vergelijking van experimentele metingen uit emmers met de metingen van ingegraven schelpdieren laat zien dat de experimentele schelpdieren in de emmers beter gegroeid waren dan de ingegraven schelpdieren. In zowel de CP als de ZA-pilot waren de experimentele individuen (emmers) in november meer dan twee keer zo zwaar dan de ingegraven individuen (zie figuur 5.6 en 5.7).

### 5.2.2 Groei gesimuleerd met het DEB model

Groei van schelpdieren, afhankelijk van voedselbeschikbaarheid, temperatuur en beïnvloed door reproductie, kan beschreven worden met een Dynamic Energy Budget model. Aan de hand van literatuurgegevens en experimentele data wordt dmv een fitting-procedure parameters geschat voor een

specifieke soort. Voor tapijtschelpen is een DEB-model met parameterschattingen online beschikbaar (Fly Sainte Marie, 2007). Deze modellen zijn gebruikt om met behulp van dataseries van temperatuur en chlorofyl concentraties groei van schelpdieren te beschrijven en te voorspellen. Hierbij wordt een allocatie van energie aangenomen (kappa-regel, zie figuur 4) die er o.a. voor zorgt dat reproductieve massa (gonaden) opgebouwd wordt al voordat maturatie intreedt.

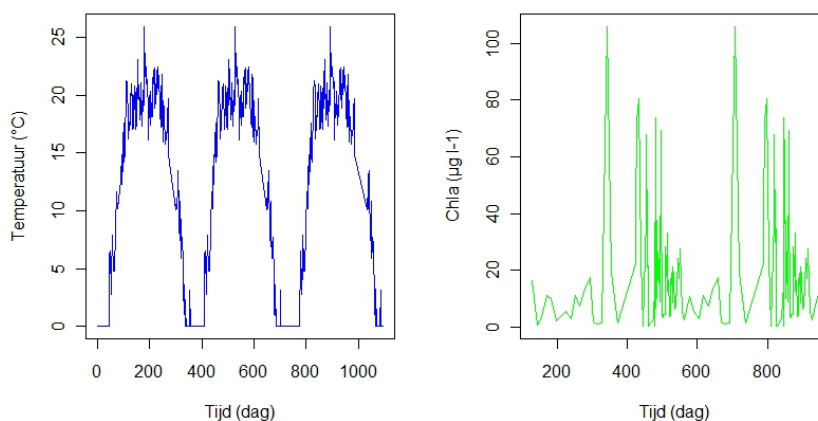


FIGUUR 5.4:

Schematische weergave van de kappa-regel in het DEB-model (uit: v.d. Meer 2006). Deel van het opgenomen voedsel wordt geassimileerd, de rest verdwijnt als faeces. Het geassimileerde wordt opgenomen in de reserves. Een vaste proportie kappa van de flux uit de reserves wordt gependend aan onderhoud en groei, en de rest (1-kappa) wordt gependend aan maturatie (in het geval van embryo's en juvenielen) of reproductie (voor adulten), en onderhoud van reproductieve organen en onderdelen.

#### Invoerdata: Chlorofyl en temperatuur reeksen

Op de WP-pilot is online iedere 8 minuten temperatuur gemeten in de schelpdierputten. Deze tijdserie is vereenvoudigd door per dag de gemiddelde temperatuur tussen 9 uur 's ochtends en 17 uur 's avonds te nemen (zie figuur voor resulterende tijdserie over 3 jaar). IMARES heeft in de experimentele vijver van ZA tussen 9 mei 2011 en 5 september 2012 tenminste elke 2 weken chlorofyl a gemeten mbv een spectrofotometer. Deze tijdserie is t.b.v. de modellering uitgebreid door vanaf 5 september 2012 dag (nr 600) de tijdserie vanaf 5 september 2011 te herhalen (fig 5.8). Deze tijdseries zijn gebruikt als forcing functions in het model. Aangenomen is dus dat de CP data voor temperatuur en de ZA data voor chlorofyl representatief zijn voor alle pilots

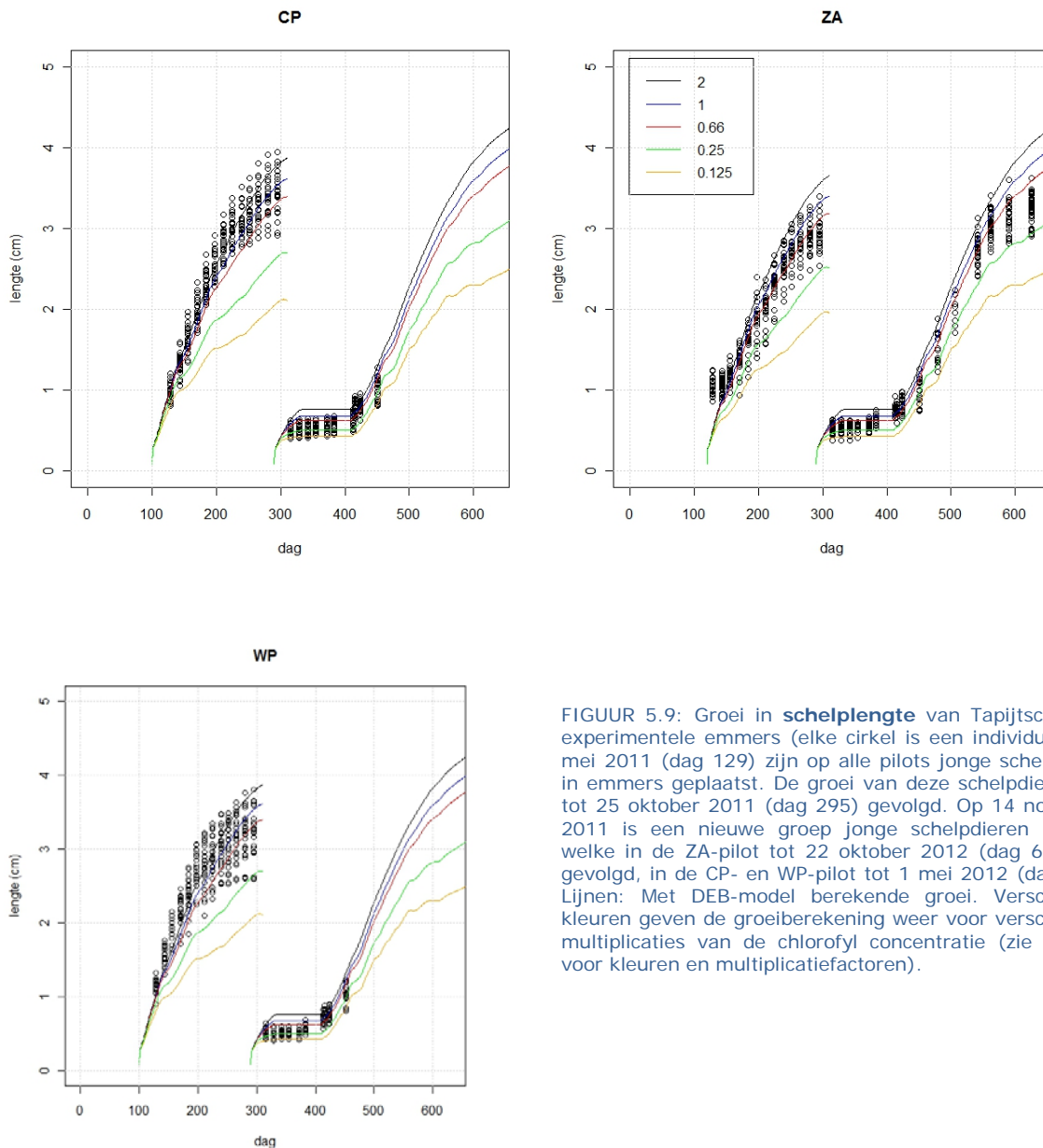


FIGUUR 5.8: tijdserie van Temperatuur (WP-pilot) en Chlorofyl a (ZA-pilot).

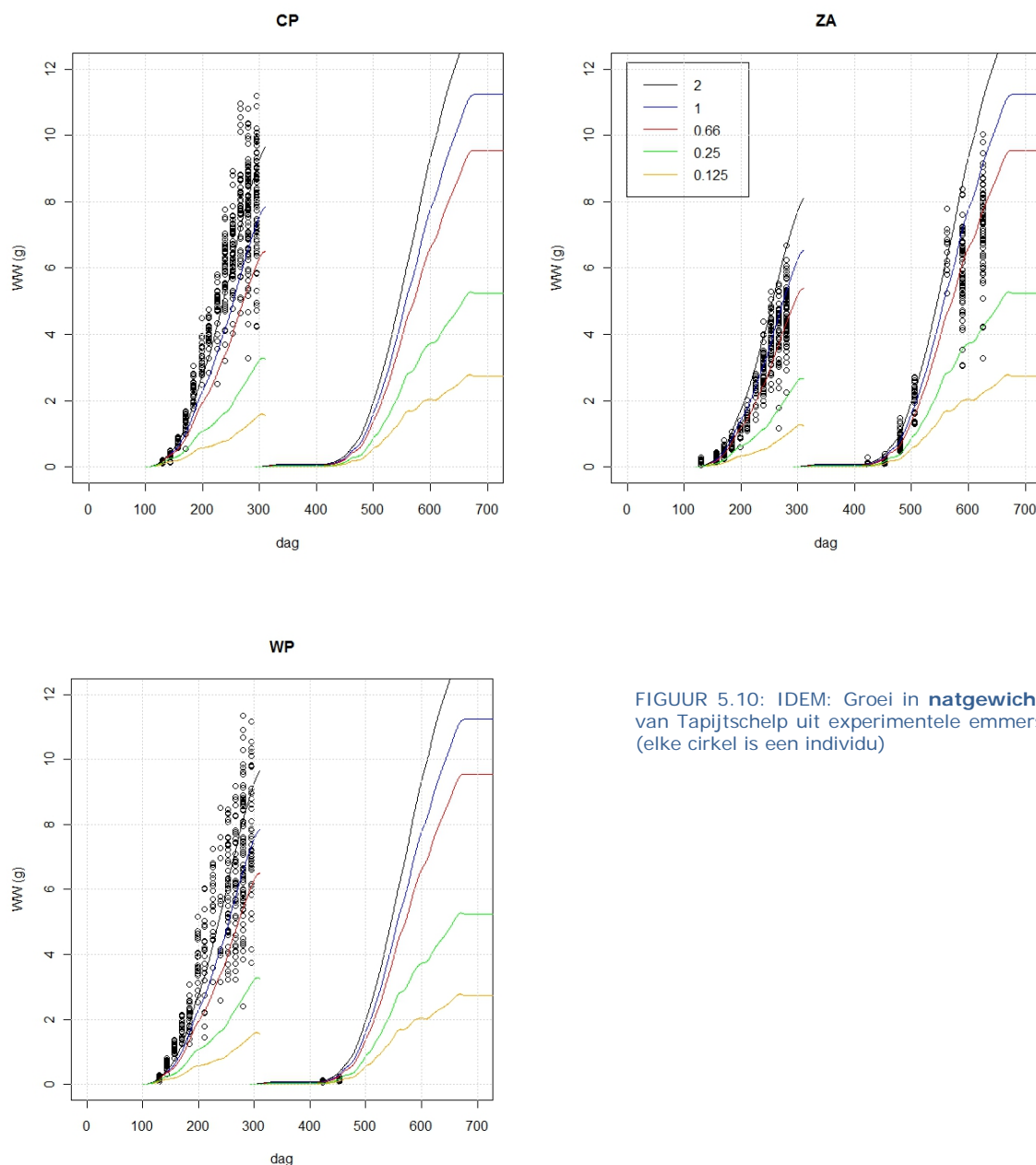
#### DEB-groei

Afname van algenconcentratie tussen begin en einde van de vijver wordt in de ZA-pilot ingeperkt door menging (verschillende toevoerpunten van algenwater) over de lengte van de vijver. Echter, het beheer is er ook op gericht een minimale hoeveelheid algen uit te spoelen aan het einde van de schelpdiervijver, wat er in resulteert dat de gemiddelde concentratie over de gehele vijver zo'n 66% van de maximale toevoer concentratie was. Wanneer we deze gemiddelde concentratie toepassen in het DEB-model blijkt

de groei in lengte en natgewicht in de ZA-pilot beter te worden beschreven dan met de invoerconcentratie. Hoewel bij de andere pilots (CP en WP) de plaatselijke chlorofyl *a* concentratie niet gebruikt is om de groei te berekenen met het model, blijkt de berekende groei overeen te komen met de metingen (zie figuur 5.9). Wel valt op te merken dat vooral de experimentele schelpdieren uit de CP-pilot iets sneller zijn gegroeid dan berekend op basis van chlorofyl *a* concentratie uit de ZA-pilot (vooral in natgewicht, zie figuur 5.10). Dit kan mogelijk worden verklaard doordat de schelpdieren in de ZA-pilot na de eerste twee weken zijn uitgewaaid uit de emmer waardoor vervanging voor deze individuen gevonden moest worden in een opslag van schelpdieren die waarschijnlijk een voedseltekort hebben ondergaan. Het begin van de groei van ZA-individuen is daardoor niet alleen vertraagd (opgevangen in het model door een latere start vd groeicurve), maar de groei zelf is ook enigszins vertraagd omdat de in de opslag uitgeputte reserves eerst aangevuld moesten worden.



FIGUUR 5.9: Groei in **schelpenlengte** van Tapijtschelp uit experimentele emmers (elke cirkel is een individu). Op 9 mei 2011 (dag 129) zijn op alle pilots jonge schelpdieren in emmers geplaatst. De groei van deze schelpdieren zijn tot 25 oktober 2011 (dag 295) gevolgd. Op 14 november 2011 is een nieuwe groep jonge schelpdieren uitgezet welke in de ZA-pilot tot 22 oktober 2012 (dag 625) zijn gevolgd, in de CP- en WP-pilot tot 1 mei 2012 (dag 451). Lijnen: Met DEB-model berekende groei. Verschillende kleuren geven de groeiberekening weer voor verschillende multiplicaties van de chlorofyl concentratie (zie legenda voor kleuren en multiplicatiefactoren).



FIGUUR 5.10: IDEM: Groei in **natgewicht** van Tapijtschelp uit experimentele emmers (elke cirkel is een individu)

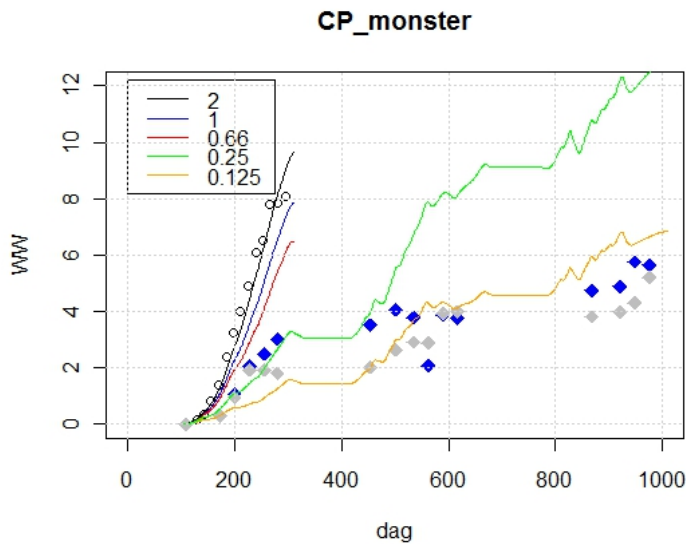
### 5.2.3 Mogelijke oorzaken voor achterblijvende groei

Met het model zijn twee alternatieve scenario's onderzocht die de verschillen tussen groei in de emmers en in de bodem zouden kunnen verklaren. Ten eerste is gekeken naar de mogelijkheid dat verschil in chlorofyl a concentratie tot een verschil in groei leidt tussen de hoger (30cm) in de waterkolom geplaatste individuen in emmers en de individuen in de bodem van de vijver. Ten tweede is gekeken naar de mogelijkheid dat individuen in de bodem meer last van elkaar hadden (meer competitie voor voedsel) dan de individuen in de emmers.

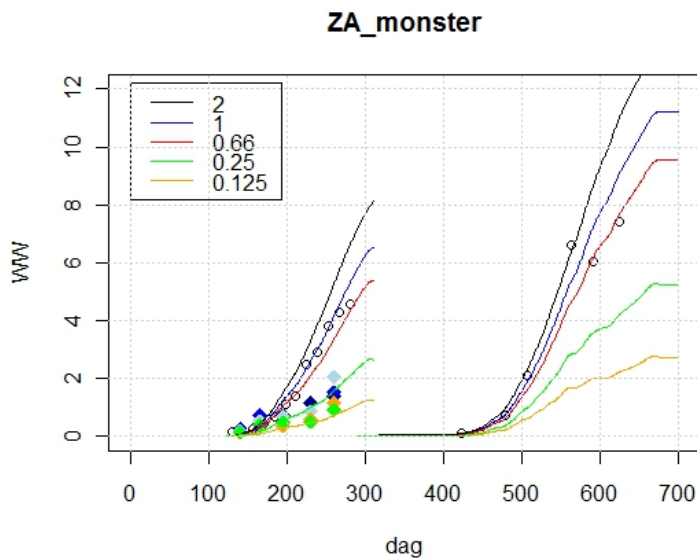
#### *Voedselbeschikbaarheid*

In de CP- en ZA-pilot is de stroming voornamelijk horizontaal gericht van ingang naar uitgang, wat mogelijk het vormen van een bodemgrenslaag (benthic boundary layer BBL) en bijgevolg lokale uitputting van de voedselbeschikbaarheid op de bodem van de vijver kan veroorzaken. Of een lagere chlorofyl concentratie veroorzaakt door de BBL oorzaak is van de achterblijvende groei van individuen in de vijver is getest in het DEB-model door de groei te berekenen met meer en minder voedselaanbod in de vorm van chlorofyl, vermenigvuldigd met resp 2, 0.66, 0.25 en 0.125. Figuur 5.11 laat zien dat de groei

berekend met een lagere concentratie chlorofyl a nog steeds de groei niet goed beschrijft; waar de groeicurve eerst een onderschatting vormt, is het later een overschatting van het gemeten gewicht. Voor de bemonsterde individuen uit de ZA-pilot lijkt een lagere concentratie chlorofyl a wel een mogelijke verklaring (Fig 5.12), maar hier is de tijdserie te beperkt.



FIGUUR 5.11: Gemiddeld (per meetmoment) natgewicht (g) gemeten door IMARES (open cirkels), en de CP-pilot met steekbuis bemonstering in twee verschillende vijvers (vijver 1: blauw (dezelfde vijver als de emmers van IMARES) vijver 7: grijs). dag 0 = 1 januari 2011. Lijnen: Met DEB-model berekende groei. Verschillende kleuren geven de groeiberekening weer voor verschillende multiplicaties van de chlorofyl concentratie.

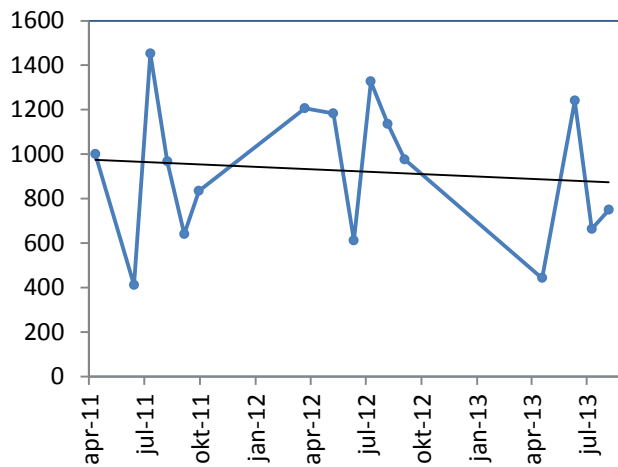


FIGUUR 5.12: Gemiddeld (per meetmoment) natgewicht (g) gemeten door IMARES (open cirkels), en de ZA-pilot met steekbuis bemonstering in 5 verschillende vijvers (dag 0 = 1 januari 2011). Lijnen: Met DEB-model berekende groei op basis van temperatuur (WP-pilot) en chlorofyl a (ZA-pilot). Verschillende kleuren geven de groeiberekening weer voor verschillende multiplicaties van de chlorofyl concentratie.

### Dichtheidsafhankelijkheid + BBL

Het experiment met de emmers was bedoeld om de groei van schelpdieren te volgen in vergelijkbare omstandigheden als de rest van de vijver. De gedachte was om de dichtheid van de meeste vijvers na te bootsen (500ind/m<sup>2</sup>). In de CP-pilot lag er in 2011 echter een initiële dichtheid in vijver 1 van 1000

ind/m<sup>2</sup> (figuur 5.13). In de gehele vijver zijn in 2011 nog 1000 ind/m<sup>2</sup> bijgezaaid, dus de dichtheid was duidelijk hoger dan in de emmers, waarvan er in totaal 20 waren geplaatst



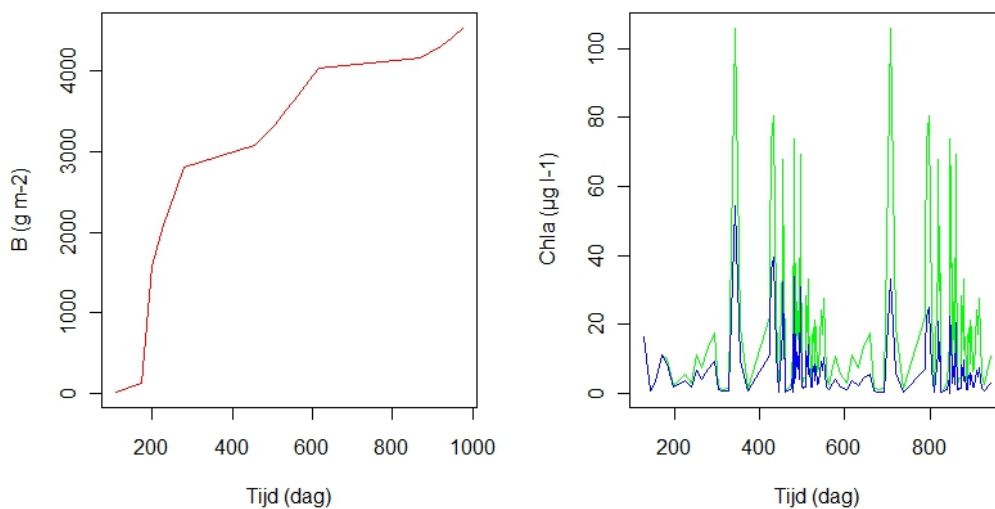
FIGUUR 5.13: Dichtheid (aantal/m<sup>2</sup>) berekend uit steekbuismonsters in CP-pilot vijver 1.

In de CP-pilot zijn gedurende het verloop van de kweekperiode van tapijtschelp tussen 11 april 2011 en 6 augustus 2013 steekbuismonsters van o.a. vijver 1 genomen (dezelfde vijver waarin de experimentele emmers stonden) om met metingen aan gewicht per individu en aantal individuen tot een biomassa te komen). De biomassa ontwikkeling is vervolgens gesmootherd tussen oplopende biomassa-metingen (biomassa metingen die een lagere biomassa aangaven dan in eerdere metingen zijn verwijderd, zie figuur 5.14). Dit is gebruikt om de Chl a metingen van de instroom om te rekenen naar de chlorofyl concentratie in de vijver:

$$Y = Chl_a - 0.75 * Chl_a * B / B_{max}$$

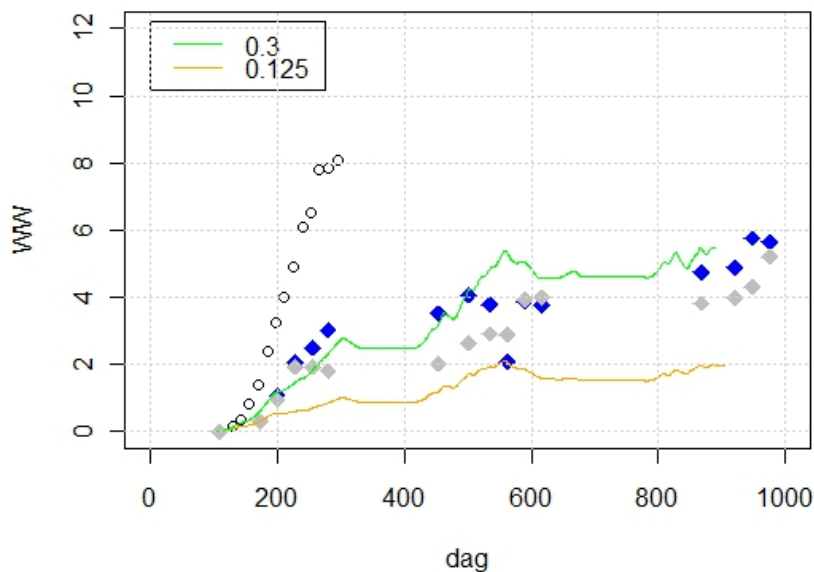
waarbij B<sub>max</sub> de biomassa is aan het eind van de biomassaontwikkeling.

De waarde Y geeft het effect van dichtheid weer op de afname in chlorofyl t.o.v. dat wat er in de vijver stroomt.



FIGUUR 5.14: Biomassa ontwikkeling op basis van gemeten biomassa in CP-pilot (steekbuismonsters) en dichtheidsafhankelijke aanpassing (y=blauw zie eq 1) op originele chlorofyl a concentratie (groen).





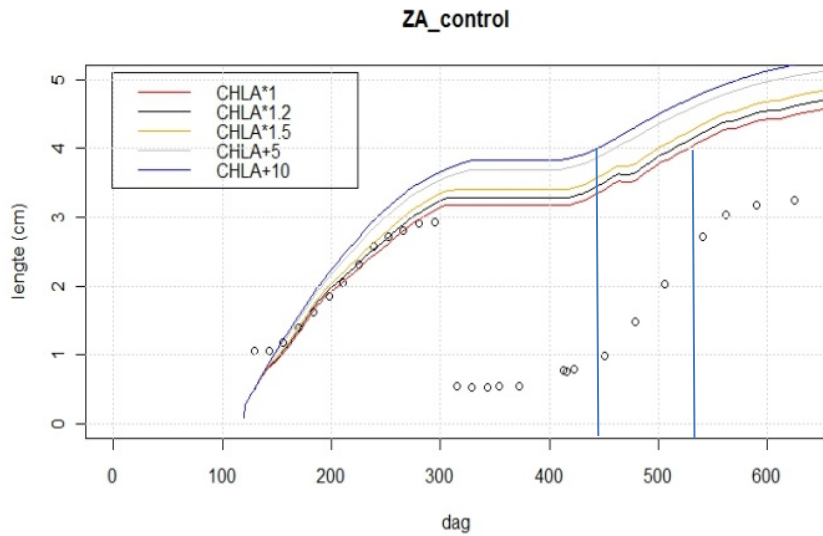
FIGUUR 5.15: Gemiddeld (per meetmoment) natgewicht (g) gemeten door IMARES (open cirkels), en de CP-pilot met steekbuis bemonstering in twee verschillende vijvers (vijver 1: blauw (dezelfde vijver als de emmers van IMARES) vijver 7: grijs). dag 0 = 1 januari 2011. Lijnen: Met DEB-model berekende groei met ingebouwde dichtheidsafhankelijkheid (eq 1). Verschillende kleuren geven de groeiberekening weer voor verschillende multiplicaties van de chlorofyl concentratie.

Uit figuur 5.11 is op te maken dat enkel met een verticale gradiënt in chlorofyl concentraties de vertraging in groei niet beschreven kan worden door het model. Figuur 5.15 laat zien dat als er in het model ook rekening wordt gehouden met een toenemende competitie tussen de schelpdieren als gevolg van toenemende biomassa, vertaald in extra afname van chlorofyl (Fig 5.14), de afname in groeisnelheid met de tijd beter kan worden beschreven: de groene lijn in fig 5.15.

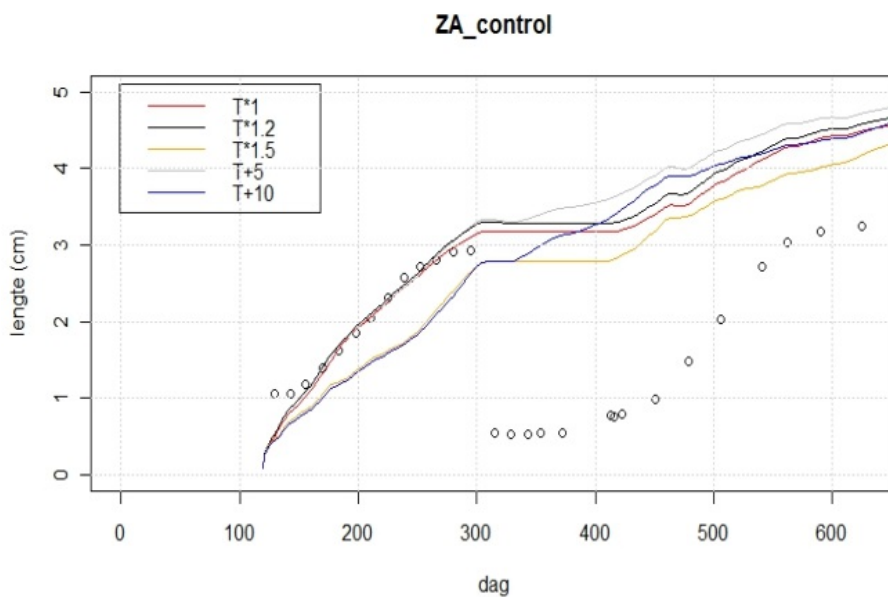
### 5.3 Groei scenarios

Uit modelberekeningen met verschillende scenarios voor chlorofyl en temperatuur (respectievelijk figuur 5.16 en 5.17) blijkt dat voedselaanbod in de ZA vijvers niet limiterend is in de winter. Een temperatuurverhoging in de wintertijd kan een doorgroei tijdens de winter tot gevolg hebben ook bij lage chlorofyl concentraties (figuur 5.17, T+5 en T+10). Tijdens de zomer wordt echter de bovengrens van toelaatbare temperatuur al benaderd, zodat een verhoging van de temperatuur daar leidt tot een verlaging van groei.

Chlorofyl concentratie in de zomer bepaalt de groeisnelheid in die periode. Te zien is in figuur 5.16 dat als het voedselaanbod hoger is de uiteindelijke groei tot 4 cm met zo'n 80 dagen kan verkorten. Belangrijk hierbij op te merken is dat de beste methode om voedselaanbod op te schroeven niet is door de gemiddelde chlorofyl concentratie te verhogen, maar vooral door het voorkomen van lage concentraties te vermijden.



FIGUUR 5.16: Effect van chlorofyl *a* aanpassingen op groei. Verschillende kleuren geven de groeiberekening weer voor verschillende multiplicaties van de chlorofyl concentratie: CHL\*1,2; \*1,5; +5 en + 10. De horizontale lijnen geven de reductie in groeitijd aan bij toename van de voedselhoeveelheid.



FIGUUR 5.17: Effect van temperatuur aanpassingen op groei. Verschillende kleuren geven de groeiberekening weer voor verschillende multiplicaties van de temperatuur: T\*1,2; \*1,5; +5; + 10

## 5.4 Schelpdierproductie

Op basis van de gestandaardiseerde groei metingen in de emmers kan een berekening worden gemaakt van potentiële productie op vijver niveau. Volgens het DEB-model is er 400-490 dagen na inzaaien (afhankelijk van moment van inzaaien, begin mei en begin november, respectievelijk) een oogstbaar gewicht van 10 gram per stuk. Het hangt van de overleving af welk deel van de ingezaaide voorraad aan het eind nog aanwezig is. De sterfte van Tapijtschelpen is over het algemeen minder dan 10 % met uitzondering van enige incidentele sterfte in 2 vijvers van ZA. De uitgeteste uitzaaidichtheden variëren van 250 tot 2000 per m<sup>2</sup>. Bij CP wordt nu uitgegaan van 250/m<sup>2</sup> en bij ZA van 1000/m<sup>2</sup>. De opbrengst bij een bepaalde dichtheid hangt o.a. af van de voedselbeschikbaarheid. Met het BBL model kan de

voedseldepletie worden berekend als functie van de dichtheid, dit is weergegeven in fig 5.18 onder aanname van een stroomsnelheid van 0,2 cm/s, die behoort bij een debiet van 285 m<sup>3</sup> per dag, dwz 2m<sup>3</sup>/kg/week. Om voedseluitputting tegen te gaan kan het debiet worden verhoogd (zie fig 4.1).

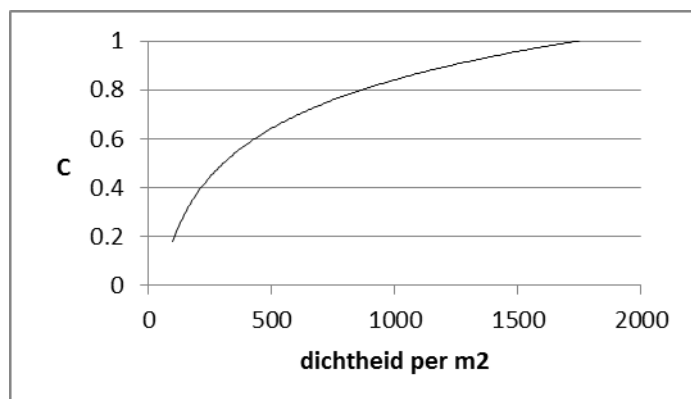


Fig 5.18. Berekende voedseluitputting (C) als functie van de dichtheid, bij een stroomsnelheid van 0.2 cm/s (zie par 4.1.4)

Uit de ervaringen van de pilots blijkt dat een productie van 420 – 850 kg per vijver mogelijk is bij ZA en 750 kg bij CP, bij een oppervlakte van resp 100 en 1000 m<sup>2</sup> per vijver. Voor WP zijn nog geen oogstgegevens beschikbaar.

Tabel 5.3 Groeisnelheid tapijtschelpen en mosselen in de verschillende pilots in 2011

pilot	soort	type data	looptijd	groei lengte	s.d (n)	groei versgewicht	s.d(n)
				mm/week		g/week	
CP	mossel	imares monitoring	mei-sep 2011	0.17	0.13 (9)	0.1	0.07(10)
	tapijtschelp	imares monitoring	mei-sep 2011	1.15	0.38 (9)	0.36	0.13(10)
WP	mossel	imares monitoring	mei-sep 2011	0.28	0.14 (9)	0.16	0.08(8)
	tapijtschelp	imares monitoring	mei-sep 2011	1.01	0.33(10)	0.32	0.12(9)
ZA	tapijtschelp	ZA metingen	mrt-sep	0.67	0.11(3)	0.11	0.03 (3 batches)
	mossel	imares monitoring	juni-sep 2011	0.16	0.14 (10)	0.07	0.07 (9)
	tapijtschelp	imares monitoring	juni-sep 2011	1.02	0.29 (8)	0.22	0.06 (7)

In tabel 5.3 zijn de gemeten groeisnelheden weergegeven bij de verschillende pilots, zowel de gestandaardiseerde metingen als de metingen door de pilots. Daaruit blijkt dat een groeisnelheid van tapijtschelpen van ruim 0.3 gram en 1 mm per week mogelijk is; indien deze groeisnelheid gehandhaafd kan worden levert dit binnen 1 jaar een oogstbaar gewicht van ca 10 g met een lengte van 35 mm. Deze waarden sluiten aan bij gegevens uit de literatuur, zie Solidoro et al, 2000, 2003 voor berekeningen op basis van modellen. In China heeft men groeisnelheden gemeten van ca 0.6 mm/week onder veldomstandigheden (Zan et al, 2014). Indien door verdere optimalisatie een hogere groeisnelheid kan worden bereikt bij een dichtheid van 1000/m<sup>2</sup> en een goede overleving, is een oogst van 10 kg/m<sup>2</sup> mogelijk binnen 1 jaar

## 6. Conclusies

Het onderzoek naar factoren die van belang zijn voor de kweek van schelpdieren in vijversystemen is gericht op de onderdelen voeding, groei en productie.

### *Voeding*

De oorspronkelijke vraag was gericht op de voedingswaarde van algen voor schelpdieren en op de vraag hoe hoogwaardige algen kunnen worden geproduceerd. Onderzocht is welke factoren de voedingswaarde voor schelpdieren bepalen. De hypothese was dat met name de omega 3 en 6 vetzuursamenstelling de kwaliteit bepalen; het gaat dan om EPA, DHA en ARA. Uit het promotieonderzoek van I. Batista komt naar voren dat met name EPA essentieel is voor schelpdiergroei, gemeten aan kokkels, en dat DHA wat minder van belang is, terwijl ARA niet essentieel is. Diatomeeën zoals *Skeletonema costatum*, *Chaetoceros muelleri* en *Phaeodactylum tricornutum* en ook de flagellaat *Tetraselmis suecica* bevatten relatief veel EPA. Gebleken is dat groei van schelpdieren op *Chaetoceros* achter bleef omdat de afmetingen te gering waren voor goede opname. Groei op dieet van *Phaeodactylum* bleef achter na een eerste periode met goede groei. De meest kansrijke soorten zijn dus *Skeletonema* en *Tetraselmis*. De algenkweek in open raceway systemen heeft zowel in batch als in doorstroom een gemiddelde levensduur van enkele weken. Uit de ervaringen bij de pilots blijkt eveneens dat het goed mogelijk algen te kweken in open systemen maar dat de levensduur beperkt is. Dit betekent dat het in stand houden van algencultures in de bestaande systemen nog (te) veel tijd kost.

### *Groei*

De groei van tapijtschelpen en mosselen is gemeten onder de omstandigheden zoals die zich in de pilots hebben voorgedaan, dat wil zeggen met het gegeven voedselaanbod van de pilots. Gebleken is dat de groei in gestandaardiseerde monitor systemen niet sterk verschilde tussen de pilots. De metingen in de monitoring systemen lieten voor tapijtschelpen een hogere groeisnelheid zien dan in de bodem van de vijvers. Dit geeft aan dat er potentieel een hoge groeisnelheid mogelijk is, mits de voedseltoevoer maximaal is, in relatie tot de dichtheid en de onderlinge competitie. Met behulp van een groeimodel is berekend dat de groei bij de bodem wordt geremd door tekort aan voedsel. Door een combinatie van betere menging en lagere dichtheid zou er een hogere groeisnelheid mogelijk zijn, waardoor een marktwaardig formaat eerder wordt bereikt.

### *Productie*

De opbrengst aan schelpdieren – met name tapijtschelpen - wordt in de eerste plaats bepaald door de groei, aangezien er weinig sterfte is opgetreden in de vijversystemen, behoudens incidentele sterfte in enkele van de ZA vijvers. De gemeten groei in de ZA pilot is gerelateerd aan de voedseltoevoer, en de opbrengst verhoudt zich tot voedsel met een food conversion ratio (FCR) = 0.2 bepaald voor totaal vers gewicht; dit is een FCR van ca 1 voor het vleesgewicht. De totale productie bedroeg in de afgelopen 3 jaar 5 – 8 kg/m<sup>2</sup> op basis van een uitzaaidichtheid van 1000/m<sup>2</sup> en na een kweekperiode van > 1 jaar per cohort. De groei in de waterkolom heeft laten zien dat bij betere voedseltoevoer een opbrengst van 10 kg/m<sup>2</sup> haalbaar is binnen een jaar. Indien er efficiëntie winst kan worden geboekt is een hogere productie per tijdseenheid mogelijk.

De oorspronkelijke vraagstelling van het onderzoek kan nu als volgt worden beantwoord:

*Voeding: wat bepaalt de voedingswaarde van algen voor schelpdieren en hoe kunnen hoogwaardige algen worden geproduceerd*

De voedingswaarde van algen voor schelpdieren wordt bepaald door de opneembaarheid en de vetzuursamenstelling. De inheemse soorten *Skeletonema costatum* en *Tetraselmis suecica* voldoen aan de eisen voor schelpdierkweek. De productie wordt bepaald door een samenspel van factoren en blijkt in de open systemen een beperkte levensduur te hebben waardoor rekening moet worden gehouden met frequent herstarten.

### *Groei schelpdieren: wat is de respons van schelpdieren op diverse diëten*

De groei is afhankelijk van de hoeveelheid algen van de juiste kwaliteit, en dit wordt beïnvloed door de toevoersnelheid en de menging in de waterkolom. Verder speelt onderlinge voedselcompetitie een rol. Berekend kan worden welke toevoersnelheid nodig is bij een bepaalde vijver configuratie en schelpdierdichtheid, voor een voldoende voedselbeschikbaarheid. In de pilots is een FCR van 0.2 voor tapijtschelpen gerealiseerd.

### *Productie : wat bepaalt de opbrengst van algen- en schelpdierkweek onder praktijkomstandigheden*

De productie is vooral afhankelijk van uitzaaidichtheid en groei, want de overleving is geen beperkende factor, tenzij er pathogene infecties aan de orde zijn. Groei bij een bepaalde dichtheid wordt bepaald door de voedselbeschikbaarheid, en voor een aantal soorten, zoals de tapijtschelp en oester, mede door de wintertemperatuur. Productie per tijdseenheid kan verder worden geoptimaliseerd door de voedseltoevoer af te stemmen op de behoefte.

## **Kennislacunes**

Het huidige onderzoek laat zien dat er mogelijkheden zijn voor verdergaande optimalisatie van binnendijkse schelpdierkweek, en dat opbrengsten van 10 kg tapijtschelpen per m<sup>2</sup> haalbaar moeten zijn. Daarvoor moeten er nog wel praktische problemen worden opgelost en is er meer detail informatie over algen en schelpdierproductie nodig. Verder is meer achtergrondkennis nodig over samenstelling en kwaliteit van algen in vijversystemen en over optimalisatie van de benutting van algen door de schelpdieren

### *Algenproductie*

In de pilots is ervaring opgedaan met spontane algenproductie in de vijver van WP en bij CP. Ongestuurde algenkweek heeft als nadeel dat de productie niet maximaal is en dat er bijgemest moet worden, zoals bij CP is gebleken. De ervaring bij WP leert dat er andere soorten tot ontwikkeling kunnen komen zoals draadwier. Dat roept de vraag hoe ongewenste bloeien zijn te bestrijden. Naast extensieve algenkweek is er bij ZA ervaring opgedaan met gestuurde algenkweek. Een van de hoofdvragen bij deze systemen betreft de levensduur van een algenkweek. In de gebruikte open systemen is de levensduur van een algenkweek beperkt en stort de cultuur op zeker moment in. Over de oorzaken daarvan en de omstandigheden waaronder deze zich manifesteren is wel bekend dat er vaak infecties met andere organismen (ciliaten, zooplankton) optreden, maar niet duidelijk is hoe dit kan worden voorkomen of uitgesteld. Een van de vragen is in hoeverre de kwaliteit van een cultuur na enige tijd achteruit gaat, zodat ze gevoeliger worden voor infecties. Verder is de vraag hoe de dosering is te optimaliseren, en hoe fluctuaties in voedselaanbod kunnen worden ingeperkt.

Er is nog weinig bekend van de omvang van nutriënten teruglevering na begrazing van de algen. Dit is in principe een belangrijke post in het nutriënten budget, aangezien maar een klein deel van het afgefilterde voedsel in schelpdierbiomassa wordt omgezet, en er dus een groot deel als faeces, pseudofaeces en opgeloste nutriënten terug in het systeem komt. De vraag is hoe dit effectief in nieuwe algen kan worden omgezet.

Wat betreft de kwaliteit van de algen is er kennis nodig van de kweekomstandigheden die de vorming van essentiële vetzuren bevorderen. Het realiseren van een hoge kwaliteit algen vereist nader onderzoek.

### *Schelpdierproductie*

Een belangrijke waarneming betreft de trage groei van ingegraven schelpdieren ten opzichte van de groei in monitoringsystemen boven de bodem. Nader onderzoek is nodig naar de voedseluitputting dicht bij de bodem en hoe dit kan worden voorkomen of gereduceerd, en wat de optimale dichtheid is bij een bepaalde menging.

In de pilots is de kweek vooral gericht op tapijtschelpen en mosselen, hoewel er ook enkele anderen soorten zoals de Japanse en de platte oester en de fijne tapijtschelp (*Tapes decussatus*) zijn getest. De kweek van deze en andere hoogwaardige soorten biedt mogelijk een beter rendement, maar dat zal

verder onderzocht moeten worden. In samenhang hiermee zijn andere kweekmethodieken nader te onderzoeken, waarbij van de gecontroleerde kweek gebruik gemaakt voor een bepaalde levensfase, in combinatie met kweek in het buitenwater, bijvoorbeeld voor de nursery fase of voor de afmestfase.

De kweek onder gecontroleerde omstandigheden op basis van uitgangsmateriaal uit een broedhuis, zoals bij de pilots het geval is, biedt een breed scala aan mogelijkheden voor veredeling van de soorten en de selectie op basis van bepaalde geprefereerde eigenschappen. Dit is een relatief nieuwe tak in de schelpdiercultuur, die traditioneel in het buitenwater wordt uitgevoerd. De verdere ontwikkeling van gecontroleerde kweek kan op velerlei manieren gebruik maken van kennis over veredeling, selectie en houderij die in de dierwetenschappen voorhanden is.

## 7. Referenties

- Badillo-Salas, C.E., Valenzuela-Espinoza, E., González-Gómez, M.A., Pares-Sierra, G., Ley-Lou, F. & Garcia-Esquivel, Z. (2009) Comparative growth of Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) postlarvae with microfeed and microalgal diets. *Aquaculture International*, 17, 173-186.
- Brown, MR., Jeffrey, SW., Volkman, JK., Dunstan, GA., 1997. Nutritional properties of microalgae for mariculture. *Aquaculture* 151, 315-331.
- Day, JD., Edwards, AP., Rodgers, GA., 1991. Development of an industrial-scale process for the heterotrophic production of a micro-algal mollusk feed. *Biosource Technology* 38: 245-249.
- Donalson, J., 1991. Commercial production of microalgae at Coast Oyster Company. Proceeding of US-Asia Workshop on Rotifer and microalgae Culture, Honolulu, Hawaii. The Oceanic Institute, HI, USA, pp. 229-236.
- Eppley RW, 1972 Temperature and phytoplankton growth in sea. *Fishery Bulletin* 70: 1063-1085
- Espinosa, E.P., and Bassem Allam, (2006), Comparative Growth and Survival of Juvenile Hard Clams, *Mercenaria mercenaria*, Fed Commercially Available Diets, *Zoo Biology* 25:513–525
- Flye-Sainte-Marie, J., Fred Jean a, □, Christine Paillard a, Susan Ford b, Eric Powell b, Eileen Hofmann c, John Klinck, 2007. Ecophysiological dynamic model of individual growth of *Ruditapes philippinarum*. *Aquaculture* 266: 130-143
- Gautier, D., 1994. Culture des Microalgues en Bassins Estérieurs - Principes et méthodes de production en masse des microalgues utilisées en aquaculture (étude bibliographique). IFREMER, pp. 17.
- P. Gouilletquer, M. Heral, J. M. Deslous-Paoli, J. Prou, J. Garnier, D. Razet et W. Boromthanarat, 1989. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 1989, Vol. 132, pp. 85-108. Ecophysologie et bilan energetique de la palourde japonaise d'élevage *Ruditapes philippinarum*
- Hansen, P.J., 2002. Effect of high pH on the growth and survival of marine phytoplankton: implications for species succession. *Aquatic Microbial Ecology* 28, 279-288.
- Hoff, F.H., Snell, T.W., 1987. Plankton culture manual. Florida Aqua Farms, Inc., 162 pp.
- Jansen, HM Henrice M. Jansen, Øivind Strand, Marc Verdegem, Aad Smaal, 2012. Accumulation, release and turnover of nutrients (C-N-P-Si) by the blue mussel *Mytilus edulis* under oligotrophic conditions. *JEMBE* 416-417: 185 – 195
- Kamermans, P., A. Blanco, E. Brummelhuis, A. Smaal (2009), Zeeuwse Tong Deelproject 8: Binnendijkse schelpdierkweek, Rapport C043/09
- Ketelaars J (red), 2013. Perspectief voor binnendijkse kweek. Eindrapport Zeeuwse Tong, St Zeeuwse Tong.
- Ketelaars J & S Ruizeveld de Winter, 2013. Toekomstperspectief voor een gemend zilt bedrijf. Zeeuwse Tong rapport.
- Knauer, J., Southgate, PC., 1999. A review of the nutritional requirements of bivalves and the development of alternative and artificial diets for bivalve aquaculture. *Reviews in Fisheries Science* 7 (3-4), 241-280
- Lefebvre, S., Probert, I., Lefrancois, C., Hussenot, J., 2004. Outdoor phytoplankton continuous culture in a marine fish-phytoplankton-bivalve integrated system: combined effects of dilution rate and ambient conditions on growth rate, biomass and nutrient cycling. *Aquaculture* 240, 211-241.
- McGinnis, K.M., Dempster, T.A. & Sommerfeld, M.R. (1997) Characterization of the growth and lipid content of the diatom *Chaetoceros muelleri* 9, 19-24.
- 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.* 33(8): 921–927.
- Muller-Feuga, A., Robert, R., Cahu, C., Robin, J., Divanach, P., 2003a. Uses of microalgae in aquaculture. In: Strøttrup, J.G., McEvoy, L.A. (Eds.), *Live Feeds in Marine Aquaculture*. Blackwell Publishing, Oxford, UK. pp. 253-299.

- Muller-Feuga, A., Moal J., Kaas R., 2003b. The microalgae of aquaculture: In: Strøttrup, J.G., McEvoy, L.A. (Eds.), *Live Feeds in Marine Aquaculture*. Blackwell Publishing, Oxford, UK. pp. 206-251
- Nevejan, N., Davis, J., Little, K. & Kilonia, A. (2009) Use of a formulated diet for mussel spat *Mytilus galloprovincialis* (Lamarck 1819) in a commercial hatchery. *Journal of Shellfish Research*, 26, 357-363.
- De Pauw, N., Verboven, J., Claus, C., 1983. Large-scale microalgae production for nursery rearing of marine bivalves. *Aquacultural Engineering* 2, 27-27.
- De Pauw, N., Morales, J. & Persoone, G. (1984) Mass culture of microalgae in aquaculture systems: Progress and constraints. *Hydrobiologia*, 116-117, 121-134
- Prins T.C. & A.C. Smaal, 1989. Carbon and nitrogen budgets of the mussel *Mytilus edulis* L. and the cockle *Cerastoderma edule* L. in relation to food quality. *Scientia Marina* 53: 477 - 482.
- Reis Batista I. (2006) Outdoor mass production of marine diatoms with ground water from Roem van Yerseke, The Netherlands. IMARES Student Report 06.016
- Reis Batista I, A Blanco Garcia, P van Dalen, P Kamermans, M C J Verdegem, A C Smaal. Culturing *Chaetoceros muelleri* using simplified mediums-effects on longevity and production. In prep
- Reis Batista I, P Kamermans, M C J Verdegem, A C Smaal (submitted) Formulation of a live microalgae diet for shellfish culture using linear programming. *Aquaculture Research*.
- Reis Batista I, P Kamermans, M C J Verdegem, A C Smaal (2013) Growth and fatty acid composition of juvenile *Cerastoderma edule* (L.) fed live microalgae diets with different fatty acid profiles. *Aquaculture Nutrition*.
- Reis Batista I, P Kamermans, M C J Verdegem, P Soudant, A C Smaal. Dietary study on *Cerastoderma edule* juveniles: growth and fatty acids metabolism. In prep
- Robert, R., 1998. Nutritional inadequacy of *Nannochloris atomus* and *Stichococcus bacillaris* for the oyster *Crassostrea gigas* (Thunberg) larvae. *Haliotis* 27, 29-34
- Richmond, A., 1986. Outdoor mass cultures of microalgae. In: Richmond, A. (Ed.), *Handbook of microalgal mass culture*. CRS Press, pp. 528.
- Robert R., Trintignac P. (1997) Substitutes for live microalgae in mariculture: a review. *Aquatic Living resources* 10, 315-327
- Robert, R., Chrétiennot-Dinet, M.J., Kaas, R., Martin-Jézéquel, V., Moal, J., Le Coz, J.R., Nicolas, J.L., Bernard, E., Connan, J.P., Le Dean, L., Gourrierec, G., Leroy, B., Quéré, C., 2004. Amélioration des productions phytoplanctoniques en éclosion de mollusques : caractérisation des microalgues fourrage, RI DRV/RA-2004-05, 149 pp.
- Spencer, B.E. (2002) General biology of bivalves with respect to cultivation In *Molluscan shellfish farming* (Spencer, B.E. ed.). Fishing News Books.
- Smaal AC, J.H.G. Verhagen, J. Coosen & H.A. Haas, 1986. Interaction between seston quantity and quality and benthic suspension feeders in the Oosterschelde, the Netherlands. *Ophelia*, 26: 385-399.
- Solidoro, C. R. Padres<sup>2</sup>, D. Melaku Canu<sup>2</sup>, M. Pellizzato<sup>3</sup>, R. Rossi<sup>4</sup>, 2000. Modelling the growth of *Tapes philippinarum* in Northern Adriatic lagoons. *MEPS* 199: 137-148
- Solidoro Ca\*, D. Melaku Canu<sup>b</sup>, R. Rossi, 2003. Ecological and economic considerations on fishing and rearing of *Tapes philippinarum* in the lagoon of Venice. *Ecological Modelling* 170: 303–318
- Suzuki, Y., Takahashi, M., 1995. Growth responses of several diatom species isolated from various environments to temperature. *Journal of Phycology* 31, 880-888.
- Verschoore, J., 2013. Eindverslag mosselpilot KMWP Neeltje Jans, Zeeuwse Tong.
- Webb, KL., Chu, FLE. (1983). Phytoplankton as food source for bivalve larvae. In: Pruder, GD., Langdon, C.J., Conklin, DE. (Eds.), *Proceedings of the Second International Conference on Aquaculture Nutrition: Biochemical and Physiological Approaches to Shellfish Nutrition*. Louisiana State University, Baton Rouge, LA, pp. 272–291.
- Wildish, D.J. & D.D. Kristmanson, 1984. Importance to mussels of the benthic boundary layer. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 42: 1618-1625.
- ZAN Xiaoxiao, XU Binduo, ZHANG Chongliang, and REN Yiping\*, 2014. Annual Variations of Biogenic Element Contents of Manila Clam (*Ruditapes philippinarum*) Bottom-Cultivated in Jiaozhou Bay, China
- Zeeland Aquacultuur, 2013. Schelpdierpilots Zeeland Aquacultuur, eindrapportage Zeeuwse Tong



## 8. Overzicht studentenrapporten

Studenten rapporten zijn in overleg in te zien, na verzoek per mail: aad.smaal@wur.nl

### ZT Fase 1 (2007-2008)

- Ruizeveld de Winter A.C. 2007. Growth of cockles (*Cerastoderma edule*) on a diet of *Phaeodactylum tricornutum*: effect of cockle density and feeding level. Possibilities for land-based cockle culture. Report number 07.013
- Tramper, J. 2008. Buitencultuur van 6 inheemse algensoorten ten behoeve van binnendijkse kokkelweek. Intern IMARES rapport 08.015.
- Hemsing, V. 2008. Optimal algal diet for on-land juvenile cockle (*Cerastoderma edule* (L.)) growth. Intern IMARES rapport 08.017.

### ZT Fase 2 (2009-2013)

- Amin, M. 2010. Bioenergetic response of juvenile manilla clam *Tapes philippinarum* to different feeding types. MSc thesis AFI-WUR.
- Bezault R. 2012. Study on algae density in shellfish tank. Zeeland Sole project.
- Brinke J.L. ten 2012. Growth and nutrient budgets (C-N-P) of the manila clam *Venerupis philippinarum* in a commercial pond system. Report number 12.017
- Dalen P van. 2011. A new medium for *Pyramimonas parkeae*.
- Debeuf B. 2012. Filtration and assimilation efficiency of *Ruditapes philippinarum* ; why do they not keep growing?
- Dousson O. (2013) Spatial distribution of algae densities and pH in an integrated algae-shellfish pond system
- Fernández Hernández A. 2013. Relation between temperature and shellfish activity and growth at Zeeland Aquaculture. BSc thesis WUR-AFI,
- Fillatre A. 2010. Cultivation of shellfish in an on-land system.
- Ghourabi M 2013. Optimising water use in the culture of *Skeletonema* sp. for a low-cost land-based shellfish farm.
- González Páez T.V. 2010. Influence of temperature, light regime and growth stage at harvest on the nutritional composition of *Skeletonema costatum* and *Tetraselmis suecica*.
- Kamerik, H. 2013 in prep
- Meer J. van der. 2013. Protocol for automation of monitoring and control system of an algae raceway. BSc thesis WUR-AFI; rapport nr CS 007
- Merel, S., (2011) Improvement of a culture of algae in a raceway: *Chaetoceros muelleri*
- Smallegange, J 2013. Determination of the optimal mussel density and size distribution in order to maximize mussel growth in an integrated outdoor pond system. MSC thesis AFI-WUR

## Verantwoording

Report number: C018/14

Project number: 4304102818

The scientific quality of this report has been peer reviewed by a colleague scientist and the head of the department of IMARES.

Approved: S. Glorius, MSc  
Researcher



Signature:

Date: 6 februari 2014

Approved: Dr. B.D. Dauwe  
Head of department Delta



Signature:

Date: 6 februari 2014

# BIJLAGE I - PROTOCOL OUTDOOR ALGENKWEK ALS VOEDSEL VOOR SCHELPDIEREN

## Voedingswaarde algen

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

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



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

## Verskillende kweekmethoden

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



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

## Batch culture

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



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

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

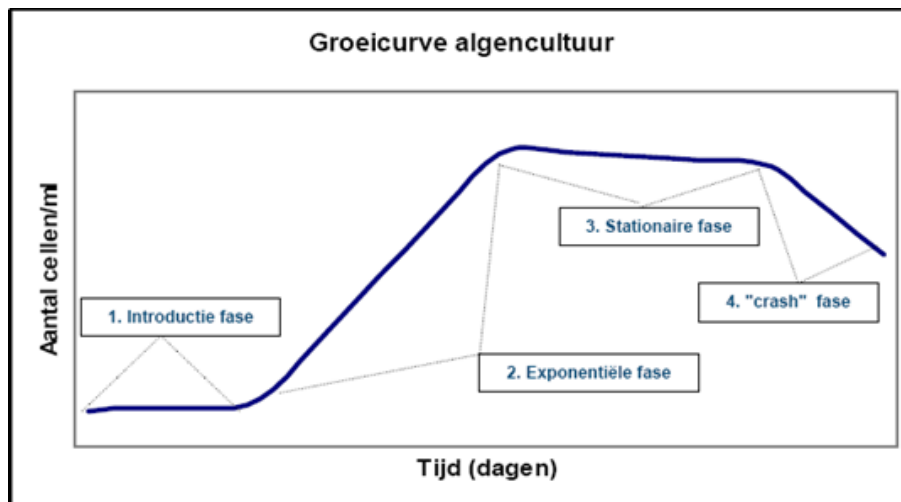


Fig. 4 Figuur met het verloop van de algengroei gedurende een batch cultuur (Hoff en Snell, 2001).

#### Semi-batch

Een kweekmethode waarbij een deel van culture wordt geoogst en het resterende deel wordt aangevuld met nieuw medium wordt een semi-batch culture genoemd. Hierbij is het noodzakelijk de celdichtheden en celkwaliteit te monitoren om het juiste tijdstip van oogsten te bepalen. Door tijdig te oogsten wordt voorkomen dat de culture in kwaliteit en dichtheid afneemt, d.w.z. in de stationaire fase komt (fig. 4). Het is belangrijk de culture regelmatig te controleren op contaminatie met andere algen of bacteriën. Het tijdig oogsten van een deel van de culture kan ervoor zorgen dat de gewenste algensoort in de exponentiële fase blijft en daarmee voorkomt dat andere algen de culture overneemt. Voor het uitvoeren van een semi-batch culture zijn dezelfde materialen nodig als voor een batch culture. Echter, omdat deze vorm van algenkweek een continue groei van algen betreft, moet voortdurend het gebruikte materiaal worden gereinigd om er verzekerd van te zijn dat er voldoende materiaal aanwezig is.

#### Continu culture

Een kweektechniek waarbij een culture zeer langdurig in stand worden gehouden door voortdurend medium toe te voegen en een deel van de algen te oogsten (doorstroom) heet een continu culture. Afhankelijk van de groeisnelheid van de culture en resulterend de celdichtheid kan de doorstroom worden aangepast. Hiermee wordt voorkomen dat lichtlimitatie optreedt en een gebrek aan nutriënten de groei van de culture beperkt, en kunnen resulteren in een kwalitatief slechtere en lichtere alg (Michels et al. 2010). Daarnaast worden contaminaties zoals bacteriën en zooplankton zodanig verdund dat zij in mindere mate de culture kunnen aantasten. Ook zal, net als in een semi-batch culture, bij voldoende doorstroom de gewenste algensoort in exponentiële fase gehouden kunnen worden en contaminatie met

andere algen voorkomen kunnen worden. Proefondervindelijk is vastgesteld dat een doorstroom of verversingssnelheid van de raceways bij 40% de hoogste productie behaald. Daarentegen bleek dat de cultures bij een verversingssnelheid van ~10% stabiel zijn (Kamermaans et al., 2009). Aanpassing van de stroomsnelheid gedurende de kweek zal gewenst zijn bij wisselende weersomstandigheden.



**Fig. 5** Een voorbeeld van een chemostat opstelling.

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

Parameters die gedurende de kweek gemonitord kunnen worden:

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

Hierbij kan gebruik gemaakt worden van de volgende meetapparatuur:

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

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

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

#### Benodigdheden voor alle kweekmethoden

- Stocks (algencultures)

- Gefiltreerd zeewater (bij voorkeur over 0.2 µm filter)
- Kweekflesjes (30 ml en 100 ml)
- Schoon glaswerk (erlenmeyers met stop of afgesloten met parafilm met openingen voor beluchting)
- Autoclaaf
- Medium (bestaande uit nutriënten, spoormetalen en vitaminen)
- Beluchting (slangen, filters (0.2 µm, pomp))
- Pipetten / pipetteerballon
- 70% alcohol
- Tissues
- Haematocytometer (telraam voor celdichtheid)
- Microscoop

*Specifiek voor 25L en grotere volumes:*

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

- UV lamp ter desinfectie van gefiltreerd zeewater
- Natriumhypochloriet (1 ml natrium hypochloriet (bleek water) oplossing per liter gefiltreerd zeewater, 1 dag laten inwerken onder beluchting) en Natrium(waterstof)-carbonaat (NaHCO<sub>3</sub>) voor neutralisatie van chloor (1,25 g per 25 L)

Specifiek voor continu cultures:

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

Voorkomen van contaminatie

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

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



**Fig. 6** Kweek in raceway op water gefiltreerd door 5 µm filter, en b, een raceway gefiltreerd over een 0,2 µm filter

Ook gedurende de kweek is het noodzakelijk bij het tussentijds bemonsteren van cultures in afgesloten flessen, erlenmeyers of plastic zakken voorzorgsmaatregelen te nemen die contaminatie kunnen worden voorkomen. Cultures in open lucht die in aanmerking komen met contaminaties van buitenaf dienen

regelmatig gecontroleerd te worden op contaminaties en celkwaliteit. Zoals in de beschrijving van de semi-batch en continue culture eerder is aangegeven, kan tijdens oogsten of verhogen van de doorstroom een schadelijke contaminatie van de culture voorkomen. Het afdekken van de open lucht kweekfaciliteiten (fig. 7) of voorkomen van direct contact met de buitenlucht kan contaminaties uit de buitenlucht verder voorkomen.



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

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

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

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

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

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

### **Nutriënten**

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

waaraan Walne is toegevoegd, zij het dat de culture met 100% Walne minder goed presteert dan de cultures waaraan 60 en 40% Walne medium was toegevoegd. Echter, bij 0% Walne vertoonde de culture bijna geen groei en stortte de culture vroegtijdig in (Fig. 8; Quesnot, 2012).

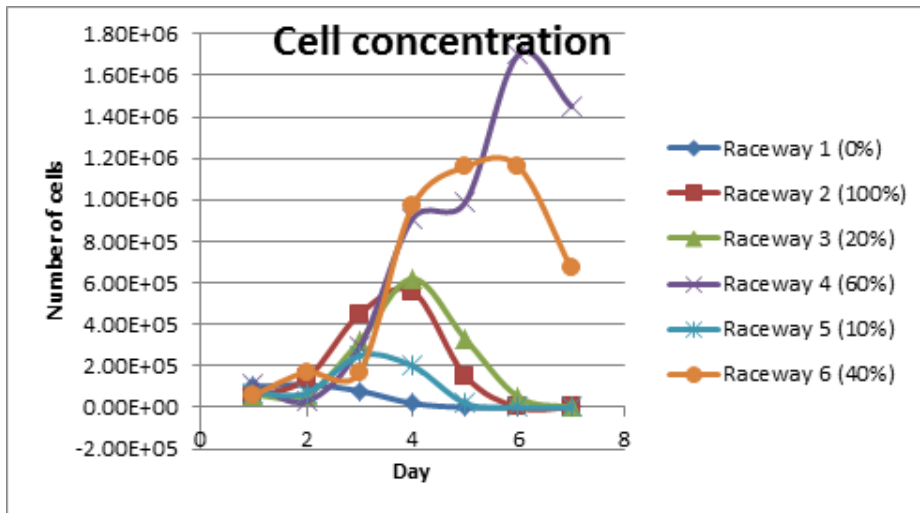


Fig. 8) Groei onder verschillende concentraties toegevoegd Walne medium

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

Tabel 1 Kostprijs van media per 1000L

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

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

#### Nutriënten versus lichtlimitatie

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

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

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



van Quesnot (2012) en (Maas, 2012) waarin het achtergrondsignaal niet in de berekening werd meegenomen, niet aangetoond.

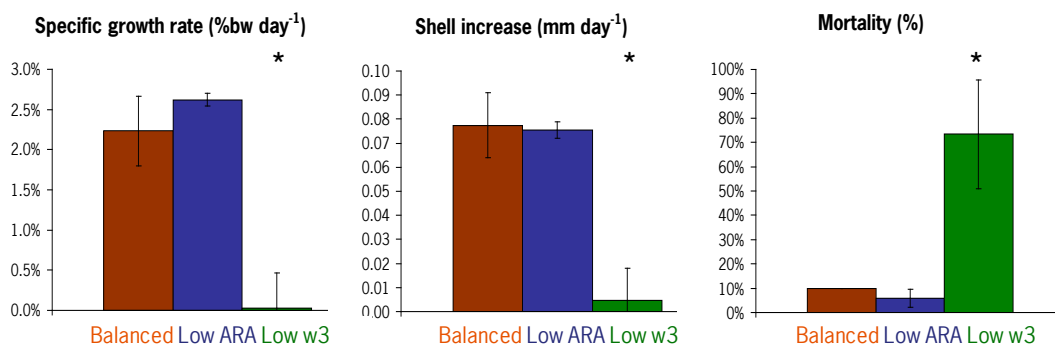
#### Keuze van algen

Voor een goede groei van schelpdieren dienen de te voeren algen aan een aantal voorwaarden te voldoen. Naast celgrootte (niet groter dan 30 µm) en tolerantie voor temperatuur is met name het vetzuurgehalte in de cellen van belang. Vetzuren zijn van belang voor de groei van schelpdieren en zullen in de juiste verhoudingen en hoeveelheden de groei bevorderen. Deze vetzuren zijn bepaald in een aantal algen die zijn geselecteerd op basis van voorkomen in de Oosterschelde en niet toxisch zijn (tabel 2). De aanmaak van vetzuren is te sturen door manipulatie van de kweekomstandigheden. Onder hogere stikstof concentraties en N:P ratio's vindt een toename in de vetzuurgehalten plaats. Daarnaast zorgt een hogere N-beschikbaarheid voor een percentueel hoger gehalte aan onverzadigde vetzuren (PUFA) (Yongmanitchai and Ward, 1991). Daarnaast kan toevoeging van vitamine B12 de productie van EPA, een PUFA van belang voor de groei van schelpdieren, stimuleren tot een 65% toename in EPA productie met toevoeging van 100 ng aan vitamine B12 (Yongmanitchai and Ward, 1991).

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

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

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



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

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

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

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

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

## Literatuur

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

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

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

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

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

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

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

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

## **Bijlage 1: Walne-medium & andere media**

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

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

FeCl <sub>3</sub> *6H <sub>2</sub> O	1.30 g
Solution 2	1 ml

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

### **Voorraad cultuur**

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

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

1) *De eerste stap in het algen cultuur systeem is de ontsmetting van de werkplek en de handen.*

*Een kleine hoeveelheid ethanol 70% wordt geschonken over alles wat in aanraking kan komen bij het maken van de algen culturen. De handen worden ontsmet door ze te wassen met ethanol 70 %.*

2) *Het water dat gebruik wordt voor de voorraad culturen wordt gefiltreerd over een aantal filters met verschillende maten. De kleinste maat is 0.2 µm. 500 ml Schot flessen worden gevuld en geautoclaveerd (15 psi voor 15 minuten). Als het water afgekoeld is worden de nutriënten toegevoegd, 500 µl Walne's medium en 50 µl Vitamine oplossing. Voor diatomeeen wordt hierbij ook nog 2 ml silicaat toegevoegd. 5 weefselkweekflessen per algensoort worden gevuld met 20 ml gefiltreerd zeewater*

3) *5 ml algencultuur wordt met een glazen Pasteur pipet overgebracht in de 30 ml weefselkweekfles. De glazen Pasteur pipetten worden in de stoof gesteriliseerd (minimaal 48 uur bij 70 °C). Voor de inoculatie van de voorraad culturen wordt de pipet in 90% ethanol ondergedompeld een door het blauwe vlam van de brander gehaald.*

4) *De datum van inoculatie en de algen soort worden op de nieuwe cultuur geschreven en de cultuur wordt op in de klimaatkast (Fig. 2) geplaatst.*



*Figuur 1: Voorraad cultuur.*



*Figuur 2: Klimaatkast.*

### **Kleine startculturen**

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

Inoculatie gaat als volgt:

- 1) De eerste stap is het ontsmetten van de werkplek en handen. Een kleine hoeveelheid Ethanol 70% wordt gegoten over alle oppervlaktes die in aanraking komen met het materiaal dat gebruikt wordt om de algen culturen te maken. De ontsmetting van de handen wordt bereikt door de handen te wassen met een beetje ethanol.*
- 2) Het water dat gebruik wordt voor de voorraad culturen wordt gefiltreerd over een aantal filters met verschillende maten. De kleinste maat is 0.2  $\mu\text{m}$ . 1L Schot flessen worden gevuld en geautoclaveerd (15 psi voor 15 minuten). Als de water afgekoeld is worden de nutriënten toegevoegd, 1 ml Walne's medium en 100  $\mu\text{l}$  Vitamine oplossing. Voor diatomeeen wordt hierbij ook nog 4 ml silicaat toegevoegd. 5 weefselkweekflessen per algensoort worden gevuld met 70 ml gefiltreerd zeewater*
- 3) De gehele 30 ml voorraadcultuur wordt overgebracht in de 100 ml weefselkweekfles.*
- 4) De datum van inoculatie en de algen soort worden op de nieuwe cultuur geschreven en de cultuur wordt op in de klimaatkast geplaatst.*



*Figuur 3: Kleine start culturen.*

### **Grote start culturen**

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

- 1) De eerste stap is het ontsmetten van de werkplek en handen. Een kleine hoeveelheid Ethanol 70% wordt gegoten over alle oppervlaktes die in aanraking komen met het materiaal dat gebruikt wordt om de algen culturen te maken. De ontsmetting van de handen wordt bereikt door de handen te wassen met een beetje ethanol.*
- 2) De erlenmeyer wordt gevuld met 2,5 gefiltreerd zeewater (1 µm filter, UV licht bestraald) en bedekt met aluminium folie en geïncubeerd in de autoclaaf bij 120°C gedurende 30-45 min.*
- 3) Van de kleine start cultuur die gebruikt wordt als inoculum worden monsters genomen en onder de microscoop geplaatst. De staat van de culturen wordt gecontroleerd: vorm van de cellen okay, activiteit van de cellen in het geval van flagellaten okay en het ontbreken van elk type contaminatie. Alleen goede culturen worden gebruikt.*
- 4) Na verwijdering van de aluminiumolie wordt de hals van de erlenmeyer door een blauwe vlam van de brander gehaald. 2,5 ml van Walne medium en 250 µl vitamine oplossing worden gepipetteerd in de Erlenmeyer. Bij diatomeen wordt ook 10 ml silicaatoplossing toegevoegd.*
- 5) 200-300 ml kleine startcultuur wordt overgebracht in de grote start cultuur.*
- 6.) De hals van de erlenmeyer wordt door de blauwe vlam gehaald, dan wordt een steriele plastic 2 ml de pipet toegevoegd voor de beluchting en de erlenmeyer bedekt met parafilm.*
- 7.) De nieuwe erlenmeyer wordt gelabeld met de datum van inoculatie en de naam van de algen soort.*
- 8) Deze culturen worden belucht (delucht wordt ook gefiltreerd door een 1 µm membraan filter).*
- 9) De lege erlenmeyers worden gewassen met een peroxide oplossing en hierna afgespoeld met demi water. Ze worden vervolgens gevuld met gefiltreerd zeewater, geautoclaveerd en zijn hierna klaar om opnieuw gebruikt te worden.*



Figuur 4. Grote start culturen.

### **Cultuur op grote schaal**

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

Van de buisfolierol wordt 105 cm geknipt en op het voorbeeld exemplaar 'algenzak' gelegd. Met een Edding 3000 stift worden de markeringen van de voorbeeldzak overgenomen op het nieuwe exemplaar.

Aan de ene kant van de buisfolie wordt nu met behulp van een sealapparaat 2 seals gemaakt (in puntvorm) aan de andere kant wordt de folie circa 11 cm omgeslagen en 2 seals direct naast elkaar gebracht. Deze seals worden wat langer en heter geseald omdat dit wordt opgehangen.

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

*1) De plastic zakken worden gevuld met gefiltreerd zeewater (0.2 µm, UV-licht bestraald, pH en zoutgehalte worden gemeten) en de chemische sterilisatie vindt plaats met 1 ml natrium hypochloriet (bleek water) oplossing per liter gefiltreerd zeewater. Maak 0.2 um filter schoon aan het eind van de dag en vervang UV lamp jaarlijks.*

*2) 24 uur na chloreren wordt de chloortest gebruikt om de hoeveelheid te meten.*

*Het restant van natrium hypochloriet wordt geneutraliseerd met natrium thiosulfaat (50 mg per liter gefiltreerd zeewater). (1,25 g per 25 L). Het natriumthiosulfaat wordt opgelost in gechloreerd zeewater (genomen uit de afvoerslag van een plastic zak) alvorens het wordt toegediend.*

*3) De beluchting wordt hierna toegevoegd aan de zakken door een pipet in het plastic te prikken en na een circa 20 minuten wordt er een chloor test uitgevoerd om zeker te zijn van de afwezigheid van chloor. (Chloortest 0- 20 mg/l (MERCK) d.i. een analytische methode mbv teststrips)*

*4) De oppervlakte die in aanraking komt met het materiaal dat gebruikt wordt gedurende de inoculatie wordt ontsmet met ethanol 70%. De handen worden ook ontsmet met ethanol 70%.*

*5) De nutriënten worden toegevoegd in de hoeveelheden zoals vermeld wordt in tabel 5.*

*6) Een grote startcultuur, meestal 14 dagen oud, wordt altijd bekeken op aanzicht (vorm) voordat deze wordt toegevoegd. De minimale celdichtheid in de 25 L plastic zak moet 50.000 cellen per ml zijn aan het begin. De kwaliteit van de algen wordt altijd voorafgaand aan inoculatie bepaald onder de microscoop (x40 en x100 vergroting).*

- 7) De plastic zak wordt gelabeld met de datum van inoculatie en de naam van de algen soort.
- 8) De materialen gebruikt voor de inoculatie worden gewassen met een peroxide+peracetic acid oplossing en hierna afgespoeld met water.
- 9) Bij vroegtijdig instorten van een algencultuur wordt het aanzicht, vorm, beweeglijkheid en status reinheid) beoordeeld en tevens pH en zoutgehalte van de cultuur gemeten.



Figuur 5. Plastic zakken van 25 liter.

### ***Bijlage 3: protocol algensbepaling 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>



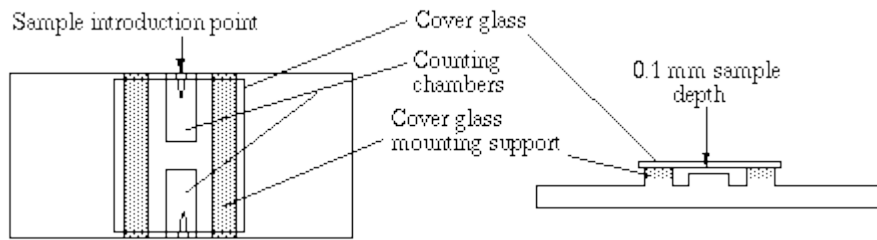


Figure 1. Hematocytometer

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  $0.1 \text{ mm}^3$
- 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)

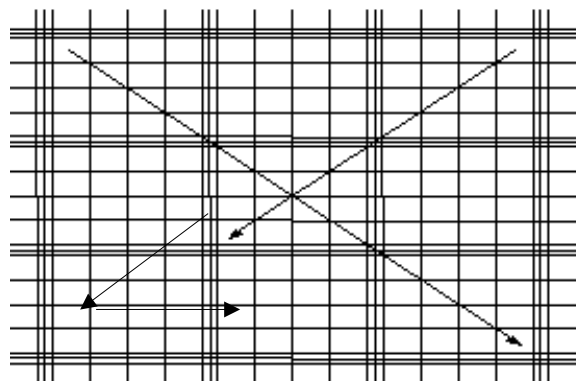


Figure 2 Diagonal counting of the squares (plus one square, follow arrows) in Bürker chamber

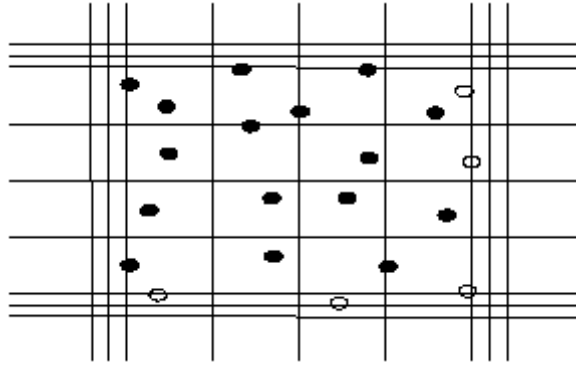


Figure 3 Counting of the cells in center of squares and on two borders (upper and left or lower and right)

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:

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

# BIJLAGE II – VOORTGANGSRAPPORT 2012 (voortbouwend op 2010 en 2011)

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

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

### 2.1 Voeding van schelpdieren in vijverteelt

Zie bijlage I – protocol outdoor algen teelt

### 2.2 Groei en gedrag van schelpdieren in vijverteelt

#### 2.2.1. Doel & Aanpak

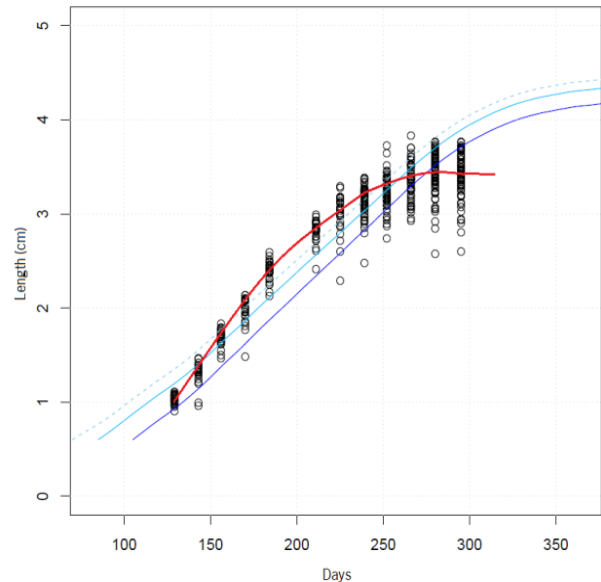
In 2011 is een onderlinge vergelijking van voedsel condities en schelpdiergroei uitgevoerd op de 3 pilots. Uit de data bleek dat voor het bepalen van optimale schelpdiergroei meer eenduidige gegevens nodig zijn over voedselcondities en fysiologische behoeften van de schelpdieren. In 2012 lag de focus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

#### *Pilot Zeeland Aquacultuur*

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

#### *Pilot Colijnsplaat*

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



Figuur 1

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

stellen werd gekeken wat de limiterende factoren voor een verhoging van algenproductiviteit zijn.

#### *Pilot Wilhelminapolder*

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

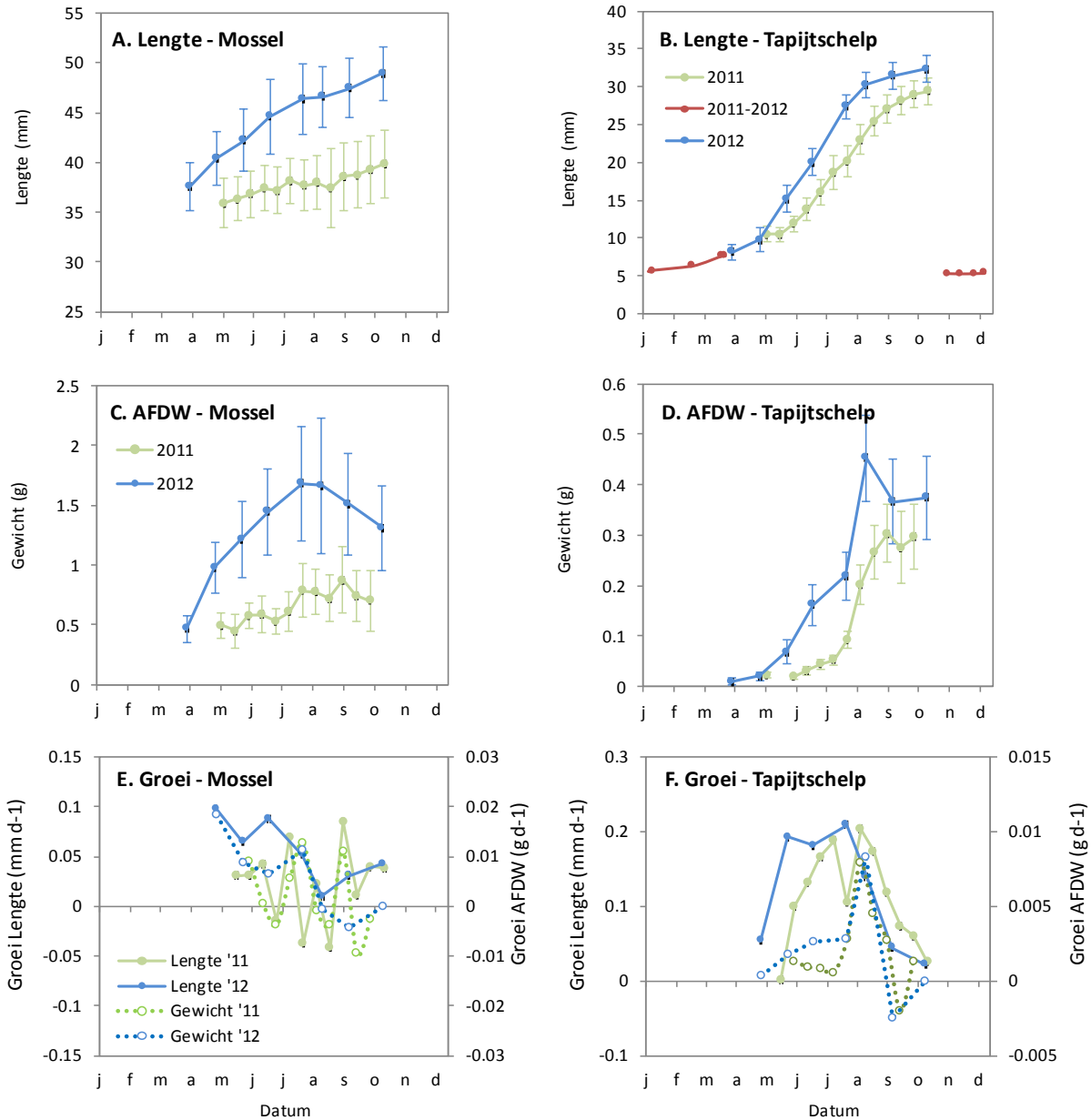
### 2.2.3 Resultaten

#### Resultaten Pilot Zeeland Aquacultuur

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

Vanaf begin April 2012 zijn de voedselcondities en schelpdiergroei gemonitord. *Figuur 2* laat de schelpenlengte voor de batches uit 2011 (groen) en 2012 (blauw) zien. Daarnaast laat de rode lijn de resultaten zien van een batch tapijtschelpen die in de winter (November-Maart) gevolgd zijn. De groei van mosselen was 70% hoger in 2012 in vergelijking met 2011 (*Figuur 2, Tabel 1*). Dit is mogelijk een gevolg van de wijze waarop de experimentele mosselen gehouden werden. In 2011 werden de mosselen in kooitjes gehouden die, ondanks regelmatig schoonmaken, regelmatig begroeid raakten. Dit kan de water doorstroming en dus de voedseltoevoer negatief beïnvloed hebben. Er is daarom in 2012 gekozen om de mosselen in (uien)zakken te houden. Deze bleven relatief schoon we kunnen dus aannemen dat er voldoende water langs de mosselen kon stromen. De tapijtschelpen zijn in 2011 en 2012 op een vergelijkbare wijze uitgezet en bemonsterd. Echter, ondanks dat de tapijtschelpen in 2012 ongeveer een maand eerder uitgezet werden dan in 2011, en in eerste instantie een snellere groei waargenomen werd (*Figuur 2F*), bereikten zij aan het einde van het seizoen een vergelijkbare lengte (circa 30mm, *Figuur 2B*). Het natgewicht van de schelpen is in 2012 niet bepaald aangezien er voorgaande jaren gebleken is dat er een goede (lineaire) relatie bestaat tussen het as-vrij-droog-gewicht en het natgewicht:  $AFDW=0.0718*NW$   $r^2=0.92$  voor tapijtschelpen en  $AFDW=0.1235*NW$   $r^2=0.74$  voor mosselen op basis van de 2011 data.

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



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

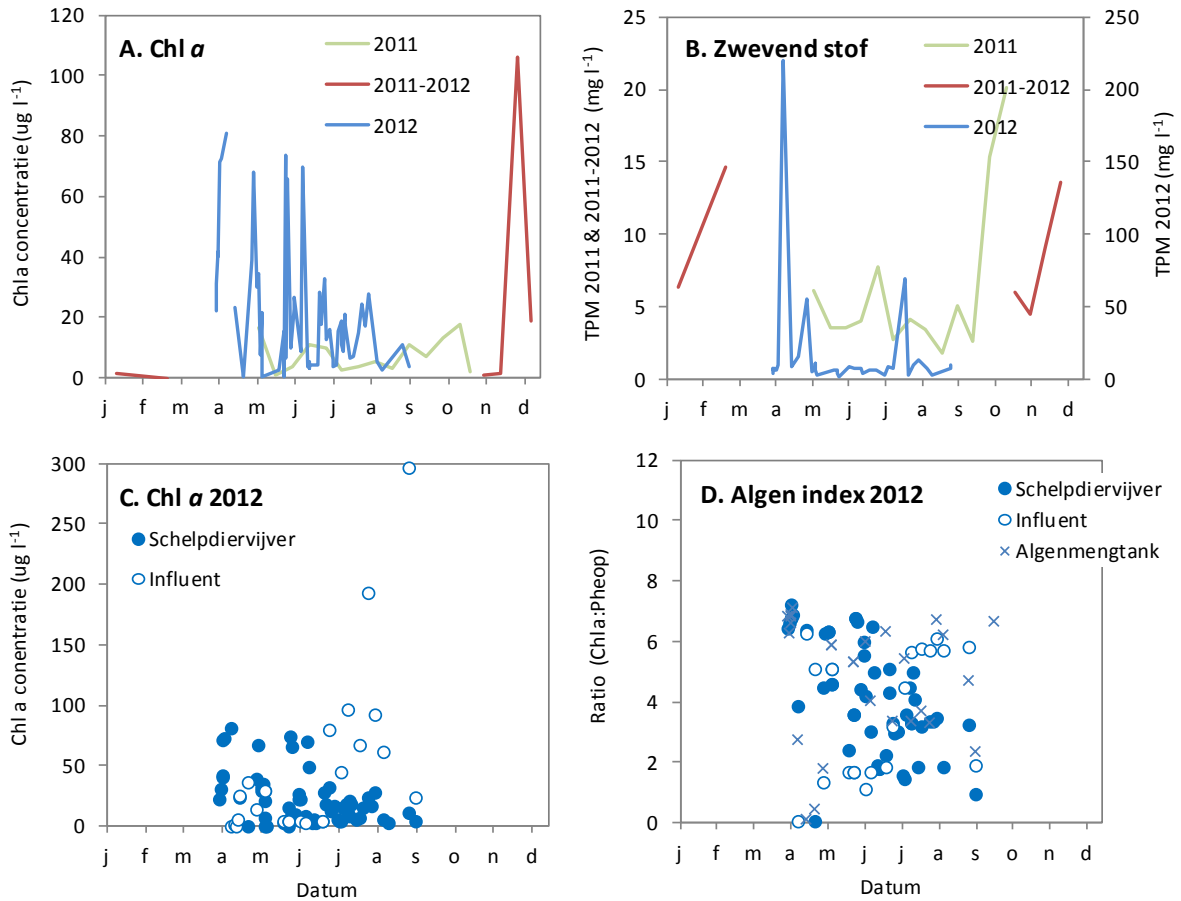
Tabel 1 Gemiddelde schelpdiergroei (in mm per week) in de verschillende pilots gedurende drie meetperiodes.

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

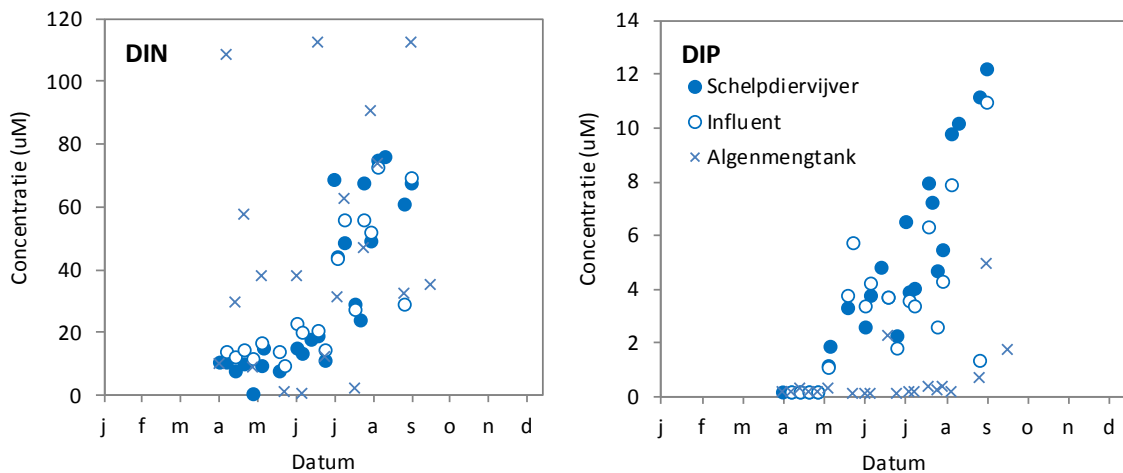
In de periode Mei-Juli zijn de Chla concentraties in de schelpdiervijver in 2012 hoger dan in 2011 (Figuur 3A). Ondanks dat begin Juli de voedseltoevoer naar de schelpdiervijver is verhoogd (zie toegenomen concentraties in de influent, Figuur 3C) leidde dit niet tot verhoogde voedselconcentraties in de

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

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



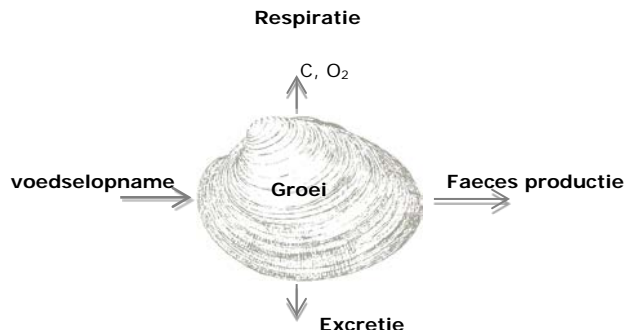
Figuur 3 Voedselcondities in de vijvers van de pilot 'Zeeland Aquacultuur'



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

## (2) Eco-fysiologie irt optimalisatie schelpdiergroei

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



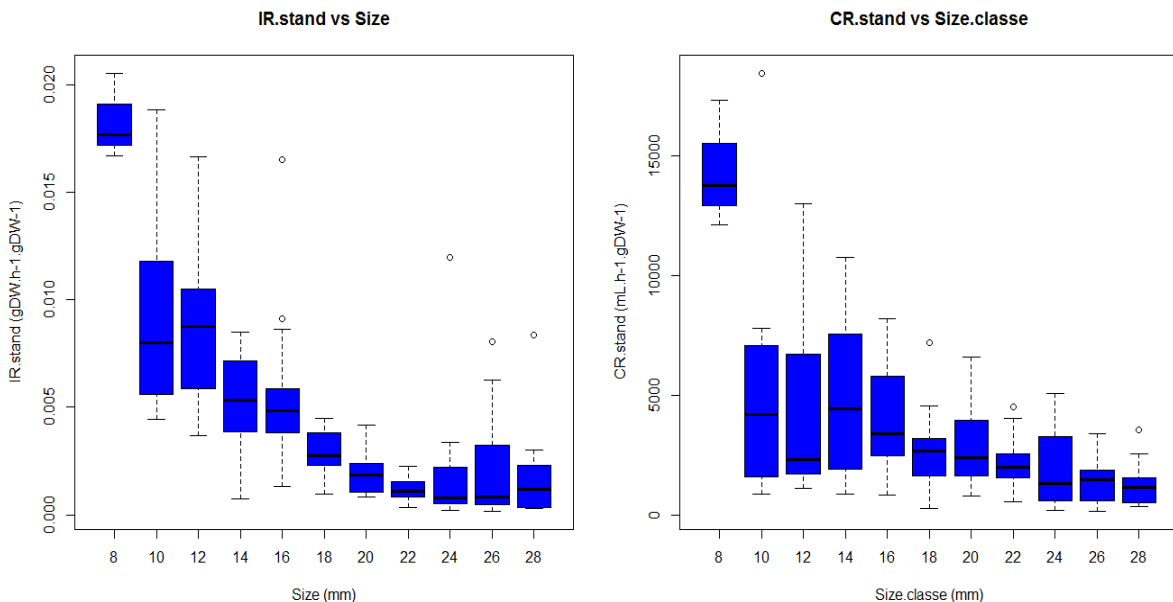
*Figuur 5* Schematische voorstelling van onderzochte processen en de bijbehorende elementen C, N en P.

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

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

### Fysiologie

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

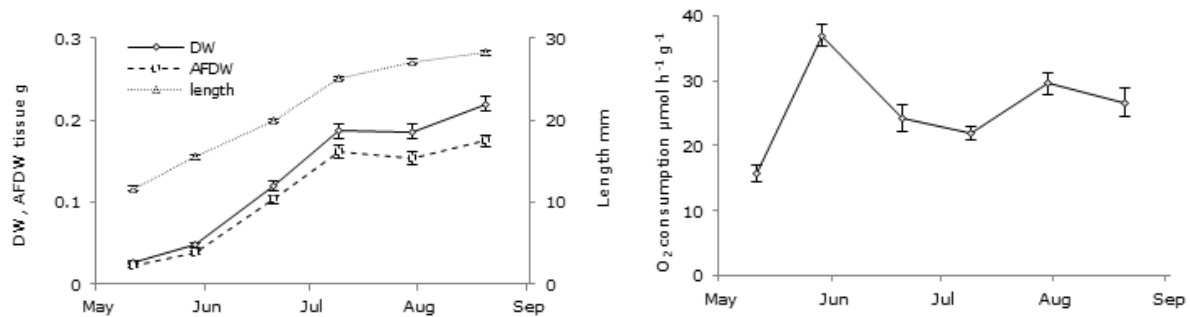


*Figuur 6* Gestandaardiseerde voedselopname (IR) en filtratie (CR) in relatie tot individuele grootte (size).

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

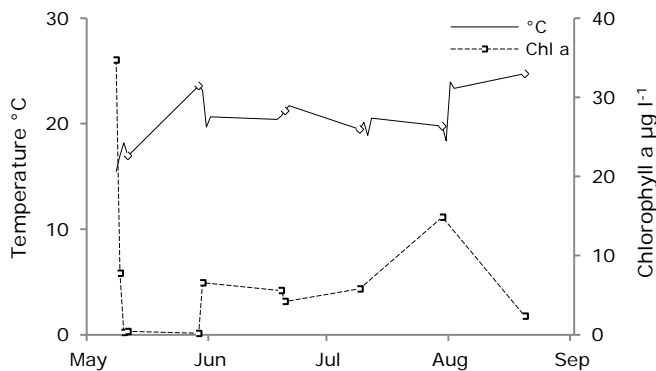


sifon-oppervlakte : volume  $\sim a \cdot \text{Lengte}^2$  :  $b \cdot \text{Lengte}^3$  (Kooijman 2010, met a en b als constanten). Als een individu groeit in lengte zal het volume daarom sneller toenemen dan de sifon-opening. Hierdoor neemt de voedselopname per gram individu af als het individu groeit.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



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

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



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

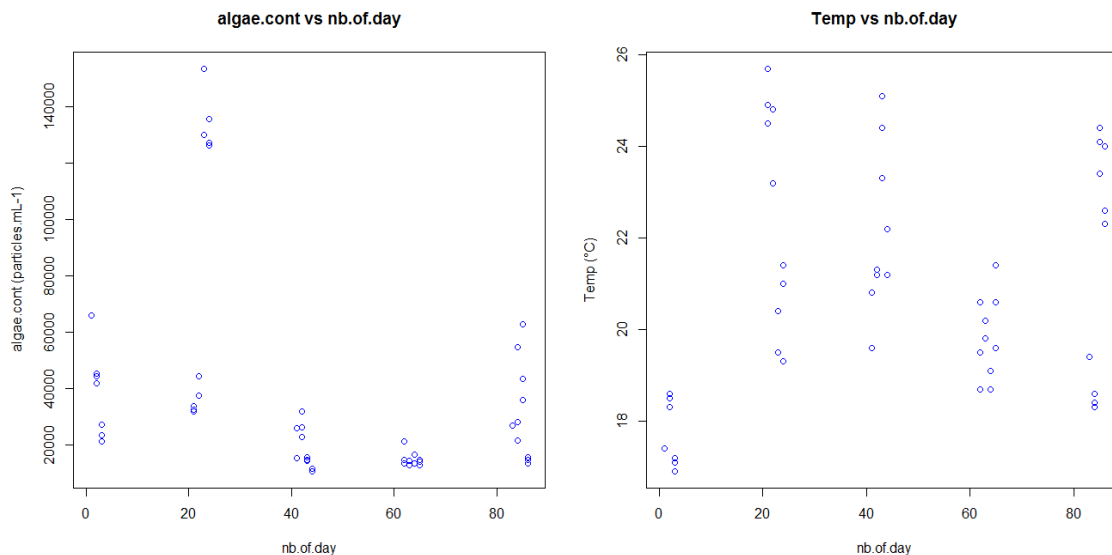
De toenemende fysieke limitatie en noodzaak voor hogere voedselconcentraties, waar deze niet hoger werden, kan mede als oorzaak voor de groeivertraging hebben opgetreden (Debeuf, 2012).

#### Variabiliteit

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

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

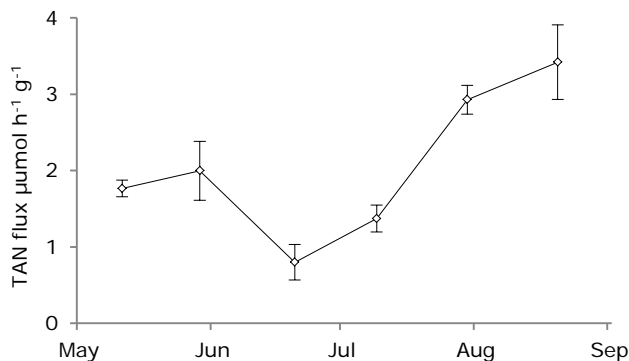
Robert et al. (1993) stellen dat scherpe variabiliteit in o.a. voedselaanbod groei kunnen vertragen doordat schelpdieren eerder dicht gaan, waardoor er minder gefiltreerd kan worden.



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

### Reproductie

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



Figuur 10 Verloop ammonia (TAN) excretie.

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

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

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

#### Spatiële variatie

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

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

Leng	IP 0	IP 3	IP 6	IP 9	IP 12	IP 15	IP 18	IP 21	IP 24	IP 27	IP 30	IP 33	IP 36	IP 39	IP 42	IP 45	IP 48	IP 50	
0										0.208519									
1			0.543038	0.413578	0.402807		0.257239		0.217017	0.213361	0.154078	0.2185	0.179761	0.248841			0.212768		
2	0.819646			0.43107	0.374444		0.265837	0.21761	0.228876		0.154078	0.236782	0.189544				0.198735		
3	0.798399			0.409131			0.440854	0.281451	0.275027		0.195573	0.153474	0.222453	0.251013	0.248348	0.203182	0.127878		
4	0.767467						0.423955	0.279079	0.259413			0.129657	0.191719	0.227394	0.218302		0.187074	0.175808	
5				0.371479	0.369602		0.280462		0.225615			0.144382	0.231841	0.220476	0.220575		0.216622	0.217413	
6	0.815397		0.535923				0.386698	0.443819	0.264093		0.219982	0.150707	0.199924		0.252989	0.171756	0.146951	0.20081	0.210199
7	0.787133	0.683664		0.423164	0.380374	0.417838			0.210989			0.149125				0.217215	0.174227		
8		0.673189	0.511908		0.392528							0.152485				0.200119	0.195968	0.205949	
9	0.805514	0.658662	0.523273							0.197549	0.183437	0.246665				0.236486		0.218006	0.18569
10	0.797806	0.608855	0.522658					0.2521	0.184109	0.191916	0.14201		0.200415	0.18233	0.254966			0.165728	
11		0.666864	0.516849	0.425338		0.435517		0.260698		0.154363	0.14369							0.166024	
12				0.374444		0.41348				0.209507	0.143591							0.16642	
Ave	0.830714	0.697599	0.554277	0.425594	0.407048	0.45086	0.300005	0.276492	0.244079	0.215216	0.154882	0.254795	0.237515	0.255478	0.255927	0.223762	0.227205	0.211304	

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

#### Temporele variatie

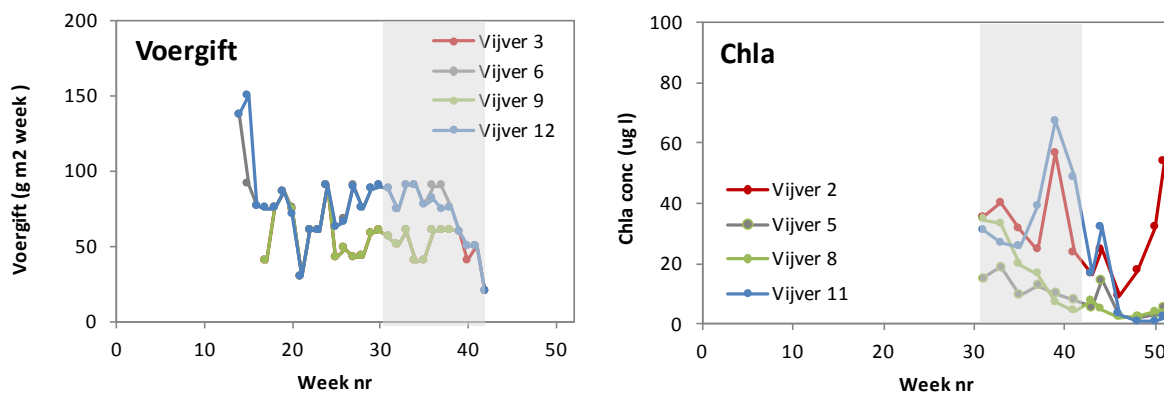
Tabel 2 laat het debiet op de verschillende inflow punten over de drie metingen zien.

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

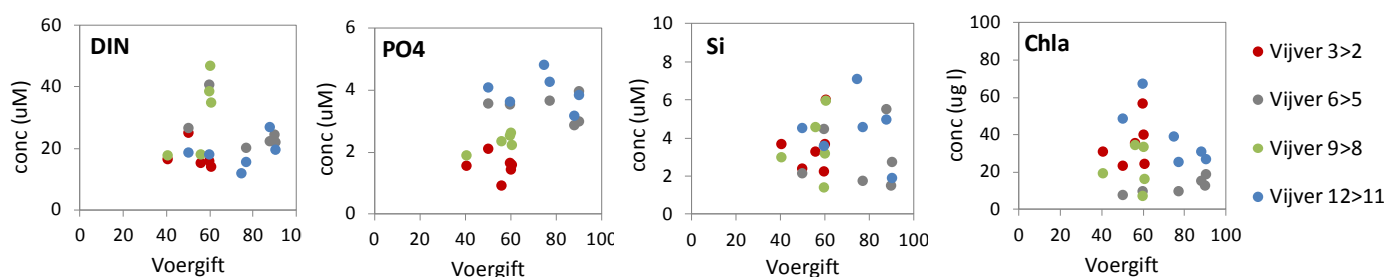
Tabel 2 Debiet op de 8 inflow punten tijdens experiment 1, en verandering in debiet t.o.v. experiment 1 in experiment 2 en 3. "=": gelijk, "-": minder, "+": meer dan in experiment 1.

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





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



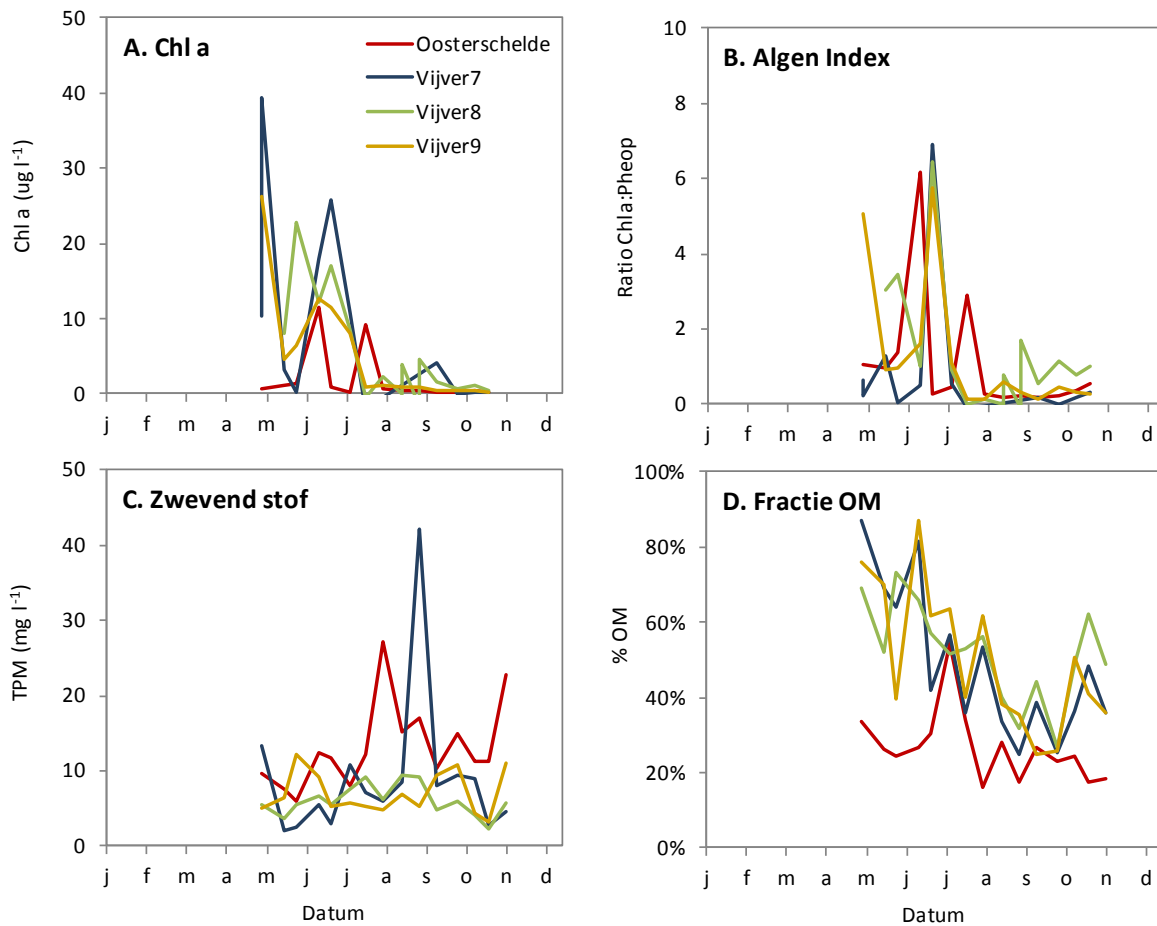
Figuur 15 Correlatie tussen voergift (x-as) en stikstof (DIN), fosfaat (PO4), silicaat (Si) en Chla in de verschillende vijversystemen voor de periode Aug-half Okt (week 31-42) (grijze box in bovenstaande figuur).

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

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

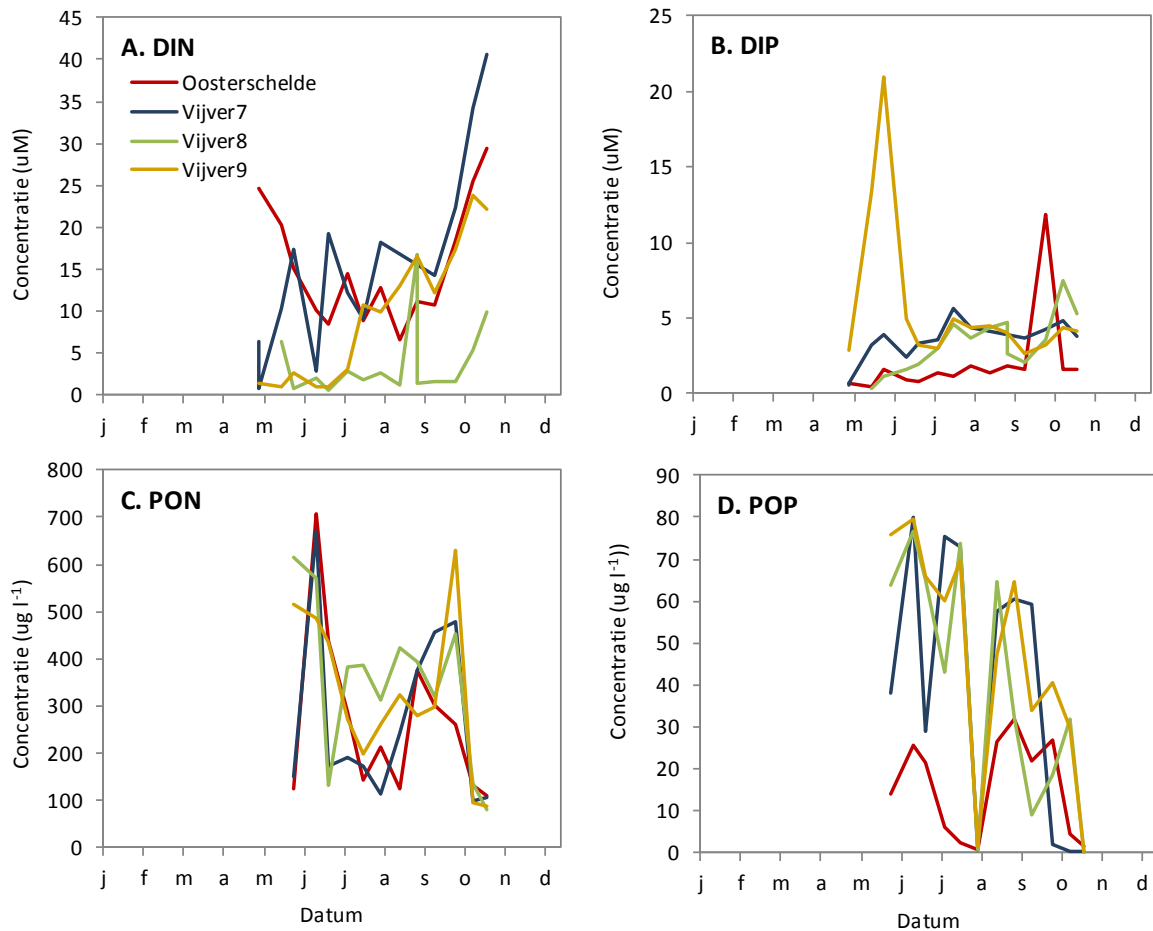
## (2) Monitoring Nutriënten en algen concentraties in 2012

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



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

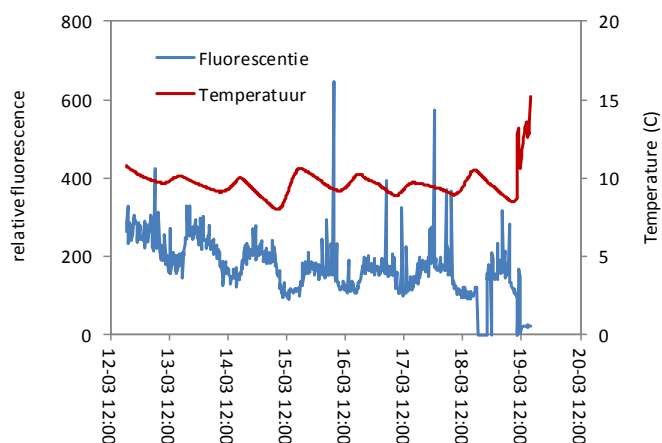
De concentraties opgelost stikstof (DIN) was het hoogst in vijver7 en wordt veroorzaakt door de instroom van nutriëntenrijk Oosterschelde water en metabolische activiteit van de vissen, schelpdieren en zaggers in de vijver. Ook decompositie van organisch materiaal (oa feces) draagt bij aan de concentraties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



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

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

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



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

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

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

- Het inkomende water uit de Oosterschelde
- In het midden van vijver 7
- In het water dat vijver 7 verlaat en naar vijver 8 stroomt
- In het midden van vijver 8
- In het water dat vijver 8 verlaat en naar vijver 9 stroomt
- In het midden van vijver 9
- In het water dat vijver 9 verlaat en naar de ringsloot wordt geleid

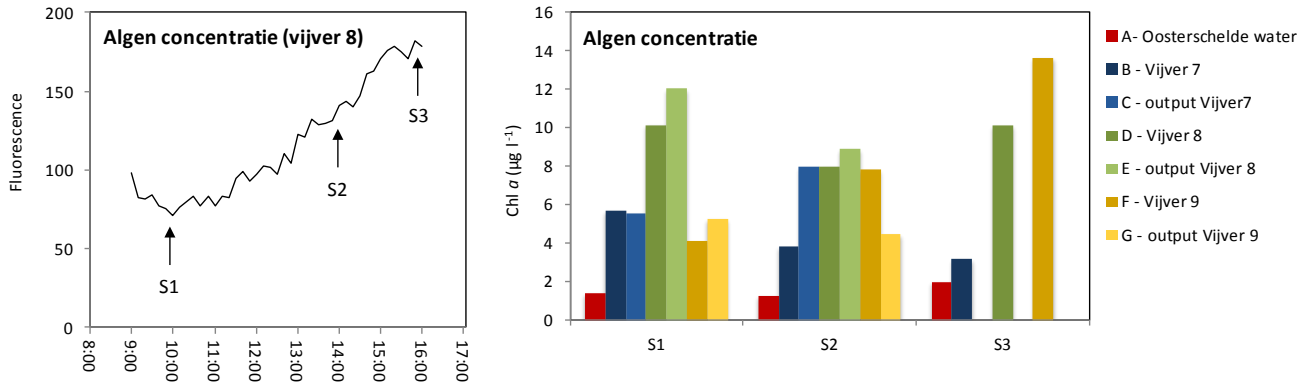
Tabel 4 Opgeloste nutriënten concentraties. Totaal stikstof (DIN – voornamelijk ammonia) en fosfaat (DIP), en de gerelateerde NP ratio gedurende de drie meetmomenten (S1=10:00, S2=14:00, S3=16:00) op ieder van de meetpunten (-=niet bepaald).

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

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

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





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

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

## Resultaten Pilot Wilhelminapolder

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

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

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

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

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

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

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

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

## 2.2.4 Conclusies & Aanbevelingen

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

### *Zeeland Aquacultuur*

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

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

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

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

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

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

#### *Colijnsplaat*

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

#### *Wilhelmina polder*

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

## BIJLAGE III OVERZICHT VAN GEGEVENS IN DE DATABASE

### A - Opzet database Zeeuwse Tong

De database bestaat uit een verzameling tabellen. Deze zijn onder te verdelen in 'ID tabellen' en 'Data tabellen'. ID-tabellen vormen de link tussen de afzonderlijke datatabellen, om die met elkaar te kunnen vergelijken. Ook zorgen ze ervoor dat bepaalde omschrijvingen/naamgeving consistent is tussen de verschillende soorten data, en ook binnen de afzonderlijke datatabellen.

Omdat de data verschillende formats heeft, en verschillende 'ID tabellen' nodig zijn voor de verschillende types data, zijn er (op dit moment) vier afzonderlijke datatabellen:

- Nutrienten data
- Plankton data
- Biometrische data
- Abiotische data

Deze data tabellen zijn aan elkaar gelinked via 'ID tabellen'. Deze geven aan waar, wanneer, en door wie de monsters verzamelt zijn:

- gebiedID: Colijnsplaat, Wilhelminapolder of Yerseke
- LocationID: bv algenvijver of schelpdijvijver
- BedrijfID: wie heeft de data verzamelt en aangeleverd
- MonsternamelD: datum waarop het monster verzamelt is (uniek nummer per gebied, locatie, bedrijf en datum). Hiermee kunnen de nutrientendata en de biometrische data met elkaar vergeleken worden

#### **Nutrientendata:**

opgeloste nutrienten, Chlorofyl-A, drooggewichten, zwevende deeltjes. Zowel dsata van IMARES als van Hogeschool Zeeland. Deze tabel is gegroepeerd met alle data onder elkaar, en één kolom die aangeeft welke data het gaat (IDmeting)

#### **Plankton data:**

soorten (en aantallen) aangetroffen in Colijnsplaat en Wilhelminapolder, afkomstig van Hogeschool Zeeland. Voorlopig staan deze gegevens in een aparte tabel. Ook deze data is gerangschikt onder elkaar, met de MetingsID als verklarende kolom om welke data het gaat. Bovendien is hier een extra IDtabel (IDplanktonSpecies) voor nodig om na te gaan om welke soort plankton het precies gaat.

#### **Biometrische data:**

Schelpdierlengtes en (droog)gewichten. Ook deze staan in aparte tabel, en heeft extra IDtabellen. Deze bevatten gegevens over IDsoort (mossel of Venerupis), IDsample (controle-schelpen (alleen lengtemetingen, dan teruggezet) of monster-schelpen (DW)), en IDvalid (of de lengtemeting geldig is, bv. Niet het geval als een dode schelp wel gemeten is.

#### **Abiotische data:**

Voorlopig vnl. van Wilhelminapolder. Omdat dit een zeer grote tabel is (>1,3 milj records), staan de waardes per uur (gemiddeld, min, max, en N) in een aparte tabel, ook weer met de waardes onder elkaar gerangschikt.

