Nederlands Instituut voor Visserij Onderzoek (RIVO) BV

Postbus 68
1970 AB IJmuiden
Tel.: 0255 564646
Fax.: 0255 564644
E-mail: visserijonderzoek.asg@wur.nl
Internet: www.rivo.wageningen-ur.nl

Centrum voor
Schelpdier Onderzoek
Postbus 77
4400 AB Yerseke
Tel.: 0113 672300
Fax.: 0113 573477

ANIMAL SCIENCES GROUP
WAGENINGEN UR

Roem van Yerseke
www.roemvanyerseke.nl

Hogeschool HZ Zeeland

INVE
Advanced Solutions for animal rearing

Rapport

Nummer: C021/06

Operationaliseren Schelpdierhatchery/nursery bij de Roem van Yerseke

Pauline Kamermans[1], Ainhoa Blanco[2], Nancy Nevejan[3] en Pieter Geijsen[2]

1. Nederlands Instituut voor Visserij Onderzoek
2. Roem van Yerseke
3. INVE Technologies

Opdrachtgever:	Provincie Zeeland Postbus 153 4330 AD Middelburg
Project nummer:	3031220016
Contract nummer:	IAZ A6 en A7
Akkoord:	H. van der Mheen Clusterleider Zeecultuur
Handtekening:	
Datum:	maart 2006

Aantal exemplaren:	15
Aantal pagina's:	111
Aantal tabellen:	23
Aantal figuren:	54
Aantal bijlagen:	2

In verband met de verzelfstandiging van de Stichting DLO, waartoe tevens RIVO behoort, maken wij sinds 1 juni 1999 geen deel meer uit van het Ministerie van Landbouw, Natuur en Voedselkwaliteit. Wij zijn geregistreerd in het Handelsregister Amsterdam nr. 34135929
BTW nr. NL 811383696B04.

De Directie van het Nederlands Instituut voor Visserij Onderzoek (RIVO) BV is niet aansprakelijk voor gevolgschade, alsmede voor schade welke voortvloeit uit toepassingen van de resultaten van werkzaamheden of andere gegevens verkregen van het Nederlands Instituut voor Visserij Onderzoek (RIVO) BV; opdrachtgever vrijwaart het Nederlands Instituut voor Visserij Onderzoek (RIVO) BV van aanspraken van derden in verband met deze toepassing.

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

Inhoudsopgave

Inhoudsopgave 2

Samenvatting 6

1. Inleiding 10

1.1. Waarom een schelpdierhatchery/nursery? 10

1.2. Het proces 10
1.2.1. Levenscyclus van de mossel 10
1.2.2. Kweek van mosselzaad in een hatchery/nursery 12

1.3. Proeven bij Centrum voor Schelpdieronderzoek in 2004 12
1.3.1. Algenkweek 13
1.3.2. Broedstock en paaien 15
1.3.3. Larven 15
1.3.4. Broed 16

1.4. Opschaling bij Roem van Yerseke in 2005 17

2. Materialen 19

2.1. Watervoorziening en hygiëne 19

2.2. Algenkweek binnen 20

2.3. Algenkweek buiten 21

2.4. Broedstock unit 21

2.5. Larven unit 21

2.6. Nursery 22

3. Protocollen 23

3.1. Algen 23
3.1.1. Cultuur medium 23
3.1.2. Algen voorraad cultuur, start cultuur en plastic zak culturen 25
3.1.3. Het bepalen van de algendichtheid 31

3.2. Broedstock 33
3.2.1 Houden 33
3.2.2 Conditioneren 33
3.2.3 Paaien en bevruchten 35

3.3. Larven 38
3.3.1. De ontwikkeling van embryo's 39
3.3.2. Voeren en reinigen van D-larven 40

3.4. Broed 42
3.4.1. Broed binnen 42
3.4.1. Broed en algen buiten 45

4. Algen Kweek 47

4.1. Optimalisatie algenkweek 47
4.1.1. Kwaliteit algen 47
4.2.2. Optimalisatie algenkweek 47

4.2. Resultaten 47
4.2.1. Kwaliteit algen 47
4.2.2. Optimalisatie algenkweek 48

4.3. Discussie 49
4.3.1. Kwaliteit algen 49
4.3.2. Optimalisatie algenkweek 49

5. Bewaren broedstock 50

5.1. Proeven 50
5.1.1. Broedstock koud bewaren 50

5.2. Resultaten 50
5.2.1. Temperatuur 50
5.2.2. Paaien 51

5.3. Discussie 52
5.3.1. Paaien 52

6. Proeven met larven 53

6.1. Overzicht 53

6.2. Ontwikkeling tot D-larven 54
6.2.1. Embryo ontwikkelingsproef beschrijving 55
6.2.2. Resultaten 56
6.2.3. Discussie 56

6.3. Waterkwaliteitproeven 57
6.3.1. Antibiotica, chloor en EDTA 1 (Batch 220305) 57
6.3.1.1. Proef beschrijving 57
6.3.1.2. Resultaten 58
6.3.2. Antibiotica, chloor en EDTA 2 (Batch 300305) 59
6.3.2.1. Proef beschrijving 59
6.3.2.2. Resultaten 60
6.3.3. Water van verschillende locaties 1 (Batch 260405) 61
6.3.3.1. Proef beschrijving 61
6.3.3.2. Resultaten 62
6.3.4. EDTA (Batch 300505) 63
6.3.4.1. Proef beschrijving 63
6.3.4.2. Resultaten 64
6.3.5. Water van verschillende locaties 2 (Batch 260905) 66
6.3.5.1. Proef beschrijving 66
6.3.5.2. Resultaten 67

6.3.6. Aktief kool (Batch 241005) 68
6.3.6.1. Proef beschrijving 68
6.3.6.2. Resultaten 68
6.3.7. Discussie 70

6.4. Verversingsproef 72
6.4.1. Proef beschrijving (Batch 040705) 72
6.4.2. Resultaten 73
6.4.3. Discussie 74

6.5. Luchttoevoer proef 74
6.5.1. Proef beschrijving (Batch 290805) 74
6.5.2. Resultaten 75
6.5.3. Discussie 76

6.6. Temperatuurproef 76
6.6.1. Proef beschrijving (Batch 260905) 77
6.6.2. Resultaten 78
6.6.3. Discussie 80

7. Vestiging en uitgroei van broed 81

7.1. Downwelling systemen 81
7.1.1. “Air-lift” downwelling systeem 81
7.1.1.1. Proef beschrijving (Batch 040705) 81
7.1.1.2. Resultaten 82
7.1.2. “Dompelpomp” downwelling systeem 84
7.1.2.1. Proef beschrijving (Batch 260905) 84
7.1.2.2. Resultaten 84
7.1.3. Discussie 85

7.2. Vestiging op touwen 86
7.2.1. Proef beschrijving (Batch 290805) 86
7.2.2. Resultaten 86
7.2.3. Discussie 87

7.3. Vestiging op kokkelschelpen 87
7.3.1. Proef beschrijving (Batch 290805) 87
7.2.2. Resultaten 88
7.3.3. Discussie 88

8. INVE proeven met voedingssupplementen 89

8.1. Supplementen aan larven en broed (Batch 060605) 89
8.1.1. Proef beschrijving 89
8.1.1.1. Paaien 89
8.1.1.2. Larven 89
8.1.1.3. Vestiging 90
8.1.1.4. Broed 90
8.1.2. Resultaten 90
8.1.2.1. Paaien 90
8.1.2.2. Larven 91
8.1.2.3. Broed 91
8.1.3. Conclusie 93
8.1.3.1. Larven 93

8.1.3.2. Broed 93

8.2. Supplementen aan broedstock en larven (Batch 220805) 93
8.2.1. Proef beschrijving 93
8.2.1.1. Paaien 93
8.2.1.2. Larven 94
8.2.2. Resultaten 94

8.3. Supplementen aan larven (Batch 290805) 94
8.3.1. Proef beschrijving 94
8.3.1.1. Paaien 94
8.3.1.2. Larven 94
8.3.1.3. Vestiging en broed 95
8.3.2. Resultaten 95
8.3.2.1. Paaien 95
8.3.2.2. Larven 95
8.3.2.2. Broed 95
8.3.3. Conclusie 96

8.4. Supplementen aan broedstock (Batch 241005) 96
8.4.1. Proef beschrijving 96
8.4.2. Resultaten 97
8.4.3. Conclusies 100

9. Benodigdheden voor opschalen van productie en aanbevelingen 101

Dankwoord 106

Literatuur 107

Bijlage 1. Productie van algen met water van tarbotkwekerij 108

Bijlage 2. Resultaten van pH, temperatuur en nutriënten metingen 109

Samenvatting

Waarom een schelpdierhatchery/nursery? (voor meer informatie zie 1.1)

Het natuurlijke aanbod van uitgangsmateriaal voor schelpdierteelt (zaad) vertoont jaarlijks sterke fluctuaties. Verder is de mosselzaadvisserij gelimiteerd in verband met de voedselbeschikbaarheid voor vogels. Er is daarom behoefte aan nieuwe technieken ten behoeve van de zaadvoorziening. Een nieuwe techniek voor de mossel is productie in een hatchery/nursery. In een hatchery (broedkamer) worden ouderdieren (broedstock) aangezet tot voortplanten en de larven opgekweekt tot broed. In een nursery (kinderkamer) wordt het broed opgekweekt tot zaad. Het zaad wordt vervolgens tot eindproduct opgekweekt in hangcultuur of op kweekpercelen. Een hatchery voor mosselen kan voor additioneel aanbod van zaad zorgen in jaren van schaarste. Deze techniek biedt daarnaast de mogelijkheid om de beschikbaarheid van zaad te realiseren onafhankelijk van de tijd van het jaar. Bovendien kan door gecontroleerde voortplanting de kwaliteit van het product worden verbeterd.

Proeven bij het Centrum voor Schelpdieronderzoek in 2004 (voor meer informatie zie 1.4)

Ter voorbereiding van het project bij de Roem van Yerseke zijn in 2004 proeven op lab-schaal uitgevoerd. In deze fase zijn culturen van algen opgezet en doorgekweekt tot 5 liter, daarnaast is mossel broedstock aangezet tot paaien en zijn larven opgekweekt in 25 liter containers. Ook heeft vestiging en uitgroei tot zaad (5 mm) plaatsgevonden. Op basis van de ervaringen die in 2004 zijn opgedaan is in 2005 een hatchery op praktijkschaal gerealiseerd bij de Roem van Yerseke.

De volgende onderdelen van de hatchery/nursery zijn nu operationeel:

Algenkweek voor larven (hatchery fase) (voor meer informatie zie 2.2, 3.1, 4)

Steriele stockcultures van eencellige algen zijn opgekweekt in batch cultures van plastic zakken van 25 en 50 liter. Toevoegen van CO_2 aan de cultures liet een verdubbeling zien van het aantal algencellen per ml tot 14 miljoen cellen per ml. Er werden voldoende algen geproduceerd voor de larven, broed en broedstock. Ter controle van de kwaliteit van de algen is het gehalte aan onverzadigde vetzuren bepaald van *Chaetoceros gracilis*, *Pavlova lutheri*, *Isochrysis galbana* and *Tetraselmis suecica* van het RIVO. Twee voor schelpdierlarven belangrijke vetzuren (C20:5w3 en C22:6w3) zijn in ruime mate aanwezig.

Broedstock (voor meer informatie zie 2.4,3.2, 5)

De in 2004 door het RIVO geteste methode om rijpe broedstock dieren koel te bewaren is gebruikt om de ontwikkeling van de geslachtsproducten uit te stellen zodat ouderdieren later in

het seizoen nog tot paaien kunnen worden aangezet. Daarnaast zijn broeddieren geconditioneerd, d.w.z. in een omgeving gebracht waar de temperatuur kan worden gecontroleerd en voldoende voedsel van hoge nutritionele waarde kan worden gegeven. De broedstock is zowel direct uit het veld gehaald tijdens de paaiperiode, als gehuisvest in de broedstock unit. Voor conditionering zijn mosselen gevoerd met gekweekte algen. Het laten paaien van de ouderdieren heeft geleid tot levensvatbare larven. Ouderdieren zijn koud gehouden waardoor ze paaiden tot in oktober (4 mdn na het einde van het paaiseizoen) en extra gevoerd zodat ze ook in oktober larven konden produceren. Het percentage paaiende mosselen werd wel minder naarmate de broedstock langer werd bewaard. Het hoogste percentage paaiende mosselen werd bereikt met mosselen uit de Grevelingen. 6-61% van de bevruchte eicellen ontwikkelde tot D-larven.

Larven (voor meer informatie zie 2.5, 3.3, 6)

Larven zijn opgekweekt in volumes van 100 en 1250 liter. Daarnaast zijn verschillende experimenten uitgevoerd om het effect te testen van (1) verschillende voorbehandelingen van het water, (2) verschillende temperaturen, (3) verschillende frequentie van water verversen, (4) verschillen in luchttoevoer.

Slechte overleving van larven werd gevonden in water van de verswaterleiding. Mogelijk zijn zwakke larven gevoelig voor bepaalde stoffen die aanwezig zijn in het water van de verswaterleiding. Om dit te onderzoeken zijn tests uitgevoerd die het effect onderzochten van de herkomst van het water (verswaterleiding, oostelijke Oosterschelde, monding Oosterschelde bij Jacobahaven en Atlantische Oceaan), ziekteverwekkende bacteriën (behandelingen met antibiotica en chloor), zware metalen (behandeling met EDTA) of TBT (behandeling met aktief kool). De tests wezen uit dat de sterfte niet werd veroorzaakt door ziekteverwekkende bacteriën, zware metalen of TBT. De lagere overleving is ofwel toe te schrijven aan andere factoren dan de kwaliteit van het water (bijvoorbeeld kwaliteit eieren), ofwel veroorzaakt door een slechte kwaliteit van het water uit de verwaterleiding op dat moment. Fluctuaties in waterkwaliteit kunnen niet worden uitgesloten.

Er zijn geen duidelijke verschillen in groei en overleving gevonden voor larven gekweekt bij 16^0C, 18^0C, 20^0C of 22^0C. Een betere overleving van larven werd gevonden in de behandeling met luchttoevoer via een buis ipv een bruissteen.

De beste overleving van de larven tot vestiging was bijna 60% en vestiging trad op na 14-25 dagen. Ongeveer 50% van de larven met een oogvlek metamorfoseren tot broed.

Broed (voor meer informatie zie 2.4, 3.4, 7)

Broed is gekweekt bij een oesterput van RvY en in de hatchery. Hierbij zijn verschillende systemen en materialen voor vestiging en opkweek getest: downwelling systemen waarbij water

van boven af door zeven stroomt aangedreven met een air lift of een dompelpomp, en vestiging op deze zeven, op touwen of op kokkelschelpen.
Opkweek in het downwelling systeem leverde de beste overleving. 80 dagen na bevruchting was de gemiddelde schelplengte respectievelijk het downwelling systeem met airlift 5 mm en het downwelling systeem met dompelpomp 1.5 mm. 150 dagen na de bevruchting was de gemiddelde schelplengte 11 mm in de downwelling met airlift. 60 dagen na de bevruchting was het gewicht van het broed 4 gr. Dit nam in 90 dagen toe tot 78 gr. De overleving was 88 % van dag 60 tot dag 150.
Er heeft weinig vestiging op touwen plaatsgevonden. Er bleken veel roeipootkreeftjes (copepoden) aanwezig. Mogelijk heeft predatie op larven en net gevestigd broed plaatsgevonden. De meeste vestiging vond plaats op touwen met een 7 dagen oude biofilm. Vestiging op kokkelschelpen heeft plaatsgevonden, maar daar zijn geen metingen aan verricht.

Algenkweek voor broed (voor meer informatie zie 2.3)

In bakken bij de oesterput is Oosterscheldewater gefiltreerd en verrijkt met stikstof en fosfaat. Hierdoor is een algenbloei ontstaan. Dit is gevoerd aan het broed in een downwelling systeem bij de oesterput.

Voedingsupplementen (voor meer informatie zie 8)

Het effect van voedingsupplementen is getest op (1) de overleving en groei van larven op het moment van vestiging, (2) de groei van het broed en (3) het produceren van ei- en zaadcellen. De groei van het broed werd gestimuleerd door toevoeging van het artificiële dieet aan larven. De ontwikkeling van de voortplantingsorganen van de ouderdieren werd gestimuleerd door de supplementen. Na behandeling was er geen enkel dier zonder gonadenweefsel. Resultaten met het broed en de ouderdieren zijn veelbelovend en geven aan dat voedingsupplementen de groei van het broed en de ei- en zaadcel productie van de ouderdieren kunnen verhogen.

Opschalen (voor meer informatie zie 9)

Berekeningen op basis van de behaalde resultaten geven aan dat voor een productie van jaarlijks 500 miljoen mosselzaadjes de benodigde hoeveelheid en ruimte voor broedstock, larven en algen voor de fase tot 3 mm goed haalbaar zijn in de huidige hatchery/nursery. Voor de fase van 3 mm tot 1 cm is het ruimtebeslag voor broed en algen zeer omvangrijk: bijna 9000 m^2 voor de algenkweek en 25.000 m^2 voor het broed. De hatchery/nursery kan gerund worden met 4 personen.
De productie van mosselzaad in een hatchery heeft vooral toekomst als wordt gedacht aan productverbetering. Het kan geen alternatief zijn voor zaadvisserij, want bij een productie van jaarlijks 500 miljoen mosselzaadjes van 1 cm wordt slechts 60.000 kg mosselzaad geproduceerd.

Aanbevelingen (voor meer informatie zie 9)

- De algenkweek kan worden geoptimaliseerd door het aantal cellen per ml te vergroten door CO_2 toevoeging en door over te schakelen op kweek in continu cultures. Dit reduceert de benodigde ruimte tot eenderde en de benodigde arbeidstijd tot eenzesde.
- De broedstock kan worden bijgevoerd met INVE dieet waardoor de productie van levensvatbare larven wordt vergroot.
- De larvenkweek kan worden verbeterd door bij iedere batch de kwaliteit van de eieren en het water te monitoren. Hierdoor kan beter worden achterhaald waar het knelpunt zit.
- Bij de kweek van broed kan de fase van 3 mm tot 1 cm op het land mogelijk worden overgeslagen door broed van 3 mm over te brengen naar een hangcultuur, of door het broed direct uit te zaaien op een perceel. Daarnaast kan het ruimte beslag op het land 65% kleiner worden als het mogelijk is om 7000 mg broed per liter te kweken.

1. Inleiding

1.1. Waarom een schelpdierhatchery/nursery?

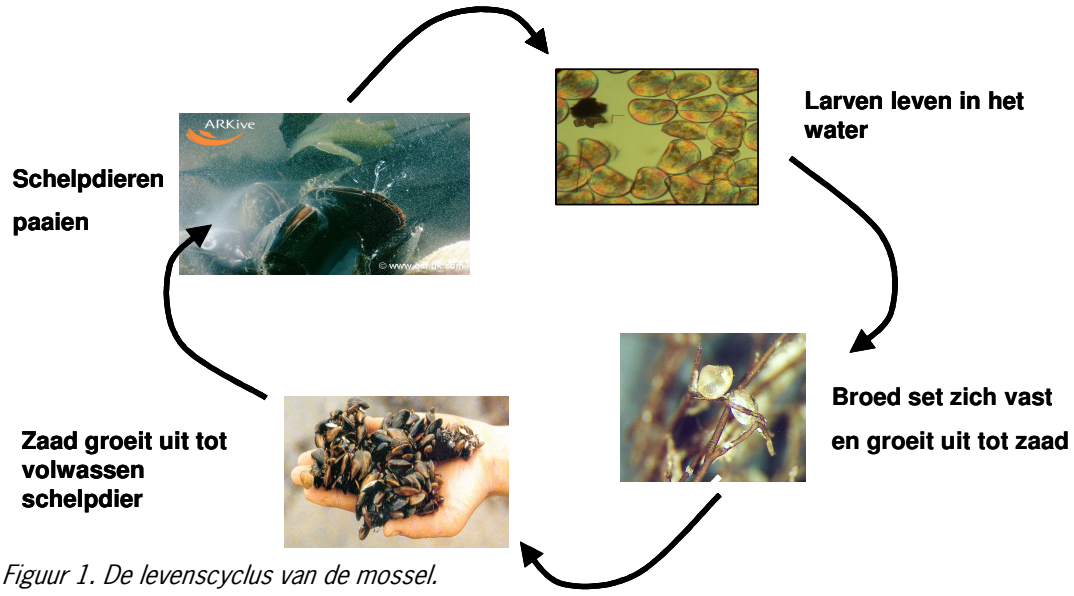
Het natuurlijke aanbod van uitgangsmateriaal voor schelpdierteelt (zaad) vertoont jaarlijks sterke fluctuaties. Verder is de mosselzaadvisserij gelimiteerd in verband met de voedselbeschikbaarheid voor vogels. Er is daarom behoefte aan nieuwe technieken ten behoeve van de zaadvoorziening. Een nieuwe techniek voor de mossel is productie in een hatchery/nursery. In een hatchery (broedkamer) worden ouderdieren (broedstock) aangezet tot voortplanten en de larven opgekweekt tot broed. In een nursery (kinderkamer) wordt het broed opgekweekt tot zaad. Het zaad wordt vervolgens tot eindproduct opgekweekt in hangcultuur of op kweekpercelen. De productie van zaad als grondstof voor de kweek van soorten als oester en tapijtschelp in een hatchery/nursery is een bestaande techniek die wordt gebruikt in andere Europese landen. Zo komt bijvoorbeeld 40% van alle in Frankrijk gekweekte Japanse oesters uit een hatchery. De hatchery/nursery techniek wordt voor de mossel nog maar sporadisch op commerciële schaal toegepast. Een commerciële hatchery voor mosselen (*Mytilus edulis*) bestaat op Hawaï en Korea, maar niet in Europa. Bovendien is dit een techniek die wereldwijd nog niet op praktijkschaal functioneert voor bodemcultuur mosselen. Een hatchery voor mosselen kan voor aanbod van zaad zorgen in jaren van schaarste. Deze techniek biedt daarnaast de mogelijkheid om de beschikbaarheid van zaad te realiseren onafhankelijk van de tijd van het jaar. Dat wil zeggen dat in een hatchery/nursery mosselzaad het jaar rond kan worden geproduceerd, terwijl dat van nature alleen in het voorjaar mogelijk is. Bovendien kan door gecontroleerde voortplanting de kwaliteit van het product worden verbeterd. Hierbij kan worden gedacht aan selectie op snelle groeiers waardoor de mosselen eerder consumptieformaat bereiken. En tenslotte vormt een hatchery/nursery voor mosselen de basis voor de gecontroleerde productie van broed van andere soorten zoals kokkels of ziekte-resistente platte oesters. Hatchery productie moet samen met innovaties op het gebied van mosselzaadwinning aan touwen een zekere toekomst opleveren voor de mosselsector en zodoende de positie versterken van de schelpdiersector.

1.2. Het proces

1.2.1. Levenscyclus van de mossel

Mosselen (*Mytilus edulis*) laten in het voorjaar geïnitieerd door een stijging van de watertemperatuur grote hoeveelheden ei- en zaadcellen vrij in het water (zie figuur 1). De

eicellen van vrouwelijke mosselen worden in het water bevrucht door de zaadcellen van mannelijke mosselen. De bevruchte eicellen ontwikkelen tot veliger larven in ongeveer 2 dagen (zie figuur 1). In die periode leven ze van het in de eicel aanwezige reserve voedsel. Na 2 dagen hebben de larven een schelp ontwikkeld. Omdat ze dan de vorm van een letter D hebben worden ze ook wel D-larven genoemd. De larven hebben een velum en een orale flap waarmee eencellige algen worden opgenomen. Het velum (een orgaan met trilharen) wordt daarnaast ook gebruikt om te zwemmen. De larven ontwikkelen zich tot een grootte van 0.2-0.3 mm in een periode van 2-6 weken. Dan vindt een metamorfose plaats, dat wil zeggen dat de larven hun velum verliezen en een voet en kieuwen gaan ontwikkelen. Tijdens de metamorfose kunnen ze geen voedsel opnemen en leven ze van opgeslagen energie reserves. De voet is een bewegelijk orgaan dat tussen de schelpen naar buiten kan worden gestoken. Het heeft een byssus klier die hechtingsdraden kan maken. Metamorfose gaat samen met vestiging, de larven worden nu broed genoemd. Ze stoppen met zwemmen en gaan over tot een leven op de bodem. Het aantal dagen tot metamorfose hangt af van de temperatuur, en de hoeveelheid en kwaliteit van het voedsel. Wanneer de stromingsomstandigheden het toelaten zal het broed naar beneden zinken voor vestiging op de harde oppervlakten, de zogenaamde broedval. Geschikte ondergrond voor vestiging zijn bijvoorbeeld palen, steentjes of hydroidpoliepen (zie figuur 1). De hoeveelheid geproduceerde larven en de sterfte in de larvale fase bepalen hoeveel larven aan de broedval kunnen deelnemen. De sterfte van larven kan oplopen tot wel 50% per dag. Ook onder het jonge broed treedt veel sterfte op als gevolg van predatie door garnalen, kleine krabben en zeesterretjes. Vanaf een grootte van ongeveer 1 cm spreekt men van mosselzaad. Bij een grootte van 1.5 - 4.5 cm worden de mosselen halfwas genoemd. Deze stadia en zelfs de consumptieformaat mossel (groter dan 4.5 cm) zijn niet veilig voor krabben, zeesterren en vogels.



Figuur 1. De levenscyclus van de mossel.

1.2.2. Kweek van mosselzaad in een hatchery/nursery

Ouderdieren worden in 4-8 weken in bakken geconditioneerd door het voedselaanbod en de temperatuur te manipuleren. Vervolgens worden de dieren met een temperatuurschok tot paaien aangezet. Eicellen en zaadcellen worden samengebracht en de bevruchting vindt plaats. De bevruchte eicellen ontwikkelen zich tot larven in grote containers met gefiltreerd zeewater. Na 2 dagen hebben de larven voedsel nodig. Dit voedsel (kleine eencellige algen) wordt dagelijks aan de containers toegediend. Onderzoek in de jaren zestig heeft geleid tot een selectie van algensoorten die het juiste formaat en de juiste voedingswaarde hebben, en die makkelijk in grote hoeveelheden te kweken zijn. De volgende algensoorten worden door de meeste hatcheries gebruikt: *Isochysis galbana*, *Chaetoceros calcitrans*, *Tetraselmis suecica* en *Pavlova lutheri*. De larven blijven in de containers, waarvan het water regelmatig wordt ververst, tot de metamorfose tot broed plaats vindt. Het broed kan vervolgens worden opgekweekt in zogenaamde downwelling systemen. Het broed ligt op zeven die in bakken zijn geplaatst en gefiltreerd zeewater stroomt van boven naar beneden door de zeef. Er kan gevoerd worden met gekweekte algen op basis van steriele monocultures of op basis van natuurlijk fytoplankton. De vestiging van het broed kan ook plaatsvinden op touwen en dan kunnen de touwen in een hangcultuur worden geplaatst voor verder uitgroei. Vanaf 2-3 mm kan het broed uit de downwellers buiten worden opgekweekt in upwelling systemen. Dit zijn zeven in bakken waarbij water van onder naar boven door de zeven stroomt. Uiteindelijk kan het in een hatchery/nursery geproduceerde mosselzaad worden uitgezet in een hangcultuur of uitgezaaid op bodempercelen.

Het RIVO heeft in 2004 op laboratoriumschaal mosselbroed geproduceerd. Vanaf 2005 is dit voortgezet in een IAZ samenwerkingsproject met RIVO, Roem van Yerseke, INVE en Hogeschool Zeeland. Hierbij worden bij de Roem van Yerseke mosselen in een hatchery/nursery op pilot schaal geproduceerd.

1.3. Proeven bij Centrum voor Schelpdieronderzoek in 2004

Ter voorbereiding van het project bij de Roem van Yerseke zijn in 2004 proeven op lab-schaal uitgevoerd (Kamermans et al., in prep.). In deze fase zijn stock culturen van algen opgezet en doorgekweekt tot batch culturen van 5 liter, daarnaast is mossel broedstock aangezet tot paaien en zijn larven opgekweekt in 25 liter containers. Ook heeft vestiging en uitgroei tot zaad (5 mm) plaatsgevonden.

1.3.1. Algenkweek

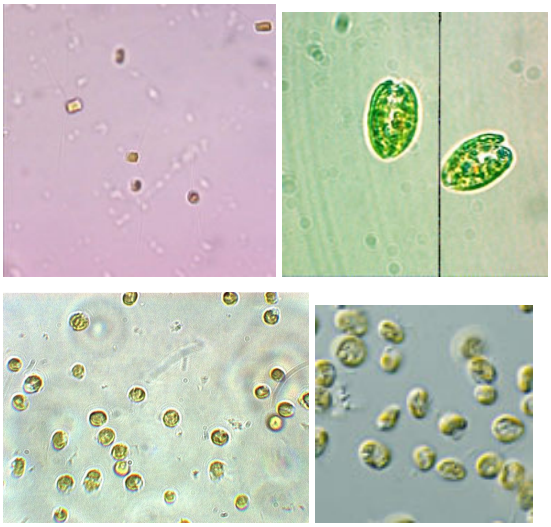
Kweek in een klimaatkamer van 19 °C

Er zijn vier soorten algen in kweek gebracht op het RIVO (figuur 2a). *Chaetoceros gracilis*, dit is een diatomee, en drie soorten falgellaten: *Tetraselmis suecica*, *Isochrysis galbana* en *Pavlova lutheri*. Meer informatie over de verschillende soorten is aangeven in tabel 1.

Tabel 1. Informatie over op het RIVO-CSO in kweek gebrachte algen soorten.

soort	Herkomst	afmetingen	temperatuur-range	Referentie
Chaetoceros gracilis	Universiteit van Gent	3.5 x 3.5 µm	18 °C	www.marine.csiro.au
Tetraselmis suecica	NIOO-CEME	4 x 12 µm	22-26 °C	www.cibnor.mx
Isochrysis galbana	NIOO-CEME	4 x 6 µm	3-28 °C	www.cibnor.mx
Pavlova lutheri	NIOO-CEME	3 x 6 µm	11-26 °C	http://ccmp.bigelow.org

Stockcultures van 80 ml zijn doorgekweekt naar batch cultures van 4.5 liter (figuur 2b). Als medium (water met voedingsstoffen) werd een door het NIOO-CEME aangepaste versie van het F2 medium gebruikt. Het behaalde gemiddelde celdichtheid was 5 miljoen cellen per ml. In 2005 zijn deze startcultures gebruikt om de grotere culturen in de hatchery van de Roem van Yerseke te enten. Op het moment waarop de faciliteiten voor de kweek van startcultures daar klaar waren is overgeschakeld naar startcultures van de Roem.



Figuur 2a. Van links boven naar rechts beneden: Chaetoceros gracilis, Tetraselmis sp., Isochrysis galbana en Pavlova lutheri.

Figuur 2b. Algenkweek in 5 liter flessen.

Kweek in klimaatkamer met water van de tarbotkwekerij

Verschillende experimenten zijn uitgevoerd met de kweek van algen op basis van water uit een visbassin van de tarbotkwekerij van Kees Kloet. De achterliggende gedachte hierbij is dat er op deze manier bespaard kan worden op de aanmaak van medium voor de algen. De resultaten zijn beschreven in de rapporten van HZ studenten Renee Quist en Maarten de Kort (Quist 2003, de Kort 2004) en bijlage 1 van dit rapport. De belangrijkste conclusie was: *Chaetoceros gracilis* kan succesvol worden gekweekt met water van een tarbotkwekerij. De kweek van algen kan een eerste zuiveringsstap zijn voor de viskwekerij. Of de algen ook dezelfde voedingswaarde voor schelpdierlarven hebben als algen geproduceerd in standaard medium dient nog te worden vastgesteld. In 2005 is dit onderwerp niet vervolgd.

Kweek buiten in bakken van 2 m^3

De kuipen werden gevuld met 5 µm gefiltreerd zeewater uit de verswaterleiding. Het water werd verrijkt met stikstof en fosfaat volgens de verhouding van het F2 medium (28,8 gram NH_4Cl en 3,2 gram $NaH_2PO_4*H_2O$ per 1/3 vulling van de kuip). Gemiddeld was het chlorofylgehalte 245 µg per liter en regelmatig werden waarden van rond de 400 µg/l behaald. Het gemiddeld aantal algencellen was 0,8 tot 1,5 miljoen per ml (zie ook figuur 3). Deze methode is zowel in 2004 (zie 1.3.4) als in 2005 toegepast om het broed van voedsel te voorzien.

Figuur 3. Algenkweek in bakken buiten.

1.3.2. Broedstock en paaien

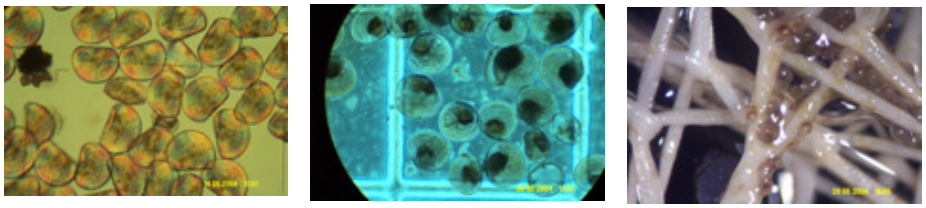
Er is een koel-unit geplaatst op het RIVO waar ouderdieren kunnen worden bewaard bij een temperatuur van 6 °C (figuur 4). Hier zijn mosselen en oesters met rijpe gonaden in geplaatst. Door de lage temperatuur kan het paaien enkele maanden worden uitgesteld. Dit is in 2005 toegepast om broedstock langdurig te bewaren. Daarnaast is broedstock geconditioneerd, d.w.z. een periode extra gevoerd (6% van het drooggewicht) waarbij de temperatuur langzaam is verhoogd (1 °C per dag).

Figuur 4. Koel-unit voor broedstock.

Mosselen en oesters werden gestimuleerd tot het loslaten van eicellen en zaadcellen door middel van een temperatuur schok, en/of het toedienen van KCl en of Prozac. Op basis van de ervaringen is voor 2005 gekozen voor het gebruik maken van een temperatuur schok.

1.3.3. Larven

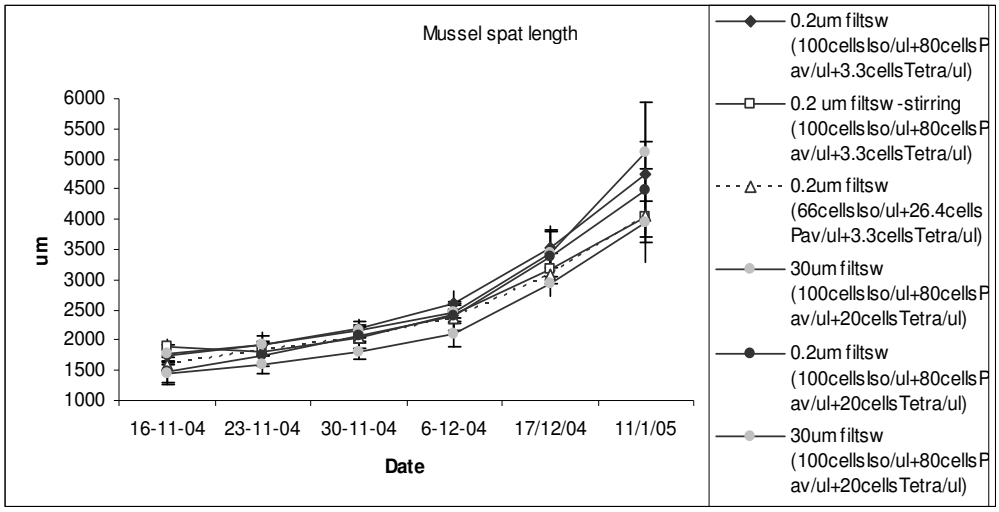
De geproduceerde larven zijn opgekweekt in containers van 25 liter. De larven lieten over het algemeen een slechte overleving zien. De veligers zakten naar verloop van tijd naar de bodem terwijl ze nog niet in het metamorfose stadium waren. Er is nog geen verklaring gevonden voor dit gedrag. Na 3-4 weken vond de broedval plaats.



Figuur 5. Van links naar rechts: 48 uur oude larven, 4 weken oude larven en op gaas gevestigd broed.

1.3.4. Broed

Na vestiging groeide het broed in een periode van ruim 1 maand uit tot 750 µm. Het broed werd binnen gevoerd met gekweekte algen. Na 3 maanden was het broed gemiddeld 1,5 mm en na 7 maanden gemiddeld 5 mm (figuur 6), dit is een trage groei. De hoeveelheid toegevoegde algen was waarschijnlijk te laag.

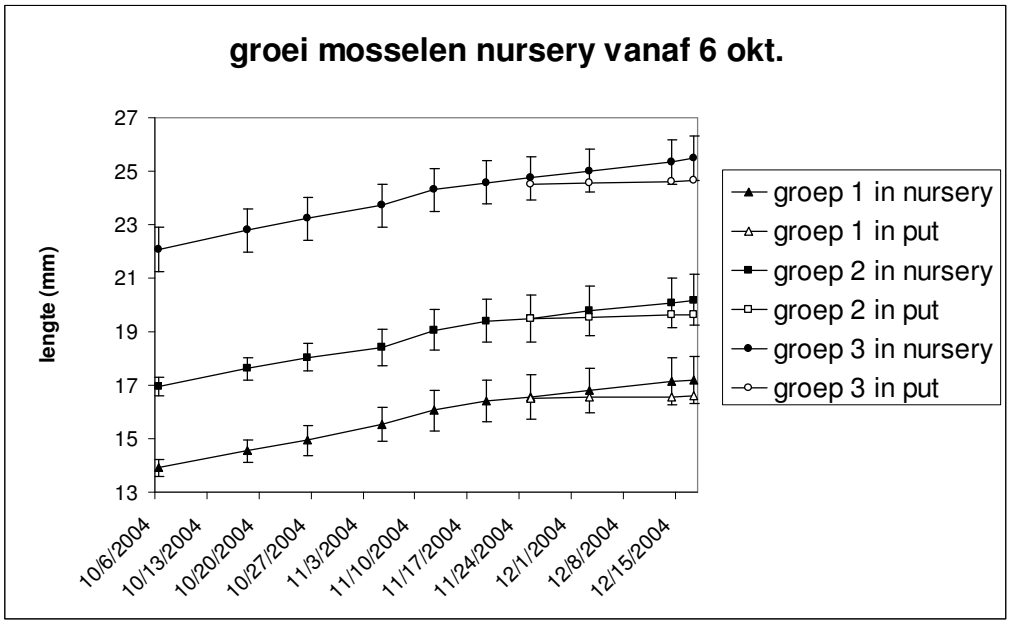


Figuur 6. Lengte toename van broed bij verschillende voedingsregimes.

Mosselbroed is ook in een nursery systeem opgekweekt. Dit is een zogenaamd upwelling systeem (figuur 7).

Figuur 7. Upwelling nursery van het RIVO-CSO waarbij water uit verswaterleiding van onder af door zeven loopt en daarna via de grijze buizen aan de bovenkant weer naar buiten loopt.

De resultaten van groei experimenten laten zien dat bijvoeren met in bakken gekweekte algen noodzakelijk is. Er is een duidelijke toename in lengte waar te nemen tot in december. Eind november is van iedere grootte klasse een groep in de put geplaatst en niet meer gevoerd. Deze lieten geen lengte toename meer zien (figuur 8).



Figuur 8. Groei van mosselbroed van drie grootte klassen in RIVO-CSO nursery en in de put.

1.4. Opschaling bij Roem van Yerseke in 2005

In 2005 is het IAZ project Operationaliseren Schelpdierhatchery/nursery bij de Roem van Yerseke gestart. Het project partners zijn Roem van Yerseke, RIVO, INVE en de Hogeschool Zeeland. Het doel van het IAZ project is hatchery en nursery technieken voor de mossel te operationaliseren op praktijkschaal. Omdat het project is opgezet in nauwe samenwerking met een groot mosselkweek- en handelsbedrijf is praktische toepassing gewaarborgd. Dit bedrijf heeft nauwe contacten met de andere leden van de schelpdiersector, en geldt als voorloper bij innovaties. Samenwerking met INVE betekent dat een centrale (Belgische) speler op het gebied van visvoeding en supplementen inbreng levert en de resultaten verder kan benutten in de diervoedingsector. Indien het geteste producten succesvol zijn gebleken zullen ze beschikbaar komen voor de markt. De betrokkenheid van de Hogeschool Zeeland - Aquatische Ecotechnologie biedt de mogelijkheid de praktijkervaringen in het onderwijs te gebruiken, en de initiatieven op het gebied van aquacultuur te versterken.

Het project is een uitbreiding van een pilot op lab-schaal die is uitgevoerd in 2004. In de opschalingfase zijn grotere volumes algen gekweekt, ouderdieren geconditioneerd zodat paaien ook buiten het seizoen kan plaatsvinden, larven opgekweekt in grotere volumes, en broed en algen gekweekt bij de oesterputten. Het voorliggende rapport presenteert de resultaten van deze opschaling bij de Roem van Yerseke.

2. Materialen

Op basis van bestaande kennis voor in hatcheries gekweekte schelpdiersoorten is in maart 2005 een berekening gemaakt voor de omvang van de hatchery. Vervolgens is een lijst met benodigdheden, prijs en leverancier opgesteld. Daarna is gestart met de aanschaf en constructie.

2.1. Watervoorziening en hygiëne

- zeewater
- bezinkbasin en algenzeef
- warmte wisselaar
- filters tot 1 µm
- UV filter
- pompen
- verzamel bassin
- ringleiding
- schoonmaakmiddelen

Figuur 9. Rechts op de foto is het bezinkbasin te zien, daarnaast een zandfilter en daarachter twee kaarsfilters en rechts het verzamelbassin. De leidingen zijn onderdeel van de ringleiding.

Figuur 10: Twee series van kaarsfilters van 25, 10, 5 en 1 µm.

2.2. Algenkweek binnen

- klimaatkamer (18 - 24 ^{0}C)
- ent algen
- gefiltreerd en UV behandeld zeewater
- luchtvoorziening (incl. pomp)
- stelling voor ophangen zakken en bevestigen TL buizen
- plastic zakken
- behangtafel voor sealen plastic zakken
- microscoop (vergroting 400x) voor tellen algen
- telkamers voor microscoop
- autoclaaf voor steriliseren glaswerk
- autoclaveerbare slangen voor toevoer lucht
- Sartorius luchtfilters
- TL Lampen
- tijdklok voor TL verlichting
- nutriënten, spore-elementen en vitaminen voor medium
- labtafel
- warm en koud stromend zoet water voor schoonmaken materiaal
- pH en temperatuur meter
- Hach kit voor nutriëntenmetingen
- afvoergoot voor water als zakken scheuren
- entkast voor over enten algen cultures
- afzuigkast voor werken met schadelijke chemicaliën
- klimaatkast voor kweek stock cultures
- glaswerk
- Ependorfbuisjes 1,5 ml voor vitaminen

- spuiten voor toevoegen vitaminen
- 0,2 µm filters voor spuiten
- vette watten
- steriele pipetten
- koelkast voor bewaren medium
- vriezer voor bewaren vitaminen
- seal machine
- micropipetten

2.3. Algenkweek buiten

- bassins
- beluchting (of pomp of peddelwiel)
- elektriciteit aansluiting
- nutriënten

2.4. Broedstock unit

- ouder dieren
- bassins met rekken waarbij stromend water bij verschillende temperaturen (5-18 0C) kan worden gehouden
- algen voor broedstock
- microscoop (400x) voor monitoren gonaden ontwikkeling

2.5. Larven unit

- klimaatkamer 18-19 0C
- containers voor opkweek larven toediening voedsel via slangen en slangenpomp of zwaartekracht
- gefiltreerd en UV behandeld zeewater
- luchtvoorziening
- zeven van verschillende maaswijdte voor uitstroom opening larven (30 µm, 45 µm, 60 µm, 90 µm, 150 µm)
- afvoerbak voor water van larvencontainers
- dataloggers voor temperatuurmetingen
- stereomicroscoop (40x) voor tellen en meten larven
- afvoergoot voor water als containers worden geleegd

- downwelling vestigingsbak met zeven
- vestigingsmateriaal (zeven, netten, touwen, kokkelschelpen)

2.6. Nursery

- downwelling bak met zeven met maaswijdte van 150 µm en 200 µm
- upwelling bak met zeven met maaswijdte van 200 µm, 500 µm, 1000 µm, 2000 µm, 3200 µm, op platform RIVO of in oesterput
- of aan touwen in hangcultuur Neeltje Jans
- voersysteem om algen van buitenkweek in nursery te krijgen

3. Protocollen

3.1. Algen

Een mono-cultuur van algen soorten van *Isochrysis* (T-ISO) en *Chaetoceros gracilis* werd gekocht bij Guernsey Seafarms. De bereiding van cultuur medium, voorraad cultuur, start cultuur en plastic zak culturen wordt hier beschreven.

3.1.1. Cultuur medium

Benodigdheden:
Demiwater
1 L glazen flessen
10 ml buizen
0.45 µm membraan filter
Injectie naalden
Steriel spuiten
Nutriënten
Analytische balans
Schaaltjes

- Walne oplossing

Oplossing 1.
Schenk de volgende hoeveelheid nutriënten in een schone fles met 1 L demiwater en geautoclaveerde oplossing. Als dit afgekoeld is bewaren bij 4°C.

Tabel 2. Hoeveelheid chemicaliën nodig voor 1 L oplossing Walne medium

Stof	**Hoeveelheid**
Na_2EDTA	45 g
H_3BO_3	33.6 g
$NaNO_3(KNO_3)$	100 g (116 g)
$NaH_2PO_4*2H_2O$	20 g
$MnCl_3*4H_2O$	0.36 g
$FeCl_3*6H_2O$	1.30 g
Oplossing 2	1 ml

Met deze oplossing kan 1000 liter medium gemaakt worden.

Oplossing 2

Schenk de volgende nutriënten in een schone geautoclaveerde fles met 100 ml demiwater. Voeg 1 ml HCl 36% toe om alles op te lossen. Bewaar de oplossing in de koelkast bij 4 °C.

Tabel 3. Hoeveelheid chemicaliën nodig voor 100 ml oplossing 2 Walne medium

Stof	**Hoeveelheid**
$ZnCl_2$	2.1 g
$CoCl_2*6H_2O$	2.0 g
$(NH_4)_6Mo_7O_{24}*4H_2O$	0.9 g
$CuSO_4*5H_2O$	2.0 g

- Vitamine oplossing

Autoclaveer 100 ml demiwater en voeg de volgende vitamines toe.

Tabel 4. Hoeveelheid chemicaliën nodig voor 100 ml Vitamine oplossing Walne medium

Stof	**Hoeveelheid**
Thiamine chlorhydraat	200 mg
Cyanocobalamine	10 mg

Breng deze oplossing over in 10 ml buizen door de oplossing te filtreren door een 0.45 µm membraan filter. De vitamine oplossing moet bewaard blijven bij –18 °C.

Met elke 10 ml buis kan 100 L medium bereid worden.

- Diatomeeën cultuur oplossing

Maak 2 oplossingen door het toevoegen van de volgende nutriënten aan 1 liter demiwater. Autoclaveer de 2 oplossingen en bewaar ze in de koelkast bij 4 °C.

Tabel 5. Hoeveelheden chemicaliën nodig voor extra diatomeeën oplossing

Stof	**Hoeveelheid**
Natrium metasilicaat	20 g
Kalium nitraat	100 g

Met deze oplossing kan 250 L medium gemaakt worden.

Tabel 6. Volume van de chemicaliën oplossing nodig per liter gefiltreerde zeewater.

	Algen soorten	
	T-ISO	*Chaetoceros gracilis*
Walne oplossing (ml oplossing/l gefiltreerd zeewater)	1	1
Vitamine oplossing (ml oplossing/l gefiltreerd zeewater)	0.1	0.1
Silicaat (ml oplossing/l gefiltreerd zeewater)	-	4

3.1.2. Algen voorraad cultuur, start cultuur en plastic zak culturen

Benodigdheden:

1 µm UV-licht bestraald zeewater
Reageerbuizen
Siliconen doppen
300 ml Erlenmeyers
3 L Erlenmeyers
Watten
Aluminium folie
Detol
Ethanol 70 %
Bunsen brander
100-1000 µl automatische pipet
1-10 ml automatische pipet
Pipet tips
Buizen rek
2 ml steriele weggooi pipetten
Steriel plastic beluchting slangen

Voorraad cultuur

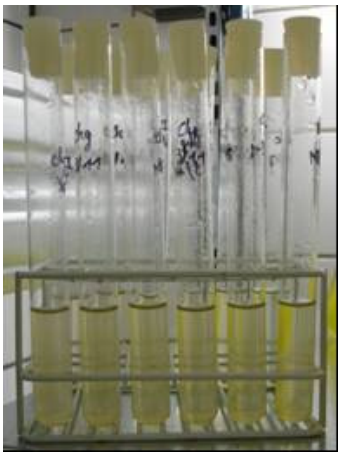
De voorraad cultuur wordt gehouden in gesteriliseerde reageerbuizen afgesloten met siliconen doppen of watten. Ze worden bewaard in de precultuur kamer bij een temperatuur van 20 °C.
Nieuwe voorraad cultures worden elke 2 weken gemaakt om ze in goed staat te houden. Om risico's te vermijden worden er 2 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 detol 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. 20 reageerbuizen (10 per algensoort) worden gevuld met 9 ml gefiltreerd zeewater (over 1 µm filter gefiltreerd en bestraald met UV licht) en 9 µl Walne medium. Voor *Chaetoceros gracilis* wordt hierbij ook nog 40 µl silicaat toegevoegd.

3. De reageerbuizen worden bedekt met siliconen doppen of met watten en aluminium folie en geïncubeerd in de autoclaaf bij 120 °C gedurende 15 minuten.

4. Als de reageerbuizen afgekoeld zijn dan zijn ze gereed om geïnoculeerd te worden. De siliconen dop of watten wordt verwijderd en de bovenkant van de buis wordt door de vlam gehaald van de brander. Zorg ervoor dat de vlam van de brander blauw is door de zuurstof toevoer te regelen. 1 ml van de monocultuur ontvangen van Guernsey (T-ISO en *Chaetoceros gracilis*) wordt gebruikt voor de inoculatie van de reageer buizen. De bovenkant van de reageerbuis wordt nog een keer door de vlam gehaald voordat de siliconen dop of de watten teruggeplaatst wordt.

Om de cultuur te continueren wordt de 1 ml genomen van de 14 dagen oude voorraad culturen.



Figuur 11: Voorraad culturen van T-Iso en Chaetoceros gracilis.

Kleine start culturen

Het eerste inoculum voor onze start culturen komen van de *Isochrysis* (T-ISO) en *Chaetoceros gracilis* voorraad cultuur. Als deze start culturen groeien, zullen ze gebruikt worden als inoculum voor de grotere start culturen, 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 Detol 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 200 ml gefiltreerd zeewater (1 µm filter, UV licht bestraald) en bedekt met watten en aluminium folie en geïncubeerd in de autoclaaf bij 120 °C gedurende 15 min.

3. Na verwijdering van de watten wordt de hals van de erlenmeyer door een blauwe vlam gehaald van de brander. De watten worden gedurende de inoculatie geplaatst op een ontsmet stuk aluminium folie. 250 µl Walne medium wordt gepipetteerd in de Erlenmeyer samen met een paar druppels Vitamine oplossing. In geval van *Chaetoceros gracilis* wordt ook 1 ml silicaat (Na_2SIO_3) toegevoegd aan de start cultuur.

4. De bovenkant van de voorraad cultuur en de hals van de startcultuur wordt door de blauwe vlam gehaald en 25-50 ml van de oude cultuur wordt overgebracht in de nieuwe algen cultuur.

5. De hals van de erlenmeyer wordt door de blauwe vlam gehaald en bedekt met watten en aluminium folie.

6. De datum van inoculatie en de algen soort worden op de nieuwe cultuur geschreven en de cultuur wordt op het startcultuur rek geplaatst.

7. De culturen worden niet belucht maar elke dag geschud.

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

Figuur 12: Kleine start culturen van T-Iso en Chaetoceros gracilis.

Grote start culturen

Er worden 3 L erlenmeyers gebruikt om de grote culturen te bewaren. Deze culturen worden ook gehouden in de precultuur kamer onder een licht intensiteit van 2000 luxes en kamertemperatuur van 20 °C. Als inoculum voor deze grote start culturen worden kleine start culturen gebruikt die niet ouder zijn dan 14 dagen.

1. De eerste stap is het ontsmetten van de werkplek en handen. Een kleine hoeveelheid Detol 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 watten en aluminium folie en geïncubeerd in de autoclaaf bij 120 °C gedurende 15 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 T-ISO okay en het ontbreken van elk type contaminatie. Allen goede culturen worden gebruikt.

4. Na verwijdering van de watten wordt de hals van de erlenmeyer door een blauwe vlam van de brander gehaald. De watten worden gedurende de inoculatie geplaatst op een ontsmet stuk aluminium folie. 2,5 ml van Walne medium en 250 µl vitamine oplossing worden gepipetteerd in de Erlenmeyer. Bij *Chaetoceros gracilis* wordt ook 10 ml silicaat (Na_2SIO_3) toegevoegd aan de start cultuur.

5. De hals van de kleine start cultuur wordt door een blauwe vlam gehaald en 150-200 ml wordt overgebracht in de nieuwe cultuur.
6. De hals van de erlenmeyer wordt door de blauwe vlam gehaald, dan is de beluchting pipet voeg en de erlenmeyer bedekken met watten en aluminium folie.

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

8. Deze culturen worden belucht.

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

Figuur 13. Grote start culturen van Chaetoceros gracilis (links) en T-ISO (rechts).

Figuur 14. Rechts op de onderste plank zijn flessen met medium te zien. Links op de onderste plank de kleine start cultures en daarboven de grote start cultures.

Plastic zak culturen

Benodigdheden
Plastic zakken
Gefiltreerd en UV-licht bestraald zeewater
Bleekwater
Natrium hypochloriet oplossing
Natrium thiosulfaat
Chloor test
Pasteur pipetten
Silicone slangen
Pastic clips
Peroxide+peracetic acid oplossing

De cultuur op grote schaal wordt in een andere kamer gehouden dan de preculturen. Deze kamer heeft een temperatuur van ongeveer 20-22°C. Plastic zakken van 25 en 50 L worden gebruikt om de batch cultuur te houden.

1. De plastic zakken worden gevuld met gefiltreerd zeewater (1 µm, UV-licht bestraald) en de chemische sterilisatie vindt plaats met 0.5 ml 15% natrium hypochloriet oplossing per liter gefiltreerd zeewater.

2. 24 uur na chloreren wordt de rest van natrium hypochloriet geneutraliseerd met thiosulfaat (50 mg per liter gefiltreerd zeewater).

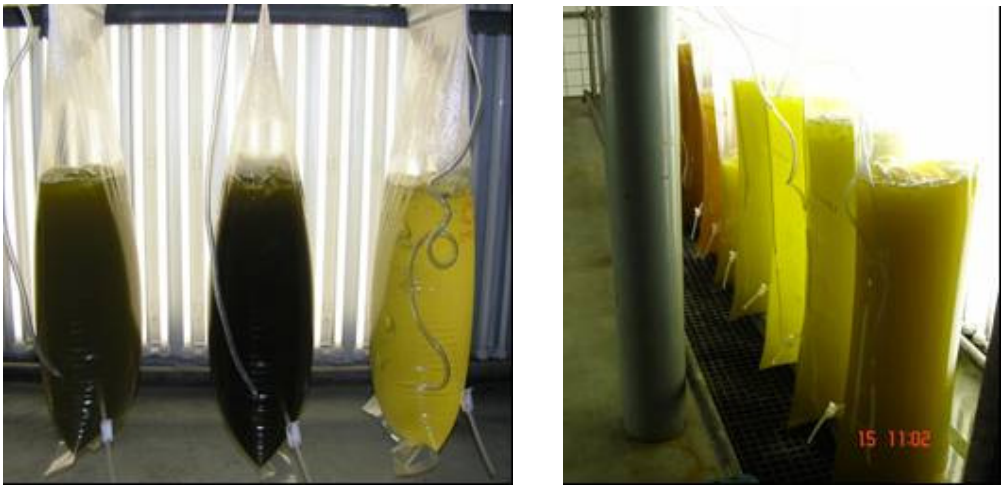
3. De beluchting wordt hierna toegevoegd aan de zakken en na een korte tijd wordt er een chloor test uitgevoerd om zeker te zijn van de afwezigheid van chloor.

4. De oppervlakte die in aanraking komt met het materiaal dat gebruikt wordt gedurende de inoculatie wordt, ontsmet met detol. De handen worden ontsmet met ethanol.

5. De nutriënten worden toegevoegd in de hoeveelheden zoals vermeld wordt in tabel 6.

6. Een grote startcultuur (minimaal 50.000 cellen per ml), meestal 14 dagen oud, wordt toegevoegd. De kwaliteit van de algen word altijd voorafgaand aan inoculatie bepaald onder de microscoop (x40 en x100 vergroting).

7. De materialen gebruikt voor de inoculatie worden gewassen met een peroxide+peracetic acid oplossing en hierna afgespoeld met water.

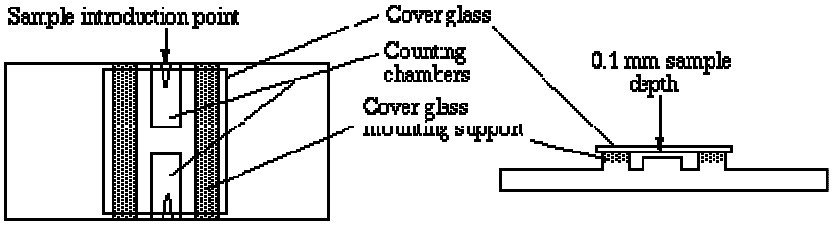


Figuur 15. Plastic zakken van 25 liter (links) en 50 liter (rechts) met algencultuur.

3.1.3. Het bepalen van de algendichtheid

Benodigdheden:
Microscope
Burker Hematocytometer
Pasteur pipet
Lugol
Teller

Er zijn meerdere manieren om de hoeveelheid algen biomassa in culturen te bepalen. In ons geval worden cellen rechtstreeks geteld onder de microscoop m.b.v. een hematocytometer.
Een hematocytometer (figuur 16) is een dik preparaat glaasje met twee tel kamers op de oppervlakte, iedere kamer is 1*1 mm. Een speciaal dekglas wordt over deze twee kamers geplaatst die een diepte van 0.1 mm geeft zodat het totale volume van elke kamer 0.1 mm^3 wordt.



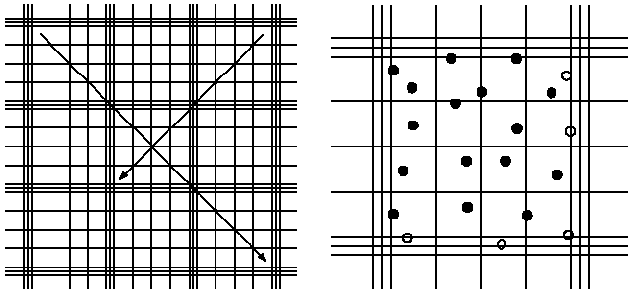
Figuur 16. Hematocytometer.

1. De eerste stap in het tellen van algen is het nemen van een klein volume van onze algen cultuur. Met betrekking tot T-ISO is het gemakkelijker om de cellen voor het tellen te doden met de volgende procedure: - plaats 10 ml cultuur monster in een maatcilinder
- voeg enkele druppels lugol of 2 druppels 4% formol toen en meng goed
Als de culture te dicht is, kan verdunning nodig zijn.

2. Het dekglas wordt geplaatst over de hematocytometer door de opstaande rand eerst met spuug te bevochtigen en daarna het dekglas goed aan te drukken. Als het goed vast zit zijn op die plaats de kleuren van de regenboog te zien. Hierna worden één of twee druppels van de algen monsters in de tel kamer gepipetteerd met een Pasteur pipet.

3. De celdichtheid wordt als volgt geschat: het centrale rooster van elk kamer is onderverdeel in 144 vakken. Het aantal cellen in 25 vakken (de twee diagonalen plus een vak, figuur 17a) worden geteld. Op elk vak worden de cellen in het midden en op twee grenzen geteld (figuur 17b). Dezelfde procedure wordt gevolgd bij de tweede tel kamer.

4. Het gemiddelde wordt uitgerekend. Dit geeft het aantal algen cellen per 1/10 µl. Om te weten hoeveel cellen er per ml aanwezig zijn in onze algencultuur wordt dit aantal vermenigvuldigd met 10000.



Figuur 17. a) Het diagonaal tellen van algencellen in de vierkantjes. b) Tellen van de algencellen in het centrum en twee randen van het vierkantje (de zwarte bolletjes).

3.2. Broedstock

3.2.1 Houden

Benodigdheden:
Bakken
Koelsysteem
Ongefiltreerd zeewater

Na de verwijdering uit het veld en voor de conditionings-periode moeten volwassen mosselen onder constante temperatuur gehouden worden. Rijpe volwassen exemplaren kunnen enkele maanden in paai conditie gehouden worden. Hiervoor wordt de broodstock gehouden in bakken met ongefiltreerde afgekoeld zeewater. De temperatuur van dit water moet onder de 10°C gehouden worden om risico van voortijdig paaien te vermijden. Er wordt geen bijkomend voedsel, behalve dat van het natuurlijke zeewater, toegevoegd in dit stadium.

Figuur 18. Broodstock bewaar ruimte.

3.2.2 Conditioneren

Benodigdheden:
500 l tanks
1 µm gefiltreerd zeewater (UV-licht bestraald)
25 l emmers
Slangen

Isochrysis (T-ISO) en *Chaetoceros gracilis* culturen

De broodstock conditionering vindt plaats in een doorstroom systeem.

1. Mosselen worden van de bewaarplaats naar de conditioneringsplaats gebracht. Hun schelpen worden geschrobd en afgespoeld met zoetwater om de byssus draden en epifauna organismen te verwijderen.

2. Ze worden daarna geplaatst in de conditionering tanks die bestaan uit 500 l vaten. De mosselen krijgen gefiltreerd zeewater met een doorstroomsnelheid van 4 liter per minuut.

3. De start temperatuur van het water moet gelijk zijn aan de temperatuur van de bewaarplaats en verhoogd worden met 1°C per dag tijdens het conditioneren totdat er een temperatuur bereikt wordt van 16°C. Deze temperatuur wordt aan gehouden tot het einde van het proces.

4. Het voedsel rantsoen tijdens de conditioneringsperiode wordt gebaseerd op het drooggewicht van de broedstock. Het drooggewicht van de algen dat nodig is per dag tijdens conditioneren komt overeen met 6% van het gemiddelde droog gewicht van de volwassen mosselen.

Uit metingen van het RIVO (van Stralen, 1988) blijkt dat

1 gr droog gewicht mossel = 21 gr nat gewicht mossel (vlees+schelp+water)

Hiermee kunnen we het drooggewicht van de mosselen die we gebruiken voor conditioneren uitrekenen. Vervolgens wordt de benodigde 6% berekend voor het droogwicht van de algen.

We weten het drooggewicht weten van 1 miljoen algen cellen (tabel 7 uit Helm et al, 2004). Daardoor kunnen we bepalen hoeveel cellen correspondeert met het verkregen drooggewicht.

Tabel 7. Droog gewicht van algen.

Drooggewicht (mg) van algen per 10^6 cellen	
Algen soort	Gewicht
T-Iso	0.02
Chaetoceros gracilis	0.07

- Formule voor het berekenen van het aantal cellen van T-Iso nodig om de broedstock te voeden:
Droog gewicht van algen nodig (g) * (10^6 cellen/0.00002 g)= cellen van T-Iso

- Formule voor het berekenen van het aantal cellen van *Chaetoceros gracilis* nodig om de broedstock te voeden:
Droog gewicht van algen nodig (g) * ((10^6 cellen/0.00007 g)= cellen van *Chaetoceros gracilis*

- Formule voor het berekenen van het aantal cellen van T-Iso + *Chaetoceros gracilis* nodig voor voeren van de broodstock:
Isochrysis: Helft droog gewicht algen nodig (g) * (10^6 cellen/0.00002 g) = cellen van T-Iso
Chaetoceros: Helft droog gewicht algen nodig (g) * (10^6 cellen/0.00007 g) = cellen *C. gracilis*

5. Het volume, dat dagelijks nodig is voor het conditioneren van de broedstock wordt geschonken in 25 liter emmers. De emmers worden hierna gevuld tot de bovenkant met zeewater. Het voedselrantsoen wordt automatisch gedoseerd in de conditionering tank met een stroomsnelheid van 16 ml per minuut.

6. Één keer per week wordt de tanks geleegd en schoongemaakt met peroxide en zoetwater. Het is nodig om elke dag de tanks zorgvuldig te observeren om dode mosselen te kunnen verwijderen. Een dagelijkse controle van de temperatuur wordt ook uitgevoerd.

3.2.3 Paaien en bevruchten

<u>Benodigdheden:</u>
Mosselen (meer dan 100)
Bakken
Rol zwart plastic
Water verwarmingselementen
Plastic potjes (250 ml)
Viltstift
3-5 liter van *Isochrysis* (T-ISO) en *Chaetoceros gracilis* culturen
Gefiltreerd zeewater
30 µm zeef
90 µm zeef
Plunger
1 liter maatcilinders

1 liter bekers
Plastic pipet (3 ml)
100-1000 µl automatische pipetten
Tel kamer
Teller
Binoculair
Microscoop

Paaien

1. Volwassen mosselen worden uit de conditionering tanks of uit de bewaarplaats gehaald en geplaatst in de ruimte waar paaien plaatsvindt. Meer dan 100 mosselen zijn nodig voor het paaien.

2. Zij worden gereinigd met zoetwater en voor een korte periode gedroogd.

3. Zij worden dan geplaatst in bakken bedekt met een zwart plastic vel om voor een donkere achtergrond te zorgen. De bakken worden met gefilterd zeewater gevuld met een temperatuur van 10°C-14°C hoger dan de temperatuur in de conditionering tanks of in de bewaarplaats.

4. 30 minuten na hun verplaatsing naar het verwarmde zeewater wordt, 500 ml algen (gewoonlijk de soort die op dat moment in een groter volume beschikbaar is in de kwekerij) toegevoegd aan elk van de bakken die gebruikt worden voor het paaien.

5. Indien paaien niet gebeurt binnen 30 minuten na de toevoeging van algen dan wordt het verwarmde zeewater verwijderd en de mosselen 15 minuten gedroogd.

6. Na deze droge periode worden de bakken weer gevuld met gefiltreerd water van 9°C-12°C. Een half uur later wordt het zeewater opnieuw vervangen door gefiltreerd zeewater van 24°C.
Deze koel-warm cyclus wordt herhaald gedurende 4-5 uur. Indien de mosselen binnen die periode niet paaien worden ze terug naar de conditionering tanks of naar de bewaarplaats gebracht (om te vermijden dat deze mosselen door vertraagd paaien de overige mosselen aanzet tot paaien moeten ze bewaard worden in een afzonderlijke tank).

7. Volwassen mosselen kunnen paaien in het koele of het warme deel van de cyclus, meestal gedurende het warme deel. Gewoonlijk, paaien mannetjes eerder dan vrouwtjes. Paaiende

mannetjes worden een tijd in de bakken gelaten omdat sperma een bijkomende stimulus kan geven voor de rest van de broedstock.

8. De paaiende dieren worden in afzonderlijke plastic potten geplaatst. De plastic potten worden gevuld met gefiltreerd zeewater van 18°C. Het tijdstip waarop de mosselen in het potje worden gezet hebben moet op de pot geschreven worden om de leeftijd van het sperma en de eicellen te onthouden. Als de paaiende mosselen van verschillende locaties zijn moet de oorsprong van de broedstock ook op de pot worden opgeschreven.

9. Het sperma veroudert snel en het water in de plastic potten met mannetjes moet iedere 30 minuten ververst worden. De nieuwe tijd wordt op de pot geschreven.

10. Bij de vrouwtjes moeten de eicellen gebruikt worden binnen 1 uur na afgifte. Na het paaien zijn de eicellen peervormig maar ze hydrateren snel in contact met zeewater en krijgen een bolvormige vorm. De kwaliteit van de eicellen (gebaseerd op hun vorm) van verschillende paaiende vrouwtjes wordt bepaald onder de microscoop (40x en 100x vergroting)

11. Als de kwaliteit van de eicellen vastgesteld is, worden de eicellen door een 90 µm zeef gehaald en opgevangen in een 30 µm zeef. Ze worden dan voorzichtig in een schoon bekerglas gespoeld met gefiltreerd zeewater van 18°C. De beker wordt aan gevuld tot 1 liter.

12. De inhoud van de beker wordt geroerd met een plunger en drie monsters van 100 µl worden genomen om de eicellen te tellen.

13. De monsters worden in een tel kamer overgebracht en geteld onder een binoculair. Als de eicel dichtheid hoger is dan 200-300 eicellen per ml wordt een deel van de eicel suspensie over geschonken in een extra beker met gefiltreerd zeewater om de eicel concentratie te verlagen.

14. Het verse sperma van verschillende mannetjes wordt bij elkaar in een schone beker gegoten.

Bevruchting

1. Voor de bevruchting wordt 2 ml van het mengsel toegevoegd aan elke liter eicelsuspensie.

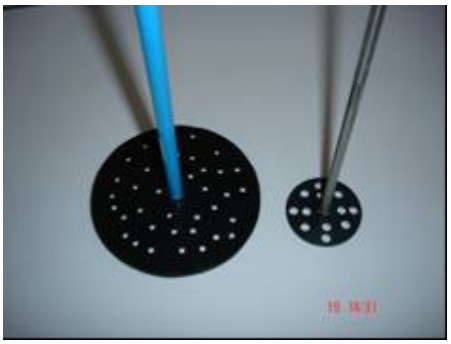
2. Tijdens de bevruchting, die ongeveer 40-60 minuten duurt, wordt de inhoud van de beker voorzichtig gemengd met een plunger (figuur 19). In deze periode zijn de eerste tekenen van bevruchting te zien door het verschijnen van het polaire lichaam.

3. Na het verschijnen van het polaire lichaam, beginnen de bevruchte cellen te delen. Eerst in 2 gelijke cellen en hierna in 4 ongelijke cellen waarbij 1 grote cel omringd wordt door 3 kleine cellen.

4. Het percentage eicellen dat zich normaal ontwikkeld wordt bepaald met de microscoop (vergroting van 40x of 100x).

5. Embryo's worden hierna geplaatst in 1250 liter kegelvormige tanks of in 100 liter platte bodem tanks gevuld met gefiltreerd zeewater van 18°C. Ze moeten bewaard worden bij een dichtheid niet hoger dan 80 embryo's/ml en bij voorkeur een concentratie van 20-50 embryo's/ml.

6. Lichte beluchting wordt toegediend tijdens de ontwikkeling van de embryo's.



Figuur 19. Stokje met geperforeerde schijf gebruikt voor het mixen van het water tijdens de bevruchting.

3.3. Larven

<u>Benodigdheden:</u>
60-90-150-200 µm zeven
1 µm gefiltreerd zeewater (ultraviolet bestraald)
Geperforeerde bak
Isochrysis (T-ISO) en *Chaetoceros gracilis* culturen
Maatbekers (1-5 l)

Plunger
100-1000 µl automatisch pipet
Tel kamer
Teller
Lugol
Reageerbuizen (15 ml)
Microscoop
Binoculair
Peroxide+peracetic acid oplossing
1250 liter kegelvormige tanks
100 liter platte bodem tanks
Slangen voor beluchting
Buizen (pijpen)

3.3.1. De ontwikkeling van embryo's

De tanks (1250 of 100 liter tanks afhankelijk van de schaal van het experiment, figuur 20) die nieuwe ontwikkeld D-larven bevatten worden 48 uur na bevruchting gedraineerd.

1. Voor het vangen en vasthouden van larven wordt er een pijp aan de afvoerkanaal klep aangesloten. De klep wordt dan geopend en de D-larven gaan door een 200 µm zeef. De larven worden in een 60 µm zeef (de zeef wordt in een geperforeerde bak geplaatst) bewaard die altijd onder gedompeld in zeewater blijft om schade aan de schelpen van de broze D-larven te voorkomen.

2. Als de tank volledig geleegd is, wordt er gefiltreerd zeewater zacht over de oppervlakte van de tank gesproeid om te verzekeren dat er geen D-larven achter blijft.

3. De larven worden opgevangen in de 60 µm zeef. De inhoud van de zeef wordt in een beker gespoeld (het volume van de beker hangt af van de hoeveelheid D-larven) en gefiltreerd zeewater wordt tot het teken toegevoegd.

Er zijn monsters van deze bekers nodig voor onderzoek naar de ontwikkeling van de larven, schatten van aantal larven en meten van schelp lengte.

4. De procedure voor het nemen van deze monsters start met het mengen van de maatbeker met een plunger. Een automatische micropipette wordt gesteld op het nodige volume en er worden monsters van de homogene suspensie genomen.

5. De ontwikkeling van de larven wordt bepaald onder de microscoop met een x40 en x100 vergroting.

6. Monsters voor het meten van schelp lengte worden in een reageerbuisje gepipetteerd en met lugol (8 druppels) gefixeerd.

7. Voor het tellen van larven, worden drie subsamples genomen. Het volume hangt af van de hoeveelheid larven (gewoonlijk van 100 of 250 µl), maar het is noodzakelijk dat de tellingen representatief zijn (meer dan 100 larven).
7.1. De monsters worden met lugol gefixeerd en het tellen wordt uitgevoerd met de binoculair.
7.2. Het gemiddelde van deze drie monsters geeft ons het aantal larven in het monster volume. Om het aantal larven per ml te rekenen, wordt het gemiddelde met een factor vermenigvuldigen die van ons monster 1 ml maakt. Om het totale aantal larven te bepalen wordt het aantal larven per ml vermenigvuldigd met het totale volume in de beker.

8. De tanks en de rest van de materialen die tijdens het tellen van D-larven gebruikt zijn worden gewassen met een peroxide+peracetic acid oplossing en enkele keren gespoeld met zoetwater.

Figuur 20. Larventanks van 1250 liter (links) en 100 liter (rechts).

3.3.2. Voeren en reinigen van D-larven

Het reinigen van D-larven vindt plaats in de 1250 l kegelvormige tanks of in de 100 l vlakke bodem tanks gebruikt tijdens embryo ontwikkeling (het volume hangt van de schaal van het experiment).

1. Deze tanks worden gevuld met zeewater (gefiltreerd door 1 µm filter en UV bestraalt) van 18°C en een saliniteit van ~30 psu. De beluchting gaat door één enkele centrale lucht slang op de bodem van de tank. D-larven worden toegevoegd aan de tank met een dichtheid van 10 larven/ml.

2. Het waterverversing van de larven tanks vindt twee keer per week plaats, op maandag en vrijdag. De procedure is gelijk aan die zoals beschreven wordt in de vorige paragraaf over embryo ontwikkeling. Tanks worden via de afvoer klep geleegd en het water door een stel van twee zeven gehaald, één met een maas afmeting groot genoeg om debris vast te houden maar niet de larven, en een zeef waar de larven vastgehouden worden. Tijdens de eerste week zal dit stel zeven een 150 en een 60 µm zeef zijn. Tijdens de tweede week na bevruchting wordt een 90 µm zeef geplaatst tussen de vorige twee. In de derde week, dicht bij het vestiging stadium, is het nodig een zeef met een afmeting groter dan 150 µm te gebruiken om te debris vast te houden (200 µm). Larven worden dan op de 90 en de 150 µm zeef vastgehouden.

3. Als de tank wordt geleegd, wordt gefiltreerd zeewater over de wanden gegoten om overblijvende larven te verwijderen.

4. De larven worden in bekers gespoeld die gefiltreerd zeewater bevatten (bekers van 1 of 5 liters zijn gebruikt). Als de larven in twee verschillende zeven zit, dan moeten ze verzameld worden in twee verschillende bekers met op elke beker de maas afmeting. Gefiltreerd zeewater wordt aan de bekers toegevoegd tot het 1 of 5 liter teken.

5. Monsters worden genomen voor de observatie van het uiterlijk en de activiteit van de larven (m.b.v. microscoop met een x40 of x100 vergroting).

6. Submonsters worden genomen om het aantal levende larven en dode larven te schatten. De procedure voor het nemen van larven monsters en schatten van overleven is hetzelfde als de procedure die gebruikt wordt voor de eicellen en de nieuw ontwikkelde D-larven. Met elke verversing worden ook monsters genomen voor het meten van de gemiddelde schelp lengte.

7. De tanks worden dan met de peroxide oplossing en een borstel gereinigd en worden goed gespoeld met zoetwater en een keer met gefiltreerd zeewater.

8. De tanks worden hierna met gefiltreerd zeewater van 18°C gevuld. De beluchting wordt hersteld en de larven terug gebracht in de cultuur tank.

9. De toevoeging van algen vindt plaats onmiddellijk na de plaatsing van de larven in de tank. Het algen dieet voor D-larven bestaat uit een mengsel van 50% T-ISO en 50% *Chaetoceros gracilis*. De larvale culturen worden dagelijks een portie van 10 cellen/µl van elk soort gevoerd. De volumes van T-ISO en *Chaetoceros gracilis* die nodig zijn voor het voeren van de larven worden met de volgende formule uitgerekend (Utting en Spencer, 1991):

$$\text{Volume (ml)} = \frac{[\text{Benodigde cel dichtheid (cellen/µl)} * \text{Volume tank (l)} * 1000]}{\text{Cel dichtheid van geoogste algen (cellen/µl)}}$$

Celdichtheid van de algen cultuur voor het voeren van de larven worden vastgesteld zoals uitgelegd wordt in het onderdeel “Het bepalen van de algendichtheid”.
Het is mogelijk dat de behoefte van algen cellen toeneemt met de leeftijd van de larven. Dit wordt herkend door helder water 24 uur na het voeren. Daarom wordt de hoeveelheid cellen/µl van elk algensoort geleidelijk verhoogd gedurende de larvale stadia.

10. Alle materialen gebruikt worden tijdens het verversen zoals bekers, buizen en zeven worden voor een korte tijd ondergedompeld in peroxide+peracetic acid oplossing en worden hierna goed gespoeld met zoetwater.

3.4. Broed

3.4.1. Broed binnen

Benodigdheden:
40 liter tanks; 100 liter tanks of 600 liter tanks
Emmers met 150 µm zeef in bodem
Buizen (pijpen)
Pomp
1 µm en 50 µm gefiltreerd zeewater
Analytische balans
Petrischaaltje
Air-lift of dompel pomp
Chaetoceros gracilis en *Isochrysis* (T-Iso) culturen

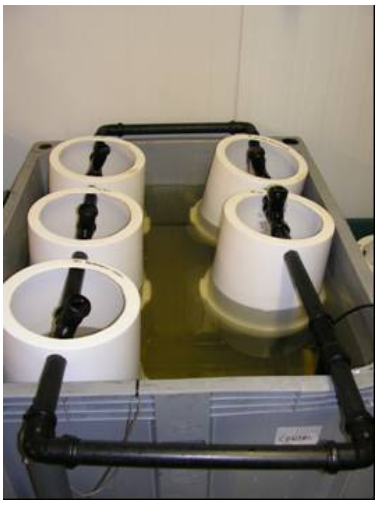
1. Pediveliger larven die achterblijven in een 150 µm zeef, worden naar een downwelling systeem gebracht dat bestaat uit een tank van 600 liter. De tank heeft vijf emmers waarvan de bodem vervangen is met een 150 µm zeef. Een serie van pijpen verbindt de emmers met elkaar en in het midden van elk emmer een buis met een open einde die de voortdurende stroom van water naar elk emmer verzekert. Een “dompel pomp” pompt het water van de bodem van de tank op en pompt het naar de aanvoer pijp in het midden van de emmers.

2. De tank wordt met 1 µm gefiltreerd zeewater gevuld en de pediveliger larven worden verdeelt over de vijf emmers.

3. Tijdens de eerste twee weken is het dieet in de aanhechting tank hetzelfde als het dieet die de larven culturen tijdens de laatste larvale stadiums krijgen. De hoeveelheid van algen die nodig zijn worden bepaald met dezelfde formule als voor de larven (paragraaf 9 van voeren en reinigen van D-larven).

4. Het verversen van de larven wordt eens per week uitgevoerd.
4.1. De eerste stap is de ontkoppeling van de pomp die het water circuleert in het systeem.
4.2. Als de tank volledig leeg is, wordt de bodem van elke emmer met een zachte borstel geschrobd om zoveel mogelijk debris te verwijderen. De zeven worden dan met gefiltreerd zeewater zacht doorgespoeld.
4.3. Tijdens het verversen worden monsters van elk emmer genomen voor het schatten van de lengte van het broed.
4.4. De aanhechting tank is dan met 50 µm gefiltreerd zeewater gevuld en de pomp opnieuw aangezet.
4.5. De algen worden in hierboven vermelde hoeveelheid toegevoegd.

5. Alle gebruikte materialen worden met een peroxide oplossing gereinigd en met zoetwater gespoeld.



Figuur 21. Downwelling nursery voor broed binnen.

Zodra het broed een afmeting van ongeveer 1-3 mm bereikt, wordt hun cultuur gewijzigd.

1. Het broed wordt eerst verwijderd van de zeef door het zacht te doorspoelen met gefiltreerd zeewater om het aantal broed per emmer vast te stellen. Het broed van elke emmer hoort gewoonlijk bij een verschillende behandeling tijdens het larvale stadium, daarom is het belangrijk om de larven afzonderlijk te houden tijdens dit proces.

2. Om hun gewicht te bepalen worden het broed zoveel mogelijk gedroogd met een tissue, daarna worden zij in een petrischaaltje geplaatst en op de analytisch balans gewogen. Een bekende hoeveelheid (b.v. 1 gram) wordt daarna gewogen en de hoeveelheid zaad geteld.
Als de hoeveelheid zaad in een gram bekend is dan wordt de totale hoeveelheid zaad per emmer uitgerekend.

3. Er worden monsters genomen voor het schatten van de broed lengte.

Als de resultaten van elke emmer bepaald zijn, wordt het mosselbroed van de verschillende emmers samengevoegd (als er weinig broed is). Ze worden dan in een air-lift reed downwelling systeem gebracht. Het volume van de tank hangt af van de totale hoeveelheid broed.

4. Vanaf dit punt wordt de voedselportie op grond van de biomassa van het broed bepaald (FAO, 2004). Rantsoen in termen van het nodige droog gewicht van de algen worden met de volgende vergelijking berekend (FAO, 2004):

$$F = (S*R)/7$$

F = droog gewicht van algen per dag (mg)
R = rantsoen als gewicht van algen (mg) per mg levend gewicht van broed per week
S = levende gewicht van broed (mg) aan het begin van elke week

Een rantsoen (R) van 0.4 heeft een praktisch rantsoen bewezen te zijn in kwekerijen omdat het niet buitensporig is in termen van algen voedsel productie en het geschikt is voor het verzorgen van bevredigende groeicijfers van meeste schelpdieren soorten (FAO, 2004).

Zodra het dagelijkse noodzakelijke voedsel voor het zaad bekend is het mogelijk om de volumes die nodig zijn van *Isochrysis* en *Chaetoceros* uit te rekenen (FAO, 2004).

$$V= (S*0.4)/(7*W*C)$$

V = volume van geoogste algen (l) om voor het dagelijkse rantsoen te zorgen
W = gewicht van 10^6 algen cellen van de nodige soort
C = geoogste celdichtheid van die soort (cellen/µl)

5. De schoonmaak van de tanks vindt eens per week plaats.

6. Nieuwe monsters om de lengte te bepalen worden iedere twee of drie weken genomen.

3.4.1. Broed en algen buiten

1. Pediveliger larven worden in een downwelling systeem gebracht. Het systeem wordt bij een oester put geplaatst. Het bestaat uit een 1000 liter tank met vijf emmers waar van de bodem door een 150 µm net vervangen zijn. Een serie pijpen verbindt de emmers met elkaar en in het midden van elke emmer is een buis met een open einde aanwezig die een voortdurende stroom van water naar elk emmer verzekert. Een dompel pomp in de oester put pompt het water op en dat gaat het naar de aanvoer pijp. De pomp is in een doos geplaatst waarvan de bodem doorboord is. Een net van 200 µm voorkomt de aanwezigheid van grote partikels die de pomp zouden kunnen verstoppen.

2. Tengevolge van lage algen concentraties in de oester put, is extra voedsel noodzakelijk. In dit stadium zijn algen uit een monocultuur niet een vereiste.
2.1. Twee 1000 liters tanks zijn dicht bij de oester put op een hoger niveau dan het downwelling systeem geplaatst.

2.2. Het water van de oester put wordt gepompt in de twee tanks van 1000 l.
2.3. Het fytoplankton in de Oosterschelde wordt dan als de inoculum gebruikt. De volgende nutriënten zijn dan toegevoegd (FAO, 2004):

Tabel 8. Nutriënten nodig voor een algencultuur buiten.

Nutriënten	**Gram per 1000 liter**
Urea (NH_2CONH_2)	1.50
Trisuperfosfaat (P_2O_5)	1.56
Natrium metasilicaat ($Na_2SiO_3*5H_2O$)	10.60

2.4. Beluchting wordt bij deze tanks toegepast met behulp van een pomp.

3. Zodra de algen starten met groeien, kunnen ze gevoerd worden aan het broed. Een buis verbindt de tanks met de doos waar de pomp in ligt. Algen druppelen ononderbroken in de doos omdat de tanks hoger geplaatst zijn naar het downwelling systeem.

4. Het dagelijks verzorgen van het systeem impliceert de meting van de temperatuur, de pH en de saliniteit van de oester put, het downwelling systeem en de algen cultuur tanks. De bodems van de emmers moeten dagelijks met een borstel gereinigd worden. Een dagelijkse controle van de doos die de pomp bevat, is ook noodzakelijk.

5. Eens per week moet de pomp worden losgekoppeld en de doos voorzichtig gereinigd.

4. Algen Kweek

4.1. Optimalisatie algenkweek

4.1.1. Kwaliteit algen

Ter controle van de kwaliteit van de algen is op het NIOO-CEME het gehalte aan onverzadigde vetzuren (HUFA, highly unsaturated fatty acids) bepaald van *Chaetoceros gracilis*, *Pavlova lutheri*, *Isochrysis galbana* and *Tetraselmis suecica* van het RIVO. Dit is vergeleken met gegevens uit het FAO handboek.

4.2.2. Optimalisatie algenkweek

In het oorspronkelijke project wordt voor de opschaling van de algenkweek gebruik gemaakt van batch cultures in plastic zakken. Voor een rendementsverbetering is toepassing van andere typen kweekreactoren noodzakelijk. Hiertoe is een bezoek gebracht aan de INVE hatchery in Rosignano Solvay om de aldaar in gebruik zijnde hoog rendement algenkweekreactor te bezichtigen. Toepassen van die techniek bij de Roem van Yerseke bleek echter niet mogelijk i.v.m. het nog in gang zijnde ontwikkelingstraject. Daarom is gewerkt aan optimalisatie binnen het bestaande batch cultuur systeem in plastic zakken. De kweek van algen in zakken van 50 liter liet een lagere concentratie zien dan in 25 liter. Een mogelijke verklaring hiervoor is dat beide zakken met een even grote luchttoevoer worden doorborreld, waardoor in het grotere volume eerder een koolstof tekort optreedt. Om de verschillen te kwantificeren is de groei van algen in zakken van 25 liter en van 50 liter vergeleken. Daarnaast zijn tests gedaan met het toevoegen van CO_2. Hierbij is de verwachting dat extra koolstof de dichtheid aan algen zal verhogen. En tenslotte is een test uitgevoerd om te zien of de algen in de 50 liter zakken mogelijk te sterk werden belicht waardoor foto-inhibitie optrad. Meer informatie over de gebruikte methoden is te vinden in het verslag van Matthijs Koole (2005).

4.2. Resultaten

4.2.1. Kwaliteit algen

Tabel 9 laat de resultaten zien van de HUFA bepaling van *Chaetoceros gracilis*, *Pavlova lutheri*, *Isochrysis galbana* and *Tetraselmis suecica* van het RIVO in vergelijking met vier andere

organisaties. Hieruit blijkt dat twee voor schelpdierlarven belangrijke vetzuren (C20:5w3 en C22:6w3) in ruime mate aanwezig zijn. Er zijn enkele opmerkelijke verschillen aangetroffen (aangegeven met grijze arcering in tabel 9). *Isochrysis galbana* van het RIVO toont een erg hoog gehalte aan C20:5w3 en C18:2w6 laat voor drie van de vier geteste algen soorten een lager gehalte zien op het RIVO dan op de andere locaties.

Tabel 9. HUFA gehaltes van RIVO algen in vergelijking met HUFA gehaltes van vier andere organisaties.

	Isochrysis galbana						
	C18:2w6t	**C18:3w3**	**C18:4w3**	**C20:4w6**	**C20:5w3**	**C22:5w3**	**C22:6w3**
Aquafauna	nm	nm	nm	nm	nm	nm	nm
FAO 2004	7	4	9	0.5	1	0.5	11.5
Ifremer	8.4	2.2	4.8	0.4	0.4	0.5	6.4
CCAP	8.9	2.5	5.2	0.5	0.6	-	9
RIVO	0.07	0.8	9.8	0.3	19.5	0.08	5.8
	Pavlova lutheri						
	C18:2w6t	**C18:3w3**	**C18:4w3**	**C20:4w6**	**C20:5w3**	**C22:5w3**	**C22:6w3**
Aquafauna	1.5	1.8	6	-	19.7	2	9.3
FAO 2004	nm	nm	nm	nm	nm	nm	nm
Ifremer	2.7	2.1	7.1	0.2	23.9	0.2	11.7
CCAP	2.6	0.6	5	0.3	15.1	0.2	7.9
RIVO	0.05	0.8	6.2	1	14	0.2	5
	Chaetoceros gracilis						
	C18:2w6t	**C18:3w3**	**C18:4w3**	**C20:4w6**	**C20:5w3**	**C22:5w3**	**C22:6w3**
Aquafauna	0.5	-	0.2	4.5	4.6	-	0.3
FAO 2004	nm	nm	nm	nm	nm	nm	nm
Ifremer	0.3	0.03	0.5	0.3	15.5	0.02	1.3
CCAP	nm	nm	nm	nm	nm	nm	nm
RIVO	0.1	0.4	0.9	2.4	20.4	0.06	1.5
	Tetraselmis suecica						
	C18:2w6t	**C18:3w3**	**C18:4w3**	**C20:4w6**	**C20:5w3**	**C22:5w3**	**C22:6w3**
Aquafauna	13.8	11.1	8.4	1.5	4.3	-	-
FAO 2004	6	5	3	1	2	-	-
Ifremer	5.6	11.3	6.6	0.7	5.7	0.3	0.4
CCAP	3.8	12.3	8.9	0.2	3.4	0.3	0.8
RIVO	0.07	6	1.1	0.4	2.5	0.01	0.01

4.2.2. Optimalisatie algenkweek

In tegenstelling tot de verwachting liet de eindconcentratie van algen in zakken van 25 liter en van 50 liter geen grote verschillen zien. Vanwege een nog onbekende reden bleef de groei in de 25 liter zakken achter. De algenconcentraties in zakken die CO_2 kregen toegediend was twee maal zo hoog als in de zakken die geen CO_2 kregen. Een negatief effect van de hoeveelheid licht werd niet geobserveerd. Meer informatie over deze proeven is te vinden in het studentenverslag (Koole, 2004).

4.3. Discussie

4.3.1. Kwaliteit algen

De HUFA bepaling heeft aangetoond dat voor schelpdierlarven belangrijke vetzuren in de door ons gekweekte algen aanwezig zijn in concentraties die vergelijkbaar zijn met wat anderen vinden (Helm et al, 2004; Robert et al, 2004). Het opmerkelijke verschil voor C20:5w3 en C18:2w6 kan mogelijk veroorzaakt zijn door de het gebruikte medium of de kweekomstandigheden zoals lichtintensiteit of hoeveelheid stiksof (Sukenik et al., 1991). Daarnaast is het gehalte aan vetzuren hoger voor algen in de exponentiele groeifase dan in de stationaire groeifase (Robert et al, 2004). In hoeverre de gehaltes wisselen gedurende de kweek is nog niet onderzocht voor onze algen.

4.3.2. Optimalisatie algenkweek

Het toevoegen van CO_2 had een positief effect op de maximale algendichtheid die kan worden bereikt in de plastic zakken van 50 liter. Deze behandeling kan worden opgenomen in de hatchery praktijk. Vervolgonderzoek is nodig om het verschil tussen de algenconcentratie in zakken van 25 liter en van 50 liter beter te begrijpen. Er vindt geen foto-inhibitie plaats, dus de hoeveelheid licht die in de hatchery wordt gebruikt om algen te kweken hoeft niet te worden aangepast.

5. Bewaren broedstock

5.1. Proeven

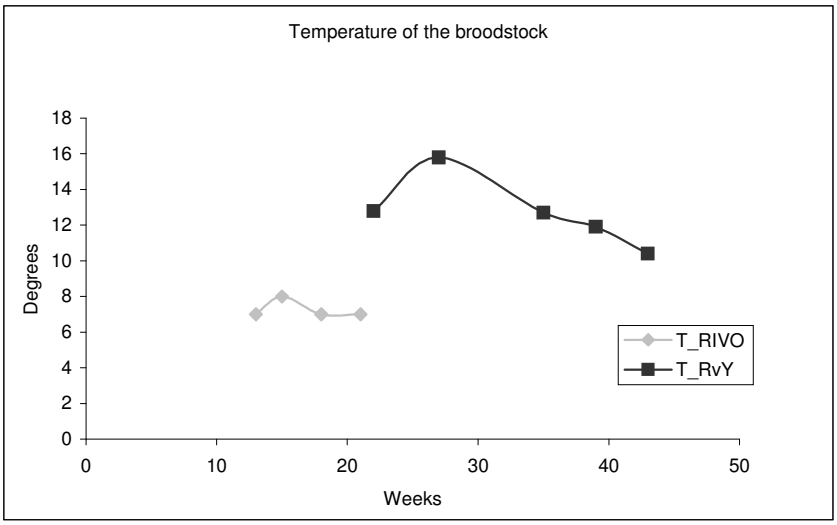
5.1.1. Broedstock koud bewaren

Op 5 verschillende tijdstippen is broedstock geplaatst bij een temperatuur van 6-10 ^{0}C. Bij het RIVO zijn op 14 februari 2005 mosselen uit Engeland koud gezet, op 17 maart 2005 mosselen uit de Grevelingen, op 19 april 2005 mosselen uit Shetland en op 23 april 2005 mosselen uit de Oosterschelde. Bij de Roem van Yerseke zijn op 5 april 2005 een grote partij mosselen uit Shetland koud gezet. De ouderdieren zijn bewaard tot het moment van paaien. De bewaarperiode varieerde van 9 dagen tot bijna 7 maanden.

5.2. Resultaten

5.2.1. Temperatuur

Uit figuur 22 blijkt dat de temperatuur van de broedstock koelhoud unit niet constant 6-10 ^{0}C is geweest.



Figuur 22. Temperatuur van de broedstock houd units bij het RIVO en de Roem van Yerseke.

5.2.2. Paaien

Tabel 10 geeft een overzicht van de datum van koud zetten van de broedstock.

Tabel 10. Overzicht van datum van koud zetten en laten paaien van de verschillende partijen mosselen.

Datum koud zetten	Datum paaien	Duur bewaring	Herkomst broedstock	Totaal mosselen	Paaiende mosselen	Percentage paaiende mosselen
14 02 05	23 02 05	9 dagen	UK	18	2 vrouwtjes 1 mannetje	16.6
Niet	02 03 05		Oosterschelde	24	1 vrouwtjes 1 mannetje	8.3
17 03 05	22 03 05	5 dagen	Grevelingen	25	7 vrouwtjes 15 mannetjes	88
17 03 05	30 03 05	13 dagen	Grevelingen	28	3 vrouwtjes 2 mannetjes	17.8
06 04 05	26 04 05	20 dagen	Shetland	30	2 vrouwtjes 1 mannetje	10
19 04 05	20 05 05	30 dagen	Shetland	25	3 vrouwtjes 1 mannetje	16
19 04 05 23 05 05	30 05 05	40 dagen 6 dagen	Shetland + Oosterschelde	48	3 vrouwtjes 10 mannetjes	27
				48	2 vrouwtjes 2 mannetje	8
05 04 05	06 06 05	60 dagen	Shetland + Schotland	200	40-45 mosselen	20-22
05 04 05	04 07 05	90 dagen	Shetland	150	9 vrouwtjes 29 mannetjes	25
05 04 05	22 08 05	110 dagen	Shetland	500	10 vrouwtjes 30 mannetjes	8
05 04 05	29 08 05	140 dagen	Shetland	200	8 vrouwtjes 17 mannetjes	12.5
05 04 05	26 09 05	170 dagen	Shetland	100	2 vrouwtjes 1 mannetje	3
05 04 05	20 10 05	200 dagen	Shetland	100	1 vrouwtjes 1 mannetje	2
?	24 10 05		Oosterschelde	221	8 vrouwtjes 21 mannetjes	13
05 04 05	31 10 05	240 dagen	Shetland	60	3 vrouwtjes 4 mannetjes	11.6

Hieruit blijkt dat het percentage paaiende mosselen minder wordt naarmate de broedstock langer wordt bewaard. Het is echter na 7 maanden koud bewaren nog steeds mogelijk om de mosselen te laten paaien. Daarnaast is een duidelijk verschil op te merken tussen broedstock

van verschillende herkomst. Het hoogste percentage werd bereikt met mosselen uit de Grevelingen.

5.3. Discussie

5.3.1. Paaien

Door broedstock koud te bewaren is het mogelijk het paaien tot 7 maanden uit te stellen. De kwaliteit van de eieren kan echter in de loop van de tijd wel zijn afgenomen. Dit kan worden opgemaakt uit het lage percentage paaiende mosselen van batch 260905. Daarnaast laten de resultaten van de waterkwaliteitsproeven ook opmerkelijke verschillen zien. De larven van batch 260905 van gekoelde Shetland broedstock vertonen wel verschil in overleving in de verschillende typen water, terwijl larven van batch 241005 van geconditioneerde Oosterschelde broedstock bij alle behandelingen een goede overleving liet zien.

6. Proeven met larven

6.1. Overzicht

Tabel 11 geeft een overzicht van de verschillende batches larven die zijn geproduceerd in 2005.

Tabel 11. Overzicht van de verschillende paaiingen die zijn uitgevoerd in 2005.

Datum paaien	Locatie	Bijzonderheden
23 02 05	RIVO	Waterkwaliteitproef larven Continu voeren versus 1x voeren. Na 4 dagen afgebroken. Hoge mortaliteit
02 03 05	RIVO	Geen experiment, laag D-larven aantal
22 03 05	RIVO	Waterkwaliteitproef larven
30 03 05	RIVO	Waterkwaliteitproef larven
26 04 05	RIVO	Waterkwaliteitproef larven
20 05 05	RIVO	Eicellen experiment (drijvende vs zinkende) Flow sorting (Willem Branderburg)
30 05 05	RIVO	Waterkwaliteitproef larven
06 06 05	RvY	INVE proef larven INVE proef broed
04 07 05	RvY	Verversen water larven
22 08 05	RvY	Na 1 week afgebroken
29 08 05	RvY	Luchttoevoer larven INVE proef larven Vestiging op touw en kokkelschelpen INVE proef broed
26 09 05	RvY	Temperatuur en waterkwaliteitproef larven
20 10 05	RvY	Voor open dag
24 10 05	RvY	INVE proef broedstock Waterkwaliteitproef larven
31 10 05	RvY	Voor opname NCRV

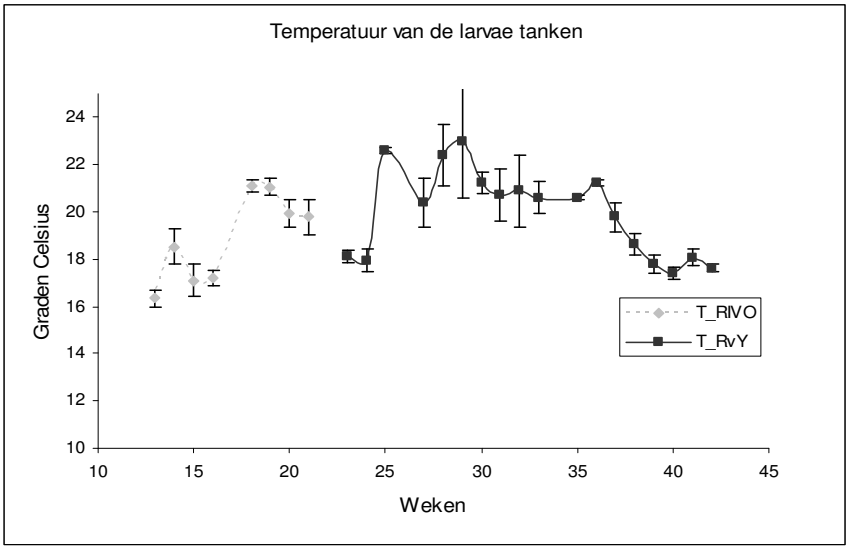
6.2. Ontwikkeling tot D-larven

Tabel 12. Percentage ontwikkelde D-larven per experiment.

Datum paaien	Paaien Vrouw-tjes	Totaal eicellen	Terugvonden D-larven	% D-larven	Slecht ontwikkelde larven	% Slecht ontwikkelde larven	Ontbevruchten eicellen	% Ontbevruchten eicellen
23-02-05	2	219466	37500	17	28400	13	153566	70
02-03-05	1	81000	32800	40	31200	39	17000	21
22-03-05	7	12568000	4569000	36	3416000	27	4583000	36
30-03-05	3	22800000	6936000	30	5687000	25	10177000	45
26-04-05	2	4113000	734400	18	612000	15	2766600	67
20-05-05	2	518000	63200	12	185200	36	269600	52
30-05-05	3	7022000	2352400	34	1451000	21	3218600	46
	2	4874000	1720000	35	849000	17	2305000	47
06-06-05	4	32800000	13580000	41	-	-	-	-
04-07-05	9	35024000	8550000	24	5890000	17	20584000	59
22-08-05	10	31300000	2000000	6	-	-	-	-
29-08-05	5	49181000	27316666	56	5463000	11	16401334	33
26-09-05	2	7729999	4689999	61	340000	4	2700000	35
20-10-05	1	1080000	-	-	-	-	-	-
24-10-05	8	5189732	2233532	43	57266	1	2898934	56
31-10-05	3	-	-	-	-	-	-	-

In tabel 12 is te zien dat het percentage goed ontwikkelde D-larven fluctueert van 6-61%. Er werd 0-39% slecht ontwikkelde larven aangetroffen en 21-70% onbevruchte eicellen.

Figuur 23 laat het temperatuursverloop in de larventanks zien. In de zomerperiode worden hoge temperaturen bereikt omdat de ruimte niet voldoende kon worden gekoeld.



Figuur 23. Temperatuur in de larven tanken gedurende de experimenten bij het RIVO en Roem van Yerseke.

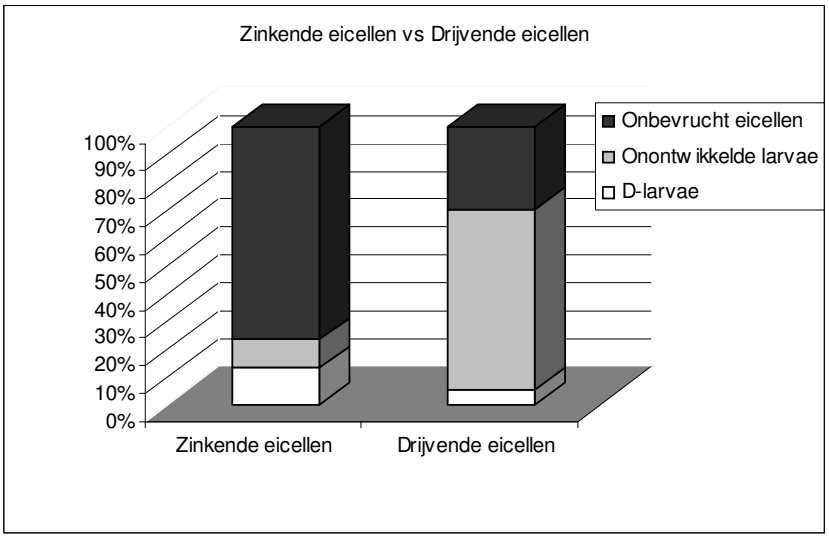
6.2.1. Embryo ontwikkelingsproef beschrijving

Er lijkt een verschil in drijfvermogen tussen eieren binnen 1 batch te bestaan. Dit verschil wordt mogelijk veroorzaakt door het gehalte aan vetzuren, wat weer een effect kan hebben op de ontwikkeling van de larven. De hypothese bij deze oriënterende proef is dat drijvende eieren een ander gehalte aan vetzuren bevatten en dus een andere ontwikkeling tot D larven zullen laten zien.

De paai methode die wordt gebruikt in dit experiment bestaat uit een combinatie van KCl injecties en temperatuur schokken. 2 ml KCl (0.5 M) werd geïnjecteerd in mosselen uit Shetland. Er paaiden 3 vrouwtjes en 1 mannetje nadat ze in zeewater geplaatst werden.
De eicellen die werden afgegeven door de vrouwtjes werden onderzocht onder de microscoop bij een vergroting van x100. Ze werden hierna bij elkaar gebracht in een 1 l maatcilinder. De eicel suspensie werd voorzichtig gemixt met een plunger en daarna 15 minuten met rust gelaten. Hierna werden de bovenste 800 ml drijvende eitjes voorzichtig gegoten in een nieuwe maatcilinder. De 200 ml die over was in de eerder maatcilinder werd beschouwd als zinkende eicellen. Bij beide maatcilinders werd het volume aangevuld tot net 1 l merk en hierna vond de bevruchting plaats. 1 uur na bevruchting werd de inhoud van de maatcilinders gegoten in 25 l containers, waarin de ontwikkeling van de embryo's plaats vond.
D-larven werden 48 uur later geteld.

6.2.2. Resultaten

Figuur 24 laat de resultaten zien van dit experiment. Een grotere hoeveelheid drijvende eicellen werden bevrucht in vergelijking met zinkende eicellen die zich snel vestigen op de bodem. Echter, van de volledig ontwikkelde D-larven werd bij de zinkende eicellen 13 % terug gevonden en 6 % bij de drijvende eicellen.



Figuur 24. Larven ontwikkeling na bevruchting van zinkende en drijvende eicellen.

6.2.3. Discussie

Er werd een grote variatie in percentage ontwikkelde D-larven gevonden (Tabel 12). Het percentage lijkt niet afhankelijk te zijn van de periode van bewaren van de broedstock, want de langst bewaarde batch (larven van 260905) gaf het hoogste percentage ontwikkelde D-larven (61%). Omdat de paaipogingen vaak onder verschillende omstandigheden en met verschillende broedstocks zijn uitgevoerd is nog niet vast te stellen welke factoren verantwoordelijk zijn voor de grote variatie.

De proef met het scheiden van drijvende en niet drijvende eieren gaf geen ontwikkeling tot D-larven. Een vet bepaling kan meer inzicht geven in eventuele verschillen in vetgehalte tussen drijvende en zinkende eieren. Op basis daarvan kan besloten worden of het scheiden van eieren zinvol is.

6.3. Waterkwaliteitproeven

Omdat in 2004 vrij hoge sterfte optrad in de larvale fase zijn in 2005 enkele waterkwaliteitsproeven uitgevoerd. Deze proeven hadden tot doel om de beste voorbehandeling van het water te ontwikkelen. Als controle is steeds UV behandeld en gefiltreerd water uit de verswaterleiding gebruikt. Ter bestrijding van eventuele ziekten is een behandeling met antibiotica getest. Andere geteste behandelingen waren ontsmetting van het water met chloor, neutralisatie van een eventueel effect van zware metalen met EDTA, het gebruik van een aktief koolfilter ter neutralisatie van een eventueel effect van TBT, en het gebruik van water van een andere herkomst (uit de Oosterschelde voor het RIVO, uit de Oosterschelde bij Jacobahaven, uit de Atlantische oceaan).

6.3.1. Antibiotica, chloor en EDTA 1 (Batch 220305)

6.3.1.1. Proef beschrijving

Mosselen uit de Grevelingen werden aangezet tot paaien met temperatuur schokken. Eicellen van 3 vrouwtjes werden bevrucht met 2 ml sperma van 15 mannetjes.
Er werden 4 verschillende water behandelingen getest:

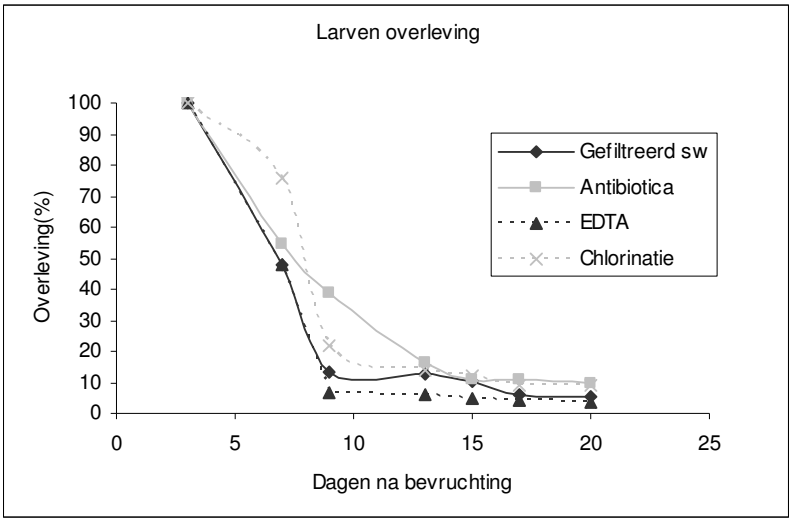
- Controle: 0.2 µm gefiltreerd zeewater (UV behandeld)
- Antibiotica: 0.2 µm gefiltreerd zeewater (UV behandeld) met 15 mg/l Penicilline + 25 mg/l Streptomycine (Hendriks, 2004).
- Chlorinatie: 0.2 µm gefiltreerd zeewater (UV behandeld) chemische gesteriliseerd met natrium hypochloriet (0.5 ml 5% natrium hypochloriet per liter gefiltreerd zeewater) gedurende 24 uur. Voor het gebruik was het zeewater geneutraliseerd door toevoeging van 50 mg natrium thiosulfaat per liter en minstens 2 uur belucht.
- EDTA: 0.2 µm gefiltreerd zeewater (UV behandeld) chemische behandeld door toevoeging van 1 mg/l van EDTA en 20 mg/l natrium metasilicaat ($Na_2SiO_3*9H_2O$), 24 uur voordat het water gebruikt werd.

De ontwikkeling van de embryo's vond plaats in de 4 verschillende water behandelingen. 48 uur na bevruchting werden er D-larven geteld. Het experiment werd uitgevoerd in 25 liter containers gevuld met 12 liter per water behandeling. De larven werden bij 18°C gehouden met een begin concentratie van 10 larven/ml. Het voeren werd 3 keer per dag gedaan m.b.v. een peristaltische pomp. Het dieet bestond uit 25 cellen/µl *Isochrysis galbana* en 25 cellen/µl *Pavlova lutheri*. Beluchting vond plaats bij alle larven culturen. Het verversen van larven culturen vond 3 keer per week plaats.

Bij alle verversingen werden er monsters genomen om het aantal larven te schatten en om larven lengte te meten. Bij elke verversen werden ook de pH, temperatuur, NH_4^+ en NO_3^- geregistreerd.

6.3.1.2. Resultaten

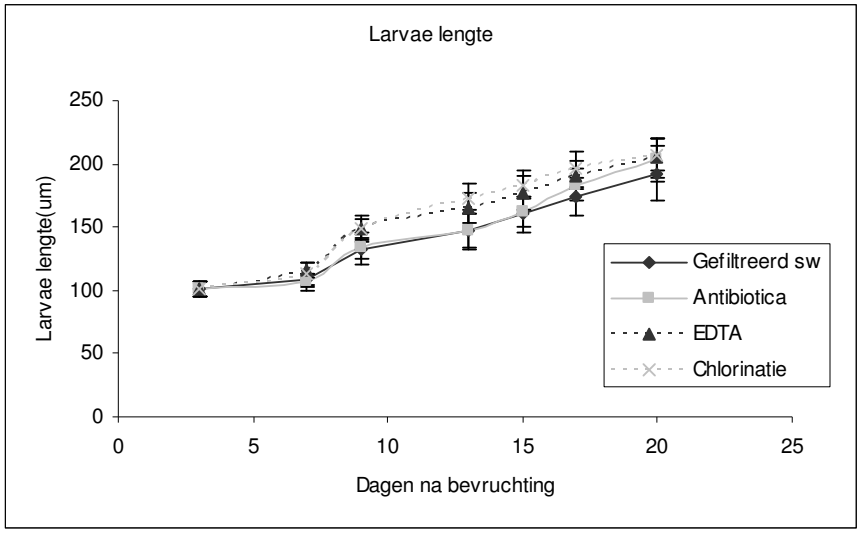
Overleving van larven (uitgedrukt in percentages) voor de vier verschillende behandelingen staat in figuur 25.



Figuur 25. Larven overleving (%) voor de verschillende water behandelingen. (n=1)

Naar het einde van het experiment werden er grotere overlevingcijfers voor de antibiotica en chlorinatie behandeling gevonden met overlevingswaarden van respectievelijk 10% en 9%. De cijfers van gefiltreerd zeewater en de EDTA behandeling waren respectievelijk 5% en 4%.

Figuur 26 laat de groei van de larven zien in relatie tot het aantal dagen na bevruchting. De kleinste waarde werd aan het einde van het experiment gevonden voor de controle behandeling (gefiltreerd zeewater). De gemiddelde groei van deze behandeling varieert van 1.7 µm tot 6.8 µm per dag en bereikt drie weken na bevruchting een lengte van 192 µm.
Larven van de chlorinatie behandeling hadden aan het eind van het experiment de grootste lengte. De gemiddelde groei (gemeten als toename in de schelp lengte) varieert van 2.7 µm tot 18.1 µm per dag, met een maximum eind waarde van 207 µm.



Figuur 26. Lengte van M.edulis larven bij de verschillende waterbehandelingen. (n=20±SD)

Larven lengte van de antibiotica en EDTA behandelingen waren gelijk aan het einde van het experiment met waarden van respectievelijk 203 en 204 µm. De gemiddelde groei varieert van 1.2 tot 13.3 µm per dag voor de antibiotica behandeling en van 3.7 tot 16.4 µm voor de EDTA behandeling.

Er was geen significant effect van behandeling (ANOVA, P>0.05).

6.3.2. Antibiotica, chloor en EDTA 2 (Batch 300305)

6.3.2.1. Proef beschrijving

Mosselen uit de Grevelingen werden aangezet tot paaien met temperatuur schokken. Eicellen van 3 vrouwtjes werden bevrucht met 2 ml sperma van 2 mannetjes.
Er werden 4 verschillende water behandelingen getest:

- Controle: 0.2 µm gefiltreerd zeewater (UV behandeld)
- Antibiotica: 0.2 µm gefiltreerd zeewater (UV behandeld) met 15 mg/l Penicilline + 25 mg/l Streptomycine (Hendriks, 2004).
- Chlorinatie: 0.2 µm gefiltreerd zeewater (UV behandeld) chemische gesteriliseerd met natrium hypochloriet (0.5 ml 5% natrium hypochloriet per liter gefiltreerd zeewater) gedurende 24 uur. Voor het gebruik was het zeewater geneutraliseerd door 50 mg natrium thiosulfaat per liter toe te voegen en minstens 2 uur belucht.

- EDTA: 0.2 µm gefiltreerd zeewater (UV behandeld) chemische behandeld door toevoegen van 1 mg/l van EDTA en 20 mg/l natrium metasilicaat (Na_2SiO_3*$9H_2O$), 24 uur voordat het water gebruikt werd.

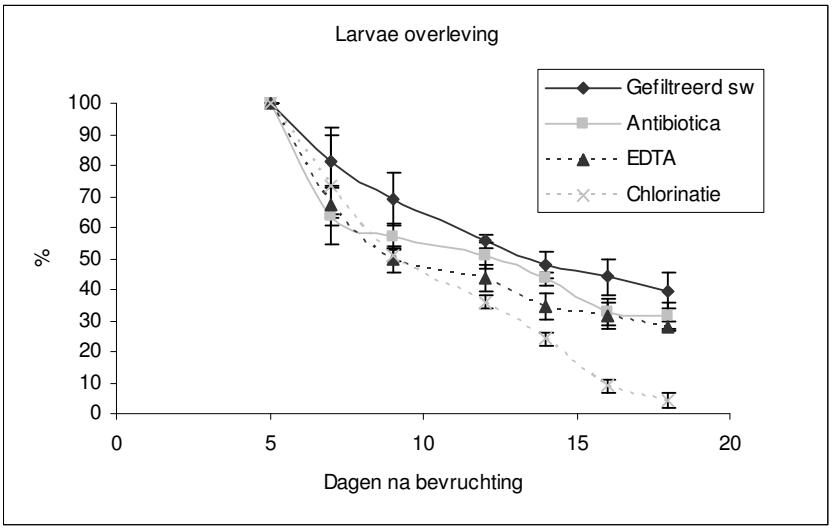
De embryo ontwikkeling vond plaats bij de verschillende water behandelingen. 5 dagen na bevruchting, werden D-larven geteld. Het experiment werd uitgevoerd met 2 replica's in 8 liter aquaria. De aquaria werden in een klimaatkamer geplaatst waar de temperatuur constant op 18°C gehouden werd. De begin concentratie van de larven was 10 larven/ml. Het dieet van de larvenculturen bestond uit 3 algen soorten, in de volgende verhouding: 12.5 cellen/µl *Isochrysis galbana* + 12.5 cellen/µl *Pavlova lutheri* + 62.5 cellen/µl *Chaetoceros gracilis*.

Bij elk verversing werden monsters genomen om lengten te meten en om het aantal levende larven te schatten. Bij elke verversen werden ook de pH, temperatuur, NH_4^+ en NO_3^- geregistreerd.

6.3.2.2. Resultaten

Figuur 27 laat de larven overleving voor de vier verschillenden waterbehandelingen zien.

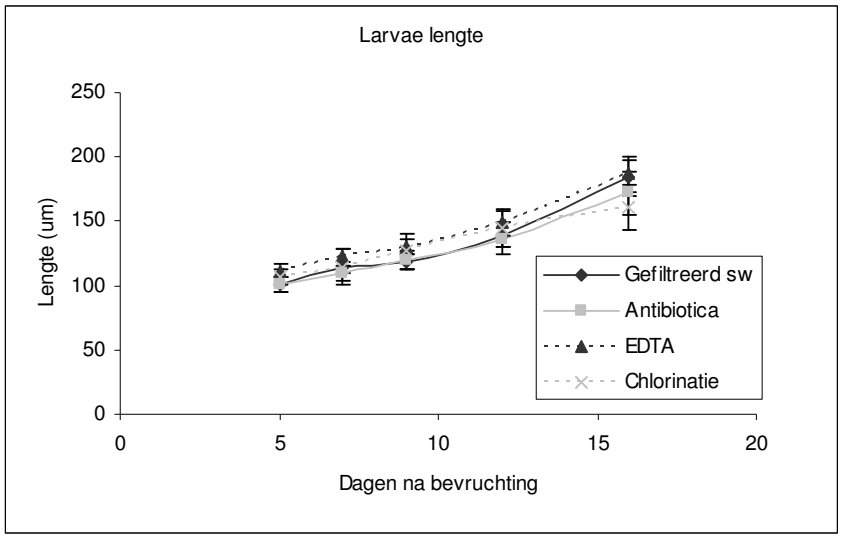
De hoogste overleving werd voor de controle behandeling gemeten met een eind waarde van 39.5 %. Tijdens dit experiment had de chlorinatie behandeling de laagste overleving. Er was een significant verschil met de andere behandelingen (ANOVA, $P<0.05$). Alleen 4.25 % van de begin hoeveelheid overleefde het na twee en half weken.



Figuur 27. Larven overleving (%) voor de vier verschillende water behandelingen. (n=2 ± SD)

De eind overlevingwaarden voor de antibiotica en EDTA behandelingen waren respectievelijk 31.6 % en 28%.

Gedurende dit experiment werd de lengte van de larven voor de verschillende behandelingen bepaald. De metingen van de lengte zijn te zien in figuur 28.



Figuur 28. Lengte van de larven bij de verschillende water behandelingen. (n=40 ± SD)

De larven gekweekt bij de EDTA behandeling laat de grootste schelp lengte zien met een einde waarde van 187 µm 2 weken na bevruchting. Echter, de larven van de controle behandeling waren maar 3 µm kleiner in schelp lengte. De gemiddelde groei cijfers voor de EDTA behandeling varieert van 3.9 tot 9.4 µm per dag. De variatie van de controle behandeling was van 2.6 tot 11.1 µm per dag.

De chlorinatie behandeling vertoonde de laagste schelp lengte, namelijk 160 µm aan het einde van het experiment. De gemiddelde groei varieert voor deze behandeling van 3.4 tot 6.2 µm per dag. Er werden significante verschillen gevonden tussen larven lengte van deze behandeling en larven lengte van de gefiltreerd zeewater en EDTA behandelingen (ANOVA, $P<0.05$)

De einde waarde voor de antibiotica behandeling was 172 µm. De gemiddelde groei cijfers varieert van 4.3 tot 9.0 µm per dag.

Deze batch vertoonde een betere overleving dan batch 220305.

6.3.3. Water van verschillende locaties 1 (Batch 260405)

6.3.3.1. Proef beschrijving

Mosselen uit Shetland werden aangezet tot paaien met temperatuur schokken. De eicellen van 2 vrouwtjes werden bevrucht met 2 ml sperma suspensie.

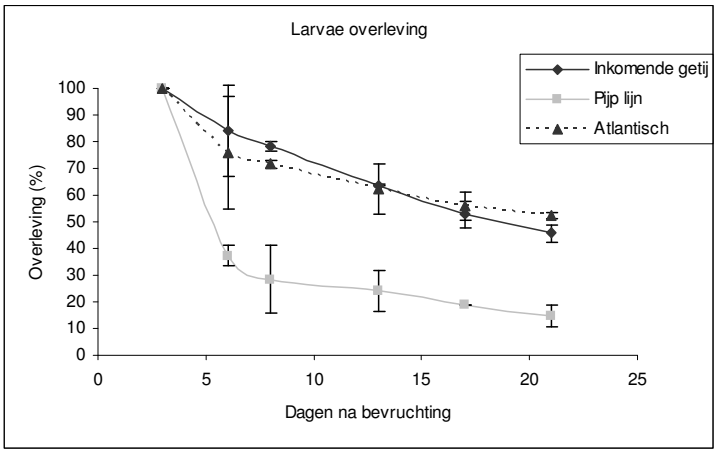
Er werden 3 verschillende water behandelingen getest:

- Controle: 25 µm gefiltreerd zeewater uit de pijpleiding.
- Inkomend getij: 40 µm gefiltreerd zeewater verzameld bij het RIVO 1 uur voor hoogwater.
- Atlantisch zeewater: 40 µm gefiltreerd zeewater uit de Atlantische oceaan (via RIVO IJmuiden)

De larven culturen werden gehouden in glazen 6 liter flessen in het laboratorium bij een temperatuur van 18°C. Elke behandeling werd in duplo uitgevoerd. De larven concentraties waren in het begin van het experiment 10 larven/ml. Een mix van 3 algen soorten (12.5 cellen/µl *Isochrysis galbana* + 12.5 cellen/µl *Pavlova lutheri* + 62.5 cellen/µl *Chaetoceros gracilis*) werd dagelijks gevoerd aan de larven culturen. Er werd 1 keer per dag gevoerd. De flessen werden 2 keer per week schoongemaakt. Om het verloop in aantal en lengte van de larven te volgen werden er van elke fles monsters genomen tijdens het verversen.
De parameters pH en temperatuur en de concentratie van NH_4^+ en NO_3^- werd bij elke verversen gemeten.

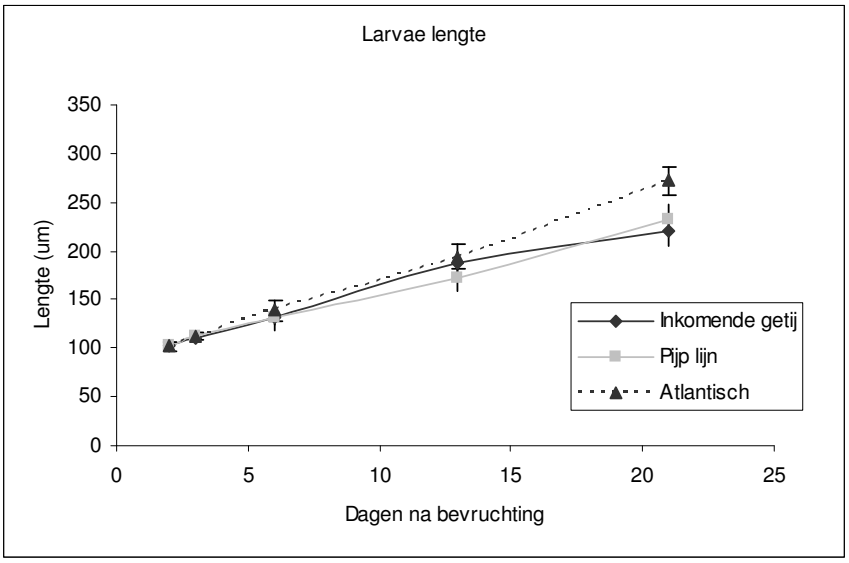
6.3.3.2. Resultaten

De overleving in de drie verschillenden behandelingen zijn in figuur 29 te zien. Het effect van type water op overleving was bijna significant (ANOVA, p=0.06). Het aantal replica's was klein waardoor de power van de statistische test laag is.
Overleving in de pijp lijn behandeling was de laagste van de drie geteste water soorten met een einde waarde van 15 %. Het grootste verschil in overleving vond plaats gedurende de eerste 6 dagen na bevruchting.
Het aantal larven in het water van de Atlantisch Oceaan en het water van de Oosterschelde dat 1 uur voor hoogwater verzameld werd, verschilden niet significant. De overleving aan het einde van het experiment was 45 % voor het inkomende getij en 52 % voor het oceanische water.



Figuur 29. Larven overleving (%) voor de drie water soorten. (n=2 ± SD)

De larven gekweekt in het water van het Atlantisch oceaan bereikte de grootste schelp lengte van de 3 behandelingen zoals te zien is in figuur 30. 3 weken na bevruchting was de gemiddelde schelp lengte voor deze water soort 272 µm met gemiddelde toename va 7 tot 10 µm per dag.



Figuur 30. Schelp lengte van de larven in de verschillende water soorten. (n=40 ± SD)

De lengte van de larven die gekweekt werden in pijplijn water bereikte een waarde van 232 µm aan het einde van het experiment. De gemiddelde groei had een bereik van 5 tot 10 µm per dag.

De larven van de inkomende getij behandeling bereikte een waarde van 220 µm. Bij deze behandeling liep de gemiddelde groei van 4 tot 9 µm per dag.

De lengte van de larven gekweekt in het water van de Atlantisch oceaan was significant verschillend van de andere twee behandelingen (ANOVA, $P<0.05$).

6.3.4. EDTA (Batch 300505)

6.3.4.1. Proef beschrijving

Mosselen uit Shetland en uit de Oosterschelde werden aangezet tot paaien met temperatuur schokken. De mosselen werden per locatie afzonderlijk gehouden. 3 vrouwtjes en 10 mannetjes uit Shetland paaiende na twee warme-koude cyclussen. Nog een cyclus was noodzakelijk om 2 vrouwtjes en 2 mannetjes uit de Oosterschelde tot paaien aan te zetten. Het experiment werd uitgevoerd in 90 l tanks.

De embryo ontwikkeling vond plaats bij verschillende water behandelingen. Er werden 4 containers gebruikt, twee per broedstock soort (zonder replica). De behandelingen van de verschillende tanken waren:

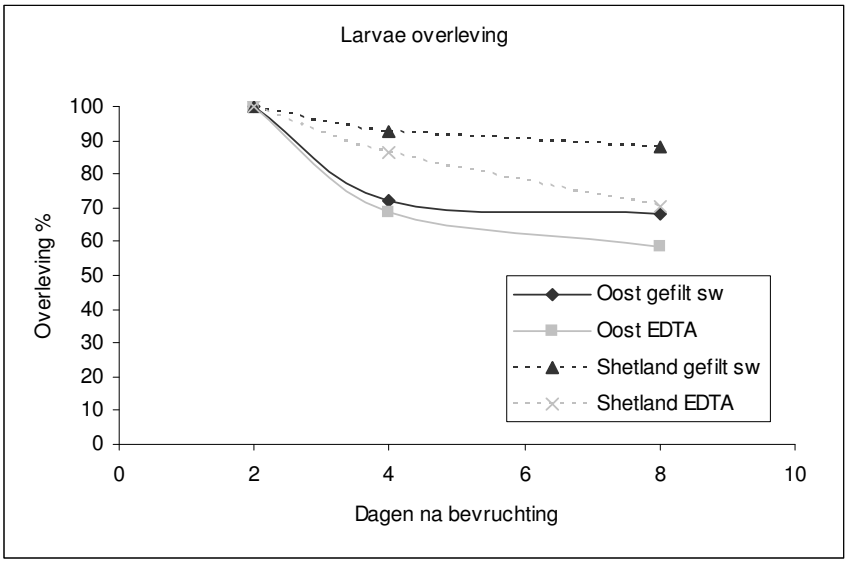
- Oosterschelde gefiltreerd zeewater: Embryo's en larven van de Oosterschelde broedstock gekweekt in 0.2 µm gefiltreerd zeewater (UV behandeld).
- Shetland gefiltreerd zeewater: Embryo's en larven van de Shetland broodstock gekweekt in 0.2 µm gefiltreerd zeewater (UV behandeld).
- Oosterschelde EDTA: Embryo's en larven van de Oosterschelde broedstock gekweekt in 0.2 µm gefiltreerd zeewater (UV behandeld) chemische behandeld door toevoeging van 1 mg/l EDTA en 20 mg/l natrium metasilicaat ($Na_2SiO_3*9H_2O$), 24 uur voordat het water gebruikt werd.
- Shetland EDTA: Embryo's en larven van de Shetland broedstock gekweekt in 0.2 µm gefiltreerd zeewater (UV behandeld) chemische behandeld door toevoeging van 1 mg/l van EDTA en 20 mg/l natrium metasilicaat ($Na_2SiO_3*9H_2O$), 24 uur voordat het water gebruikt werd.

48 uur na bevruchting werden D-larven geteld. De ontwikkeling en kweek van de larven werd uitgevoerd (in een koelcel) bij een temperatuur van 18°C. Tijdens dit experiment werd niet belucht. Een mix van drie algen soorten (12.5 cellen/µl *Isochrysis galbana* + 12.5 cellen/µl *Pavlova lutheri* + 62.5 cellen/µl *Chaetoceros gracilis*) werd dagelijks gevoerd aan de larven culturen. Het verversen van de culturen vond twee keer per week plaats. Bij elk verversing werden monsters genomen om lengten te meten en om het aantal levende larven te schatten.

6.3.4.2. Resultaten

De overleving van larven en de larven lengte werden gemeten bij dit experiment gedurende de eerste week na bevruchting. Na deze week werd waarschijnlijk door een bacteriële infectie de larven gedood in de verschillende behandelingen.

Gedurende het experiment werd een hogere overleving gemeten voor de Shetland larven, gekweekt in gefiltreerd zeewater, met een eind waarde van 88 %. De laagste overleving werd gevonden voor de Oosterschelde larven gekweekt in EDTA behandeld water. Overleving na een week was 58 %. Deze waarden staan in figuur 31.

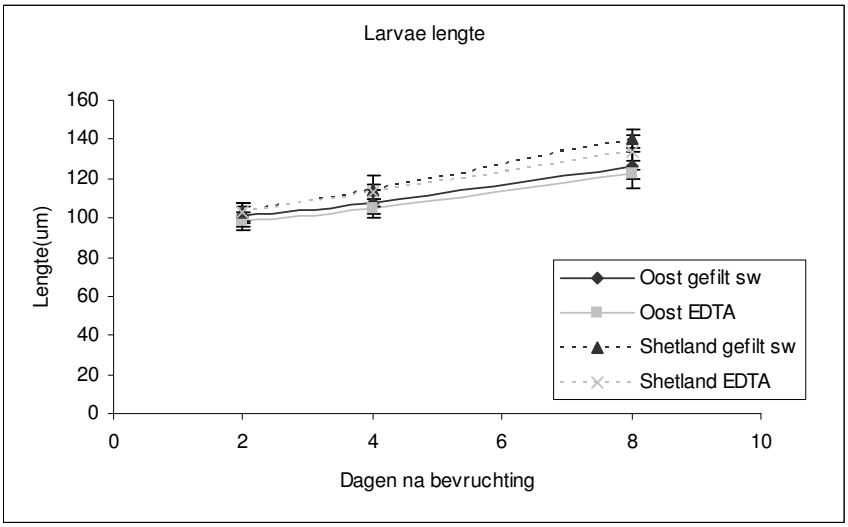


Figuur 31. Larven overleving (%) voor de twee plaatsen en de twee verschillende water behandelingen. (n=1)

Overleving in het geval van de Shetland larven gekweekt in EDTA behandeld water en voor de Oosterschelde larven in gefiltreerd zeewater waren respectievelijk 68 % en 58 %.

De larven lengte wordt gepresenteerd in figuur 32. Shetland larven van beide behandelingen hebben een hogere waarden voor de schelp lengte dan die van de Oosterschelde broedstock.
Van de larven uit 2 verschillende plaatsen hebben de larven gekweekt in onbehandeld gefiltreerd zeewater de hoogste waarde voor hun schelplengte.

De schelp lengte voor de Shetland larven was 140 µm voor de gefiltreerd zeewater behandeling en 133 µm voor EDTA behandelde zeewater. Voor beide behandelingen was de gemiddelde groei van 5 tot 6 µm per dag. De Oosterschelde larven van de gefiltreerd zeewater behandeling bereikte een week na de bevruchting een lengte van 127 µm. Voor het water behandeld met EDTA was deze waarde 122 µm. De gemiddelde groei liep in beide behandelingen van 3 tot 4 µm per dag.
Er werden significante verschillen gevonden tussen larven lengte van de twee Oosterschelde behandelingen en de larven lengte van de twee Shetland behandelingen (ANOVA, $P<0.05$).
Verschillen in schelplengten tussen larven van de Shetland gefiltreerd zeewater behandeling en larven van de Shetland EDTA behandeling waren significant (ANOVA, $P<0.05$).



Figuur 32. Schelp lengte van de larven voor de twee verschillende broodstock aan het verschillende water behandelingen. (n=20 ± SD)

De beste resultaten werden gevonden bij de larven van de Shetland broed stock gekweekt in gefiltreerd zeewater.

6.3.5. Water van verschillende locaties 2 (Batch 260905)

6.3.5.1. Proef beschrijving

Mosselen uit Shetland werden aangezet tot paaien met temperatuur schokken. De eicel suspensie van 2 vrouwtjes werd door 2 ml van een sperma suspensie bevrucht. De ontwikkeling van de embryo's vond plaats in de 1250 l tanks bij een temperatuur van 18°C.
D-larven werden 48 uur na bevruchting geteld.
Water uit twee verschillende plaatsen werd in dit experiment getest:

- 50 µm gefiltreerd zeewater van de pijplijn van Roem van Yerseke.
- 40 µm gefiltreerd zeewater van het veldstation van Jacobahaven. 120 l werden verzameld de dag dat D-larven gevonden werden. Het water werd belucht en water uit deze 120 l werd tijdens het hele experiment gebruikt.

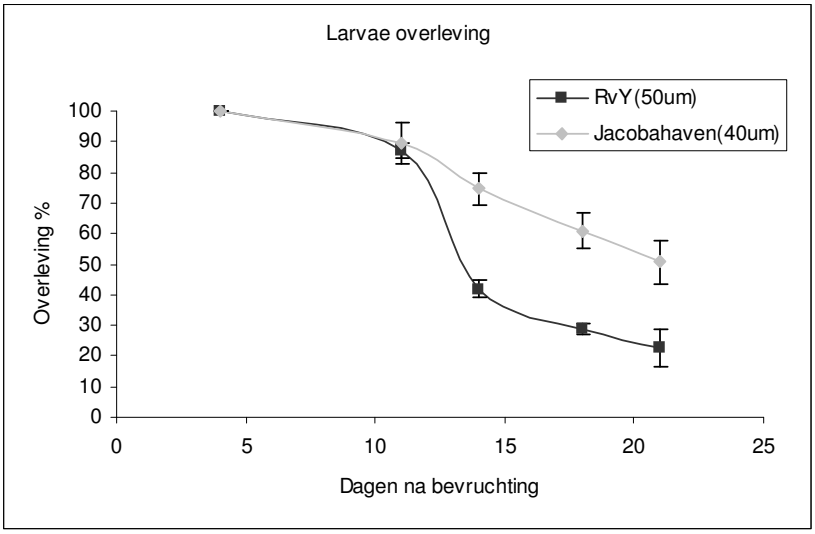
Het experiment vond plaats in duplo in 4 l glazen flessen. Larven concentraties waren in het begin van het experiment 10 larven/ml. De temperatuur werd op 17-18°C gehouden gedurende het hele experiment. Voeren vond eens per dag plaats. Bij de start werden 10 cellen/µl van *Isochrysis* (T-ISO) en 10 cellen/µl van *Chaetoceros gracilis* gevoerd. Deze concentraties werden tijdens de eerste week verdubbeld. Het verversen van de flessen vond twee keer per week

plaats. Bij elke verversing werden er monsters genomen om lengten te meten en om het aantal levende larven te schatten.

6.3.5.2. Resultaten

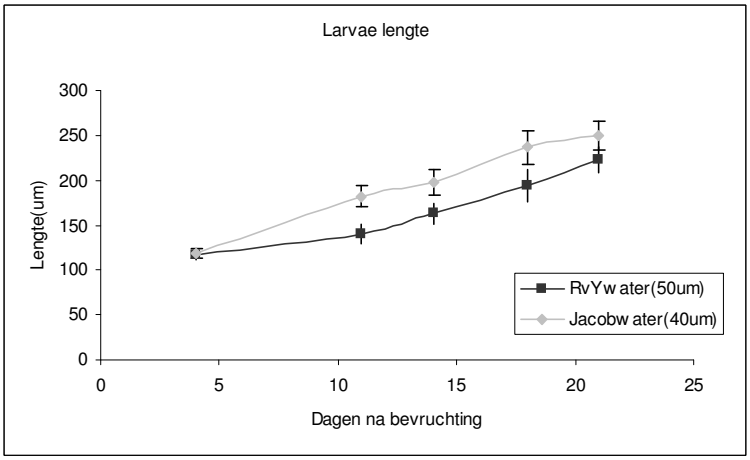
Het verschil in larven overleving tussen het water van 2 verschillende plaatsen staat in figuur 33. De larven gekweekt in het water van Jacobahaven hebben een hogere overleving in vergelijking met de larven gekweekt in het water uit de pijplijn van de Roem van Yerseke.

Het verschil in overleving ontstaat tussen dag 10 en dag 14 na bevruchting.



Figuur 33. Larven overleving (%) van de water van twee verschillende plaatsen. (n=2 ± SD)

Drie weken na bevruchting was de larven overleving in relatie met het begin in het water van Jacobahaven 50 %. 23 % van het aantal larven gekweekt bij het begin overleefde het in het water van de pijplijn. Het effect van type water op overleving was bijna significant (ANOVA, p=0.053). Het aantal replica's was klein waardoor de power van de statistische test laag is.



Figuur 34. Schelplengte van de larven van de twee plaatsen. (n=80 ± SD)

3 weken na bevruchting bereikte de larven van de Jacobahaven behandeling een schelp lengte van 250 µm (figuur 34). De gemiddelde groei liep van 3 tot 10 µm per dag.
De larven die gekweekt zijn in het water van de pijplijn bereikte na dezelfde periode een schelplengte van 222 µm. De gemiddelde groei liep van 5 tot 8 µm per dag.
Larven die gekweekt werden in water van Jacobahaven groeiden beter dan de larven die gekweekt werden in het water van de pijplijn.
Deze verschillen zijn echter significant (ANOVA, $P<0.05$).

6.3.6. Aktief kool (Batch 241005)

6.3.6.1. Proef beschrijving

Mosselen uit de Oosterschelde (de mosselen die gebruikt werden in het INVE- conditionering experiment) werden aangezet tot paaien met temperatuur schokken. De bevrucht van de eicelsuspensie van 3 vrouwtjes werd door 2 ml spermasuspensie gedaan. De ontwikkeling van de embryo's vond plaats in 25 l emmers. Na een periode van 48 uur, na bevruchting, werden D-larven aangetroffen.
Er werden 3 verschillende water behandelingen getest:

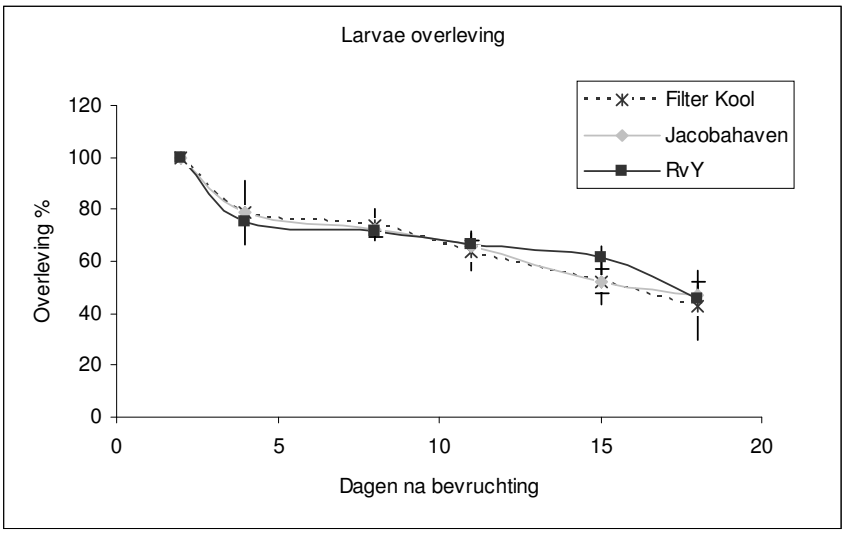
- 50 µm gefiltreerd zeewater van de pijplijn van Roem van Yerseke.
- 50 µm gefiltreerd zeewater van de pijplijn van Roem van Yerseke gefiltreerd door een actief kool filter.
- 50 µm gefiltreerd zeewater van het veldstation van Jacobahaven verzameld 1 uur voor hoogwater.

Voor dit experiment werden 4 water baden bij een temperatuur van 19-20°C gezet. De temperatuur van de water baden werd dagelijks geregistreerd. Het water verversen van de flessen vond twee keer per week plaats. Aan het begin van het experiment werden 10 cellen/µl van *Isochrysis* (T-ISO) en 10 cellen/µl van *Chaetoceros gracilis* gevoerd. Tijdens de eerste week werden deze concentraties verdubbeld.
Het opmeten van de larven en het aantal levende larven werd twee keer per week bepaald.

6.3.6.2. Resultaten

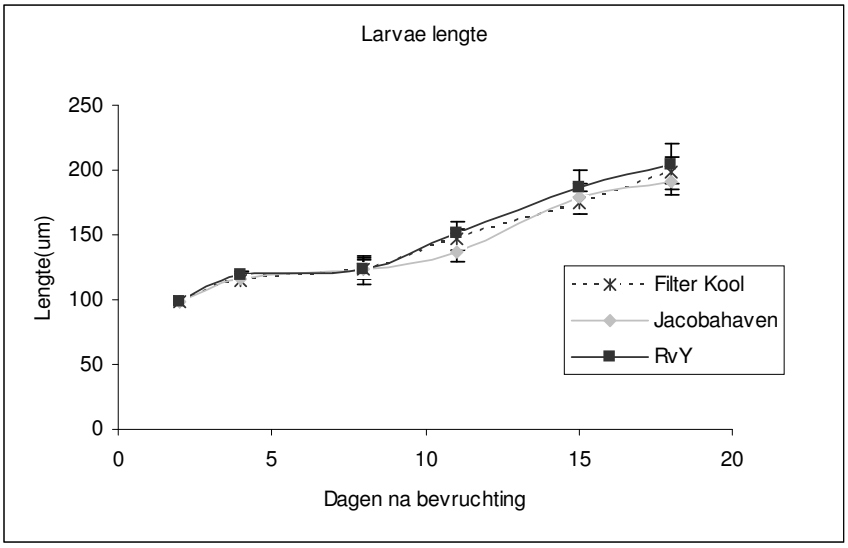
18 dagen na bevruchting is het aantal larven dat overgebleven is in de Jacobahaven behandeling 47 % van de begin hoeveelheid (figuur 35). Dit is de behandeling met de grootste overleving. Echter, de overleving in de andere behandelingen verschilden niet significant (ANOVA, $P>0.05$). De overleving in de pijplijn behandeling komt overeen met 45 % van het

begin aantal terwijl 43 % van de larven in de actieve koolstof filter behandeling bijna 3 weken in leven bleef na de bevruchting.



Figuur 35. Larven overleving (%) voor de verschillende water behandelingen. (n=3 ± SD)

De schelplengte van de 3 behandelingen staat in figuur 36.



Figuur 36. Lengte van M.edulis larven bij de drie water behandelingen. (n=80 ± SD)

De behandeling met de hoogste schelplengte was degene met het water uit de pijplijn. De gemiddelde schelplengte aan het einde van het experiment was 196 µm. Bij deze behandeling

liep de gemiddelde groei van 2 tot 10 µm per dag. De larven die gekweekt werden in de Jacobahaven water en in de actieve koolstof gefiltreerde water bereikte aan het einde van het experiment een schelplengte van respectievelijk 191 µm en 192 µm. De gemiddelde groei voor beide behandelingen liep van 2 tot 10 µm per dag.
Er werden significante verschillen gevonden tussen de larven lengte van de filter kool en de pijplijn behandelingen (ANOVA, $P<0.05$).

Bij het begin van het experiment werden er 4 replica's gebruikt per behandeling. Er werd echter 14 dagen na de bevruchting een bacterie infectie gevonden. Er werd een bacterie test uitgevoerd. Op 17 november werden INVE dipslides gedoopt in het water en na 20 uur werden de stripjes onderzocht. De resultaten staan in tabel 13.

De hoogste contaminatie werd gevonden in de koolstof behandeling en het laagste in de Jacobahaven behandeling.

Tabel 13: Aantal bacterie kolonies op INVE dipslides. 0 = geen; + = weinig; ++ = gemiddeld; +++ = heel veel. Groene kant is TGBS voor Vibrio infectie en witte kant is marine agar voor alle bacteriën.

Datum	Tijd	Kant	RvY 1	RvY 2	RvY 3	RvY 4	Jac 1	Jac 2	Jac 3	Jac 4	Kool 1	Kool 2	Kool 3	Kool 4
18-11-05	9.15	groene	0	0	0	0	5	0	1	0	0	0	0	0
		witte	++	0	++	++	+	+	+	+	+++	+++	+	+++

Hoogste infectie waarden waren voor de kool behandeling gevonden en de laagste voor de Jacobahaven water.

6.3.7. Discussie

Herkomst

Er zijn drie proeven met water van verschillende herkomst uitgevoerd (batch 260405, batch 260905 en batch 241005). Het geteste water kwam uit de verswaterleiding, uit de Oosterschelde voor het RIVO, uit de Oosterschelde bij Jacobahaven en uit de Atlantische oceaan. De broedstock kwam van Shetland (respectievelijk 20 dagen koud bewaard en 6 maanden koud bewaard) en de Oosterschelde (8 weken geconditioneerd). De groei van de larven liet geen grote verschillen zien. De larven gekweekt in Atlantisch water en water van Jacobahaven gaven echter wel een significant grotere lengte vlak voor vestiging. Slechte

overleving werd gevonden in water van de verswaterleiding voor de batches van Shetland, maar niet voor de batch van de Oosterschelde. In beide gevallen werd de slechte overleving veroorzaakt door een afname in de eerste periode van de kweek. Mogelijk zijn zwakke larven gevoelig voor bepaalde stoffen die aanwezig zijn in het water van de verswaterleiding. Dit kunnen bijvoorbeeld bacteriën, zware metalen of TBT zijn. In de volgende proeven zijn deze factoren uitgesloten om te zien of de groei en overleving verbeterde in het water van de verswaterleiding.

Bacteriën

Ziekteverwekkende bacteriën kunnen sterfte onder de larven veroorzaken (Helm et al, 2004). Er zijn twee proeven met een behandeling tegen bacteriën uitgevoerd (batch 220305 en batch 300305). De eerste proef gaf een zeer grote sterfte bij alle behandelingen. De reden voor deze sterfte is onbekend, maar is waarschijnlijk niet toe te schrijven aan ziekteverwekkende bacteriën. De tweede batch liet een betere overleving zien, vooral bij de controle en antibiotica behandeling. Dit geeft aan wederom dat de slechte overleving niet werd veroorzaakt door ziekteverwekkende bacteriën.

Zware metalen

Zware metalen zijn schadelijk voor de ontwikkeling van schelpdierlarven (Helm et al, 2004). Er zijn drie proeven met een neutralisatie van zware metalen uitgevoerd (batch 220305, batch 300305 en batch 300505). De eerste proef gaf een zeer grote sterfte bij alle behandelingen. De reden voor deze sterfte is onbekend, maar is waarschijnlijk niet toe te schrijven aan zware metalen. De tweede batch liet een betere overleving zien, vooral bij de controle. Dit geeft aan wederom dat de slechte overleving niet werd veroorzaakt door zware metalen. De derde proef liet opnieuw een betere overleving in de controle zien. Zware metalen lijken dus niet verantwoordelijk voor de slechte overleving in water uit de verwaterleiding.

TBT

TBT is schadelijk voor de ontwikkeling van schelpdierlarven (Helm et al, 2004). TBT wordt gebruikt in de antifoulingverf van bedrijfschepen. De inlaat van de verswaterleiding is dicht bij de Julianahaven. Alikruiken kunnen worden gebruikt om de aanwezigheid van TBT in het water te detecteren. Kaag et al (2004) hebben het voorkomen van intersex (steriele vrouwtjes met een penis) bij alikruiken in de Julianahaven van Yerseke onderzocht en vonden verhoogde waarden. De inlaat is echter niet in de haven, maar er buiten. Daarom zijn op 25 oktober 2005 40 alikruiken verzameld op de dijk bij de inlaat en 40 alikruiken uit het RIVO bassin waar water van de verswaterleiding doorheen stroomt. Beide groepen lieten geen intersex zien (ongepubliceerde resultaten J. Jol).

Er is een proef uitgevoerd waarbij water van de verwaterleiding eerst werd gefilterd over een actief kool filter om het eventueel aanwezige TBT te verwijderen (batch 241005). De overleving van larven werd door deze behandeling echter niet verhoogd. Er zijn dus geen aanwijzingen dat TBT de overleving van larven belemmert.

De beste overleving van de larven in water uit de verswaterleiding (controle) was op het moment van vestiging 30-45% (40% voor batch 300305 van Grevelingen broedstock, 30% voor batch 290805 van koud bewaarde Shetland broedstock en 45% voor batch 241005 van geconditioneerde Oosterschelde broedstock). Dit is iets lager dan de 50% overleving die wordt aangehouden voor larven van Japanse oesters en Tapijtschelpen (Helm et al, 2004). De lagere overleving van de andere batches is ofwel toe te schrijven aan andere factoren dan de kwaliteit van het water (bijvoorbeeld kwaliteit eieren), ofwel veroorzaakt door een slechte kwaliteit van het water op dat moment. Fluctuaties in waterkwaliteit kunnen niet worden uitgesloten. De verswaterleiding is bijvoorbeeld niet het hele jaar door even intensief in gebruik. Mogelijk heeft het minder hard stromen van water in de leiding een effect op de kwaliteit.

6.4. Verversingsproef

In een batch cultuur van larven vindt ophoping van afvalstoffen plaats. Daarom wordt het water regelmatig ververst. Het verversen van de larven kost relatief veel tijd. Het is nog onduidelijk welke minimale frequentie moet worden aangehouden om de omstandigheden voor de larven optimaal te houden. In de hieronder beschreven test is het effect van 1x per week verversen en 2x per week verversen op de overleving en groei van larven onderzocht.

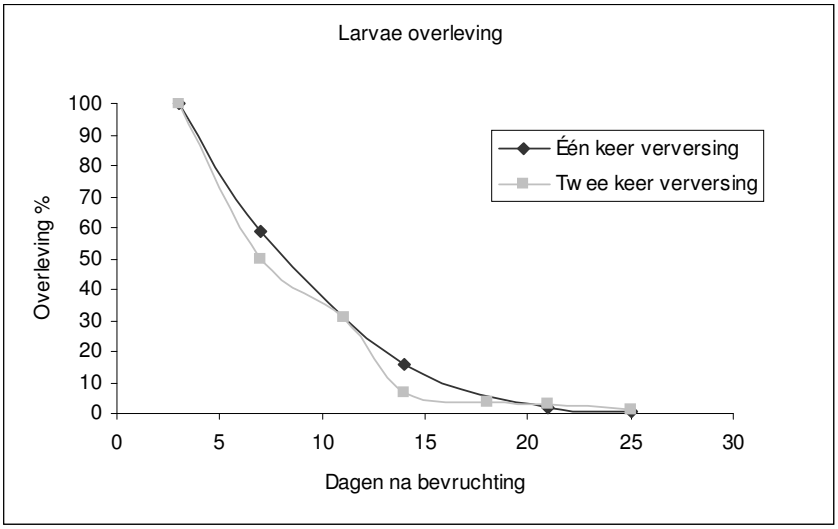
6.4.1. Proef beschrijving (Batch 040705)

Paaien van mosselen uit Shetland vond plaats met temperatuur schokken. Eicellen van 9 vrouwtjes werden met 2 ml van spermasuspensie bevrucht. 72 uur na bevruchting werden D-larven geteld. Het experiment werd in 1250 l tanks uitgevoerd. De twee tanks gebruikt in het experiment werden met 475 l van 1 µm gefiltreerd zeewater (UV behandeld) gevuld. Beluchting werd hierin toegepast. Larven werden aan de experimentele tanks gevoegd met een begin hoeveelheid van 9 larven/ml.
Één van de tanks werd twee keer per week schoon gemaakt, terwijl het verversen van de andere werd één keer per week gedaan.
De larven culturen werden dagelijks met 10 cellen/µl van *Isochrysis* (T-ISO) en 10 cellen/µl van *Chaetoceros gracilis* gevoerd.

Temperatuur werd dagelijkse gemeten. Bij elke verversing, werden monsters genomen voor metingen van de larven lengte en het schatten van het aantal levende larven.

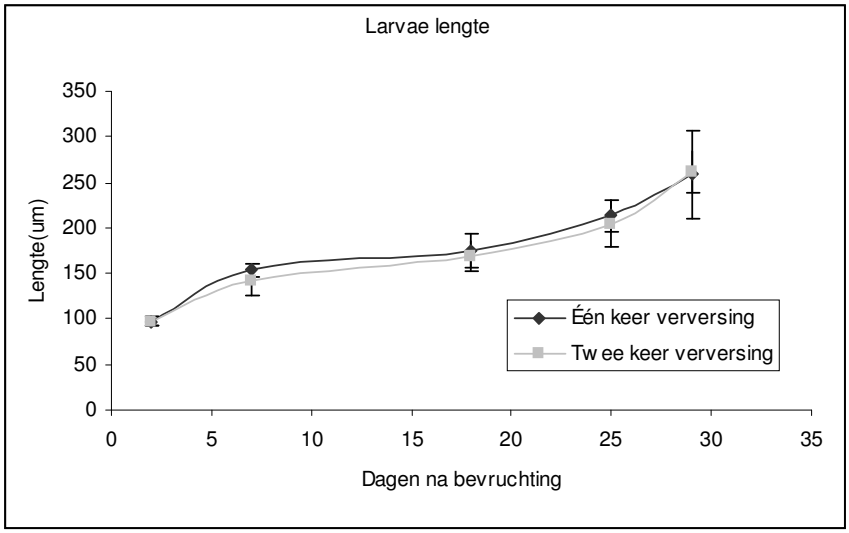
6.4.2. Resultaten

De larven overleving aan het einde van het experiment was erg laag voor beide behandelingen. Figuur 37 laat zien dat 25 dagen na de bevruchting de overleving in de larven tank die 1 keer per week schoongemaakt wordt 0.9 % is van het aantal larven in het begin. De overleving in de tank die 2 keer schoongemaakt is in een week is 1 % van het aantal larven in het begin.



Figuur 37. Larven overleving (%) van de verversing behandelingen. (n=1)

Er was geen significant verschil tussen de behandelingen met betrekking tot de larven lengte (ANOVA, P>0.05). Figuur 38 laat zien dat de schelplengte tijdens het experiment bij beide behandelingen bijna hetzelfde zijn. Schelplengte van de larven die gekweekt werden in de tank die 1 keer per week schoongemaakt werd bereikte aan het einde van het experiment een lengte van 258 µm. De gemiddelde groei liep van 4 tot 9 µm. De schelp lengte van de larven die 2 keer per week schoongemaakt zijn was 260 µm. Voor deze behandeling liep de gemiddelde groei ook van 4 tot 9 µm.



Figuur 38. Schelplengte van de larven van de twee behandelingen. (n=20 ± SD)

6.4.3. Discussie

Er werd geen effect van 1x per week of 2x per week verversen van de larven op de groei en overleving gevonden. De overleving van de larven was echter voor beide behandelingen slecht waardoor harde conclusies niet te trekken zijn.

6.5. Luchttoevoer proef

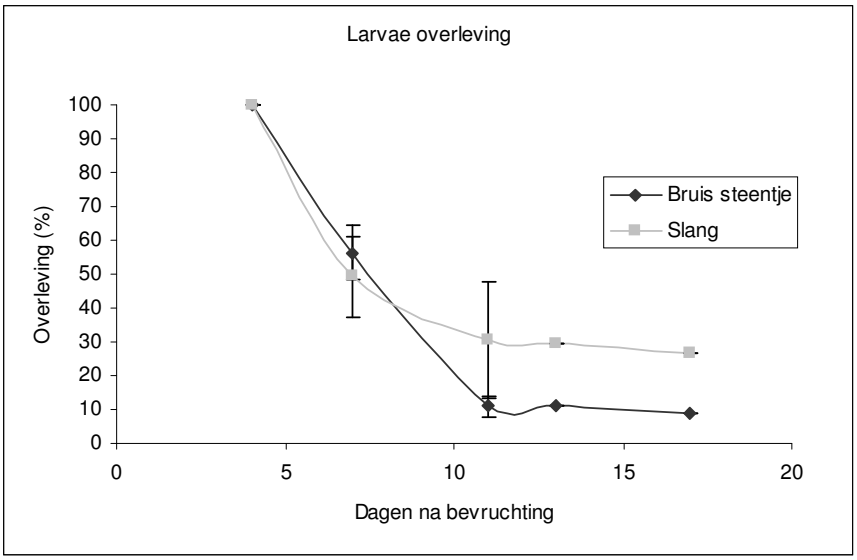
Het water in de larventanks wordt in beweging gehouden door luchttoevoer. De grootte van de luchtbellen is belangrijk voor de larven. Veel kleine luchtbellen geproduceerd door b.v. een bruissteentje maken de kans dat een larf er tegen opbotst veel groter dan weinig grote luchtbellen geproduceerd zonder bruissteentje (persoonlijke communicatie A. Beaumont). Het verschil in groei en overleving in larven met beide methoden van luchttoevoer is onderzocht.

6.5.1. Proef beschrijving (Batch 290805)

Mosselen uit Shetland werden met temperatuur schokken aangezet tot paaien. Gevonden D-larven werden over 4 tanks van 1250 l verdeeld. Elke tank werd met 500 l van 1 µm gefiltreerd zeewater gevuld.
De beluchting vond plaats door slangetjes met bruissteentjes in twee tanks. De beluchting van de andere twee tanks bestaat uit een slang die op de bodem van de tank geplaatst werd (om de flotatie te verhinderen werden er gewichten aan slangen gebonden) .
Het voeren werd één keer per dag gedaan. Het dieet voor dit experiment bestond uit 10 cellen/µl van elk van de algen soorten *Isochrysis* (T-ISO) en *Chaetoceros*.
Het verversen van de tanks vond twee keer per week plaats. Monsters voor de bepaling van de larven lengte en schatting van het aantal levende larven werden met elke verversing genomen.

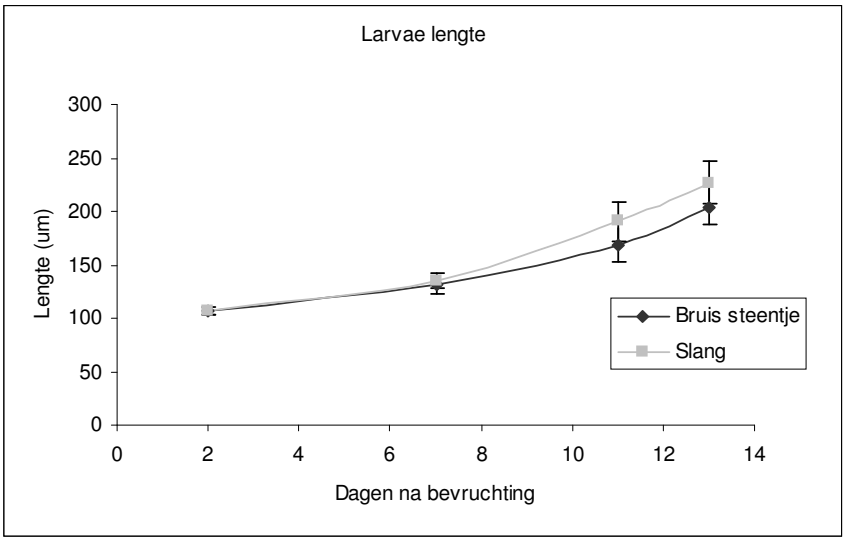
6.5.2. Resultaten

De containers die belucht zijn met een open slang laten een hogere overleving zien dan degene die belucht zijn met aquarium stenen. Figuur 39 laat een 17 % overleving zien voor de lucht slang behandeling terwijl die van de met aquarium steentjes beluchte behandeling een overleving had van 3 %.



Figuur 39. Larven overleving (%) voor de twee beluchting behandelingen. (n=2 behalve voor dag 13 en 17 toen n=1)

Er werd ook een significant verschil in schelplengte gezien tussen de 2 behandelingen (ANOVA, P>0.05), zoals te zien is in figuur 40.



Figuur 40. Schelp lengte van de mosselen larven. (n=40 behalve voor dag 13 wanneer n=20)

De lengte van de larven in de open slang behandeling was 13 dagen na de bevruchting 227 µm. De schelplengte van de larven met de aquariumsteentjes behandeling was na dezelfde periode 204 µm. De gemiddelde groei was voor beide behandelingen tussen de 5 en 18 µm per dag.

6.5.3. Discussie

Een betere overleving werd gevonden in de behandeling met luchttoevoer via een buis ipv een bruissteen. Ook de groei was beter met luchttoevoer via een buis. Na 13 dagen zijn de replica's echter samen gevoegd waardoor statistische analyse niet meer mogelijk was. Een verklaring voor de betere overleving met lucht via een buis is dat er minder luchtbellen in het water zijn waardoor de kans dat een larf er tegenaan bots kleiner is (pers. comm. Andy Beamont). Ook werd minder opstapeling van larven op de bodem van de tank geobserveerd (pers. comm. Nancy Nevenjan).

6.6. Temperatuurproef

Informatie in de literatuur over de optimale temperatuur om *Mytilus edulis* larven op te kweken is niet eenduidig. Er wordt een range van 16 tot 20^{0}C genoemd (Bayne, Helm et al, 2004). In de volgende proef is onderzocht wat de optimale temperatuur voor groei en overleving van onze larven is.

6.6.1. Proef beschrijving (Batch 260905)

Mosselen uit Shetland werden aangezet tot paaien met temperatuur schokken. De eicellen van twee paaiende vrouwtjes werden door 2 ml sperma suspensie bevrucht. Embryo ontwikkeling vond plaats in de 1250 l tanks bij een temperatuur van 18 ^{0}C. 48 uur na bevruchting werden er D-larven geteld.

Vier verschillende temperaturen werden tijdens het experiment getest: 16^{o}C, 18^{o}C, 20^{o}C en 22^{o}C. 2 glazen flessen van 4 l werden bij kamer temperatuur (16^{o}C) geplaatst. Drie water baden werden op 18^{o}C; 20^{o}C en 22^{o}C gezet, en 2 glazen flessen werden in elke water bad geplaatst. Het water gebruikt tijdens het experiment was 1 µm gefiltreerd zeewater (UV behandeld).

Temperatuur werd dagelijks gemeten.

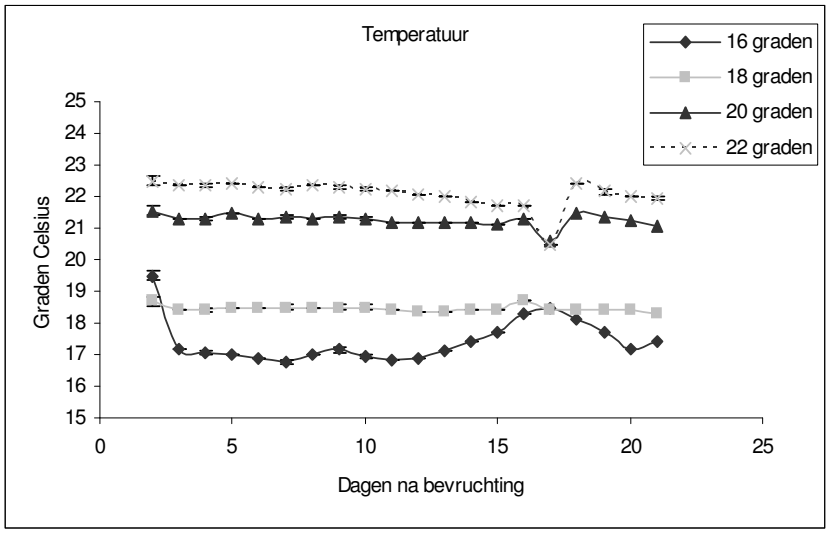
Larven werden bij een concentratie van 10/ml gehouden. Bij de start van het experiment werden 10 cellen/µl van *Isochrysis* (T-ISO) en 10 cellen/µl van *Chaetoceros gracilis* gevoerd. Aan het einde van de eerste week werden deze concentraties verdubbeld.

Het verversen van de flessen en het nemen van monsters (voor lengte en het aantal levende larven bepaling) vond twee keer per week plaatst.

Figuur 41. Waterbaden met glazen 4 liter flessen met larven bij verschillende temperaturen.

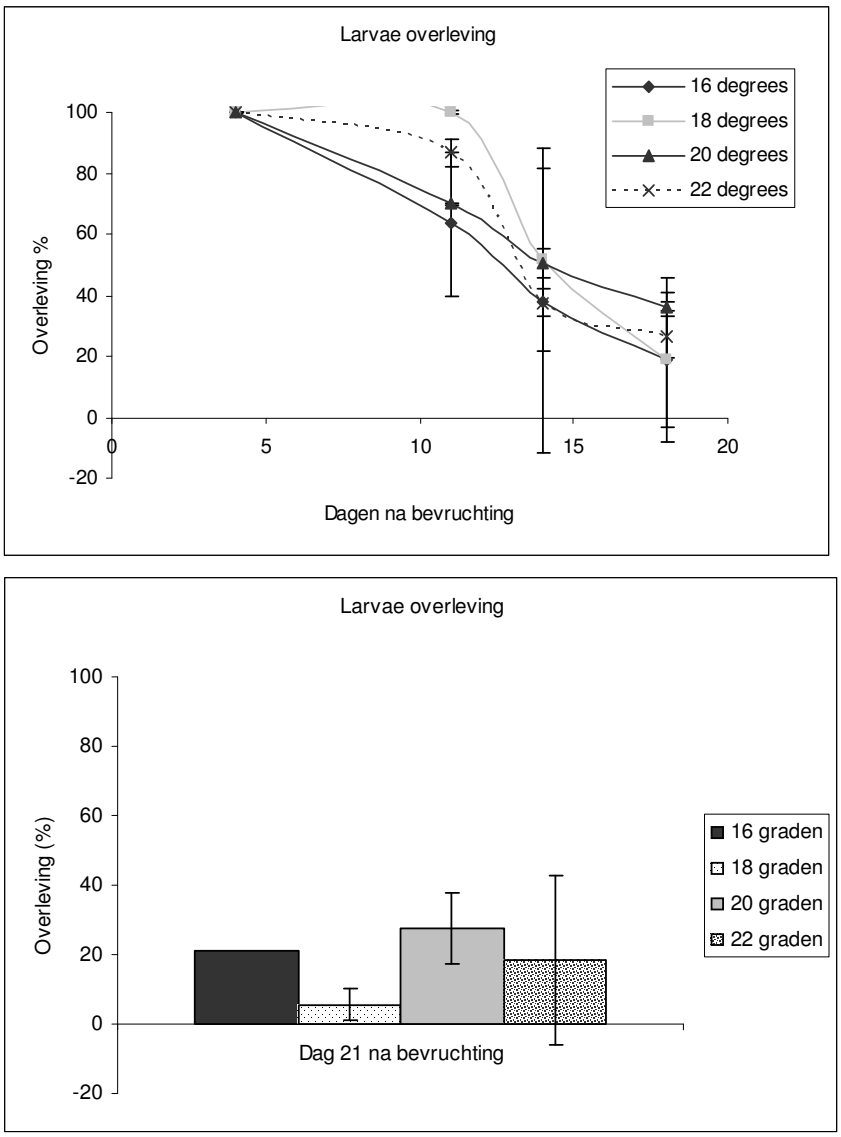
6.6.2. Resultaten

De temperatuur werd gemeten met replica's gedurende het experiment. Het gemiddelde van de 2 replica's die gebruikt werden per temperatuur behandeling staat in figuur 42. De 16 graden behandeling heeft grotere schommelingen in vergelijking met de rest van de temperaturen. Dit komt doordat de rest van de behandelingen plaatst vond in een waterbad terwijl de 16 graden behandeling werd uitgevoerd bij kamertemperatuur.



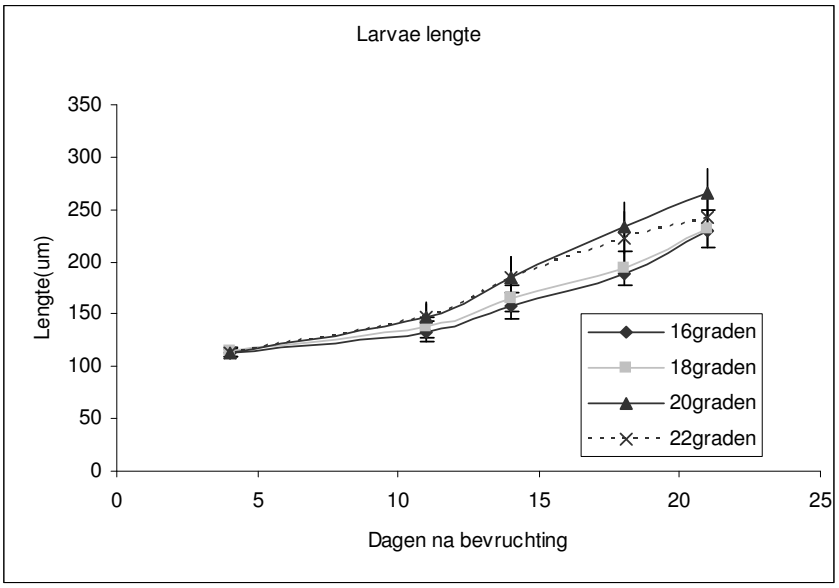
Figuur 42. Temperatuur tijdens de hele experiment. (n=2 ± SD)

De larven overleving bij de 4 verschillende temperaturen die getest zijn is te zien in figuur 43.
De laagste overleving werd gemeten in de 18 graden behandeling met een overleving van 5 % terwijl de 20 graden behandeling de hoogste overleving had. Het aantal larven dat in leven was aan het eind van het experiment was 27 % van de begin hoeveelheid larven. De overleving voor de 16 graden en de 22 graden behandeling was aan het einde van het experiment 25 % van de hoeveelheid larven in het begin.
Het verschil van larven overleving tussen de behandelingen waren niet significant (ANOVA, $P>0.05$).



Figuur 43. a) Larven overleving (%) van de vier behandelingen tot dag 18 na bevruchting. (n=2 ± SD) b) Larven overleving (%) voor dag 21 na bevruchting. (n=2 ± SD, behalve voor behandeling 16 graden wanneer n=1)

De schelp lengtes van de larven die gekweekt zijn worden getoond in figuur 44.



Figuur 44. Larven schelplengte voor de vier behandelingen. (n=80 ± SD, behalve voor 16 graden behandeling aan dag 21 toen n=40 ± SD)

3 weken na de bevruchting waren de schelplengtes van larven gekweekt bij 20 graden 266 µm. De gemiddelde groei liep van 4 tot 13 µm per dag. De larven die gekweekt werden bij 22 graden hadden een lengte aan het einde van het experiment van 242 µm met een gemiddelde groei van 4 tot 12 µm per dag. De larven die gekweekt zijn bij 16 en 18 graden verschilden niet in schelp lengte en bereikte aan het einde van 3 weken een waarde van 231 µm. De gemiddelde groei voor beide behandelingen liep van 2 tot 10 µm per dag.
Verschillen in schelplengten tussen behandelingen waren niet significant (ANOVA, P>0.05).

De beste overleving en groei voor deze behandeling was bij 20 graden, maar de verschillen waren niet significant.

6.6.3. Discussie

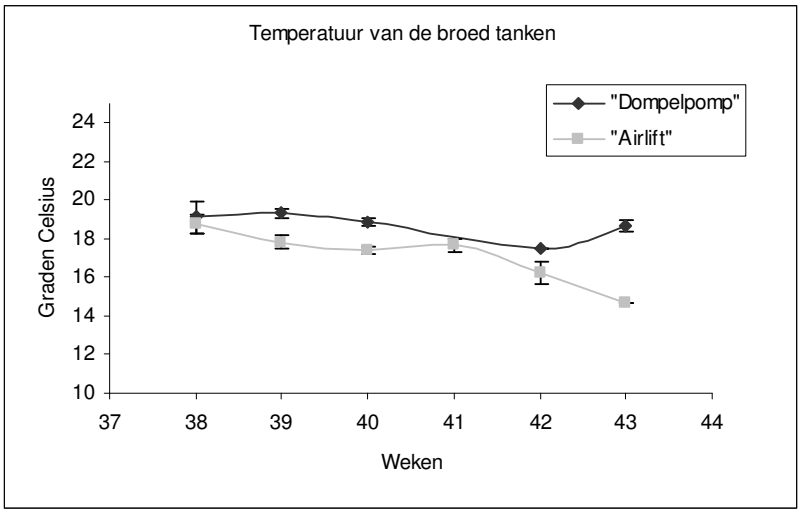
Er zijn geen duidelijke verschillen in groei en overleving gevonden voor larven gekweekt bij 16^0C, 18^0C, 20^0C of 22^0C. Overleving op het moment van vestiging was in alle behandelingen laag. Dit geeft aan dat de omstandigheden niet optimaal waren. In een aantal containers is besmetting met bacteriën geconstateerd (fel roze aanslag). De beste resultaten werden behaald bij 20^0C, maar deze proef moet worden herhaald om dit te bevestigen.

7. Vestiging en uitgroei van broed

Vestiging van larven is getest in verschillende systemen.

7.1. Downwelling systemen

In figuur 45 is het temperatuursverloop te zien van de downwelling systemen voor het broed. De temperatuur is altijd hoger in het dompelpomp systeem. Bij het dompelpomp systeem staat de pomp in het water. Hierdoor vindt warmte afgifte plaats.



Figuur 45. Temperatuur in de dompelpomp and airlift containers die werden gebruikt voor het opkweken van het broed.

7.1.1. "Air-lift" downwelling systeem

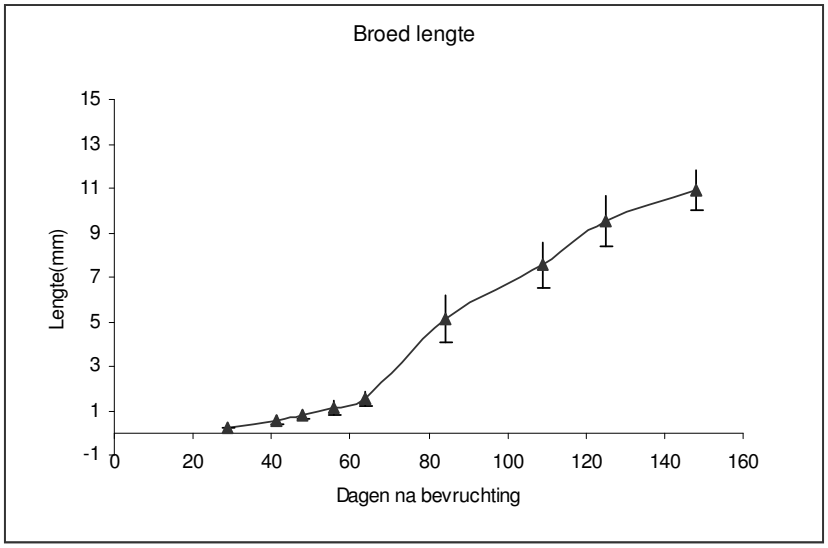
7.1.1.1. Proef beschrijving (Batch 040705)

Drie weken na bevruchting werden pediveliger larven in het downwelling systeem gebracht. Ten gevolge van een laag aantal larven, verschilt het "downwelling" systeem met het systeem dat beschreven wordt in de Protocollen. Het systeem bestaat uit een tank van 100 l. Een emmer met 150 µm zeef bodem werd in de tank geplaatst. Water werd met een "airlift" gecirculeerd. Larven werden in de emmer geplaatst en werden dagelijks met 10 cellen *Isochrysis*/µl en 10 cellen *Chaetoceros*/µl gevoerd. Verversen vond één keer per week plaats.

3 maanden na hun plaatsing in het systeem, werd het broed van de zeef verwijderd, gewogen en geteld. De broedjes werden in de emmer (nu met 200 µm zeef bodem) teruggebracht en tevens in een 40 l tank geplaatst. Het dieet werd ook veranderd, vanaf dit punt werd de voedselportie op grond van de biomassa van het broed bepaald (zoals beschreven in de Protocollen).
Verversen vond één keer per week plaats. Monsters werden één keer in de drie weken genomen voor lengte meting. Het totale aantal broed werd ook bepaald.

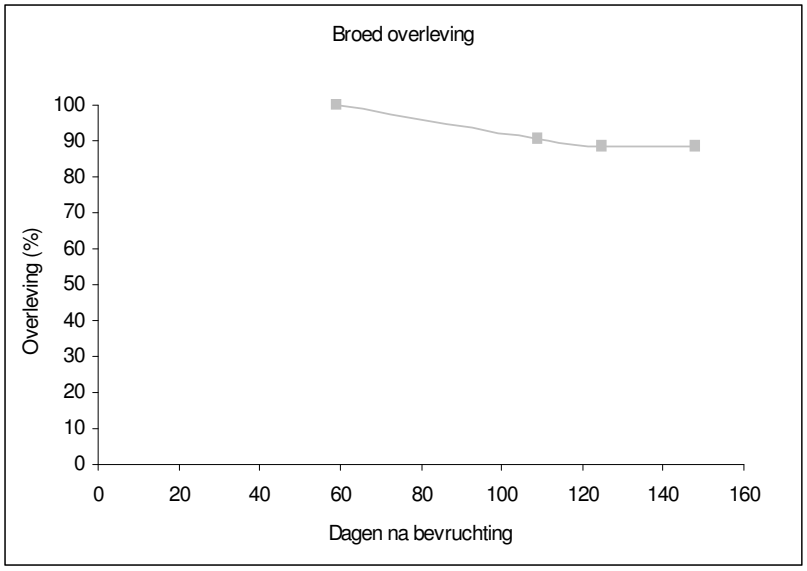
7.1.1.2. Resultaten

Figuur 46 laat de toename zien in schelplengte van het broed in het airlift systeem. 150 dagen na de bevruchting was de gemiddelde schelplengte 11 mm.



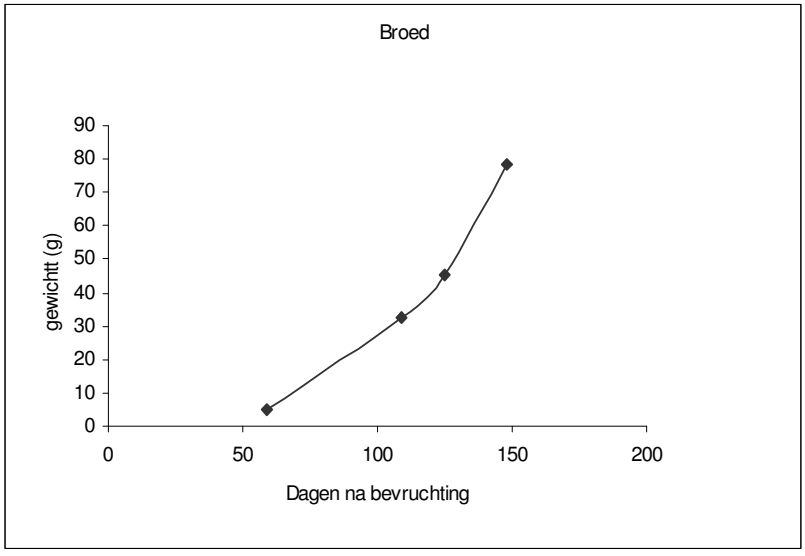
Figuur 46. Schelp lengte van het broed gevestigd in het airlift systeem. (n=20 ± SD)

De overleving van het broed vanaf dag 60 staat in figuur 47. Het aantal broed dat dood ging in een periode van 3 maanden liep van 2192 tot 1859. Dit komt overeen met een overleving van 88 % in deze periode.



Figuur 47. Broed overleving, uitgaande van het aantal dat op dag 60 na bevruchting aanwezig was. (n=1)

Figuur 48 laat een toename zien van het gewicht van het broed in de tijd. 60 dagen na de bevruchting was het gewicht van het broed 4 gr. Dit nam in 90 dagen toe tot 78 gr.



Figuur 48. Gewicht van de broed gevestigd in de airlift systeem. (n=1)

7.1.2. "Dompelpomp" downwelling systeem

7.1.2.1. Proef beschrijving (Batch 260905)

4 weken na bevruchting, werden pediveliger larven in het "downwelling" systeem gebracht. De larven voor dit experiment zijn afkomstig van het temperatuur experiment en van het experiment dat water van Jacobahaven vergelijkt met water van de pijplijn van Roem van Yerseke. Er waren 6 behandelingen, maar het "downwelling" systeem had alleen 5 emmers. Larven van de 16°C behandeling (kamer temperatuur) en larven van de Roem van Yerseke pijplijn behandeling (kamer temperatuur) werden samen in één emmer geplaatst. De rest van de behandeling werden apart gehouden.
De eerst week werd de tank met 1 µm gefiltreerd zeewater gevuld, echter, de filtratie werd tijdens de tweede week voor 50 µm verwisseld.
Voeren van het broed vond één keer per dag plaats, 20 cellen/µl van elke algen soort (*Isochrysis* en *Chaetoceros gracilis*) werden naar het broed gevoerd.
Temperatuur werd dagelijkse gemeten. Verversen van de tank vond eens per week plaats. Monsters voor lengte bepaling werden eens in de twee weken genomen.

7.1.2.2. Resultaten

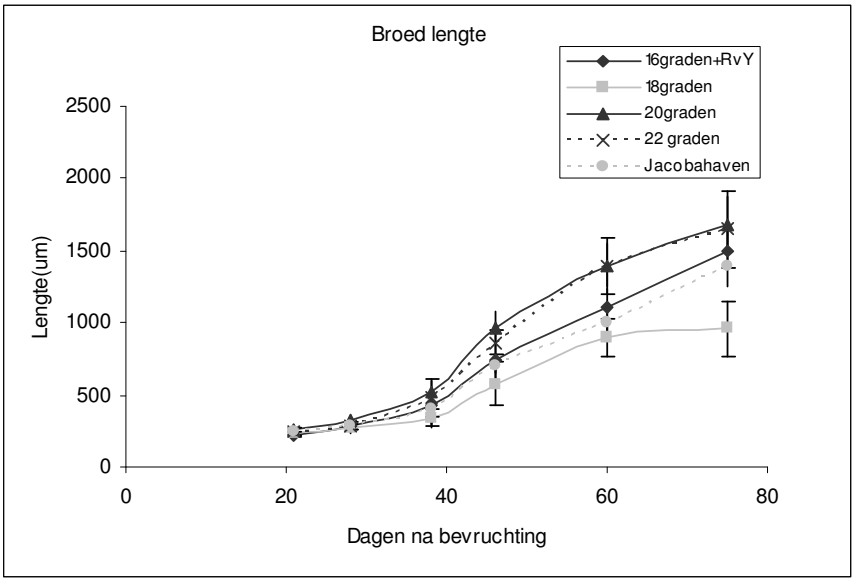
De toename in schelplengte van het broed dat geplaatst werd in het downwelling systeem met dompelpomp wordt in figuur 49 getoond. Het broed dat eerst gekweekt werd als larven in de 20 en 22 graden behandelingen laat de hoogste toename in larven lengte zien met een eindmeting van 1.6 mm. De 2 behandelingen werden geplaatst in 2 verschillende emmers. De gemiddelde groei (gemeten als verandering in schelplengte) liep in beide emmers van 19 tot 55 µm per dag.

Het broed dat gekweekt werd als larven in 18 graden liet de laagste schelplengte zien met aan het einde van het experiment een lengte van 0.9 mm. De gemiddelde groei liep van 6 tot 30 µm per dag.

De larven die gekweekt werden in het water van Jacobahaven werden geplaatst in een aparte emmer. De schelplengte van het broed was aan het einde van het experiment 1,4 mm. De gemiddelde groei liep van 11 tot 38 µm per dag.

De larven die gekweekt werden bij de 16 graden behandeling werden geplaatst in een van de emmers met het downwelling systeem samen met de larven die gekweekt werden in het water van Roem van Yerseke en larven van dezelfde batch in de 1250 l tank. De schelplengte van het broed aan het einde van het experiment was 1.5 mm. De gemiddelde groei liep van 14 tot 40 µm per dag.

Er waren significant verschillen tussen behandelingen (ANOVA, $P<0.05$). Broed van de 18 graden behandeling waren significant kleiner dan het broed van de andere vier behandelingen. Verder was de 16 graden behandeling significant verschild van de 20 graden en de 20 graden en 22 graden behandelingen waren significant verschillend van de Jacobahaven behandeling.



Figuur 49. Schelp lengte van het broed. (n=40 ± SD)

7.1.3. Discussie

De sterfte van het broed is laag. Broed gekweekt in het airlift systeem (batch 040705) liet een betere groei zien dan in het dompelpomp systeem (batch 260905). 80 dagen na bevruchting was de gemiddelde schelplengte respectievelijk 5 mm en 1.5 mm. Dit kan geen temperatuur verschil zijn, want de temperatuur was juist hoger in dompelpomp systeem. Het kan ook geen verschil in voedselaanbod zijn, want het airlift systeem heeft een tijd minder voedsel gehad. Een mogelijkheid is dat de dompelpomp de algen beschadigd. De twee kweeksystemen zijn echter niet gelijktijdig vergeleken. Hierdoor zijn harde conclusies niet mogelijk.

7.2. Vestiging op touwen

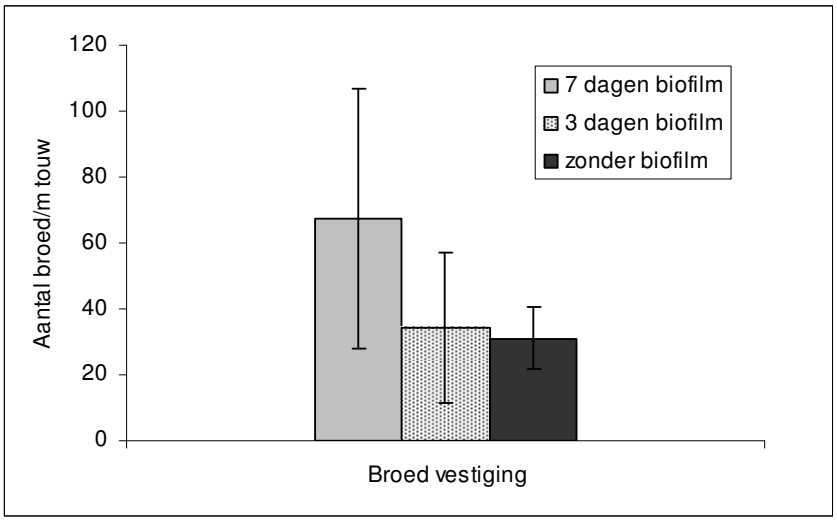
7.2.1. Proef beschrijving (Batch 290805)

Voor de ontwikkeling van dit experiment werden pediveliger larven van de luchttoevoer proef gebruikt. Tien metalen frames met Xmas tree touw werden in een tank van 600 l geplaatst.
Van de totaal 10 touwen, er werden 4 bij het RIVO geplaatst in stromend ongefiltreerd zeewater 7 dagen voor de plaatsing van de pediveliger larven in de vestiging tank. 3 touwen werden 4 dagen bloot gesteld aan zeewater en de laatste 3 touwen werden in de tank gebracht op de zelfde dag dat de pediveliger larven in de 600 l tank werden geplaatst (figuur 50). Na verplaatsing van het RIVO naar de Roem van Yerseke werd de tank met 50 µm gefiltreerd zeewater gevuld. Beluchting werd hierbij toegepast. Gedurende 2 maanden werd elke dag 20 cellen/µl *Isochrysis* (T-Iso) en 20 cellen/µl *Chaetoceros gracilis* toevoegde aan de container.
De verversing werd eens per week gedaan. De temperatuur werd elke dag gemeten. Na 2 maanden werden de touwen voorzichtig afgewassen en het aantal broed op de touwen geteld.

Figuur 50. Tank met metalen frames met Xmas tree touw.

7.2.2. Resultaten

Figuur 51 laat de aanhechting van het broed zien aan touwen met biofilm van verschillende leeftijd. Het hoogste aantal broed werd teruggevonden op de touwen met de oudste biofilm. 1 maand na de plaatsing in de aanhechting tank werd 68 broed per meter gevonden op Xmas touw. De helft van dit aantal werd gevonden op touw met een 3 dagen oude biofilm. Op de touwen waar geen biofilm zat werd het laagste aantal broed teruggevonden met maar 30 broed per meter touw.
De aantallen broed per m touw zijn veel lager dan op basis van het aantal larven werd verwacht.



Figuur 51. Vestiging van broed aan touwen met biofilm van verschillende leeftijd. (n=2 ± SD)

7.2.3. Discussie

Er heeft weinig vestiging op touwen plaatsgevonden. De touwen zijn voorafgaand aan de vestiging in een bak geplaatst die werd doorstroomd met ongefiltreerd water uit de verswaterleiding. Door middel van deze behandeling werden biofilm met verschillende leeftijden op de touwen verkregen. Toen de larven aan de bak zijn toegevoegd is de doorstroming stopgezet. Bij verversing van het water bleek dat er veel roeipootkreeftjes (copepoden) aanwezig waren. Mogelijk heeft predatie op larven en net gevestigd broed plaatsgevonden, want er zijn ook weinig lege schelpen terug gevonden. Uit de biofilm test bleek dat de meeste vestiging op de 7 dagen oude biofilm optrad. Bij herhaling van de proef moet de biofilm worden aangebracht met gefiltreerd zeewater (bv 50 µm).

7.3. Vestiging op kokkelschelpen

7.3.1. Proef beschrijving (Batch 290805)

Een emmer met een 150 µm bodem werd in een 40 l container geplaatst. Kokkel schelpen werden in de emmer geplaatst zodat de 150 µm bodem bedekt was. Een airlift recirculeerde het water in de emmer. Pediveliger larven werden in het systeem gebracht.

Bij de start van het experiment werden 20 cellen/µl *Isochrysis* (T-Iso) en 20 cellen/µl *Chaetoceros gracilis* dagelijks gevoerd aan de container. Drie weken na verplaatsing van de pediveliger larven naar het vestiging systeem nam de concentratie van algen toe tot 37.5 cellen/µl voor elke soort.
Het schoonmaken werd 1 keer per week gedaan. De temperatuur werd dagelijks gemeten.

7.2.2. Resultaten

Er werd broed op kokkelschelpen geobserveerd. Dit is echter niet gekwantificeerd.

7.3.3. Discussie

Vestiging op kokkelschelpen heeft plaatsgevonden. Er zijn geen metingen verricht aan de groei en overleving.

8. INVE proeven met voedingssupplementen

8.1. Supplementen aan larven en broed (Batch 060605)

8.1.1. Proef beschrijving

8.1.1.1. Paaien

We hebben 3 verschillende groepen van broeddieren gepaaid met wisselend succes. De beste groep waren de mossels uit Shetland (bewaard op 10°C), terwijl slechts enkele individuele mossels uit Schotland (bewaard op 10°C) en uit de Oosterschelde (bewaard op 9°C) konden gestimuleerd worden tot paaien.

8.1.1.2. Larven

De larven werden afgezeefd op 60 µm en geteld. Een totaal van 13.580.000 D-larven werden geteld, wat een hatching percentage representeert van 41%. Ze werden verdeeld over de experimentele larvale tanks. Het experiment werd als volgt opgesteld:

- 13 tanks gevuld met gefilterd zeewater (1µm, geen UV, saliniteit 30 ppt)
- beluchtingsteentjes
- Temperatuur varieerde tussen 17 en 18°C gedurende de eerste 10 dagen van het experiment. De laatste 5 dagen van het larvale stadium steeg de temperatuur tot 19.8-22°C.
- De larven werden gestockeerd aan een densiteit van 6 larven/ml
- Water werd tweemaal per week vervangen waarbij de tanks en beluchtingsteentjes ook gereinigd en gedesinfecteerd werden.
- De voedsel ratio was 20 000 cellen/ml gedurende het volledige experiment omdat de groei gecompenseerd werd door de mortaliteit. Een mengsel 50:50 van Isochrysis galbana:Chaetoceros neogracilis (gekweekt in RIVO) werd toegediend.
- De volgende 5 behandelingen (# replica's) werden toegepast :
    1. controle (3) : 100% algen
    2. LB (3) : 100% algen + 0.61ppm LB na 1 week
    3. LBall (3): 100% algen + 0.61ppm LB vanaf begin
    4. LB+WC (2): 100% algen + 0.61ppm LB na 1 week + 0.5ppm WC na 11 dagen
    5. LB+Macro (2): 100% algen + 0.61ppm LB na 1 week + 0.1ppm Macro na 11 dagen

8.1.1.3. Vestiging

De competente larven werden gezeefd op 150 µm en geteld. Mortaliteit werd bepaald in sub-monsters onder de microscoop. Tanks met heel hoge mortaliteit werden geëlimineerd (tank 7 LB+WC en tank 14 LB). De larven van 1 behandeling werden samengevoegd, opnieuw geteld and in een emmer geplaatst met een zeef van 150 µm als bodem. De emmers maakten deel uit van een downwelling systeem dat gevoed werd met ongefilterd oesterput-water (enkel voorfilter van 250 µm). De broedjes kregen extra algen die gekweekt werden buiten op het RIVO en die natuurlijk voorkwamen in het zeewater.

Na 18 dagen werd de hoeveelheid broed in elke emmer volumetrisch bepaald en werden stalen genomen voor lengtemetingen. Daarna werd alle broed van de verschillende behandelingen samengevoegd in 1 emmer en werd het opnieuw in de downweller bij de oesterput gebracht voor nog 1 week. Op 18/7/2005 werd het zaad gebruikt voor de zaadtest.

8.1.1.4. Broed

De experimentele proefopzet voor het broed was als volgt:

- tanks met 40 l gefiltreerd (1 micron) en UV behandeld zeewater
- gesloten downwelling systeem
- 1x voeren per dag
- Temperatuur varieerde tussen 19 en 23°C
- 2x per week schoonmaken van de tanks en water verversing
- dichtheid: 7 g broed in emmer met zeefbodem (212 micron)

De volgende behandelingen werden uitgevoerd (1 replica):

- controle : 100% algen (50 000 *Chaetoceros gracilis*/ml)
- Spat 1 : 100% algen + 200 mg Spat 1 (=0.2g/gLW)
- Spat 4 : 100% algen + 200 mg Spat 4
- Spat 5 : 100% algen + 200 mg Spat 5

8.1.2. Resultaten

8.1.2.1. Paaien

Ongeveer 40-45 dieren paaiden eitjes en sperma en dit resulteerde in 32.8* 10^6 embryo's. De embryo's werden overgebracht naar een tank van 1500 l, gevuld met gefilterd (1 µm, geen UV) zeewater van 18°C en voorzien van zachte beluchting. De larven bleven er 48 uur tot ze ontwikkeld waren tot D-larven.

8.1.2.2. Larven

- groei resultaten van larven en broed zijn samengevat in Tabel 14
- mortaliteit is samengevat in Tabel 14
- evaluatie van metamorfose is weergegeven in Tabel 14

8.1.2.3. Broed

Na 2 weken werd al het broed verwijderd uit de emmers met een hoge druk spuit en verzameld op een zeef die was geplaatst op absorberend papier om zoveel mogelijk water te verwijderen. Het broed werd gewogen en monsters werden genomen voor lengte metingen. De resultaten worden getoond in Tabel 15. Er was geen zichtbare sterfte in alle behandelingen.

Tabel 14. Groei van mossel larven tot broed

Behan-deling	Tank	D-larven lengte (µm)	Gemidd. lengte (µm)			Overleving%	Gemidd. lengte (µm)	Over-leving (%)	Gemidd. lengte (µm)		
		08/06/05	13/06/05	17/06/05	20/06/05	20/06/05	23/06/05	23/06/05	30/06/05	07/07/05	11/7/05
Ontwi-kkelings stadium		larf	larf				competente pediveliger		Broed		
Controle	1	86	129	184	205	23	252 (±15)	41	278 (±56)	463 (±137)	769 (±145)
Controle	8	86	-	185	204	11		26			
Controle	15	86	-	189	209	11		35			
LB all	3	86	-	174	210	5	254 (±15)	64	294 (±75)	452 (±137)	761 (±122)
LB all	10	86	-	186	215	19		54			
LB all	13	86	126	184	207	12		74			
LB	2	86	-	-	196	7	255 (±16)	21	242.5 (±31)	442 (±146)	818 (±176)
LB	4	86	-	-	215	20		76			
LB	14	86	-	-	182	5		3			
LB+WC	7	86	-	-	190	10	234 (±28)	5	280 (±49)	373 (±79)	626 (±115)
LB+WC	11	86	-	-	189	7		39			
LB+macro	9	86	-	-	217	15	254 (±17)	35	289 (±49)	456 (±147)	846 (±137)
LB+macro	12	86	-	-	201	17		82			

20/jun start met toevoeging van WC en Macro

Tabel 15. Groei van broed.

Behandeling	Start gewicht(g)	Eind gewicht (g)	% toename gewicht	Start lengte (±stdev, µm)	Eind lengte (±stdev, µm)
Controle	7	11.70	67	555 (±208.1)	875.2 (±439.6)
Spat 1	7	14.77	111	555 (±208.1)	1092(±472.8)
Spat 4	7	16.10	130	555 (±208.1)	1257.5(±429)
Spat 5	7	13.82	97	555 (±208.1)	1150.7(±432)

8.1.3. Conclusie

8.1.3.1. Larven

Mortaliteit was heel hoog gedurende het larvale stadium wegens de slechte waterkwaliteit (geen UV filtratie), het gebruik van nieuwe tanks, en tekort aan hygiëne in de hatchery. Geen significant verschil werd waargenomen tussen de behandelingen, hoogstwaarschijnlijk door de algemene hoge mortaliteit.

8.1.3.2. Broed

Het is duidelijk dat de groei van het broed wordt gestimuleerd door toevoeging van het artificiële dieet (zie tabel 15). In het geval van Spat 4 was het percentage toename in gewicht tweemaal hoger dan bij de controle. Van alle INVE diëten presteerde Spat 5 het slechts.

8.2. Supplementen aan broedstock en larven (Batch 220805)

8.2.1. Proef beschrijving

8.2.1.1. Paaien

- spawning broodstock dieren van verschillende oorsprong:
    - INVE conditioneringsproef BD9
    - INVE conditioneringsproef Controle
    - Koud bewaarde mosselen Zeeland
    - Koud bewaarde mosselen Waddenzee
    - Koud bewaarde mosselen Shetland

8.2.1.2. Larven

- Er werden 4x 500 000 larven gestockeerd in een experimentele larvale tank van 100 liter (5 larven/ml). De behandelingen waren :
    - controle: 2x per week waterverversing (maandagnamiddag/vrijdagvoormiddag)
    - LB1 supplement vanaf begin (0.61ppm) (LB1)
    - LB2 supplement vanaf begin (0.61ppm) (LB2)
    - LB2 supplement vanaf begin (0.61ppm) + macro (0.1ppm) vanaf dag 11 (LB2+macro)
- De larven kregen 20000 cellen/ml (50:50 Iso:Chg)

8.2.2. Resultaten

- Twee dagen na paaien werden 2 miljoen D-larven gerecupereerd (de misvormde larven werden verwijderd door een zeef van 60 µm te gebruiken).
- Telling op 26/8/2005
    - Controle (tank 1) : 3.6 larven/ml
    - LB1 (tank 3) : 4.1 larven/ml
    - LB2 (tank 4) : 4.1 larven/ml
    - LB2 + macro (tank 2) : 4.3 larven/ml

Mortaliteit is al zichtbaar en er zitten nog veel mismaakte larven tussen.
Experiment opgegeven op 31/8/2005 (na 1 week) omdat er betere larven beschikbaar waren.

8.3. Supplementen aan larven (Batch 290805)

8.3.1. Proef beschrijving

8.3.1.1. Paaien

Mosselen van Shetland en Duitsland werden gestimuleerd om te paaien.

8.3.1.2. Larven

De larven werden opgekweekt in 15 experimentele tanks van 100l (10 larven per ml). De experimentele tanks hadden de volgende behandelingen (telkens 3 replica's):

1. controle 1: 1x per week

2. controle 2 : (tank 5,8,15)
3. LB1 supplement vanaf begin (0.61ppm) (tank 2,10,12)
4. LB2 supplement vanaf begin (0.61ppm) (tank 3,7,14)
5. LB2 supplement vanaf begin (0.61ppm) + macro (0.1ppm) vanaf dag 11 (tank 1,9,11)

Het controle dieet bestaat uit 20 000 cellen/ml (Iso:Chg, 50:50).
De tanks werden 2x per week ververst.

8.3.1.3. Vestiging en broed

De larven afkomstig van de 100l tanks werden samengevoegd per behandeling en gesetteld op zeven. Een downwelling systeem met zeewater van 50 µm werd toegepast. Het water werd 1 maal per week ververst. Alle dieren kregen 50 000 cellen/ ml toegediend.

8.3.2. Resultaten

8.3.2.1. Paaien

De reactie van de broedstock was veel vlugger dan op 220805 (40 minuten na stimulatie). Blijkbaar was de temperatuur in de cold store opgelopen tot 19 ^{0}C in de loop van de week. Misschien heeft dat een impact gehad.
7 fertilisaties werden uitgevoerd die samen resulteerden in 50 miljoen eitjes. De celdelingen zagen er veel beter uit.

8.3.2.2. Larven

Er was een hoge mortaliteit in alle behandelingen. De volgende hoeveelheden larven (>150 µm, alle 100l replica's per behandeling samen) zijn teruggevonden:

Controle 1	: 23600
Controle 2	: 50400
LB1	: 5000
LB2	: 35200
LB2+macro	: 27600

8.3.2.2. Broed

Het broed werd in spatcilinders ondergebracht. De groei van het zaad in de cilinders werd opgevolgd door een staalname na 14 dagen met volgende resultaten (Tabel 16):

Tabel 16. Groei van broed.

Behandeling	Begin aantal larven met oogvlek	Aantal broed aan het eind	% gemetamorfoseerd	Lengte (µm)
Controle 1	23600	11785	50	620±183
Controle 2	50400	19882	39	574±173
LB1	5000	1841	37	508±223
LB2	35200	13508	38	537±201
LB2+macro	27600	13312	48	616±157

8.3.3. Conclusie

De mortaliteit in de tanks van 100 liter tijdens de larvale fase is veel te groot (> 95%) om tot enige besluit te komen. De mortaliteit is hoogstwaarschijnlijk veroorzaakt door de hoge temperaturen met een trage larvale ontwikkeling als gevolg. De kwaliteit van het water kan ook een rol hebben gespeeld.

8.4. Supplementen aan broedstock (Batch 241005)

8.4.1. Proef beschrijving

Verschillende INVE experimentele conditioneringvoeders zijn vergeleken met een controle algendieet. Het succes van de diëten is getoetst aan de volgende parameters:

- aantal dieren dat na stimulatie overgaat tot paaien
- aantal eitjes per vrouwelijk dier
- grootte van de eitjes
- FAME analyze van de eitjes
- % fertilisatie
- % hatching rate

De broeddieren (Zeeuwse mosselen uit de Oosterschelde) zonder enige gonaden zijn in een doorstroomsysteem ondergebracht (1.5 liter/minuut, dag en nacht). Het zeewater is gefiltreerd tot 1 micron en is 18°C warm. De tanks (250 liter)en mosselen werden 1 x week volledig

gereinigd. Het voedsel werd op continue basis toegediend door een emmer van 20 liter (algen+INVE+aanlenging met zeewater) via hevel te laten leeglopen gedurende 12 uur.

Volgende behandelingen zijn uitgevoerd :

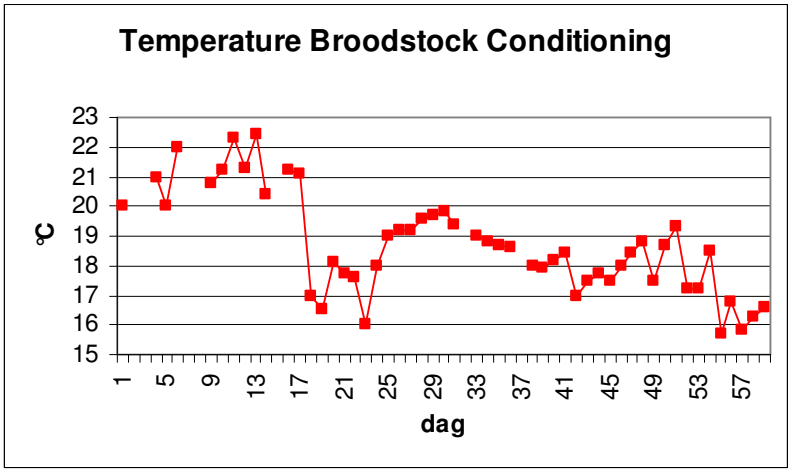
- Controle : 100% algenvoeding ($2.7*10^{10}$/kg.dag; Iso:Chg, 50:50)
- BD9 : 100% algenvoeding + BD9 (2.5mg/gLW)
- BD7 : 100% algenvoeding + BD7 (2.5mg/gLW)
- BD1 : 100% algenvoeding + BD1 (2.5mg/gLW)
- BSelco2 : 100% algenvoeding + BSelco2 (1mg/gLW)

Elke behandeling heeft ongeveer 1 kilo mosselen van Zeelands oorsprong. Een poging tot paaien is ondernomen na 8 weken van conditionering.

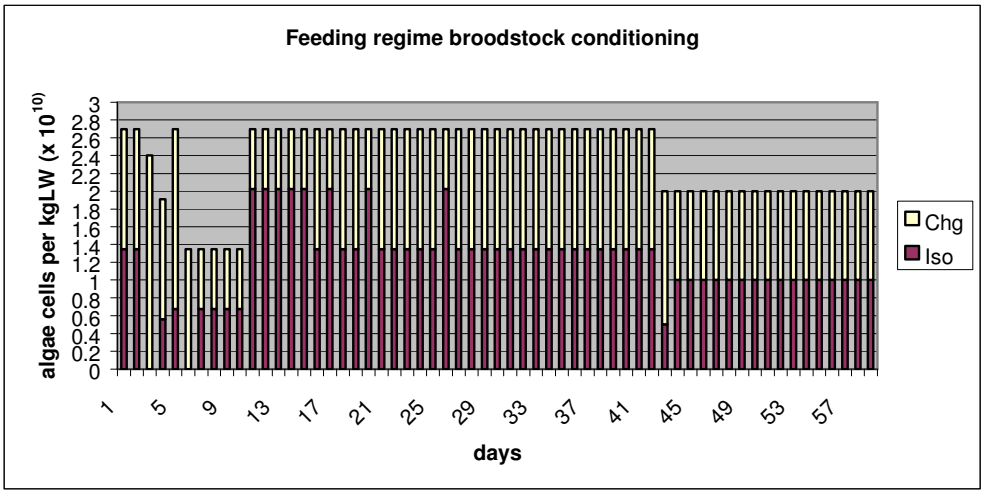
8.4.2. Resultaten

De temperatuur was onvoldoende gecontroleerd tijdens de conditionering. De temperatuur fluctueerde tussen 22.5 en 16°C en werd volledig bepaald door de buitentemperatuur (figuur 52).

De hoeveelheid algen die moest worden toegediend werd vastgelegd op $2.7*10^{10}$/kg LW.dag wat ongeveer 3% voorstelt op DW (ruwe schatting). Door een tekort aan algen werd die vooropgestelde hoeveelheid gereduceerd tot $2*10^{10}$/kg LW.dag gedurende de laatste 2 weken van het experiment (figuur 53).



Figuur 52. Temperatuursverloop gedurende conditioneringsexperiment.



Figuur 53. Voedingsregime gedurende conditioneringsexperiment.

Na 6 weken conditionering zijn enkele mannelijke dieren van verschillende behandelingen beginnen paaien (behalve BD9) tijdens de waterverversing. De dieren werden apart gezet en het experiment werd verder gezet met de overige dieren.

Er trad mortaliteit op in de verschillende behandelingen (behalve voor BD7), maar die bleef beperkt tot maximum 12% (Tabel 18). Tabel 17 toont ook aan dat er maar een minieme toename in vers levend gewicht optrad na 8 weken conditionering.

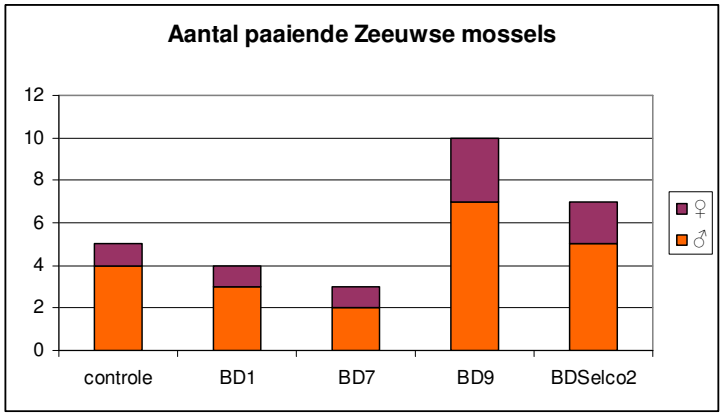
Tabel 17. Aantal dieren gedurende conditioneringsexperiment.

	Begin waarde 26/8/05	Control 24/10/05	BD1 24/10/05	BD7 24/10/05	BD9 24/10/05	BDSelco 24/10/05
# dieren	50	46	47	50	47	44
Totaal gewicht (g)	1000	918.2	917.9	1043.9	929.1	849.5
Gemidd./dier (g)	20	20.9	20.9	20.9	21.1	20.2

Tabel 18. Aantal dieren dat voortijdig dood ging, of wel of niet paaide na afloop van de conditioneringsperiode.

	Controle	BD1	BD7	BD9	BDSelco2	Totaal
Mortaliteit	4	3	0	3	6	16
♂/♀/?	39/4/3	28/15/4	41/7/2	34/13/0	26/15/3	167/54/12
%♂ paaiende*	10.2	10.7	4.8	20.6	19.2	12.6
%♀ paaiende	25.0	6.6	14.3	23.1	13.3	14.8

*paaien na 6 en 8 weken opgeteld



Figuur 54. Aantal paaiende mosselen bij de verschillende diëten.

Alle behandelingen tezamen beschouwd, bestond de broeddierenpopulatie uit ¾ mannelijke dieren en slechts ¼ vrouwelijke dieren. Bijna alle dieren hadden gonaden in ontwikkeling terwijl slechts 12 dieren absoluut geen gameten hadden en bijgevolg niet gesexed konden worden. Ongeveer 12% van de mannelijke dieren en 15% van de vrouwelijke dieren hebben gepaaid, leidend tot een totale productie van 5.2 miljoen eitjes (Tabel 19).

De behandeling BD9 leidde tot het grootste aantal paaiers (10), terwijl de behandeling met BD7 leidde tot het minst aantal paaiers (3). Er valt ook op te merken dat de behandeling BD9 geen enkel dier had zonder gonadenweefsel, in tegenstelling tot de andere behandelingen (Fig. 54).

Tabel 19. Aantal eitjes en ei-grootte bij de verschillende diëten.

# eieren	Controle	BD1	BD7	BD9	BDSelco
♀1	923 333	2 183 333	78 200	1 105 000	229 600
♀2				381 333	83 600
♀3				205 333	
Aantal eitjes	923 333	2 183 333	78 200	1 691 666	313 200
Ei-grootte	66.1 (±3.1)	78.2 (±2.8)	71.9 (±5.7)	69.3 (±3.8)	67.2 (±2.1)

Het aantal eitjes is heel variërend binnen een behandeling en gezien het matig succes van de conditionering in het algemeen kan er niet echt een patroon waargenomen worden. Het vrouwelijk dier van de BD1 behandeling had de meeste eitjes en de grootste eitjes, wat zou kunnen wijzen op volledige rijpheid (Tabel 19).

8.4.3. Conclusies

- Het is mogelijk om broeddieren te conditioneren buiten het normale paaiseizoen. Het matig succes van deze proef kan te wijten zijn aan de volgende factoren :
    - Geen temperatuurscontrole
    - Onvoldoende voedsel
    - Te korte conditioneringsperiode
    - Onaangepaste doorstroming

- De behandeling BD9 leidde tot het grootste aantal paaiende dieren, maar dat leidde niet tot het grootste aantal eitjes. Dat zou kunnen wijzen op onvoldoende rijpheid. De conditioneringsperiode onder de beschreven omstandigheden was waarschijnlijk te kort.

- Het doorstromingssysteem kan verbeterd worden door kleinere doorstromingstanks te gebruiken en ze op te stellen in een rustiger ruimte.

- Indien conditionering van broeddieren voor productie wordt opgezet, kan er beter water gebruikt worden dat gefilterd werd tot op 50 micron en niet 1 micron zoals in deze test.

9. Benodigdheden voor opschalen van productie en aanbevelingen

Schelpdierhatcheries produceren zaad in aantallen en niet in kg. De productie van een hatchery verschilt, maar maximaal worden zo'n 500 miljoen individuen op jaarbasis geproduceerd.
In onderstaande tabel 19 wordt weergegeven welke algenproductie en ruimte nodig zijn voor een productie van 500 miljoen mosselzaadjes van 1 cm op jaarbasis. Hierbij is uitgegaan van het maandelijks produceren van broed, dus 12x 42 miljoen zaadjes. Om een batch mosselzaad van 1 cm te produceren is 203 dagen nodig. Het zal dus een jaar duren voordat iedere maand 42 miljoen zaadjes kunnen worden afgezet. Het aantal van 42 miljoen mosselzaadjes per batch is gebruikt om met behulp van overlevingsfactoren terug te rekenen hoeveel larven er geproduceerd moeten worden en hoeveel ouderdieren daarvoor nodig zijn. Deze rekenfactoren staan onderaan in de tabel. De factoren zijn gebaseerd op de ervaringen die in het huidige project zijn opgedaan en gegevens die zijn gepubliceerd in het FAO handboek (Helm et al, 2004). De benodigde algenproductie is berekend aan de hand van voedselbehoeftes van larven en broed. Voor algen is gerekend met het huidige kweeksysteem dat aanwezig is in de hatchery: een batchcultuur van plastic zakken van 50 liter. Broed tot 1 mm blijft in de hatchery. Daarna vindt opkweek buiten plaats.

Uit de gegevens in tabel 19 blijkt dat de benodigde hoeveelheid en ruimte voor broedstock, larven en algen voor de fase tot 1 mm goed haalbaar zijn in de huidige hatchery. Het grootste ruimtebeslag is de voorziening voor het broed. Bij gebruik van bakken van 1 m diep is dit ongeveer 170 m^2. Voor de fase van 1 mm tot 3 mm is het ruimtebeslag voor broed en algen een stuk groter: bij bassins van 1 m diep is ruim 600 m^2 nodig voor het broed met 200 m^2 algenkweek om deze dieren te voeden. Voor de fase van 3 mm tot 1 cm is het ruimtebeslag voor broed en algen zeer omvangrijk: bijna 9000 m^2 voor de algenkweek en 25.000 m^2 voor het broed.

Tabel 20. Rekenmodel voor bepaling algenproductie en ruimtebeslag van mossel hatchery/nursery met productie van 500 miljoen mosselzaadjes per jaar.

Productie van 500 miljoen mosselzaadjes per jaar in batches van 42 miljoen per maand						
fase	dagen	aantal mosselen	algen liters per dag	1 m³ = 1000 liter ruimte voor algen (l)	50 liter aantal plastic zakken	1 m³ = 1000 liter ruimte voor mosselen (l)
broedstock	40	200	140	1404	28	96
eicellen	2	249995000				12500
larven	21	124997500	100	1000	20	12500
broed binnen 1mm	10	59523810	150	1500	30	167857
broed buiten 3mm	10	59523810	42485	212426		644345
zaad 1cm	120	41666667	1783542	8917708		25000000
totaal	203				78	

rekenfactoren	waarde	referentie
aantal eicellen per mossel	5000000	eigen onderzoek
percentage vrouwtjes in broedstock batch	0.25	eigen onderzoek
droog-gewicht van 1 volwassen mossel in mg	1170	eigen onderzoek
versgewicht van 1 volwassen mossel in kg	0.02	eigen onderzoek
dagelijks mg voeren broedstock 6% van DW	70	FAO handboek
droog-gewicht in mg van 10^6 cellen *Isochrysis*	0.02	FAO handboek
aantal liters water per kg versgewicht broedstock	24	FAO handboek
succesvolle bevruchting en ontwikkeling eicellen	0.50	eigen onderzoek
overleving larven tot broed	0.48	eigen onderzoek
overleving broed tot zaad	0.70	eigen onderzoek
concentratie eicellen / ml	20	eigen onderzoek
concentratie larven / ml	10	eigen onderzoek
dagelijks voeren D larven 2 soorten algen 20 cellen Chae/ul en 20 cellen Iso/ul	40	eigen onderzoek
cel/ul = concentratie cultuur klimaatkamer	5000	eigen onderzoek
aantal dagen voor cultuur in plastic zak om te volgroeien	10	eigen onderzoek
aantal liters plastic zak	50	eigen onderzoek
mg versgewicht per 1 liter	200	FAO handboek
versgewicht (mg) van 1 zaadje van 1 mm	0.6	eigen onderzoek
versgewicht (mg) van 1 zaadje van 3 mm	2	eigen onderzoek
versgewicht (mg) van 1 zaadje van 1 cm	120	eigen onderzoek
aantal liters algencultuur per 1 miljoen zaad van 3 mm	714	FAO handboek
aantal liters algencultuur per 1 miljoen zaad van 1 cm	42805	FAO handboek
cel/ml = concentratie cultuur buiten bassin	800000	eigen onderzoek
aantal dagen voor buitencultuur om te volgroeien	5	eigen onderzoek

Naast ruimte is ook de benodigde arbeid in te schatten op basis van de ervaringen die zijn opgedaan in het huidige project (zie tabel 21). De hatchery/nursery kan tot een product van 3 mm in principe gerund worden met 2 personen. In verband met het aantal benodigde uren per week (58 uur per persoon) en het draaien van weekend diensten, en uitval door ziektes en vakanties is het echter aan te raden om een team van 4 personen samen te stellen, b.v. 1 fulltime kracht (de hatchery manager, HBO-er met aquacultuur achtergrond) van 40 uur per week, 1 persoon (de eerste assistent, MBO-er met laboratorium achtergrond) van 32 uur per week, 1 persoon voor 24 uur per week (geen specifieke vereisten) en 1 persoon voor 20 uur per week (geen specifieke vereisten). Wanneer het broed van 3 mm wordt opgekweekt tot 1 cm zijn nog 14 extra fulltime personen (geen specifieke vereisten) nodig. Deze laatste fase is in het huidige project echter niet uitgetest. De benodigde hoeveelheid arbeid is gebaseerd op ervaringen met het downwelling systeem. De inschatting van 14 personen kan mogelijk minder worden als blijkt dat meer mosselen op een kleine ruimte gekweekt kunnen worden.

Tabel 21. Benodigde arbeid voor mossel hatchery/nursery met productie van 500 miljoen mosselzaadjes per jaar.

Onderdeel	Werkzaamheden	Aantal personen	Totaal aantal uur per week
Watersysteem	Check UV dagelijks en schoonmaken filters en bassin wekelijks	1 persoon	4 uur per week
Broedstock	dagelijks check temperatuur en doorstroom water, dagelijks voeren en 1x per week schoonmaken	1 persoon	18 uur per week
Paaien	aanzetten tot paaien, apart zetten paaiende dieren, bevruchten van eicellen	2 personen	16 uur per maand (omgerekend 4 uur per week)
Larven	dagelijks 10 tanks van 1250 liter voeren en twee maal per week tanks verversen	1 persoon 2 personen	14 uur per week 16 uur per week
Broed binnen	schoonmaken en voeren downwelling systeem: 170 zeven van 1 m^2	2 personen	4 uur per week
Kweek algen binnen	dagelijks 8 zakken aanmaken, wekelijks nutriënten stock aanmaken, dagelijks 2.5 liter voorkweek aanmaken	1 persoon	16 uur per week
Broed buiten	Schoonmaken en voeren upwelling systeem: voor 3 mm 600 zeven van 1 m^2 en voor 1 cm 25.000 zeven van 1m^2	2 personen (3 mm) 14 personen (1cm)	16 uur per week 40 uur per week
Kweek algen buiten	drie keer per week nieuwe kweek starten	1 persoon	12 uur per week
Totaal – 3 mm		2 personen	116 uur per week
Extra – 1 cm		14 personen	40 uur per week

Er zijn enkele scenario's voor vermindering van ruimtebeslag en arbeid te bedenken.

1. De fase van 3 mm tot 1 cm kan worden overgeslagen door broed van 3 mm over te brengen naar een hangcultuur, of door het broed direct uit te zaaien op een perceel. Dit is momenteel onderwerp van studie. Het product van de hatchery/nursery is dan broed van 3 mm.
2. Bij de berekening van de benodigde ruimte voor broed is uitgegaan van 200 mg per liter zoals vermeld in het FAO handboek van Helm et al (2004). Er zijn echter aanwijzingen dat er meer mg per liter gekweekt kan worden. Bij 7000 mg per liter wordt de benodigde ruimte met 65 % verminderd (Tabel 22).
3. De algenkweek kan worden geoptimaliseerd door het aantal cellen per ml te vergroten. In de batch cultures in plastic zakken kan dit worden bereikt door CO_2 toediening. Uit experimenten van Matthijs Koole (student van de Hogeschool Zeeland) blijkt dat hierdoor het aantal cellen per ml in een cultuur toeneemt van 5 miljoen per ml naar 14 miljoen per ml (Koole, 2005). In de cultuur buiten kan het cel aantal per ml mogelijk worden verhoogd door de batchcultuur te koppelen aan een continu cultuur. Aan deze onderzoeksvraag wordt momenteel door RIVO en het Franse instituut IFREMER gewerkt. In onderstaande tabel 22 is te zien wat voor effect verhogen van de celconcentratie heeft op het benodigde algen volume.
4. De algenkweek in batch cultures kan worden vervangen door kweek in continu cultures. Het Seacaps systeem (www.seacaps.com) rekent 16 uur per week voor het kweken van algen in 40 zakken van 500 liter. Per zak van 500 liter wordt een productie gehaald van 80 liter per dag, dit is dus totaal 3200 liter per dag met een celdichtheid van 4000 cellen per µl. Het huidige systeem van batch cultures in zakken van 50 liter kost 16 uur per week voor 78 zakken. Iedere 1 zak van 50 liter met CO_2 levert een productie van 5 liter per dag, dus totaal 290 liter per dag. Dit is een 11x lagere productie. De celdichtheid is weliswaar hoger (14000 cellen per µl, i.p.v. 4000 cellen per µl, dus 3.5 maal zo hoog), maar dit levert toch maar 30 % van de productie van Seacaps (tabel 23). Met het Seacaps systeem kan worden voorzien in de voedselbehoefte in de hatchery met een productie van 490 liter per dag, dus kweek in 6 zakken van 500 liter. Omgerekend vanaf 16 uur voor 40 zakken zou dit 2.4 uur per week aan arbeid vergen.

Tabel 22. Scenario's voor vermindering ruimtebeslag.

fase	volume voor algen nu (l)	volume voor algen verbeterd (l)	verbetering
broedstock	1404	501	CO_2 toediening
larven	1000	357	CO_2 toediening
broed binnen 1mm	1500	536	CO_2 toediening
broed buiten 3mm	212426	106213	verdubbeling concentratie buiten cultuur
zaad 1cm	8917708	4458854	verdubbeling concentratie buiten cultuur
fase	volume voor broed nu (l)	volume voor broed verbeterd (l)	verbetering
broed buiten 3mm	644345	18410	7000 mg per liter
zaad 1cm	25000000	714286	7000 mg per liter

Tabel 23. Vergelijking van de algen productie van de twee verschillende systemen.

	Liter geproduceerd per dag	Celdichtheid per zak (cellen/µl)	Totale cellen geproduceerd per dag
Seacaps systeem	3200	4000	$4.06*10^{12}$
Batch culture systeem	290	14000	$12.8*10^{12}$

Aanbevelingen

- Om de algenkweek te verbeteren zijn de volgende acties nodig:
    - Meten van het vetzuurgehalte gedurende de kweek om het beste tijdstip van oogst te bepalen.
    - CO2 toevoegen aan algenkweek.
    - Overschakelen op continu cultuur.
- Om de conditionering van broedstock te verbeteren zijn de volgende acties nodig:
    - Het doorstromingssysteem kan verbeterd worden door kleinere doorstromingstanks te gebruiken en ze op te stellen in een rustiger ruimte.
- Om de larvenkweek te verbeteren zijn de volgende acties nodig:
    - Omdat de hatchery nog in aanbouw was tijdens de proeven zijn de omstandigheden niet optimaal geweest. Daarom is het aan te bevelen enkele proeven te herhalen zodra de bouw af is. Voor larven zijn dit de verversingsproef, de temperatuurproef en de proef met INVE supplementen. Voor het broed de proeven met vestiging op touwen en kokkelschelpen en de proef met INVE supplementen.
    - Om beter inzicht te krijgen in onverklaarbare sterfte is het raadzaam om bij iedere batch de kwaliteit van de eieren (vorm + vetgehalte) en het water te monitoren (bacteriën, nutriëntengehalte, pH, temperatuur).
- Om het ruimtebeslag van de nursery op het land te verminderen is een test nodig die het maximale aantal mg per liter bepaald waarbij geen groeivertraging optreedt.
- In september 2005 heeft Rene Robert van IFREMER een bezoek gebracht aan de hatchery. Zijn suggesties voor technische verbeteringen zijn samengevat in een rapport (Kamermans, 2005).
- De productie van mosselzaad in een hatchery heeft vooral toekomst als wordt gedacht aan productverbetering. Het kan geen alternatief zijn voor zaadvisserij, want bij een productie van jaarlijks 500 miljoen mosselzaadjes van 1 cm wordt slechts 60.000 kg mosselzaad geproduceerd.

Dankwoord

Verschillende mensen hebben bijgedragen aan het tot stand komen van dit rapport: de Roem van Yerseke medewerkers: Theo Sies (†), Joska Lamper, Eddy Lindenberg, Appie Pronk, Adri Gunst en vakantiekracht Frank Peene; de HZ studenten Maarten de Kort en Matthijs Koole en hun begeleider Jouke Heringa; de RIVO-CSO medewerkers: Ad van Gool, Emiel Brummelhuis, Johan Jol, Vincent Breen, Jack Perdon en Joke Kesteloo.

Literatuur

Helm, M.M., Bourne, N., Lovatelli, A. (comp. / ed.) Hatchery culture of bivalves. A practical manual. FAO Fisheries Technical Paper. No. 471. Rome, FAO. 2004. 177 p.

Hendriks, I.E., 2004. Flow dependent processes in settlement of intertidal bivalve larvae. PhD Thesis University of Groningen.

Kaag N.H.B.M., R.G.Jak, J. Jol & C.A. Schipper (2004). Veldstudie naar TBT verontreiniging in de Noordzee en risico's voor het mariene milieu. TNO-rapport R 2004/475.

Kamermans, P., E. Brummelhuis, A. van Gool, J. Jol, J. Kesteloo, J. Perdon, A. Blanco (in voorbereiding). CSO hatchery/nursery 2002-2004. Intern RIVO rapport.

Kamermans, 2005. Short report of hatchery expertise.

Koole, M., 2005. Optimalisatie algenkweek ten behoeve van een mosselhatchery. Intern RIVO rapport nr. 05.007

Kort, M.H.C. de 2004. Het kweken van eencellige algen met behulp van water uit een visbassin van een tarbotkwekerij ten behoeve van schelpdierlarven. Intern RIVO rapport nr. 04.015

Quist, M.C. 2003. Algenkweek met natuurlijk water en water uit het visbassin. Intern RIVO rapport nr. 03.021

Robert, R., Chretiennot-Dinet, M.J., Kaas, R., Martin-Jezequel, V., Moal, J., Le Coz, J.R., Nicolas, J.L., Bernard, E., Connan, J.P., Le Dean, L., Le Gourrierec, G., Leroy, B., Quere, C., 2004. Amelioration des productions phytoplanctoniques en ecloserie de mollusques: caracterisation des microalgues fourrage. Laboratoire de Physiologie des Invertebres Marins, Ifremer Brest/Argenton.

Stralen, van M.R., 1988. Het functioneren van mossel percelen in de Oosterschelde. Deelstudie: Mosselgroei Dgw. RIVO Directie Landbouw Onderzoek, RWS. Maart 1988

Sukenik, A., Wahnon, R., 1991. Biochemical quality of marine unicellular algae with special emphasis on lipid composition. I. Isochrysis galbana. Aquaculture, 97: 61-72

Utting, S.D. and Spencer, B.D., 1991. The hatchery culture of bivalve mollusk larvae and juveniles. MAFF, Laboratory leaflet no. 68. Directorate of Fisheries Research, Lowestoft. 1991.

www.marine.csiro.au

www.cibnor.mx

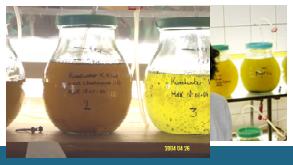
www.seacaps.com

http://ccmp.bigelow.org

Bijlage 1. Productie van algen met water van tarbotkwekerij

ANIMAL SCIENCES GROUP
WAGENINGEN UR

V08



Production of algal feed for bivalve larvae with the use of water from a turbot farm

Pauline Kamermans, Maarten de Kort, Renee Quist & Ad van Gool

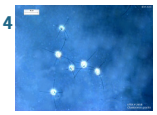
Introduction

In a bivalve hatchery several monocultures of unicellular algae are produced as feed for larvae. In general, the medium for algal growth is made by dissolving chemicals in autoclaved and filtered seawater. In order to reduce this time consuming step water from a turbot farm was used as growth medium for the algae. Futhermore, nutrient uptake by the algae can be an alternative method of water treatment for the fish farm.

Material & methods

12 liter water from tutbot farm

filtered over 5 um, 4 liter per culture flask



0.5 liter *Chaetoceros gracilis* culture per culture flask

190 mg Na_2SiO_3 per culture flask

4.5 l

flasks bubbled with air at room temperature

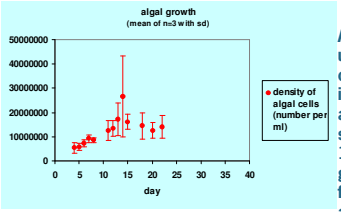
5x a week determination of algal cell density

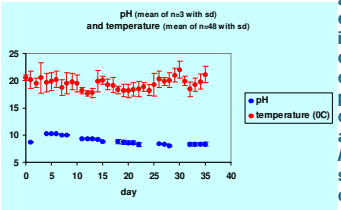
1x a week determination of ammonium, nitrate, nitrite, phosphate and silicate concentration with colorimeter

5x a week pH measurements with Portable pH/ISE Meter

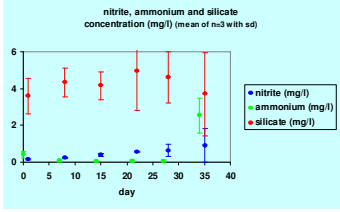
every 30 minutes temperature measurements with datalogger

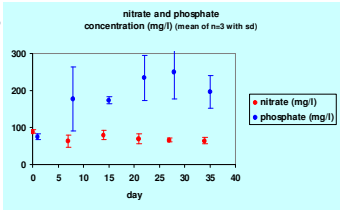
Results





Algal growth showed a significant increase upto day 14 (ANOVA, p=0.008), after which 2 of the 3 replicates crashed causing a decline in average cell density. Maximal cell densities are comparable to those observed with the standard medium. pH showed an increase to 10 as a result of the addition of silicate, but gradually declined to 8. Temperature fluctuated between 16 en 25 °C. Silicate was added in surplus and remained high during the experiment. Ammonium concentration was low, indicating uptake by the algae. The concentration significantly increased after the crash of the culture (ANOVA, p=0.000), probably as a result of decomposition of algal cells. Nitrite concentration increased slightly and nitrate concentration decreased slightly. Available phosphate concentration increased significantly (ANOVA, p=0.03), probably due to organic matter oxidation.





Conclusion

Water from a turbot farm can be used succesfully to culture *Chaetoceros gracilis*. The algal culture can be used as a first step in water treatment for the fish farm. Whether the algae produced with water from the turbot farm are similar in quality for bivalve larvae as algae produced in standard medium remains to be tested.

Animal Siences Group
Netherlands Institute for Fisheries Research
Centre for Shellfish Research
PO Box 77, 4400 AB Yerseke
Tel +31-113 - 672302 - Fax +31-113 - 573477
E-mail pauline.kamermans@wur.nl
www.asg.wur.nl

Netherlands Institute for Fisheries Research

Centre for Shellfish Research

Bijlage 2. Resultaten van pH, temperatuur en nutriënten metingen

Batch 220305

Date	Container	Treatment	pH	T	NH4+	NO3-
25-03-05	1	Filtered seawater	7.73	16.8	0	0-0.05
25-03-05	2	Filtered seawater	7.82	16.9	0	0-0.05
25-03-05	3	Antibiotics	7.88	15.9	0	0-0.05
25-03-05	4	Antibiotics	7.75	16.1	0	0-0.05
25-03-05	5	EDTA	7.88	16.3	0	0-0.05
25-03-05	6	EDTA	7.79	16.2	0	0-0.05
25-03-05	7	Chlorination	7.81	16.1	0	0-0.05
25-03-05	8	Chlorination	7.74	16.4	0	0-0.05
29-03-05	1	Filtered seawater	7.78	19.4	0	0-0.05
29-03-05	2	Antibiotics	7.83	19.1	1-3	0-0.05
29-03-05	3	EDTA	7.87	19.3	0	0
29-03-05	4	Chlorination	7.91	19	0	0-0.05
31-03-05	1	Filtered seawater	7.74	17.8	0	0-0.05
31-03-05	2	Antibiotics	7.85	17.9	0	0
31-03-05	3	EDTA	7.77	17.7	0	0-0.05
31-03-05	4	Chlorination	7.79	18	0	0-0.05
04-04-05	1	Filtered seawater	7.85	17.9	0	0-0.05
04-04-05	2	Antibiotics	7.71	17.7	0-0.5	0-0.05
04-04-05	3	EDTA	7.84	18.1	0	0-0.05
04-04-05	4	Chlorination	7.79	17.6	0	0-0.05
06-04-05	1	Filtered seawater	7.87	18.1	0	0-0.05
06-04-05	2	Antibiotics	7.79	18.2	1-3	0
06-04-05	3	EDTA	7.88	18.1	0	0-0.05
06-04-05	4	Chlorination	7.85	18.2	0	0-0.05
08-04-05	1	Filtered seawater	7.95	18.1	0	0-0.05
08-04-05	2	Antibiotics	7.84	18.2	1-3	0
08-04-05	3	EDTA	8.14	17.8	0	0-0.05
08-04-05	4	Chlorination	8.05	17.9	0	0-0.05
11-04-05	1	Filtered seawater	7.75	17.6	0	0-0.05
11-04-05	2	Antibiotics	8.01	18.1	1-3	0-0.05
11-04-05	3	EDTA	7.85	17.9	0	0-0.05
11-04-05	4	Chlorination	7.94	17.6	0	0-0.05

Batch 300305

Date	Container	Treatment	pH	T	NH4+	NO3-
04-04-05	1	Filtered seawater	7.69	16.9	0	0-0.05
04-04-05	2	Filtered seawater	7.84	16.8	0	0-0.05
04-04-05	3	Antibiotics	7.74	17.3	0-0.5	0-0.05
04-04-05	4	Antibiotics	7.81	17.1	1-3	0-0.05
04-04-05	5	EDTA	7.86	16.4	0	0-0.05
04-04-05	6	EDTA	7.91	16.6	0	0-0.05
04-04-05	7	Chlorination	7.71	16.7	0	0
04-04-05	8	Chlorination	7.84	16.5	0	0
06-04-05	1	Filtered seawater	7.81	16.9	0	0-0.05
06-04-05	2	Filtered seawater	7.77	16.8	0	0-0.05
06-04-05	3	Antibiotics	7.91	16.5	1-3	0
06-04-05	4	Antibiotics	7.85	16.6	1-3	0-0.05
06-04-05	5	EDTA	7.84	16.5	0	0-0.05
06-04-05	6	EDTA	7.79	16.3	0	0-0.05
06-04-05	7	Chlorination	7.79	16.4	0	0-0.05
06-04-05	8	Chlorination	7.82	16.1	0	0-0.05
08-04-05	1	Filtered seawater	7.79	16.8	0	0-0.05
08-04-05	2	Filtered seawater	7.84	16.9	0	0-0.05
08-04-05	3	Antibiotics	7.89	16.6	1-3	0
08-04-05	4	Antibiotics	7.81	16.8	0.5-1	0-0.05
08-04-05	5	EDTA	7.76	16.7	0	0-0.05
08-04-05	6	EDTA	7.94	16.5	0	0-0.05
08-04-05	7	Chlorination	7.77	16.5	0	0-0.05
08-04-05	8	Chlorination	7.85	16.4	0	0-0.05
11-04-05	1	Filtered seawater	7.84	16.9	0	0-0.05
11-04-05	2	Filtered seawater	7.94	17.1	0	0-0.05
11-04-05	3	Antibiotics	8.03	17.3	1-3	0
11-04-05	4	Antibiotics	8.14	17.1	0.5-1	0-0.05
11-04-05	5	EDTA	7.97	17.1	0	0-0.05
11-04-05	6	EDTA	8.12	17.3	0	0-0.05
11-04-05	7	Chlorination	7.89	16.8	0	0-0.05
11-04-05	8	Chlorination	7.85	16.9	0	0-0.05
13-04-05	1	Filtered seawater	7.89	16.8	0	0-0.05
13-04-05	2	Filtered seawater	7.96	16.6	0	0-0.05
13-04-05	3	Antibiotics	8.12	17.1	0.5-1	0-0.05
13-04-05	4	Antibiotics	8.01	17.3	1-3	0
13-04-05	5	EDTA	7.75	17.2	0	0
13-04-05	6	EDTA	7.89	17.3	0	0-0.05
13-04-05	7	Chlorination	8.21	16.9	0	0-0.05
13-04-05	8	Chlorination	7.98	16.3	0	0-0.05
15-04-05	1	Filtered seawater	7.89	16.9	0	0-0.05
15-04-05	2	Filtered seawater	8.01	17.3	0	0-0.05
15-04-05	3	Antibiotics	7.94	17.4	1-3	0-0.05
15-04-05	4	Antibiotics	8.12	17.2	0.5-1	0-0.05
15-04-05	5	EDTA	8.12	17.6	0	0-0.05
15-04-05	6	EDTA	8.04	17.4	0	0-0.05
15-04-05	7	Chlorination	7.88	17.4	0	0-0.05
15-04-05	8	Chlorination	7.94	17.3	0	0-0.05
17-04-05	1	Filtered seawater	7.98	17.1	0	0-0.05
17-04-05	2	Filtered seawater	7.84	17.1	0	0-0.05
17-04-05	3	Antibiotics	8.05	17.4	0.5-1	0-0.05
17-04-05	4	Antibiotics	7.78	17.2	0.5-1	0-0.05
17-04-05	5	EDTA	7.95	17.3	0	0-0.05
17-04-05	6	EDTA	8.01	17.3	0	0-0.05
17-04-05	7	Chlorination	8.1	16.9	0	0-0.05
17-04-05	8	Chlorination	7.86	17	0	0-0.05

Batch 260405

Date	Bottle	Treatment	pH	T	NH4+	NO2-
29-04-05	1	Os high tide 1	8.03	20.9	0	0-0.05
29-04-05	2	Os high tide 2	7.89	21.1	0	0-0.05
29-04-05	3	Pipe line 1	7.85	20.8	0	0-0.05
29-04-05	4	Pipe line 2	8.12	20.9	0	0.05-0.1
29-04-05	5	Atlantic 1	7.96	21.4	0	0-0.05
29-04-05	6	Atlantic 2	7.98	21.4	0	0-0.05
02-05-05	1	Os high tide 1	7.85	21.2	0	0-0.05
02-05-05	2	Os high tide 2	8.05	21.1	0	0-0.05
02-05-05	3	Pipe line 1	8.11	21.5	0	0.05-0.1
02-05-05	4	Pipe line 2	7.94	21.5	0	0-0.05
02-05-05	5	Atlantic 1	7.99	21.4	0	0-0.05
02-05-05	6	Atlantic 2	8.06	21.3	0	0-0.05
04-05-05	1	Os high tide 1	8.02	20.6	0	0-0.05
04-05-05	2	Os high tide 2	7.89	20.8	0	0-0.05
04-05-05	3	Pipe line 1	8.2	20.9	0	0.05-0.1
04-05-05	4	Pipe line 2	8.15	21	0	0-0.05
04-05-05	5	Atlantic 1	7.94	20.4	0	0-0.05
04-05-05	6	Atlantic 2	7.98	20.8	0	0-0.05
09-05-05	1	Os high tide 1	8.01	19.9	0	0-0.05
09-05-05	2	Os high tide 2	7.95	19.9	0	0-0.05
09-05-05	3	Pipe line 1	7.89	20.1	0	0.05-0.1
09-05-05	4	Pipe line 2	8.12	20.3	0	0-0.05
09-05-05	5	Atlantic 1	8.17	20.4	0	0-0.05
09-05-05	6	Atlantic 2	8.15	20.3	0	0
13-05-05	1	Os high tide 1	7.84	18.7	0	0-0.05
13-05-05	2	Os high tide 2	7.95	18.9	0	0-0.05
13-05-05	3	Pipe line 1	7.98	19.9	0	0-0.05
13-05-05	4	Pipe line 2	7.79	20.1	0	0.05-0.1
13-05-05	5	Atlantic 1	8.03	20.3	0	0-0.05
13-05-05	6	Atlantic 2	7.96	20.5	0	0-0.05
17-05-05	1	Os high tide 1	7.78	18.9	0	0.05-0.1
17-05-05	2	Os high tide 2	7.76	18.8	0	0.05-0.1
17-05-05	3	Pipe line 1	7.98	20.1	0	0-0.05
17-05-05	4	Pipe line 2	7.85	20.2	0	0-0.05
17-05-05	5	Atlantic 1	8.06	20.5	0	0-0.05
17-05-05	6	Atlantic 2	7.89	20.3	0	0-0.05