

SHANGO BUSINESSPLAN

Gecontroleerd schelpdier- kweekstelsel, van zaad tot aan consumptiemossel



Systeemontwerp, protocollen, technisch-
economische haalbaarheid

Frans Veenstra¹, Pauline Kamermans¹, Marnix Poelman¹, Pieter Geijzen²,
Annelies Pronker², Frank Peene², Ronald de Vos³, Hans van Geesbergen⁴

Rapport C065/08



- 1 Wageningen IMARES
- 2 Roem van Yerseke
- 3 Koninklijke Prins & Dingemanse
- 4 PO Mossel

Institute for Marine Resources and Ecosystem Studies

Wageningen **IMARES**

Wageningen IMARES Yerseke

Opdrachtgever: LNV/FIOV/ Aqua/ 2005/ 025
Postbus 20401
2500 EK 's-Gravenhage

Publicatiedatum: 25 oktober 2008

- Wageningen **IMARES** levert kennis die nodig is voor het duurzaam beschermen, oogsten en ruimte gebruik van zee- en zilte kustgebieden (Marine Living Resource Management).
- Wageningen **IMARES** is daarin de kennispartner voor overheden, bedrijfsleven en maatschappelijke organisaties voor wie marine living resources van belang zijn.
- Wageningen **IMARES** doet daarvoor strategisch en toegepast ecologisch onderzoek in perspectief van ecologische en economische ontwikkelingen.



© 2007 Wageningen **IMARES**

De financiering van het project is mede mogelijk gemaakt door een subsidieverstrekking in het kader van Innovatie Aquacultuur 2005 (Ministerie LNV) en door de Provincie Zeeland.

Wageningen IMARES is een samenwerkingsverband tussen Wageningen UR en TNO. Wij zijn geregistreerd in het Handelsregister Amsterdam nr. 34135929, BTW nr. NL 811383696B04.



A_4_3_1-V4

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

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

Inhoudsopgave

Samenvatting	4
1. Inleiding.....	6
2. Kennisvraag.....	6
3. Methoden	7
4. Resultaten	7
4.1 Broedstock unit	11
4.1.1 Achtergrond reproductie broedstock	12
4.1.2 Broedstock protocollen	15
4.2 Algenteelt, inrichting en technieken.....	18
4.2.1 Achtergrond algencultures.....	20
4.2.2 Protocollen algencultures	29
4.2.3 Cultuur medium	29
4.2.4 Algenvoorraad cultuur, start cultuur en plastic zak culturen	30
4.2.5 Bepaling van de algendichtheid	34
4.3 Hatchery/nursery.....	35
4.3.1 Achtergronden hatchery/nursery.....	36
4.3.2. Protocollen.....	39
4.4 Nursery, inrichting en technieken.....	41
4.4.1 Protocollen nursery.....	42
4.5 Growout, upweller en percelen.....	43
4.5.1 Achtergronden growout.....	45
4.5.2 Protocollen growout upweller/percelen.....	67
4.6 Technisch/economische beschouwing.....	67
5. Conclusies.....	70
Kwaliteitsborging	71
Referenties	72
Verantwoording	73

Samenvatting

In het kader van de subsidie vaststelling voor innovatieprojecten in de aquacultuur 2005 is het SHANGO project goedgekeurd door LNV. SHANGO is het acronym voor Schelpdier Hatchery Nursery Growout, de ontwikkeling van professionele schelpdierkweeksystemen in Nederland. Dit project is gericht op het ontwikkelen van een commercieel schelpdier hatchery (broedhuis)/nursery (kinderkamer)/ growoutsysteem (doorkweek) in hangcultures of op binnendijkse of buitendijkse percelen). Het project focust op het verder ontwikkelen van de benodigde technieken en het opschalen naar een niveau dat kwantitatief toereikend is voor een deel van de jaarlijkse behoefte aan schelpdierbroed.

De project deelnemers zijn:

- Producentenorganisatie van de Nederlandse Mosselcultuur (PO Mossel); hoofdaannemer
- Roem van Yerseke (RvY); hatchery/nursery systemen
- Koninklijke Prins en Dingemanse (PD); growout
- Wageningen IMARES (Imares); wetenschappelijke ondersteuning, coördinatie, management

Het natuurlijke aanbod van uitgangsmateriaal voor schelpdierteelt(zaad) vertoont jaarlijks sterke fluctuaties. Er is daarom behoefte aan nieuwe technieken ten behoeve van de zaadvoorziening. Een nieuwe techniek is productie van zaad op land in een hatchery/nursery Het project is gericht op de mossel (*Mytilus Edulis*) en het ontwikkelen en uittesten van een prototype hatchery/nursery met growout systemen.

In de project periode 2006-2008 is het gelukt om de ambitie te realiseren voor een hatchery productie van minstens 500 miljoen mosselbroed. Als groeivermelders zijn succesvolle proeven met voedingssupplementen voor de hatchery/ nursery ontwikkeld. Echter, het is (nog) niet gelukt voldoende hatcheryzaad levensvatbaar te krijgen op de percelen. Op microschaal is door middel van het nemen van beschermende maatregelen op de percelen wel aangetoond dat de growout met een factor twee is te verbeteren. Opschaling van dergelijke maatregelen tegen predatie, migratie en wegspoelen is praktisch (nog) niet haalbaar. De nursery resultaten zijn gehaald en kunnen indien gewenst verder opgeschaald worden, maar de zwakste schakel in de keten zijn de growout experimenten gebleken. Deze zijn sterk achtergebleven en hebben nog niet tot de oplossingen geleid waarmee een rendabele doorkweek van schelpdierhatcheryzaad gerealiseerd kan worden.

Een belangrijke afweging is om tot een goede overleving van het zaad op de percelen te kunnen komen, door het zo lang mogelijk in de nursery (kinderkamer) te houden. Hiervoor zijn echter zeer grote hoeveelheden algen nodig. Maar dit soort kweeksystemen zijn commercieel nog niet op de markt. Wel is aangetoond dat met het commercieel verkrijgbaar algenkweekstelsel (SeaCaps) goed te voorzien is in de algenbehoefte van de hatchery. Voor de nursery zal het SeaCap nog opgeschaald moeten worden. Een alternatief is de aanlevering van algen door een specifiek toeleveringsbedrijf. Gaande het project zijn er in Nederland een paar algenkweekbedrijven gestart, maar ze zijn nog niet volop in bedrijf voor de teelt van algen voor schelpdieren.

Naast het opgeschaalde SeaCaps systeem is op labniveau de algenkweek productiviteit van de vlakke plaat bioreactor eveneens getest. De productie bleef nog ver achter. Bij een verdere technische optimalisatie kan er momenteel een theoretische productiviteit worden bereikt die vergelijkbaar is met het SeaCaps systeem. Maar dan zal het systeem op vele technische punten een verbeteringsslag moeten ondergaan. Ook is nog niet bekend welk bedrijf dit concept in productie gaat nemen.

Ter ondersteuning van de hatchery/nursery en growout experimenten zijn door IMARES diverse proeven en labexperimenten uitgevoerd, zoals:

- het effect van de oorsprong van de broedstock op de groei van de larven en het broed;
- het effect van temperatuur op de conditionering van de broedstock;
- de teelt van algen op grondwater;
- verschillende tests met vlakke plaat reactor;
- het effect van waterkwaliteit op de groei en overleving van larven;
- drie growout proeven op percelen en een in een opwelling systeem.

Om het groeiproces te verbeteren zijn in samenwerking met INVE succesvolle voederproeven uitgevoerd.

De technische beschrijving beperkt zich tot op systeemniveau, inclusief het programma van eisen voor de benodigde componenten. Tevens worden de operationele aspecten in protocollen weergegeven. Tenslotte wordt aan het eind een technisch-economische beschouwing gegeven. De kostprijs voor hatcheryzaad is nog vele malen te hoog t.o.v. bodemzaad en mosselzaadinvang.

1. Inleiding

In het kader van de subsidievestiging voor innovatieprojecten in de aquacultuur 2005 is op 22 maart 2006 het SHANGO project goedgekeurd door LNV. SHANGO is het acronym voor Schelpdier Hatchery Nursery Growout, de ontwikkeling van professionele schelpdierkweeksystemen in Nederland. Dit project is gericht op het ontwikkelen van een commercieel schelpdier hatchery (broedhuis)/nursery (kinderkamer)/growoutsysteem (doorkweek) in hangcultures of op binnendijkse of buitendijkse percelen). Het project focust op het verder ontwikkelen van de benodigde technieken en het opschalen naar een niveau dat kwantitatief toereikend is voor een deel van de jaarlijkse behoefte aan schelpdierbroed.

De project deelnemers zijn:

- Producentenorganisatie van de Nederlandse Mosselcultuur (PO Mossel)
- Roem van Yerseke (RvY)
- Koninklijke Prins en Dingemanse (PD)
- Wageningen IMARES (Imares)

Op 27 april 2007 is door LNV per brief het budget met 20% verhoogd met extra focus op de growout activiteiten. Omdat gaande de looptijd 2006-2008 bleek dat de growout experimenten achterbleven op de hatchery/nursery voortgang is eind 2007 een verzoek ingediend de einddatum van 31 mei 2008 met 5 maanden te verlengen om het kweekseizoen 2008 (april – nov.) nog een keer ten volle te benutten. Dit is door LNV niet goedgekeurd, maar de partners hebben besloten om in eigen beheer tot 1 september 2008 nog een gericht growout experiment te houden.

2. Kennisvraag

Het natuurlijke aanbod van uitgangsmateriaal voor schelpdierteelt(zaad) vertoont jaarlijks sterke fluctuaties. Er is daarom behoefte aan nieuwe technieken ten behoeve van de zaadvoorziening. Een nieuwe techniek is productie van zaad op land in een hatchery/nursery. Een hatchery voor mosselen (*Mytilus edulis*) kan voor additioneel aanbod van zaad zorgen in de 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. Het SHANGO project is gericht op het ontwikkelen van een professioneel schelpdier hatchery/nursery/growout systeem in Nederland, waarmee een rendabele productie van schelpdierbroed mogelijk is. Het project is gericht op het verder ontwikkelen van de benodigde technieken en het opschalen naar een niveau dat kwantitatief toereikend is voor een deel van de jaarlijkse behoefte aan schelpdierbroed.

De overall kennisvragen in het SHANGO project betreffen:

- onderhoud, conditionering en selectie van de ouderdieren (broedstock),
- het ontwikkelen en opschalen van een continue cultuur voor algenkweek,
- het opschalen van bestaande batch cultures
- het ontwikkelen en opschalen van hatchery en nursery systemen
- het verbeteren van de overleving van het broed in het buitenwater (overleving van het zaad).

Bijkomende specifieke kennisvragen betreffen de effecten van:

- de oorsprong broedstock op de groei van de larven worden
- temperatuur op de broedstock
- waterkwaliteit op algencultures
- testen van INVE dieten
- bepaling stukstal

Ten behoeve van de kennisoverdracht zijn de bevindingen in dit Businessplan vastgelegd, waar met name aandacht is voor het systeemontwerp en de protocollen voor de gehanteerde werkwijzen

3. Methoden

Alvorens het project van start is gegaan, is het plan van aanpak opgesteld. Hierin staat beschreven welke inbreng, rol en verantwoording de verschillende partners hebben bij het ontwikkelen en uittesten van het prototype hatchery/nursery/growout. De PO Mossel was de hoofdaannemer met Wageningen Imares als penvoerder (coördinatie, management). De focus van de Roem van Yerseke lag voornamelijk op het landgedeelte, de hatchery /nursery en die van Prins&Dingemanse op het growout gedeelte. Verder was Imares verantwoordelijk voor de wetenschappelijke ondersteuning, niet alleen ten aanzien van het literatuuronderzoek maar er werden gedurende het project ook diverse proeven en experimenten uitgevoerd in de eigen laboratorium faciliteiten. Enerzijds om meer kennis op te doen en anderzijds om achtergronden voor de verdere ontwikkeling te kunnen onderbouwen.

Aangezien er in de wereld nog geen commerciële hatcheries voor de mossel (*Mytilus edulis*) bestaan, hebben de Roem van Yerseke en Imares bij de opschaling gebruik gemaakt van de kleinschalige hatchery/nursery ervaringen van 2004-2005. Omdat er nog geen growout ervaringen waren, is bij de start van het project een plan van aanpak vastgesteld.

Om de verschillende werkzaamheden efficiënt op elkaar af te stemmen is er regelmatig met alle partners voortgangsoverleg gehouden en zijn de actiepunten vastgelegd. Daarnaast heeft er frequent afstemming plaatsgevonden over de proeven en experimenten bij de bedrijven en Imares.

Contractueel is de voortgang jaarlijks aan de opdrachtgever gerapporteerd. Tijdens het voortgangsoverleg is in het eerste jaar reeds de format voor het uiteindelijke Businessplan vastgesteld en waar nodig bijgesteld. Het betreft hier een gemeenschappelijke vrantwoording(en contractuele verplichting) om de opgedane kennis en ervaringen vast te leggen en indien gewenst aan de sector over te dragen. Hierbij is gekozen voor een Businessplan aanpak.

In dit business plan wordt verslag gedaan van het ontwikkelen en uittesten van een prototype hatchery/nursery/growout systeem en worden de volgende aspecten beschreven:

- het technisch ontwerp en de layout
- de werkwijze, vastgelegd in protocollen
- de technische, economische haalbaarheid

De technische beschrijving beperkt zich tot op het systeemniveau, inclusief het programma van eisen voor de benodigde componenten. Tevens worden de operationele aspecten in protocollen weergegeven. Tenslotte wordt aan het eind een technisch-economische beschouwing gegeven, inclusief de benodigde arbeid in elke fase van de productie.

Een belangrijke schakel in de gecontroleerde keten is de overleving en de groei van het mosselbroed op de bodem na de fase van de nursery, het growoutsysteem. Op de bodem wordt de aandacht gericht op factoren die de overleving kunnen vergroten.

4. Resultaten

In de test- en ontwikkelperiode 2006-2008 heeft het uiteindelijke systeem 500 miljoen mosselbroed opgeleverd en is jaarrond kweek van 80 miljoen broedjes per maand haalbaar.

In het businessplan staat een beschrijving van de prototype hatchery/nursery/growout op een relevante praktijkschaal. Alvorens op de verschillende deelaspecten in te gaan wordt de hatchery/nursery layout bij de Roem van Yerseke beschreven. Evenals bij de kleinschalige proeven van 2004-2005 werd dezelfde ruimte benut, een voormalig schelpdierverwerkingsruimte.

**LAYOUT VOOR PILOT HATCHERY/NURSERY GROWOUT a 50 Mbroedjes(60.000 kg)
200 m² interne ruimte/ ca 200 m² externe ruimte**

BROEDUNIT/opslag ouderdieren 25 m ²	ALGENRUIMTE 50 m ²		Broedstock conditionering 10 m ²	GROWOUT/UPWELLER 200 m ²
	KANTOOR 25 m ²	HATCHERY 50 m ²	NURSERY 50 M ²	
			ALGEN STOCK 10 m ²	



Kweekproces:

Liters/dg	OUDERDIEREN (Oosterschelde)	Temperatuur
50 l/100 ouderdieren	BROEDSTOCK (14- 40 dg)	8 - 19° C
15 l/M larven	LARVEN (14 -20 dg) (0.007-0.025 mm)	19° C
1200 L/M zaadjes	ZAAD (20 dg.) (0.03 - 3.0 mm)	19° C
	NURSERY (70 dg) (3 – 10 mm)	Omgevingstemperatuur
	TOTAAL ca 150 dg, incl. conditionering broedstock	
	PERCELEN (6mnd)	

Overall beschrijving benodigde ruimten en belangrijkste systeemcomponenten:

Voor de productie van 500 M mosselbroedjes zijn verschillende ruimten nodig, van conditionering ouderdieren t/m de growout, op het land dan wel op de percelen. In de **hatchery** (broedhuis) worden ouderdieren (broedstock) aangezet tot het 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 de **growout** (doorkweek in hangcultuur of op binnendijkse of buitendijkse percelen). In de beschikbare **broedstock unit** (50 m²) worden de ouderdieren (visserij) geconditioneerd opgeslagen en wanneer gewenst aangezet tot voortplanting middels een temperatuurschok. In deze ruimte staan opslag verwaterbakken, die in een stelling boven elkaar geplaatst zijn en waar het zeewater van boven naar beneden kan doorstromen. Voor de reproductie is een conditioneringstank opgesteld. In de ruimte moet voldoende aan- en afvoer van zeewater zijn, zowel ongefilterd als UV gefilterd. De belangrijkste aspecten voor deze broedstock c.q. conditioneringsunit zijn de temperatuurregeling van zowel de ruimte (5-16°C) als het zeewater (8- 19°C).

Tussen de broedstock unit en de hatchery/nursery bevindt zich de **algenproductie ruimte** (50 m²). Deze ruimte moet een klimaatkamer zijn met een temperatuurbereik van ca 18 – 24°C. De algen worden in 100 liter plastic zakken opgekweekt. Deze zijn in stellingen opgehangen met daarboven TL buizen (20000 lux). Voor de algenkweek is voldoende gefilterde beluchting en gefilterd zeewater noodzakelijk alsmede de juiste afvoerstromen. Voor het bewaren van de kweek stock cultures staat een klimaatkast opgesteld met een temperatuurregeling van 20 – 25°C. Voor het bewaren van medium (?) en vitaminen zijn respectievelijk een 100 liter en 200 liter koelkast c.q. vriezer nodig.

Bij de RvY is gekozen voor een gecombineerde **hatchery- en nursery ruimte** (2 x 50 m²), omdat deze klimaatruimte op deze manier beschikbaar was (voorheen een schelpdierverwerkingsruimte). Bij het opzetten van een nieuwe hatchery/nursery is ter preventie van ziektes het beter om deze ruimten gescheiden te houden. De belangrijkste systeemaspecten van deze ruimte zijn de klimaatregeling (18-24°C), voldoende zeewater aanvoer en afvoer (gefilterd) en een achttal zeven en zes tubs (200 liter) met een netophanging voor de opkweek.

Hoe eerder het zaad naar de buitenpercelen kan, des te lager de hatchery-nursery kosten zijn. Een tussenoplossing op het land zijn de zgn. UPWELLERS 's, een opwaarts doorstroomsysteem dat in de volgende paragraaf verder beschreven zal worden; op het buitenterrein van RvY is hiervoor ca 400 m² gereserveerd met toe- en afvoer van het gebruikte hatchery-nursery zeewater met reststoffen (algen; ca 6000 l voor 1 M broedjes).

4.1 Broedstock unit

Systemcomponenten/capaciteiten:

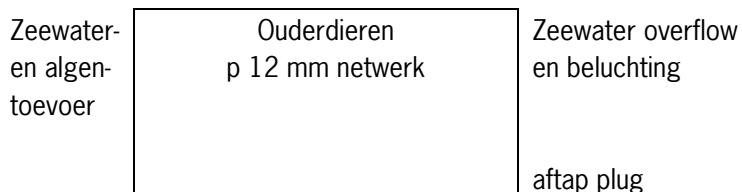
Overall	Ruimtebeslag voor 500 M broedjes	Systeemcomponenten	Capaciteit
	M ²		
Broedstock	50	Conditioneringstanks Tanks voor algen Koelsysteem Slangenpomp Zeewater Gefiltreerd zeewater	5 m ³ 2 m ³ 1- 16°C 3 l/mossel/dag 50 m ³ 5 – 18°C

Principe koudeopslag ouderdieren:

Ouderdieren in zes tubs boven elkaar

- afmetingen tubs 80 x 60 x 30 cm
- volume 150 liter
- aantal ouderdieren >100
- zeewater toevoer 1.5 liter/min
- temperatuur 8 ° C

Principeschets broedstock tanks:



- afmetingen tanks diameter boven 80 cm/diameter onder 40 cm
- volume 100 liter
- aantal ouderdieren >100
- zeewater toevoer 1.5 liter/min
- temperatuur 8 ° C
- toevoer algen 34 l/dg

Bijlage: Lijst Hulpmiddelen/benodigdheden

4.1.1 Achtergrond reproductie broedstock

Achtergrond: effect van oorsprong broedstock op groei larven en broed

Om het effect van de oorsprong van de broedstock te testen zijn mosselen uit de Grevelingen en uit de Oosterschelde verzameld en in de experimentele hatchery van IMARES aangezet tot paaien.

Experimentele set-up

Larven zijn geweekt in 50 liter conische tanks met beluchting. Twee tanks bevatten larven van Oosterschelde broedstock en twee tanks larven van Grevelingen broedstock. De tanks werden gevoerd met 25.000 cellen per ml *Isochrysis galbana* en *Chaetoceros calcitrans* (50:50). Het water was 17°C en werd gefiltreerd over 0.2 µm en met UV behandeld om bacteriën te verwijderen. Een maal per week werd de lengte van de larven bepaald. Wanneer 50% van de larven een oogvlek hadden werden de larven overgeplaatst naar een down-welling systeem. Hier vond vestiging plaats. Het broed werd de eerste maand werd een mix van *I.galbana*, *P.lutheri*, *C.gracilis* and *C.calcitrans* gevoerd, daarna een mix van *Dunaliella tertiolecta* and *Phaeodactylum tricornutum*. Het aantal algencellen was in de eerste maand 56 miljoen cellen per dag en daarna 42 miljoen cellen per dag. Iedere 2-3 weken werd een monster genomen voor lengtebepaling. Na zeven weken is het broed opgesplitst in groter en kleiner dan 500 µm. Vanaf dat tijdstip is alleen het broed groter dan 500 µm gevolgd.

Resultaten en discussie

Aan het einde van de larvale fase (na 29 dagen) waren de larven van broedstock uit de Grevelingen significant groter dan larven van broedstock uit de Oosterschelde (Fig. 1; t-test, $P < 0.05$). Het verschil in lengte tussen mosselen van de twee broedstocks bleef bestaan in de broed fase (Fig. 2). Dit geeft aan de kwaliteit van de eieren de groei van de larven en het broed kan beïnvloeden.

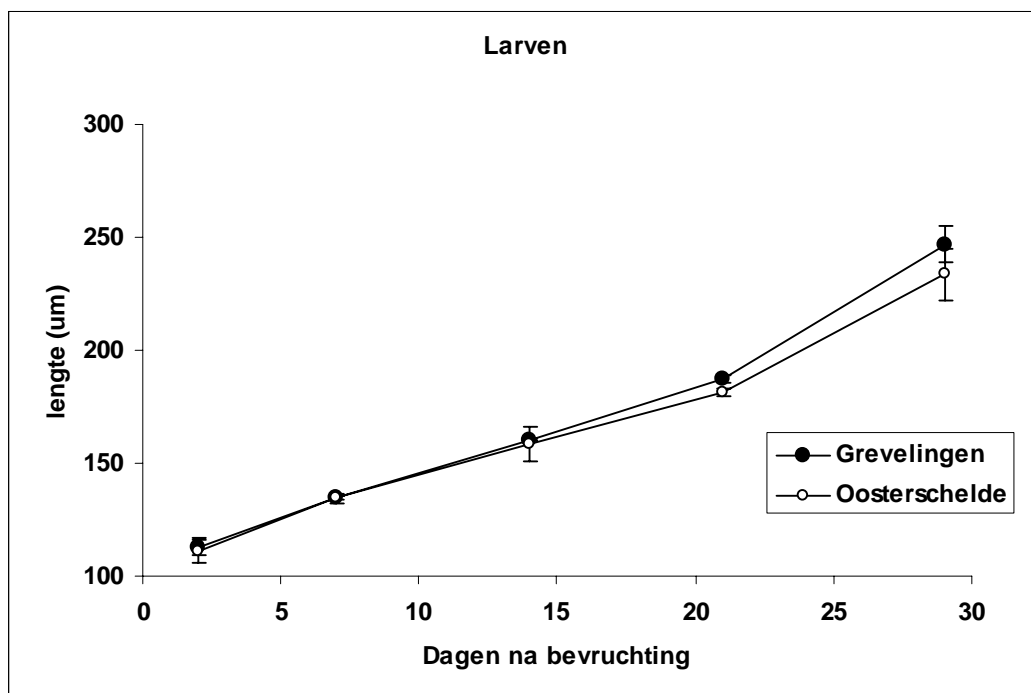


Fig. 1. Lengte van larven in broedstock oorsprong experiment ($n=2$ met sd).

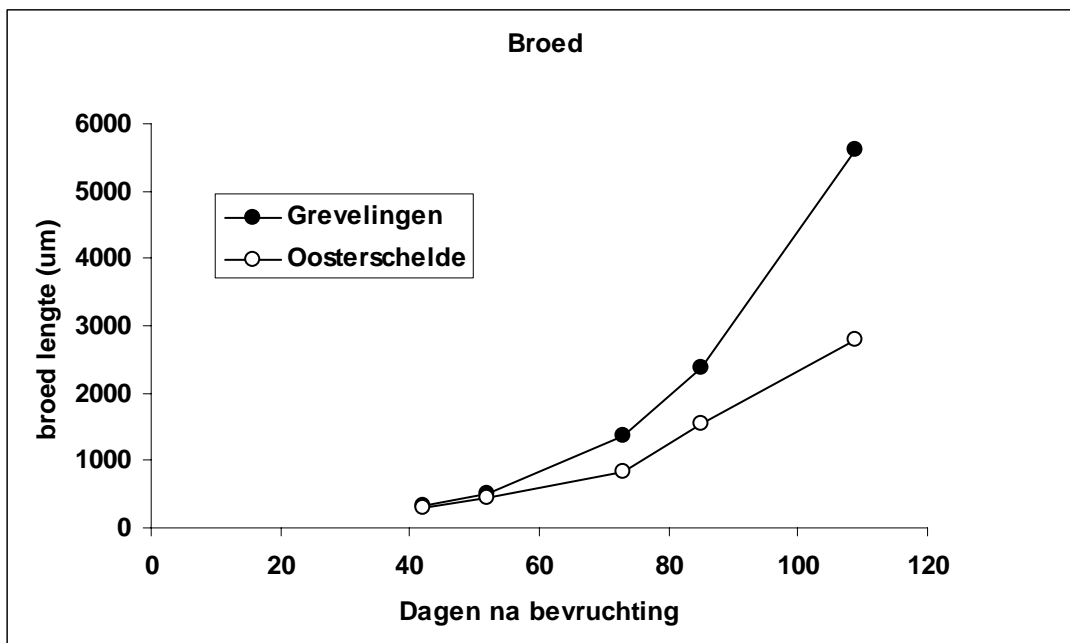


Fig. 2. Lengte van broed in broedstock oorsprong experiment ($n=1$).

Achtergrond effect van temperatuur op conditionering broedstock

Een experiment is uitgevoerd om het effect van conditionering bij een constante temperatuur van 6°C of 18°C te testen.

Experimentele set-up

Mosselen uit de Waddenzee zijn in doorstroomcontainers geplaatst (stroomsnelheid van 3 liter per mossel per dag) en een diet gevoerd bestaande uit een mix van de volgende soorten *Chaetoceros gracilis*, *C. calcitrans* and *C. muelleri*, *T-iso*, *Pavlova lutherii* en *Tetraselmis chui* bij 3-6% van het drooggewicht van de mosselen. De containers waren blootgesteld aan een lichtregime (licht : donker) dat startte met 9 u L :15 u D en geleidelijk afnam tot 7 u L :17 u D op dag 21 en daarna nam de daglengte weer toe tot 18 u L : 6 u D op dag 45. De containers werden bij 6 °C of bij 18 °C geplaatst. Iedere behandeling had vijf containers met 70 mosselen.

Voorafgaand aan het experiment werden de mosselen tot paaien aangezet. Dit hield in dat ze één nacht droog stonden bij 6°C. De volgende dag werden ze 30 minuten ondergedompeld in een continue stroom koud water (6°C) en daarna 30 minuten in stromend warm water (18°C). Deze afwisselende koud en warm water schokken werden 6 uur volgehouden. De behandeling leverde geen paaiing, dus alle mosselen konden worden gebruikt in het experiment.

Begin en eind werden voor gonaden ontwikkeling (Seed and Brown, 1977), glycogeen gehalte (enzymatische methode) en conditie index (Hawkins, et al., 1987) zijn bepaald. Na zes weken zijn de mosselen aangezet tot paaien zoals hierboven beschreven. Dit keer werd een extra stap toegevoegd. Het water werd 30 minuten van 18°C tot 28°C verwarmd. Deze extra stap werd tweemaal herhaald. De hele paaiing duurde 7 uur. Het aantal paaiende dieren werd genoteerd. De geproduceerde eieren werden bevrucht en de D-larven geoogst na 48 uur. Goed ontwikkelde en slecht ontwikkelde D-larvae werden apart geteld.

Resultaten en discussie

Na zes weken conditioneren waren de gonaden ontwikkeld van het rust stadium en het eerste ontwikkelingsstadium naar het late ontwikkelingsstadium en rijpe stadium. In de 6°C behandeling werden meer individuen in het rijpe stadium aangetroffen dan in de 18°C behandeling, maar dit verschil was niet significant (ANOVA, $P > 0.05$). De temperatuur behandeling had geen significant effect op het aantal paaiende dieren (ANOVA $P > 0.05$; Fig. 3a). Het percentage paaiende mosselen was laag en de variatie binnen de behandelingen was hoog. De ontwikkeling tot D-larven was goed in beide behandelingen en verschilde niet significant (ANOVA $P > 0.05$; Fig. 3b). Het glycogeen gehalte en de conditie index van de mosselen vertoonde geen significant verschil van de begin waarde (ANOVA, $P > 0.05$; Fig. 4). In verband met problemen met het in stand houden van algencultures was het niet altijd mogelijk om het voedselaanbod 3-6% van het drooggewicht van de mosselen te houden. Dit kan het lage percentage paaiende dieren en het gebrek aan verschil in glycogeen gehalte en de conditie index verklaren.

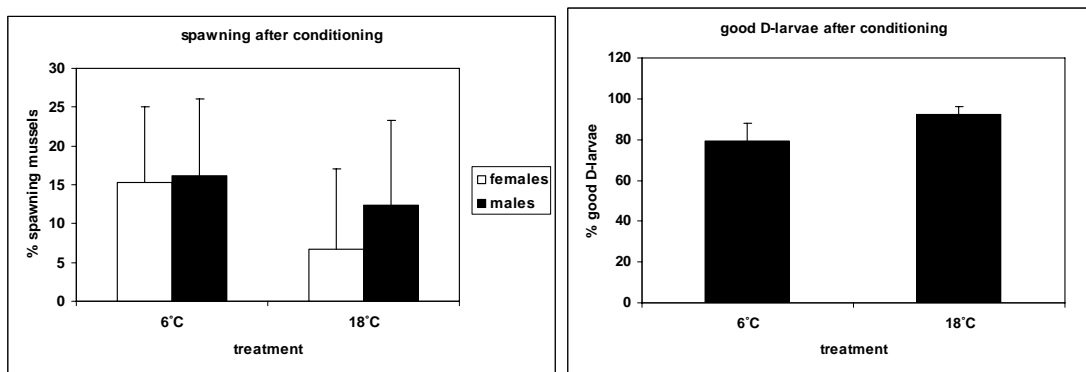


Fig. 3. Percentage (a) paaiende mosselen en (b) goede D-larven na zes weken conditioneren bij een constante temperatuur van 6°C of 18°C. Het gemiddelde van vijf replica's met standaarddeviatie is weergegeven.

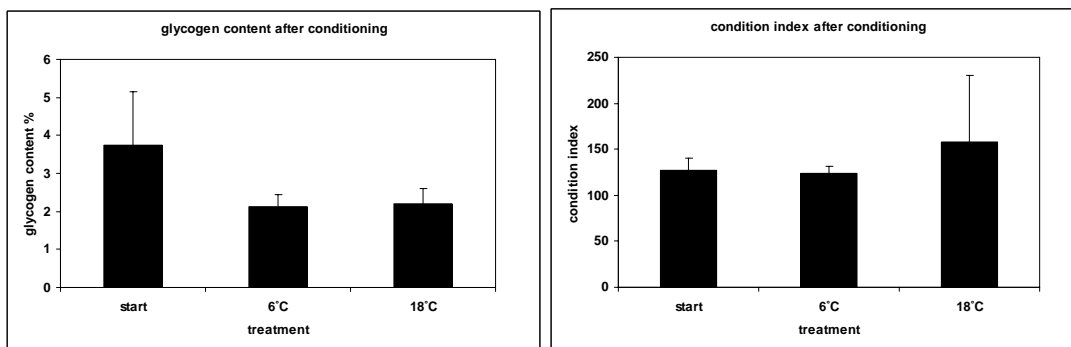


Fig. 4. Glycogeen gehalte (a) en conditie index (b) van mosselen aan het begin en na zes weken conditioneren bij een constante temperatuur van 6°C of 18°C. Het gemiddelde van vijf replica's met standaarddeviatie is weergegeven, behalve voor de conditie index bij 6°C en 18°C, daar is $n=3$.

4.1.2. Broedstock protocollen

Houden

Na de verwijdering uit het veld en voor de conditioningsperiode 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 (Fig. 5). 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 5. Broodstock bewaar ruimte.

Conditioneren

De broodstock conditionering vindt plaats in een doorstroom systeem (Fig. 6).



Figuur 6. Doorstroomsysteem

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. De mosselen krijgen 50 µm gefiltreerd zeewater met een doorstromingsnelheid van 3 liter per mossel per dag.
3. De mosselen kunnen zowel in het licht als in het donker worden gehouden. Belangrijk is dat ze op een rustige plaats staan.
4. 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.
5. 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 drooggewicht van de algen.

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

Tabel 1. Droog gewicht van algen.

Drooggewicht (mg) van algen per 10⁶ cellen	
Algen soort	Gewicht
T-Iso	0.02
<i>Isochrysis galbana</i>	0.03
<i>Pavlova lutheri</i>	0.02
<i>Chaetoceros gracilis</i>	0.07
<i>Chaetoceros calcitrans</i>	0.01
<i>Chaetoceros muelleri</i>	0.05
<i>Skeletonema costatum</i>	0.05
<i>Phaeodactylum tricornutum</i>	0.08
<i>Dunaliella tertiolecta</i>	0.24

Formule voor het berekenen van het aantal cellen van een bepaalde algensoort of mix van algen soorten nodig om de broedstock te voeden:

Droog gewicht van algen nodig (g) * (10⁶ cellen/gewicht van 10⁶ cellen g) = aantal cellen van bepaalde algensoort

Een mix van algensoorten geeft de beste resultaten. Iedere soort levert dan een deel van de totale 6% en wordt apart uitgerekend.

5. Het volume, dat dagelijks nodig is voor het conditioneren van de broedstock wordt geschonken in de algentank. Het voedselrantsoen wordt automatisch gedoseerd in de conditionering tank met een slangenpomp.

6. Eén keer per week worden de tanks geleegd en schoongemaakt met peroxide en zoetwater. Het is nodig om elke dag de tanks zorgvuldig te observeren en dode mosselen te verwijderen. Een dagelijkse controle van de temperatuur wordt ook uitgevoerd. Drie keer per week wordt het O₂, N-NH₄, N-NO₂ gehalte van het water gemeten. Grenswaarden zijn: O₂ 40% verzadiging, N-NH₄ 5 mg l-1, N-NO₂ 0,5 mg l-1 (Postma et al, 2002).

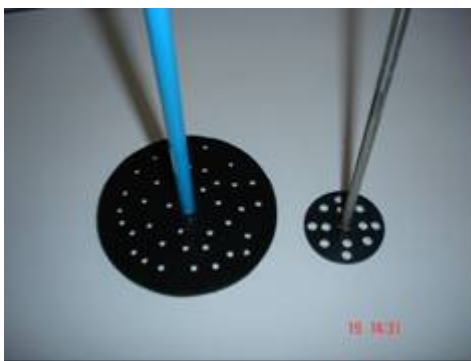
Paaien en bevruchten

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. Paaierende mannetjes worden een tijd in de bakken gelaten omdat sperma een bijkomende stimulus kan geven voor de rest van de broedstock.
- 8) De paaierende 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 paaierende 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 ververs 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 paaierende 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 bekersglas 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

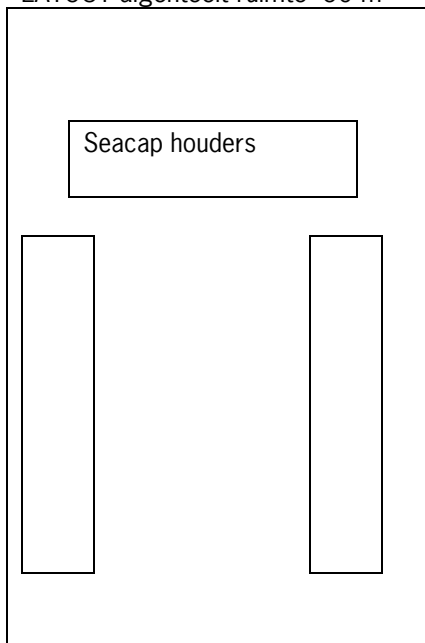
- 1) Voor de bevruchting wordt 2 ml van het mengsel toegevoegd aan elke liter eicelsuspensie.
- 2) Tijdens de bevruchting, die ongeveer 40-60 minuten duurt, wordt de inhoud van de beker voorzichtig gemengd met een plunjer (figuur 7). In deze periode zijn de eerste tekenen van bevruchting te zien door het verschijnen van het polaire lichaam.
- 3) Na het verschijnen van het polaire lichaam, beginnen de bevruchte cellen te delen. Eerst in twee gelijke cellen en hierna in vier ongelijke cellen waarbij een grote cel omringd wordt door drie 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 7. Plunjer met geperforeerde schijf gebruikt voor het mixen van het water tijdens de bevruchting.

4.2 Algenteelt, inrichting en technieken

LAYOUT algenteelt ruimte 50 m²



Systeemcomponenten/capaciteiten

Overall	Ruimtebeslag voor 500 M broedjes M ²	Systemcomponenten	Capaciteit
Algen	25	Klimaatkamer (21°C) Klimaatkast Entkast Stellingen Zakken (systeem Seacaps) Sealmachine TL verlichting Koelkast Vriezer Autoclaaf Lucht (pomp) Luchtfilters Zeewater Gefiltreerd zeewater	40 x 500 ltr 100 ltr. 200 ltr



Algenteelt Roem van Yerseke

4.2.1 Achtergrond algencultures

Achtergrond: teelt van algen op grondwater

Het grondwater van de Roem van Yerseke is gebruikt om de diatomeeën *Skeletonema costatum* en *Chaetoceros muelleri* te kweken. Gebruik van grondwater heeft als voordeel dat er geen nutriënten aan hoeven te worden toegevoegd. Daarnaast is het water vrij van organismen zoals andere soorten algen. Vier experimenten zijn uitgevoerd: (1) Monitoring nutriëntengehalten grondwater, (2) Batch cultuur van *Skeletonema costatum*, (3) Batch cultuur van *Chaetoceros muelleri*, (4) Effect van temperatuur op ontwikkeling *Chaetoceros* cultuur. Dit onderdeel is uitgevoerd door een student van de Universiteit van Faro (Portugal) onder begeleiding van IMARES (Batista, I (2007) Outdoor mass production of marine diatoms with ground water from Roem van Yerseke, The Netherlands Essays on its feasibility. IMARES rapport 06.016).

Experimentele procedures en set-up

(1) Monitoring nutriëntengehalten grondwater

Een week lang is de nutriëntenconcentratie in het grondwater gemonitord om een indruk te krijgen van de fluctuaties. Tussen 18 en 21 september 2006 is twee maal per dag, met hoog en met laag water, grondwater bemonsterd. Het monster werd gefiltreerd over een Whatman CF/C 47mm filter en ingevroren. Concentraties aan ijzer, silicaat, fosfaat, mangaan, totaal stikstof (is som van nitraat, nitriet en ammonia) werden na ontdoeien bepaald met een HACH DR/890 Datalogging Colorimeter. Zoutgehalte werd bepaald met een refractometer.

(2) Batch cultuur van *Skeletonema costatum*

Algen zijn geweekt in drie 0.025 m³ tanks met grondwater en beluchting. De tanks werden geïnoculeerd met *Skeletonema costatum* van de Roem van Yerseke. De eerste vier dagen werd dagelijks een monster voor nutriëntengehalte en cel aantallen genomen en daarna twee maal per dag. Het experiment startte op 22 september 2006 en duurde 7 dagen.

(3) Batch cultuur van *Chaetoceros muelleri*

Algen zijn geweekt in drie 0.055 m³ tanks met grondwater en beluchting. De tanks werden geïnoculeerd met *Chaetoceros muelleri* van de Roem van Yerseke. Er werd dagelijks een monster voor nutriëntengehalte en cel aantallen genomen. Het experiment startte op 2 oktober 2006 en duurde 14 dagen.

(4) Effect van temperatuur op ontwikkeling *Chaetoceros* cultuur

Voor dit experiment is het grondwater eerst voorbehandeld door het ijzer te laten neerslaan met behulp van een oxidatie filter. Algen zijn geweekt in zes 0.020 m³ tanks met grondwater en beluchting. Drie tanks waren afgedekt met plastic om afkoelen te voorkomen. De tanks werden geïnoculeerd met *Chaetoceros muelleri* van de Roem van Yerseke. Er werd dagelijks een monster voor nutriëntengehalte en cel aantallen genomen. Temperatuur werd continu gemonitord met een HOBO temperature logger. Het experiment startte op 21 oktober en duurde 11 dagen.

Resultaten

(1) Monitoring nutriëntengehalten grondwater

De nutriëntengehalten toonden weinig fluctuaties en er werden geen significante verschillen in nutriëntengehalte gevonden tussen hoog of laag water (Fig. 8).

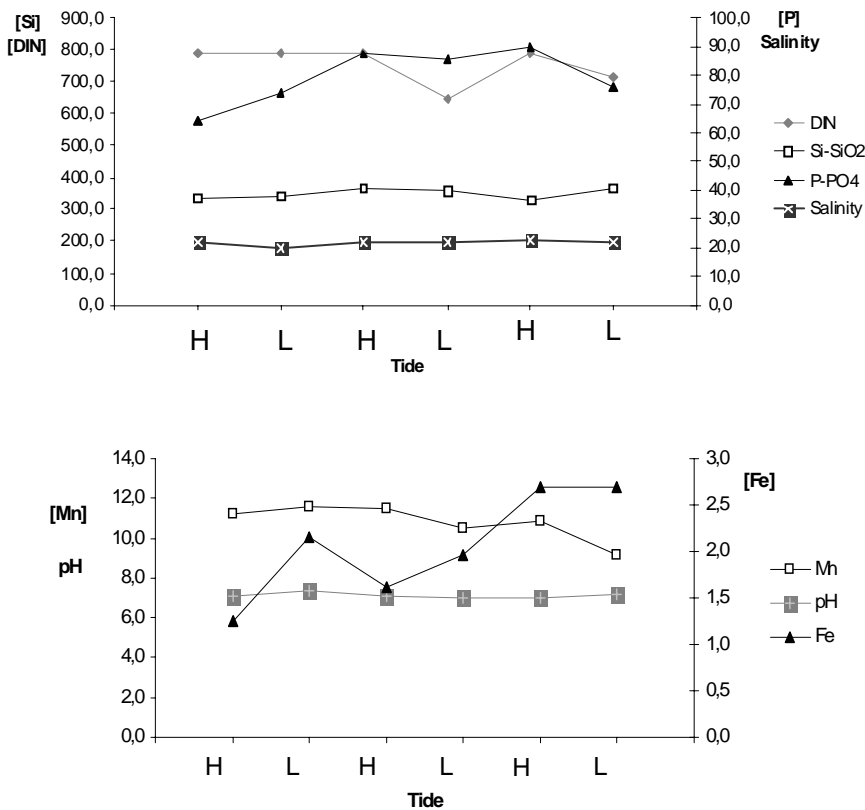


Fig. 8. Silicaat (Si), opgelost anorganisch stikstof (DIN), fosfaat (P), mangaan (Mn) en ijzer (Fe) concentraties (μM) aanwezig in grondwater van Roem van Yerseke bij hoog (H) een laag (L) water. Zoutgehalte en pH zijn ook aangegeven.

(2) Batch cultuur van *Skeletonema costatum*

Skeletonema behaalde een concentratie van 1.4 cellen per ml in een periode van 7 dagen. In die periode is ook het gehalte aan stikstof, silicaat en fosfaat uitgeput (Fig. 9).

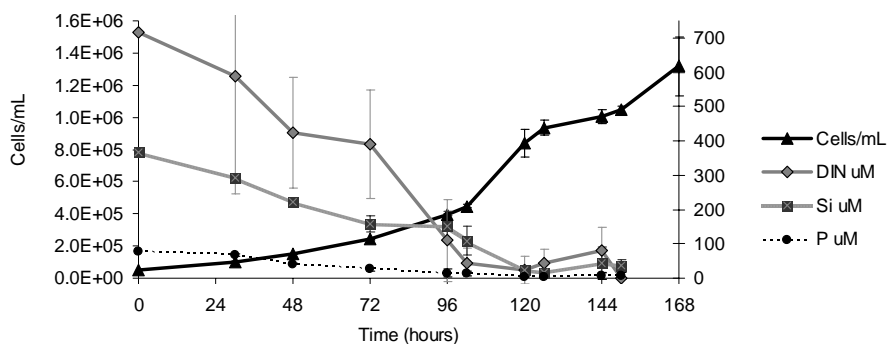


Fig. 9. Opgelost anorganisch stikstof (DIN), silicaat (Si) en fosfaat (P) en celantallen in een batch cultuur van *Skeletonema costatum*.

(3) Batch cultuur van *Chaetoceros muelleri*

Chaetoceros behaalde een concentratie van 500.000 cellen per ml in een periode van 10 dagen. Daarna nam de concentratie af. In die periode is ook de concentratie aan silicaat afgenomen (Fig. 10).

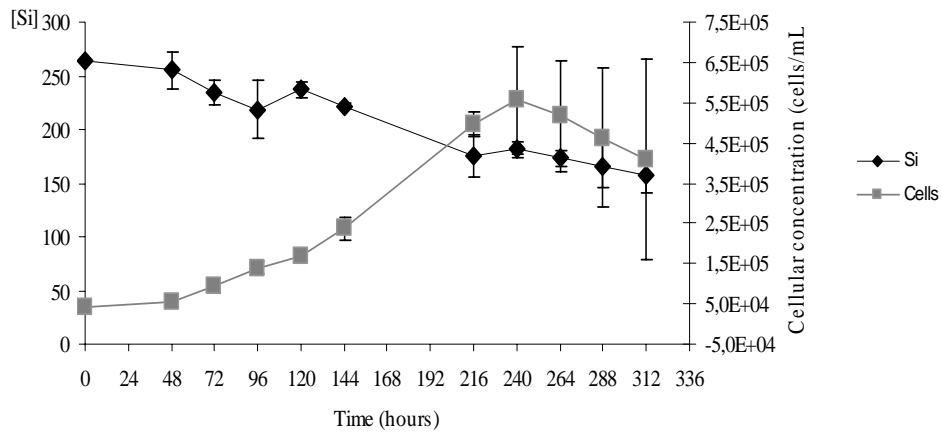


Fig. 10. Silicaat (Si) en celtaantallen in een batch cultuur van *Chaetoceros muelleri*.

(4) Effect van temperatuur op ontwikkeling *Chaetoceros* cultuur

Afdekken van de algencultuur had tot gevolg dat de temperatuur fluctuaties iets minder extreem waren (Fig. 11). De ontwikkeling van de *Chaetoceros* cultuur toonde echter geen significante verschillen tussen beide behandelingen. Er werd een dichtheid van 200.000 cellen per ml in 6 dagen gehaald (Fig.11).

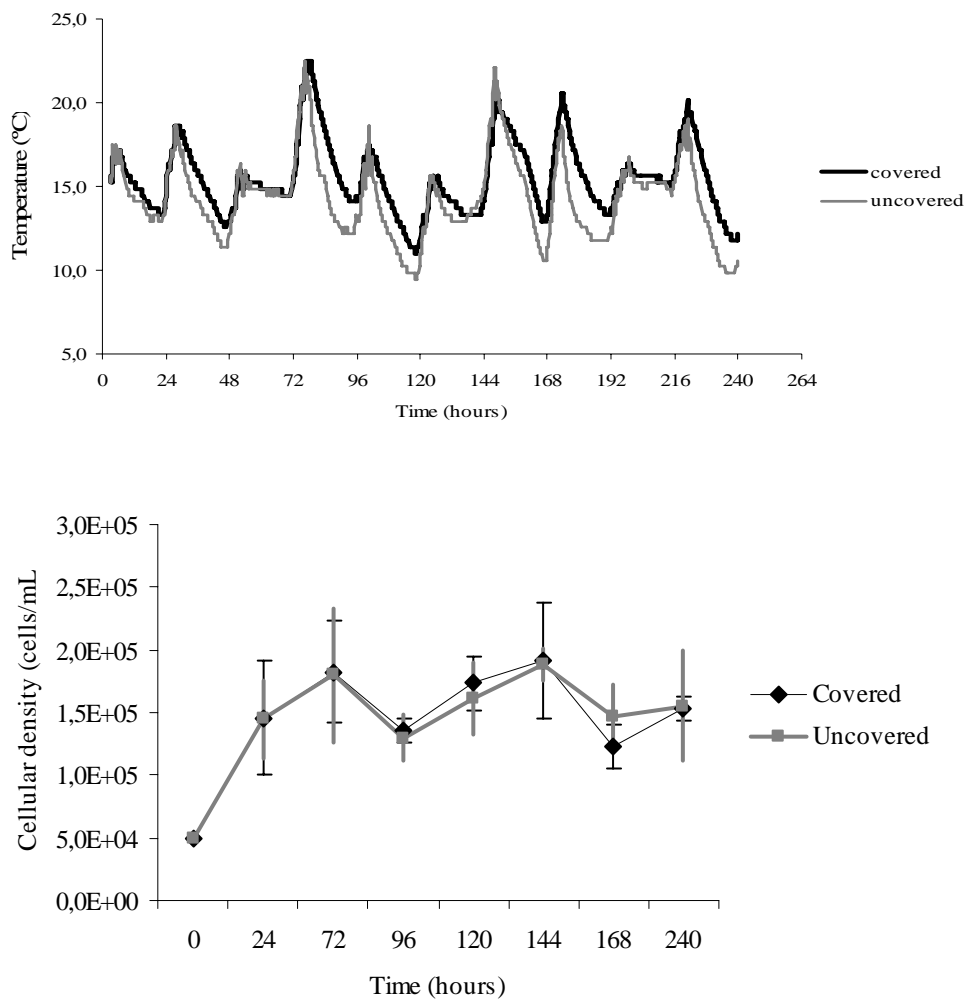


Fig. 11. Temperatuur (a) en celtaantallen (b) van batch cultuur van *Chaetoceros muelleri*.

Conclusies

Beide algensoorten kunnen groeien op basis van grondwater, dus dit kan een goed groeimedium zijn. De behaalde concentraties zijn niet extreem hoog, maar dat kan mogelijk te maken hebben met de lichtomstandigheden in het najaar. Afdekken van de cultuur is niet nodig.

Bioreactoren

In het kader van de ontwikkeling en toepassing van hoogwaardige algenkweek technieken in schelpdier hatchery/nursery systemen zijn een tweetal algenkweeksystemen beproefd. Enerzijds is het commercieel verkrijgbare systeem SeaCaps (www.seacaps.com) in de hatchery van Roem van Yerseke geïnstalleerd en toegepast. Anderzijds is een concept vlakkeplaat bioreactor (ontwerp, Wijffels) geïnstalleerd en getest op zoutwateralgenproductie. Op basis van de beschikbare praktijk informatie is de productiviteit van beide systemen bepaald.

Systeemontwerp

SeaCaps

Het SeaCaps systeem is een commercieel verkrijgbaar algenkweekstelsel. Deze is voor de opschaling van de hatchery naar pilotschaal aangeschaft en door de leverancier geïnstalleerd (figuur 12). Het systeem bestaat uit een continue cultuur. Er zijn ronde cilinders geconstrueerd van geplastificeerd gaas, welke functioneren als versteviging en borging van plastic zakken. De plastic zakken worden op maat gemaakt, geseald en in de houders geplaatst, waardoor een gesloten plastic cilinder (doorsnede 25cm) ontstaat. De plastic cilinders worden voorzien van een beluchtingset, CO₂ wordt aan het zeewater toegevoegd. De toevoer van nutriënten en zeewater vindt plaats via een druppelslang aan de bovenzijde van de zak. Aan de bovenzijde is ook een afvoer geïnstalleerd. Het oogstvolume wordt bepaald door het toevoervolume. Er zijn verschillende van dergelijke zakken naast elkaar geïnstalleerd. Alle in- en uitgangsstromen worden via een buizensysteem aan elkaar gekoppeld. De toevoervolumes kunnen per zak worden geregeld, afhankelijk van de algensoort en de behoeften van de algen. Hierdoor wordt een oogst van gemiddeld 20 liter per systeem per dag gerealiseerd.

Het toegevoegde medium wordt aan 1 µm gefilterd en gepasteuriseerd zeewater toegevoerd, waardoor voorkomen wordt dat er kruisbesmettingen voorkomen. Bij start van het systeem wordt een zak met een cultuur van enkele liters beent, het volume wordt vervolgens opgevoerd tot het gewenste volume (100 liter). De doorkweek wordt gerealiseerd in één week en er kan per zak gemiddeld drie maanden worden afgeogst.



Figuur 12. Seacaps systeem, Seasalter. B) SeaCaps Systeem, Roem van Yerseke

Vlakkeplaat bioreactor

Op basis van een concept design van de vlakke plaatreactor technologie van Wijffels (WUR) is een vlakke plaatreactor nagebouwd (Fig. 13). Hierbij zijn de designcriteria van Wijffels aangehouden. De vlakke plaatreactor is verkozen omdat de productiviteit voor flagellaten in pilots veelbelovend lijkt te zijn. De reactor is echter nog niet getest voor algensoorten die geschikt zijn voor schelpdieren. In de huidige studie is het systeem getest voor twee algensoorten die worden gebruikt in de hatchery van de Roem van Yerseke. Het systeem is op pilotschaal toegepast, hetgeen betekent dat één bioreactor is toegepast.

De vlakkeplaat reactor (zie figuur 13) bestaat uit een metalen houder, waartussen een zestal platen geklemd zijn. Tussen de platen is een metalenframe geïnstalleerd, waarbij afdichting met siliconenstrips is gerealiseerd. Er ontstaat hierdoor een algenkweekkamer van 3 cm dik, met een hoogte van 40 cm en een breedte van 20cm. Aan weerszijden van de algenkweekkamer ontstaat een koelcompartiment, waar een waterstroom (met een temperatuur van 18°C) stroomt. De koelcompartimenten zijn 2 cm dik (afmeting 40x20cm) en zorgen voor temperatuurregulatie. Aan de onderzijde van de algenkweekkamer is een uitsparing gemaakt, waarboven een membraan is geïnstalleerd. Aan de holle kamer die hierdoor ontstaat is een luchtaanvoer gemaakt. De lucht wordt via het membraan aan de cultuur toegevoegd. CO₂ wordt via een aansluiting aan de onderzijde van de kweekkamer via een HPLC-bruissteen aan het kweekmedium toegevoegd.

Medium wordt via aansluitingen aan de bovenzijde van het systeem druppelsgewijs (via een slangenpomp) toegevoegd. Er is een uitstroomkanaal gerealiseerd aan de bovenzijde, waarbij de uitstroomdebiet gelijk is aan het instroomdebiet.

Beënting van het systeem gebeurt door een algencultuur van 0,5 liter aan te vullen met medium tot een volume van 3 liter. Wanneer nagenoeg maximale cel aantallen zijn bereikt wordt het systeem op continue doorstroming gezet. De waterbehandeling is gebeurd door water te filtreren (0.2µm) gevolgd door destillatie.



Figuur 13. Overzicht vlakke plaat bioreactor opstelling A) Bioreactor, zonder aansluitingen. B) Bioreactor inclusief complete aansluitingen. C) Overzicht bioreactoropstelling Wageningen IMARES.

Experimenten bioreactor

In totaal werd een viertal verkennende experimenten met de vlakke plaat bioreactor (ontwerp, R. Wijffels) uitgevoerd (zie tabel 2 voor overzicht).

In tabel 2. is een overzicht gegeven van de uitgevoerde experimenten.

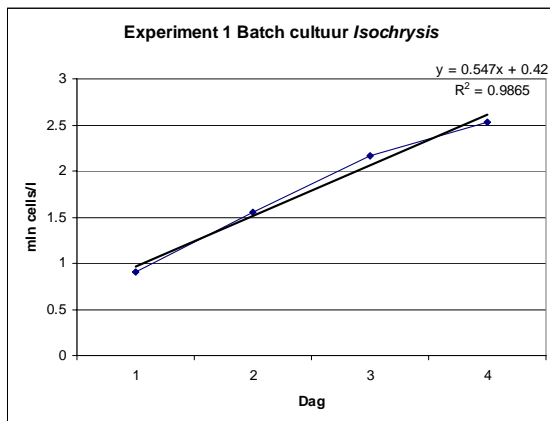
	Doel	Continue/batch	CO ₂	Algensoort
Experiment 1	Testen functionaliteit, werkbaarheid, potentiële opbrengst	Batch	Geen	<i>Isochrysis</i>
Experiment 2	Testen functionaliteit, potentiële opbrengst	Batch	Geen	<i>Pavlova</i>
Experiment 3	Testen functionaliteit, potentiële opbrengst	Batch	CO ₂	<i>Pavlova</i>
Experiment 4	Langdurig experiment Testen doorstroming, reactie algen	Continue	CO ₂	<i>Pavlova</i>

De uitgevoerde experimenten voor de vlakke plaat bioreactor bestaan allereerst uit het testen van de werking en functionaliteit van de bioreactor, waarbij de bioreactor in batch cultuur (*Isochrysis galbana*) is opgestart. Er is geen CO₂ toegevoegd. Een maximale celdichtheid van 2.5 mln cellen per ml is behaald (figuur 14).

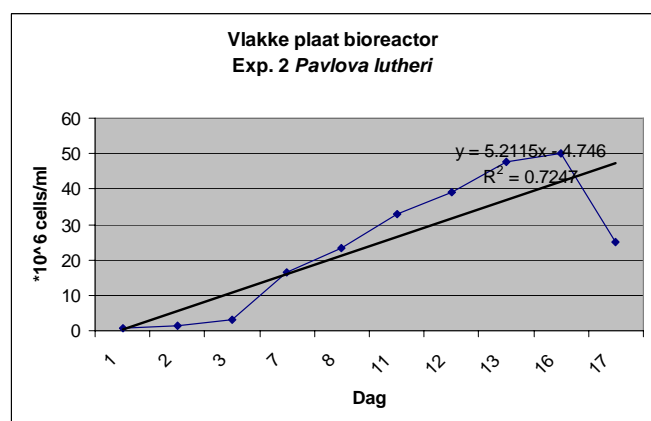
In de vervollexperimenten is gebruik gemaakt van *Pavlova lutheri*. Deze soort werd verkozen als testsoort.

Experiment 2 bestaat uit een batchcultuur, zonder toevoeging van CO₂. Op dag 8 en 10 is de cultuur verrijkt met nutriënten. De cultuur is gedurende 16 dagen in stand gehouden, waarbij een maximale celdichtheid van 48 mln cellen per liter is behaald. Na 16 dagen is de cultuur ingestort.

A)



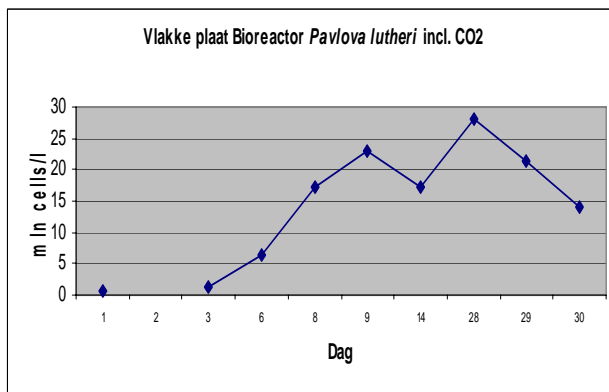
B)



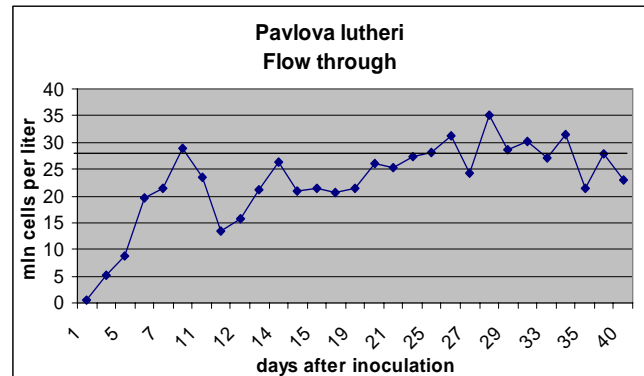
Figuur 14. Resultaten Experiment vlakke plaat bioreactor met batch cultures. A) Experiment 1 batchcultuur *Isochrysis galbana*.. B) Experiment 2 Batchcultuur *Pavlova lutheri*.

Experiment 3 is uitgevoerd door eenzelfde opzet als experiment 2 te realiseren. Hierbij is CO₂ toegevoegd aan de cultuur (0.2ml/uur). Daarnaast werd op dag 14 medium toegevoegd om een maximale celdichtheid te bereiken. De groeisnelheid in de eerste negen dagen van het experiment is gelijk aan de groeisnelheid zonder toevoeging van CO₂. Echter, de celdichtheden bereikten 28 mln cellen per ml (na vier weken) (zie Fig. 15). In vergelijking tot het experiment, waarbij geen CO₂ is toegevoegd (experiment 2) is de maximale celdichtheid beperkt. De oorzaak ligt naar alle waarschijnlijkheid in het gebrek aan nutriënten. Deze zijn in het tweede experiment wel toegevoegd, in het derde experiment heeft geen toevoeging plaatsgevonden.

A)



B)



Figuur 15. Resultaten Experiment vlakke plaat bioreactor met batch en continu cultures. Experiment 2 Batchcultuur Pavlova lutheri. met CO₂ toevoeging.

Experiment 4 is uitgevoerd als pilot voor continue doorstroming. De bioreactor is met CO₂ aansluiting gedurende 11 dagen opgestart. Na 11 dagen is het systeem in continue cultuur gebracht, waarbij een doorstroomsnelheid van 0.3-0.4 ml/min (0.43-0.57 l/dag) is gerealiseerd. De gemiddelde celdichtheid die met doorstroming zijn bereikt bedraagt 28 mln cellen per ml.

De behaalde resultaten liggen beneden de theoretische verwachting, echter door gebrek aan ruimte voor verdere experimenten is de optimalisatie van het systeem gestaakt. Op basis van de behaalde resultaten kan echter een praktisch behaalde productiviteit worden berekend (op basis van de resultaten van experiment 4). Daarnaast kan de productiviteit van het systeem berekend worden op basis van de maximaal behaalde celdichtheden (experiment 2) en de resultaten van de continue cultuur (experiment 4).

Berekening productiviteit fotobioreactoren

De productiviteit van de systemen is berekend aan de hand van de verkregen resultaten. Er zijn berekeningen uitgevoerd voor de vlakke plaat fotobioreactor op basis van de opgedane ervaringen. Dit betekent dat er nog een grote optimalisatieslag noodzakelijk is, waardoor de praktisch haalbare productiviteit hoger zal zijn. Hierom is berekend wat de theoretische productiviteit van een vlakke plaatreactor kan zijn op basis van de ervaringen in batch cultuur. Deze waarden kunnen behaald worden wanneer het systeem een optimalisatieslag ondergaat. Als derde is de theoretisch berekende waarde van de vlakke plaat bioreactor weergegeven (Janssen, 2007). De productiviteit van het SeaCaps systeem is bepaald aan de hand van de ervaringen bij Roem van Yerseke.

De berekende productiviteit van de beide systemen zijn weergegeven in tabel 3.

Tabel 3. Berekende productiviteit van *Pavlova lutheri* in het SaeCaps algenkweekstelsel en een pilot vlakke plaat bioreactor op basis van SHANGHO experimenten/optimalisatie.

	Bioreactor op basis van ervaringen	Bioreactor theorie gebaseerd op maximale waarden van batchervaringen	Bioreactor theoretische berekening	SeaCaps op basis van ervaringen
Concentratie alg (mln cellen per ml)	28	40		15
Percentage verversing (dag)	20%	50%		20%
Opbrengst (gram dw/liter)	0.52	0.74		0.28
Opbrengst (gram dw / dag)	0.30	1.12		5.58
Opbrengst ton dw / y / ha	11*	49*	64**	41***

* Berekend op basis van tien systemen per m².

** Conform M. Janssen: Generiek voor algensoorten. Microalgae as feedstock for biodiesel?, ICSR 2007, Vlissingen.

*** Berekend op basis van twee systemen per m²

Discussie

In de praktijk is een productiviteit van de vlakke plaat bioreactor behaald van 11 ton droge stof per hectare per jaar. Deze resultaten zijn gebaseerd op een onvoldoende geoptimaliseerd systeem. Wanneer de praktisch gehaalde resultaten verder doorgerekend zijn komt de productiviteit op 49 ton dw per ha per jaar. De theoretische productiviteit bedraagt 64 ton droge stof per ha per jaar. Er dient derhalve nog een optimalisatieslag aan het systeem te gebeuren. Daarnaast zijn de investeringskosten voor het gebruikte systeem hoog (ongeveer 20 keuro per reactor), dit zal echter drastisch verminderen wanneer een opgeschaald systeem benut wordt. De werkbaarheid van het beproefde systeem is daarnaast ook beperkt gebleven, ook hieraan dienen verbeteringen te worden ingevoerd. De vlakke plaat bioreactor is in pilotschaal getest, waardoor geavanceerde apparatuur voor CO₂ en vloeistofdebieten noodzakelijk zijn. Een dergelijk systeem is bewerkelijk en vergt grote kennis en aandacht voor het systeem. Derhalve zal een opgeschaald systeem eenvoudiger in de bediening en goedkoper moeten zijn.

Het SeaCaps systeem bleek eenvoudig te installeren en de werkbaarheid was functioneel.

Investeringskosten bedragen ongeveer 20.000 euro per 50 zakken. De productiviteit is berekend op 41 ton droge stof per hectare.

Aangezien commercieel verkrijgbare systemen eenvoudig te installeren zijn en de productiviteit (zonder uitgebreide optimalisatie) in de beurt ligt van de vlakke plaat bioreactor is het op het moment van het schrijven de meest efficiënte oplossing om een commercieel verkrijgbaar systeem te benutten voor hatchery doeleinden. De gebruiksvriendelijkheid van het gebruikte systeem blijkt zeer groot, optimalisatie is in mindere mate noodzakelijk. Vlakke plaatreactoren zullen wellicht in de toekomst uitkomst bieden voor hatchery productie van schelpdieren, echter deze technieken zullen verder moeten worden uitgewerkt en op praktijkschaal moeten worden beproefd.

4.2.2 Protocollen algencultures

Een mono-cultuur van algensoorten 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.

4.2.3 Cultuur medium

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 4. Hoeveelheid chemicaliën nodig voor 1 L oplossing Walne medium

Stof	Hoeveelheid
Na ₂ EDTA	45 g
H ₃ BO ₃	33.6 g
NaNO ₃ (KNO ₃)	100 g (116 g)
NaH ₂ PO ₄ *2H ₂ O	20 g
MnCl ₃ *4H ₂ O	0.36 g
FeCl ₃ *6H ₂ O	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 5. Hoeveelheid chemicaliën nodig voor 100 ml oplossing 2 Walne medium

Stof	Hoeveelheid
ZnCl ₂	2.1 g
CoCl ₂ *6H ₂ O	2.0 g
(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ *4H ₂ O	0.9 g
CuSO ₄ *5H ₂ O	2.0 g

Vitamine oplossing

Autoclaveer 100 ml demiwater en voeg de volgende vitamines toe.

Tabel 6. 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 twee oplossingen door het toevoegen van de volgende nutriënten aan 1 liter demiwater. Autoclaveer de twee oplossingen en bewaar ze in de koelkast bij 4°C.

Tabel 6. 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 7. Volume van de chemicaliën oplossing nodig per liter gefiltreerde zeewater.

	Algensoorten	
	T-ISO	<i>Chaetoceros gracilis</i>
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

4.2.4 Algenvoorraad cultuur, start cultuur en plastic zak culturen

Voorraad cultuur

De voorraad cultuur wordt gehouden in gesteriliseerde reageerbuizen afgesloten met siliconen doppen of watten (Fig. 16). Ze worden bewaard in de precultuur kamer bij een temperatuur van 20°C.

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

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

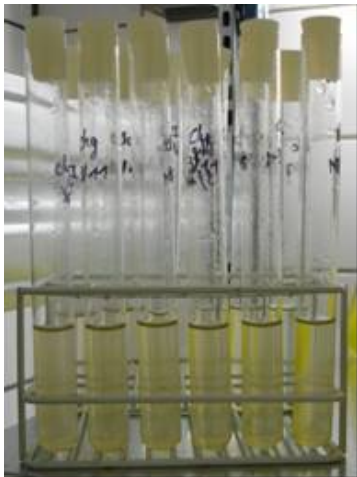
Een kleine hoeveelheid detol wordt geschonken over alles wat in aanraking kan komen bij het maken van de algen culturen. De handen worden ontsmet door ze te wassen met ethanol 70 %.

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 reageerbuizen. 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 16: Voorraad culturen van T-ISO en *Chaetoceros gracilis*.

Kleine startculturen

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 startculturen, de overgebleven hoeveelheid wordt ook gebruikt als inoculum voor de nieuwe kleine start culturen.

Inoculatie gaat als volgt:

1) De eerste stap is het ontsmetten van de werkplek en handen. Een kleine hoeveelheid 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 (Fig. 17).

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 17: 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. Alleen 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 (Fig. 18 en 19).

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



Figuur 19. Rechts op de onderste plank zijn flessen met medium te zien. Links op de onderste plank de kleine start culturen en daarboven de grote start culturen.

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 (Fig. 20).

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 dettol. De handen worden ontsmet met ethanol.

5) De nutriënten worden toegevoegd in de hoeveelheden zoals vermeld wordt in tabel 8.

6) Een grote startcultuur (minimaal 50.000 cellen per ml), meestal 14 dagen oud, wordt toegevoegd. De kwaliteit van de algen wordt 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.

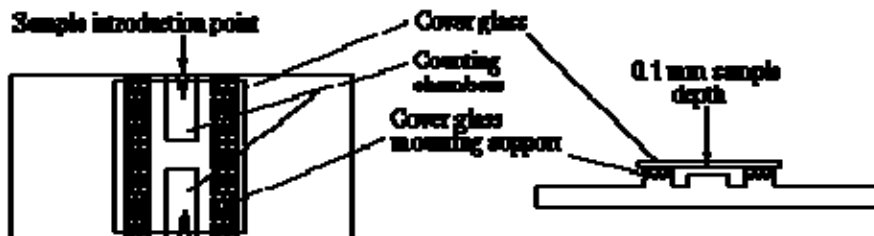


Figuur 20. Plastic zakken van 25 liter (links) en 50 liter (rechts) met algencultuur.

4.2.5 Bepaling van de algendichtheid

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 21) 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 mm³ wordt.



Figuur 21. 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:

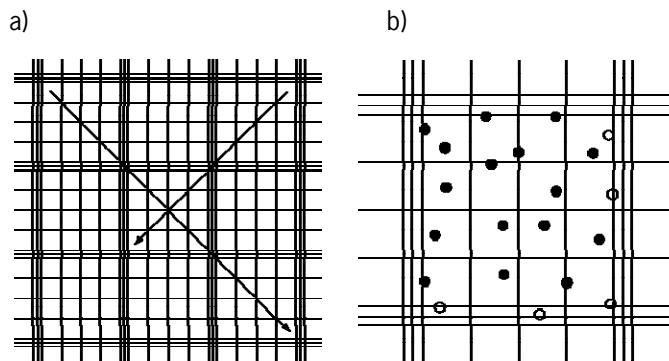
- plaats 10 ml cultuur monster in een maatcilinder
- voeg enkele druppels lugol of twee druppels 4% formal toe en meng goed

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 onderverdeeld in 144 vakken. Het aantal cellen in 25 vakken (de twee diagonalen plus een vak, figuur 22) worden geteld. Op elk vak worden de cellen in het midden en op twee grenzen geteld (figuur 22). 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 22. 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).

4.3 Hatchery/nursery

Systeemcomponenten/capaciteiten

Overall	Ruimtebeslag voor 500 M broedjes M ²	Systeemcomponenten	Capaciteit
Hatchery <i>Uit IAZ rapport 2006</i>	50	-Klimaatkamer (18 – 24°C) -Tanks voor opkweek -Zeven Zeewater -Gefiltreerde zeewater -Luchtvoorziening -Afvoerbak voor afvalwater	30,45,60,90150

Bijlage: hulpmiddelen/benodigdheden

4.3.1 Achtergronden hatchery/nursery

Effect van waterkwaliteit op groei en overleving larven.

Experimentele set-up waterkwaliteitsexperiment 1

Het effect van filtratie en UV behandeling om bacteriën te verwijderen op de groei en overleving van larven werd getest in de experimentele hatchery van IMARES op het NIOO in april en mei 2006. Water werd gefilterd over 0.1 μm met UV behandeling om bacteriën te verwijderen en alleen over 5 μm zonder UV behandeling om bacteriën te behouden. In beide behandelingen werden de larven gevoerd met 25.000 cellen per ml *Isochrysis galbana* en *Chaetoceros gracilis* (50:50) per dag. De water temperatuur was 17 °C. Het water in de larven tanks werd drie keer per week verversd (maandag, woensdag en vrijdag) met peroxide en gespoeld met gefiltreerd zeewater. Bij iedere verversing werden de larven opgevangen op een zeef en in een 1 liter beker gespoeld. De larven aantallen werden bepaald door drie monsters van 50 μl te tellen. Een maal per week werden een monster genomen voor lengte determinatie.

Resultaten en discussie waterkwaliteitsexperiment 1

Een duidelijk effect van filtratie en UV behandeling op overleving van larven werd niet gevonden (t-test, $P > 0.05$) (Fig.23). Er werd echter een gestage afname in larvenaantallen in beide behandelingen geobserveerd. Dit geeft aan dat de condities voor overleving niet optimaal waren. De lengte van de larven nam toe tot 187-214 μm 21 dagen na bevruchting, toen 50% van de larven een oogvlek vertoonden (Fig.23). Er werd geen effect van waterbehandeling op de groei gevonden (ANOVA, $P > 0.05$). Dit experiment geeft aan dat een behandeling met 0.1 μm filtratie en UV niet noodzakelijk is, maar omdat de overleving in beide behandelingen niet optimaal was is dit niet met zekerheid te stellen.

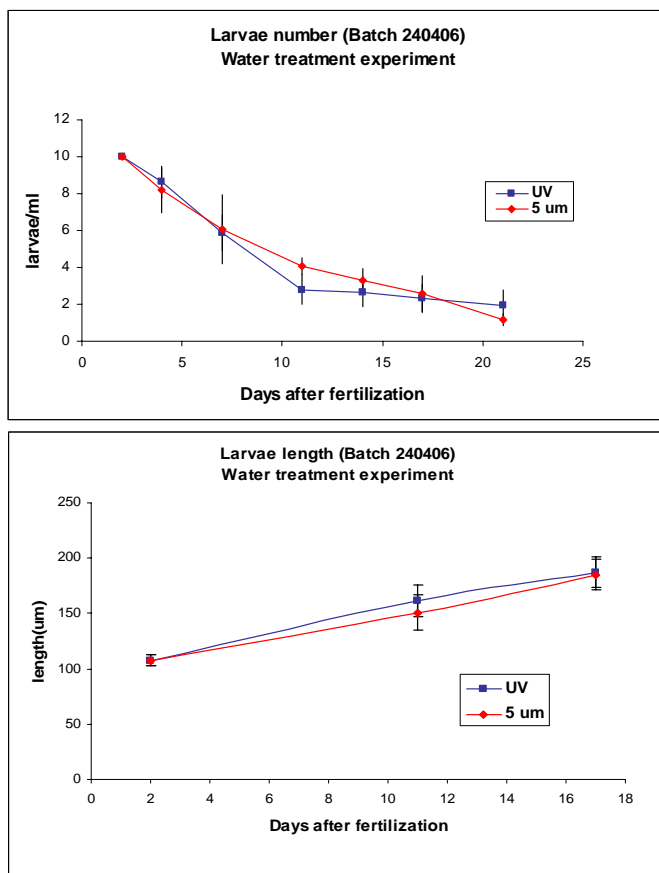


Fig. 23 Overleving (boven) en lengte (onder) van larven bij twee verschillende waterbehandelingen ($n=3$ met sd).

Experimentele set-up waterkwaliteitsexperiment 2

Observaties van een hogere overleving van larven bij de Roem van Yerseke en in Jacobahaven dan bij IMARES/NIOO waren de aanleiding tot een tweede waterkwaliteitsexperiment. Het experiment werd eind oktober 2006 uitgevoerd met larven van een broedstock van de Roem van Yerseke uit Shetland.

Vijf typen water werden getest: water van Roem van Yerseke, water van NIOO, water van Prins en Dingemanse, water van Jacobahaven en Instant Ocean water.

Honderd liter van ieder type water werd verzameld op dezelfde dag. Het water werd gefilterd door 0.2 µm behandeld met UV. Ieder type water werd opgeslagen in twee 50 liter tanks en belucht. Zoutgehalte en pH werden gemeten.

De opkweek van larven vond plaats in 4 liter glazen flessen met drie replica's per behandeling. De larven werden dagelijks gevoerd met 25.000 cellen *Pavlova lutheri* en *Chaetoceros calcitrans* (50:50). Water verversing gebeurde twee maal per week (maandag en vrijdag). Bij iedere verversing werd een monster van 100 µl genomen voor aantalsbepaling en lengte opmeting. De glazen flessen werden schoongemaakt met peroxide, gespoeld met demiwater en droog weggezet tot de volgende verversing (er waren dus twee sets flessen). Zoutgehalte en pH werden gemeten bij iedere verversing. Gedurende het experiment werd een bacterie/vibrio test (Sanoguard BDS-G) uitgevoerd.

Resultaten en discussie waterkwaliteitsexperiment 2

De hoogste overleving werd gevonden voor het NIOO water, met 82% overleving (Fig. 24). De Instant Ocean behandeling gaf 0% overleving 22 dagen na bevruchting. Er werden significante verschillen gevonden tussen de NIOO behandeling en Instant Ocean (ANOVA, $P < 0.05$) en tussen Roem van Yerseke water en Instant Ocean (ANOVA, $P < 0.05$). Het NIOO water gaf ook de beste groei van de larven te zien (Fig. 24). Drie weken na bevruchting hadden de larven een lengte van 225 µm. De kleinste lengte werd gevonden bij de Instant Ocean behandeling met 130 µm. De lengte van de larven die werden gekweekt in NIOO water verschilde significant met Instant Ocean, Jacobahaven water en Prins en Dingemanse water (ANOVA, $P < 0.05$). Significante verschillen werden ook gevonden tussen Jacobahaven water and Instant Ocean water (ANOVA, $P < 0.05$) en tussen Prins en Dingemanse en Instant Ocean water (ANOVA, $P < 0.05$). Verschillen tussen Roem van Yerseke water en Instant Ocean waren bijna significant (ANOVA, $P = 0.054$).

De temperatuur varieerde tussen 17 en 17.5 °C en het zoutgehalte tussen 28 en 31 psu. Er werd geen *Vibrio* infectie in de wateropslag tanks of de flessen gevonden, behalve bij de Instant Ocean behandeling.

De verwachting was dat de overleving van de larven het beste zou zijn bij Jacobshaven. De hoogste overleving werd echter gevonden nabij het NIOO gebouw. Dit onverwachte resultaat ondersteunt deze verwachting niet en geeft aan dat de kwaliteit van het water kan fluctueren.

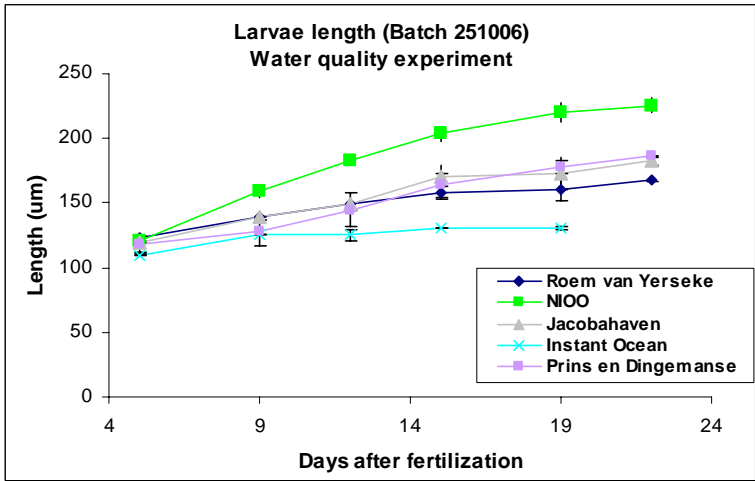
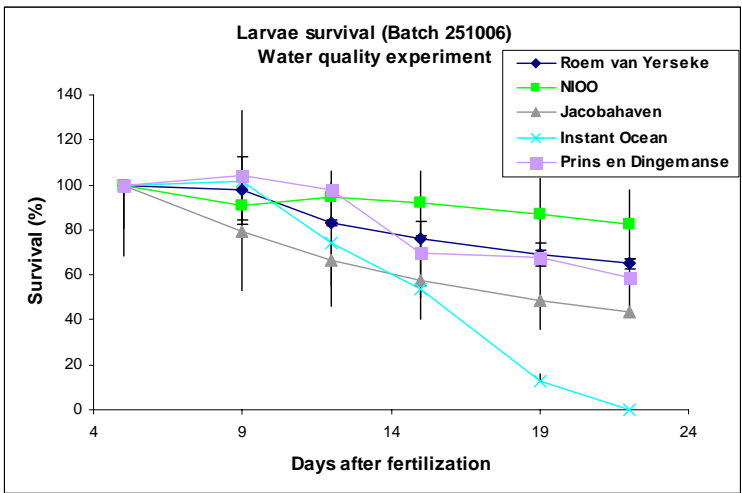


Fig. 24. Larvenoverleving (boven) en lengte van larven (beneden) voor de vijf typen water ($n=3$ met sd, behalve voor Instant Ocean en Prins and Dingemane waar $n=2$ met sd).

4.3.2. Protocollen

Hatchery-fase:

Paaien

1. Een groep van ten minste 100 paarijpe mosselen wordt schoongemaakt en in een schaal met 1 μm stromend zeewater van 19°C geplaatst.
2. De temperatuur wordt snel omhoog gebracht naar 29°C. Na 20 minuten wordt de watertemperatuur teruggebracht naar 19°C. Dit proces wordt maximaal drie keer herhaald of totdat de eerste dieren beginnen te paaien.
3. Wanneer de dieren na driemaal een temperatuurschok te hebben gekregen niet paaien worden deze teruggeplaatst in de conditioneringstanks.
4. Indien voldoende vrouwtjes paaien wordt achter de wateruitstroom een set van 30- en 90 μm zeven geplaatst om de bevruchtte eitjes in op te vangen.
5. Regelmatig wordt de 30 μm zeef geleegd in een 5 L maatbeker met 1 μm gefilterd zeewater van 19°C om verstopping van de zeef te voorkomen.
6. Indien er voldoende eitjes zijn worden deze gecontroleerd op grootte en vorm, geteld (zie procedure) en zo snel mogelijk overgebracht naar een embryotank.
7. Mosselen die gepaaid hebben worden teruggeplaatst in de conditioneringstanks.

Ontwikkeling embryo's

5. Bevruchtte eitjes worden overgebracht naar conische 1000 liter tanks met 1 μm gefilterd zeewater en zachte beluchting (Fig. 23). Maximale dichtheid is 25 embryo's per liter.
6. Enkele liters T-Iso van zeer goede kwaliteit wordt toegevoegd om als voedsel te dienen voor jonge D-larven.
7. Na 48 uur worden de larven afgeogst over een 60 μm zeef. Deze zeef staat tijdens het afoogsten in een ondiepe schaal om droogvallen van de larven te voorkomen.
8. Larven worden geteld en de hatching-rate wordt berekend:
 - a. Voor procedure zie (tellen larven)
 - b. $\text{Hatching rate (\%)} = \frac{\text{aantal D-larven}}{\text{aantal eitjes}} * 100\%$
9. Indien de larven van goede kwaliteit zijn (maximaal 10% misvormde larven, geen beschadigingen aan het velum, actief, hatching rate van tenminste 70%, 100-110 μm groot) worden ze overgebracht naar conische larventanks.

Larvenkweek

Mossellarven kunnen zowel in batch- als in continusystemen gekweekt worden. Bij Roem van Yerseke wordt gebruik gemaakt van continusystemen. De werkwijze is als volgt:

1. Na afoogsten en tellen worden de D-larven zo snel mogelijk overgebracht naar 130 liter doorstroomtanks (Fig. 23), gevuld met 1 μm gefilterd zeewater van 19°C. Deze tanks bevatten een trommelzeef om te voorkomen dat larven uit de tanks spoelen (Fig. 25). Het water wordt onderin de punt belucht voor een optimale waterstroming en zo te voorkomen dat larven ophopen op de bodem van de tank.
2. Maximale stockerings dichtheid van D-larven in een 130 liter doorstroomtank bedraagt 20 miljoen (ongeveer 150 larven per ml).
3. De eerste week is de doorstroomsnelheid 400 ml/min.
4. Aan het instromende water wordt continue een mix van *I. galbana* (T-Iso), *P. lutheri* en *C. muellerii* (2:1:1) toegevoegd zodat de totale concentratie aan algen in de tank continue 40.000 cellen/ml bedraagt.
5. Tot aan de metamorfose worden de tanks om de dag volledig geleegd en gereinigd:
 - a. Larven worden afgeogst over een 60 μm zeef en overgebracht naar een 5 liter maatbeker.
 - b. Larven worden onder de microscoop gecontroleerd op vitaliteit (x100 vergroting)
 - c. Eenmaal per week worden de larven geteld (zie procedure 4.5.2).

- d. Larventanks en trommelzeven worden schoongemaakt met een verdund mengsel van azijn- en zoutzuur en nagespoeld met zoet water.
 - e. Trommelzeven worden teruggeplaatst en larventanks worden gevuld met 1 μm gefilterd zeewater van 19°C.
 - f. Larven worden teruggebracht in de tank.
6. Negen dagen na bevruchting is het merendeel van de larven 150 μm groot. Dit is een goed moment voor de eerste 'culling': grote larven worden van de kleine larven gescheiden en in aparte tanks geplaatst. Hiervoor worden de larven afgeogst over een set van 60 en 90 μm zeven. Indien de larven in de kleine fractie niet van voldoende kwaliteit zijn wordt deze fractie weggegooid.
 7. Trommelzeven worden aangepast aan de grootte van de larven.
 8. De hoeveelheid algen voor de 150 μm larven wordt verhoogd tot een totale concentratie van ongeveer 60.000 cellen/ml.
 9. Naarmate de larven groeien worden de zeven indien mogelijk bij iedere waterwissel vervangen door grovere zeven van achtereenvolgens 90, 120, 150, 175 en 200 μm .
 10. Na ongeveer 17 dagen bij 19°C zijn de larven 210 - 250 μm groot en zullen de eerste oogjes te zien zijn (zie foto ..?)
 11. Wanneer het merendeel van de larven ook voetjes heeft gevormd (gewoonlijk 18 – 19 dagen na bevruchting) worden de pedi-veliger larven overgebracht naar een systeem waar ze kunnen settelen en uitgroeien tot mosselbroed.

Tellen larven

- 1) 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.
- 2) De ontwikkeling van de larven wordt bepaald onder de microscoop met een x40 en x100 vergroting.
- 3) Monsters voor het meten van schelp lengte worden in een reageerbuisje gepipetteerd en met lugol (8 druppels) gefixeerd.
- 4) 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).
 - 4.1. De monsters worden met lugol gefixeerd en het tellen wordt uitgevoerd met de binoculaire.
 - 4.2. 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.



Figuur 25. Larventanks van 1250 liter (links) en 100 liter (rechts), Roem van Yerseke.

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

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.

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

4.4 Nursery, inrichting en technieken

Systeemcomponenten/capaciteiten/

Overall	Ruimtebeslag voor 500 M broedjes	Systeemcomponenten	Capaciteit
	M ²		
Nursery	50		

Bijlage: hulpmiddelen en benodigdheden



Nursery Roem van Yerseke

4.4.1 Protocollen nursery

Nursery fase:

Afhankelijk van de beoogde manier van opkweken tot mosselzaad kunnen de mossel pedi-veligers op verschillende manieren gesetteld worden:

1. Aan netten of touwen welke vervolgens buiten uitgehangen worden en waaraan de dieren tot zaad-formaat opgroeien:
 - a. Een stuk net of touw wordt in een conische 1000 liter tank gehangen, gevuld met 1 µm gefilterd zeewater van 19°C en verrijkt met een mix van verschillende soorten micro-algen in een concentratie van ongeveer 100.000 cellen/ml. Deze mix kan bestaan uit onder andere de volgende algensoorten: *I. galbana*, *P. Lutherii*, *Tetraselmis suecica*, *Thalassiosira weissflogii*, *T. pseudonona*, *Chaetoceros muellerii*, *C. calcitrans* en *Skeletonema costatum*.
 - b. Het is belangrijk om de tank voldoende te beluchten en op die manier de broedjes aan te zetten tot met maken van veel en sterke bysdraden. Is de beluchting onvoldoende dan zullen de broedjes zich niet stevig genoeg vastzetten waardoor ze bij het uithangen in het buitenwater zullen loslaten waardoor er verliezen ontstaan.
 - c. Bij het gebruik van netmateriaal met een maaswijdte van 4 cm is de maximale bezettingsgraad 400 broedjes per maas. Over het algemeen zal 85% van de pediveligers zich succesvol ontwikkelen tot broed dus de hoeveelheid larven nodig voor een net met een maaswijdte van 4 cm is 470 larven per maas.
 - d. Na het toevoegen van de larven aan de tank met netmateriaal wordt er de eerste week niet afgeogst om de larven de kans te geven zich goed vast te hechten.
 - e. Afhankelijk van de hoeveelheid larven per tank worden er extra algen toegevoegd.
 - f. Na een week wordt de tank afgeogst over een 200 µm zeef om eventuele niet gesettelde larven op te vangen. Ook de wanden van de tank worden met een harde (zoet)waterstraal afgespoten om broedjes op de wand van de tank te verwijderen.
 - g. Om een indruk te krijgen of de juiste bezettingsgraad is bereikt worden de opgevangen broedjes en lege schelpjes geteld (zie procedure..).
 - h. Indien het om een groot stuk net gaat wordt dit voor het schoonmaken niet uit de tank verwijderd maar wordt enkel de wand van de tank zo goed mogelijk schoongespoeld waarna de tank weer wordt gevuld met 1 µm gefilterd zeewater van 19°C. Ook worden er weer algen toegevoegd.
 - i. Vanaf een week na settelen worden de algen die worden gevoerd niet meer geteld maar wordt er simpelweg gekeken naar de kleur van het water. Indien dit er helder uit ziet worden er extra algen toegevoegd, gemiddeld eenmaal per dag.
 - j. Vanaf drie weken na settelen kan het net of touw in het buitenwater worden uitgehangen.
2. In een downwelling-systeem:
 - a. Dit systeem bestaat uit een ondiepe zeef van ongeveer 40 cm doorsnede met een maaswijdte van 200 µm. Deze zeef is in een ondiepe schaal geplaatst en het is mogelijk om het water van beneden naar boven (opwelling) of van boven naar beneden (downwelling) door de zeef te laten stromen. Eerst zal van downwelling gebruik gemaakt worden en naar ongeveer 1 week wordt overgeschakeld naar opwelling (Fig. 24).
 - b. Voordelen van het laten settelen in een downwelling-systeem is de beperkte ruimte die hiervoor nodig is en de continue doorstroming waardoor een constante, goede waterkwaliteit en voldoende voedsel (algen worden direct aan het water toegevoerd) gewaarborgd is. Een van de nadelen is dat er het risico bestaat dat op de beperkte ruimte de vele broedjes die net na het settelen zeer hard groeien elkaar zullen verstikken. Regelmatig de dieren over verschillende zeven verdelen is dus belangrijk.
 - c. Vaak wordt op laboratoriumschaal van dit systeem gebruik gemaakt maar het is ook geschikt voor dieren die binnendijks verder worden opgekweekt in vijvers of up- of

downwelling systemen.

Opmerking voeding tijdens de nursery-fase:

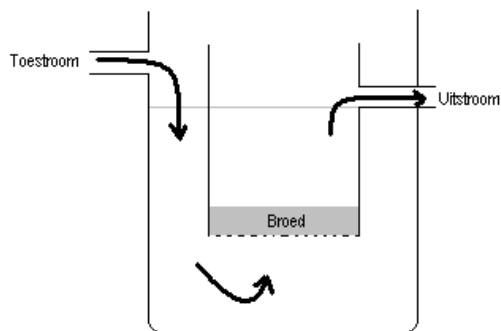
Voor broedjes tot 3 mm is er een commercieel verkrijgbaar geformuleerd voeder (MySpat, INVE-technologies B.V.) beschikbaar. Indien MySpat wordt gevoerd is nog maar 1/8^e van de hoeveelheid algen nodig.

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



Figuur 26. Downwelling nursery voor broed binnen.

4.5 Growout, upweller en percelen



1) Upweller Roem van Yerseke



Systemcomponenten

Overall	Ruimtebeslag voor 500 M broedjes	Systemcomponenten	Capaciteit	Investeringsen
	M ²			
Growout upweller	50			

II) PERCELEN



Locatie van de proefopstelling op het perceel Vlieter 85 (gele cirkel) en Vlieter 110 (rode cirkel) nabij de afsluitdijk in de Waddenzee. Koninklijke Prins & Dingemanse.

Overall	Ruimtebeslag voor 500 M broedjes	Systemcomponenten	Capaciteit
	M ²		
Growout percelen	50		

4.5.1 Achtergronden growout.

Achtergrond SHANGO stukstal

Mosselkwekers geven het formaat van zaad aan in stukstallen (aantal in een blik van 880 ml of aantal in een kg) terwijl hatchery managers werken met lengtes in millimeters. Om beide maten op elkaar af te stemmen heeft in december 2007 een ijking plaatsgevonden in de hatchery van de Roem van Yerseke.

Methode

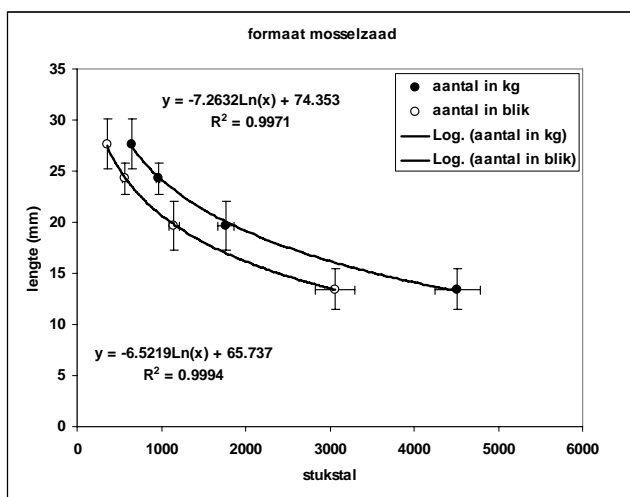
Mosselen van verschillend formaat zijn gemeten en het aantal per volume of gewicht is geteld. Drie monsters van de kleinste klasse (nummer 1) zijn gemeten, vier monsters van klasse 2, zeven monsters van klasse 3 en één monster van klasse 4 (de grootste klasse).

Resultaten

Tabel 4 geeft een overzicht van de meetgegevens en in figuur 27 is de relatie weergegeven. Met behulp van de formules kan uit het stukstal de lengte worden berekend. Bij gelijke lengte van de mosselen zijn busstallen (aantal per blik) lager dan stukstallen (aantal per kg). Binnen een grootte klasse is de variatie in schelpenlengte groot. Dit is te zien aan de maximale en minimale lengte en de waarden van de standaard deviatie (sd).

Tabel 4. Vergelijking van stukstallen en lengtes van mosselen.

grootte klasse	type volume maat	gem aantal in blik	stdev	gem aantal in kg	stdev	gem lengte	stdev	max lengte	min lengte
1	borrelglas	3066	234	4513	269	13.46	1.94	17.87	9.92
2	borrelglas	1150	63	1767	96	19.70	2.37	23.77	13.26
3	borrelglas	561	26	959	25	24.28	1.55	28.79	21.12
4	400 ml	352		648		27.67	2.39	34.74	23.68



Figuur 27. Relatie tussen stukstal en lengte van mosselzaad met sd.

Discussie

De bepalingen zijn gedaan aan mosselzaad van 10 tot 24 mm. Hatchery zaad is vaak kleiner dan 10 mm. Voor dit kleinere formaat dient nog een ijking te worden uitgevoerd.

Achtergrond grow-out: SHANGO perceel proef 2006

In 2006 is een experiment uitgevoerd op het perceel Vlieter 85 ook wel Wieringen 85 genoemd van Koninklijke Prins & Dingemanse in de Waddenzee waarbij mosselzaad van verschillende herkomst met en zonder bescherming is uitgezaaid op een perceel. Drie typen zaad (hatchery, MZI, sublitoraal bodem) zijn getest. Een aantal vakken zijn met gaas beschermd tegen predatie door krabben en zeesterren. In oktober 2006 zijn monsters genomen ter bepaling van de dichtheid van de mosselen, de afmetingen en het gewicht. De vraagstelling bij het onderzoek was of bescherming de overleving van het mosselzaad verhoogd en of er verschillen waren tussen de typen zaad.

Materiaal en methode

Het hatchery zaad was afkomstig van de hatchery van Roem van Yerseke. Het MZI zaad was afkomstig van de MZI van Mosselzaadbedrijf Prins en Dingemanse in het Malzwin. Het zaad was direct van de MZI geoogst op 10 oktober 2006. Het sublitorale bodemzaad was op tot 10 oktober verzameld op een wilde bank in de Vlieter in de Waddenzee door Nico Laros van LNV. Het zaad is na binnenkomst bij TNO IMARES in Den Helder gesorteerd op grootte. Alleen mosselen in de range 10 – 23 mm werd gebruikt. Deze mosselen werden verdeeld in groepjes van 50 mosselen.

De helft van de mosselen werd blootgesteld aan predatoren en de andere helft niet. Om dit te bereiken zijn vier tableaux van beton geconstrueerd waar de mosselen zich op konden hechten. De helft van ieder tableau was bedekt met gaas en de andere helft niet. Het gaas had een maaswijdte van 5 mm en was bevestigd aan een opstaande rand van gaas die 2 cm boven het beton uitstak. De tableaux waren onderverdeeld in vakken d.m.v. opstaande randen van gaas (figuur 28). Op 11 oktober zijn de mosselen per type zaad in groepjes van 50 per vak en drie vakken per type zaad op het beton gelegd in het ruim van de YE 198. Dit ruim was met zeewater gevuld. Na één dag werd met behulp van pompen een stroming opgewekt in het ruim. De mosselen kregen nu de tijd om zich te hechten. Per tableaux werden zes vakken bedekt met het gaas en bleven zes vakken zonder bescherming (figuur 28). De onbeschermd mosselen kunnen in aantal afnemen in de tijd. Dit kan ofwel doordat ze worden opgegeten, ofwel doordat ze van het substraat migreren. De beschermende substraten laten zien hoeveel mosselen zijn gemigreerd (=nog wel op beton, maar niet bij het oorspronkelijke groepje). De vier tableaux werden uitgezet op 13 oktober.



Figuur 28. Tableau van beton onderverdeeld in met gaas bedekte en onbedekte vakken met mosselen in het ruim van de YE 198.

Aan het begin van het experiment is een subsample van vijf mosselen per type zaad apart gehouden. Dit levert informatie over de inzet. Op 18, 25 oktober en 3 en 8 november 2007 werd steeds één tableau opgehaald (figuur 29).



Figuur 29. Ophalen tableau 2 op 25 oktober 2006.

Van iedere opgehaald tableau werd per vak werd het aantal mosselen geteld. Daarnaast werd genoteerd of er mosselen naar de rand van het vak waren verplaatst, en hoeveel lege schelpen per vak aanwezig waren. Per type zaad is de schelpdikte bepaald. Hiervoor is de schelpenlengte (l), schelphoogte (h) en schelpbreedte (b) in mm en het schelpgewicht (w) in mg opgemeten. Vervolgens werd gebruik gemaakt van de formules uit Frandsen & Dolmer (2002). Eerst werd het oppervlak (A) van de schelp uitgerekend met formule 1.

$$(1) A = l * \sqrt{(h^2 + b^2)} * \pi/2$$

Daarna werd de schelpdikte (D) uitgerekend met formule 2.

$$(2) D = w / A$$

De inzetwaarde is gebaseerd op 5 mosselen per type zaad. Voor de eindwaarde zijn de metingen uitgevoerd aan alle nog overgebleven mosselen per vak.

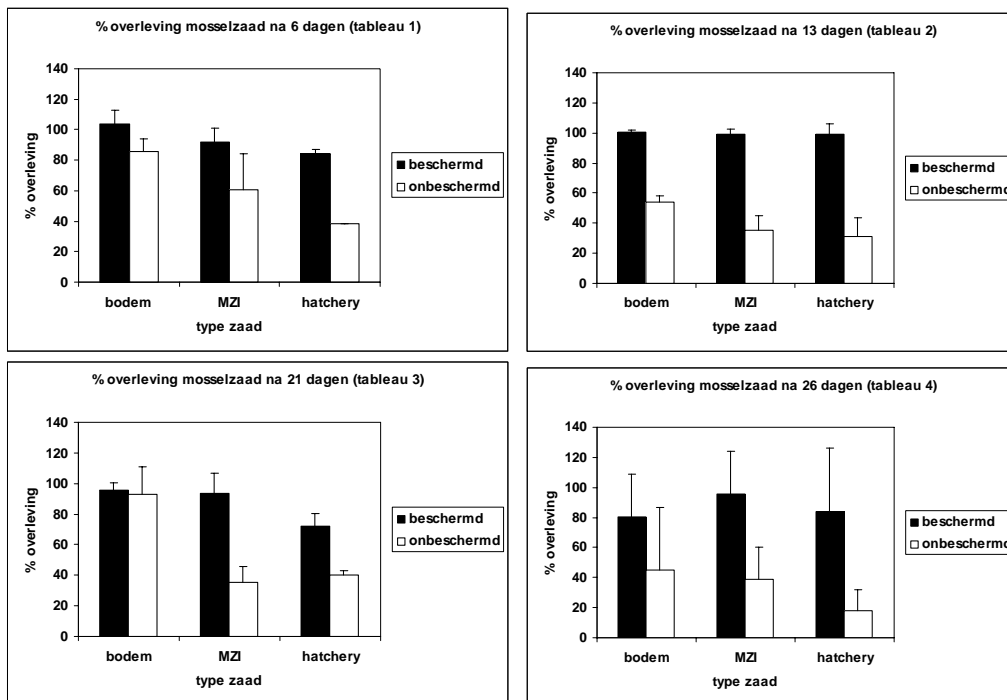
Aan het einde van het experiment is de conditie-index (CI) van de verschillende typen zaad bepaald. Hiertoe is van alle mosselen per vakje samen het gemiddelde asvrij drooggewicht (AFDW) van het vlees in μg bepaald. Dat hield in dat de mosselen werden geopend en het vlees 72 uur werden gedroogd bij 60°C , gewogen en vervolgens 2,5 uur verast bij 560°C en opnieuw gewogen. Met behulp van de gemiddelde waarde voor AFDW en de gemiddelde schelpenlengte (l), schelphoogte (h) en schelpbreedte (b) kon de conditie-index worden berekend in μg per mm^3 zoals weergegeven in formule 3 en ook toegepast door Frandsen & Dolmer (2002).

$$(3) CI = AFDW / (l * b * h)$$

Een Analysis of Variance (ANOVA) werd gebruikt om het effect te testen van type zaad en de aan of afwezigheid van bescherming op de overleving, migratie, het aantal lege schelpen, de schelpdikte en de conditie van het zaad. Voorafgaand aan de ANOVA werden de gegevens getest met een F_{\max} -test ter controle van homogeniteit van de variaties (Sokal & Rohlf, 1995). De aanname van normale verdeling van de residuen werd gecontroleerd door visuele inspectie van box plots. Een significantie van 0.05 werd aangehouden bij alle tests. De statistische analyses werden uitgevoerd met SPSS.

Resultaten

Het aantal mosselen dat aanwezig was in een vakje is de resultante van predatie, migratie en wegspoelen. Alleen migratie binnen het vakje kon worden gekwantificeerd. Overleving is dus een combinatie van predatie en wegspoelen. De overleving van mosselzaad was significant hoger in de beschermde vakken dan in de onbeschermde vakken (figuur 29). Dit gold voor alle drie de typen zaad. Door migratie was het aantal mosselen per vak in de beschermde vakken in sommige gevallen hoger geworden dan 50 (=100%). In de beschermde vakken werd geen significant verschil in overleving gevonden tussen de typen zaad, maar in de onbeschermde vakken was de overleving van het bodemzaad significant beter (figuur 30).



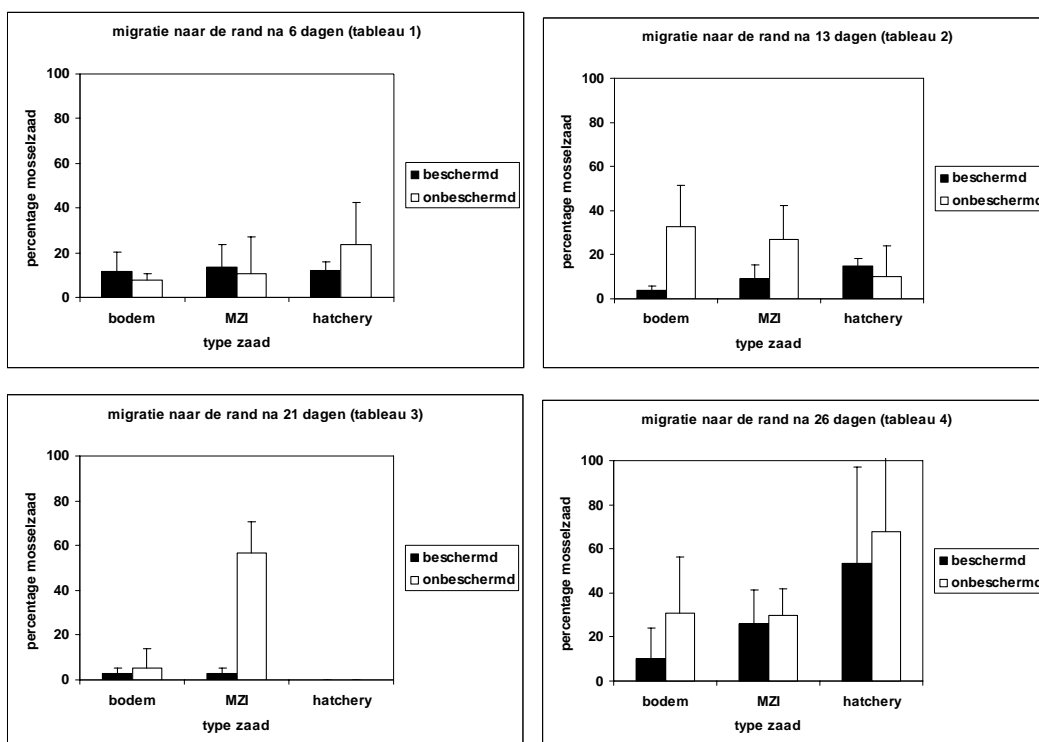
Figuur 30. Gemiddelde overleving van mosselzaad van bodem, MZI en hatchery in beschermde en onbeschermdde vakken op vier tijdstippen ten opzichte van de inzet waarde van 50 mosselen per vak ($n=3$ met sd), behalve voor hatchery zaad, daar is $n=2$)

Migratie van mosselen naar de rand van het vak trad significant vaker op in de onbeschermdde vakken (figuur 31).

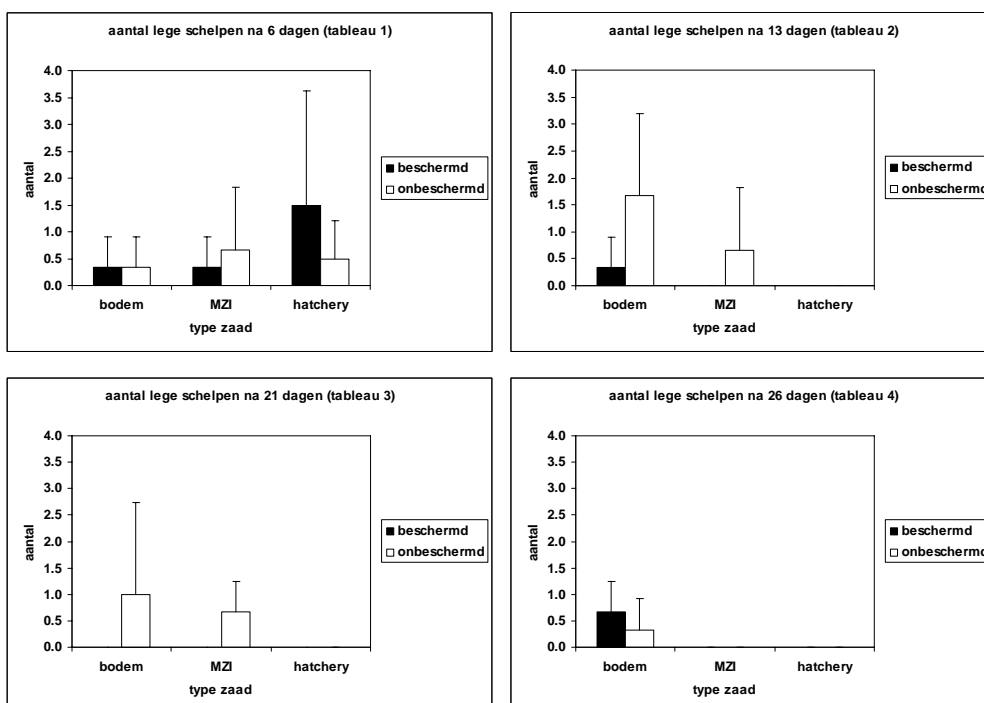
Lege schelpen werden niet significant vaker aangetroffen in de onbeschermdde vakken (figuur 32). Het aantal lege schelpen vertoonde ook geen significant verband met type zaad (figuur 32).

De schelpdikte van het mosselzaad was toegenomen gedurende de periode van het experiment (figuur 33). Er was een significant grotere toename voor onbeschermd zaad. Er werd geen effect van type zaad gevonden. Dit komt overeen met de resultaten gevonden door Frandsen & Dolmer (2002). Zij noemen dat dit mogelijk een reactie is van de mosselen op chemische stoffen die worden afgescheiden door de predatoren of een reactie op bewegingen van de predatoren. Een andere verklaring die ze noemen kan zijn dat de mosselen met de dunste schelp het eerst worden opgegeten en dat dus de dieren met een dikkere schelp overblijven.

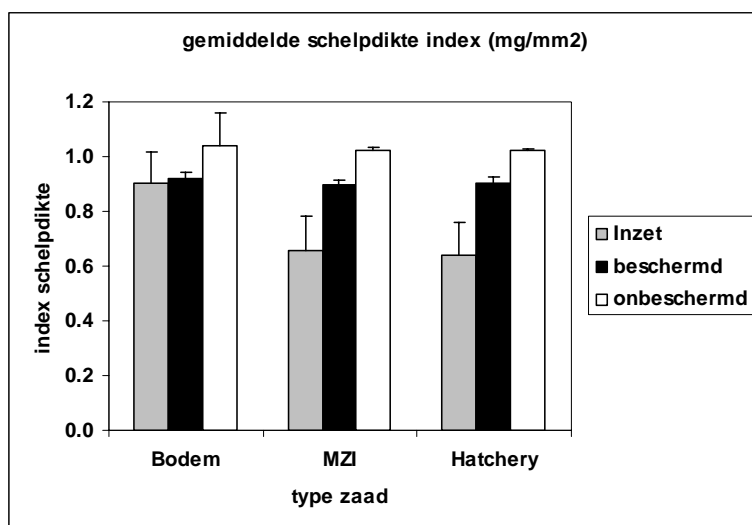
Aan het einde van het experiment was de conditie index van het mosselzaad vergelijkbaar voor het onbeschermdde zaad en het beschermde zaad (figuur 34). De conditie index vertoonde geen significant verband met type zaad.



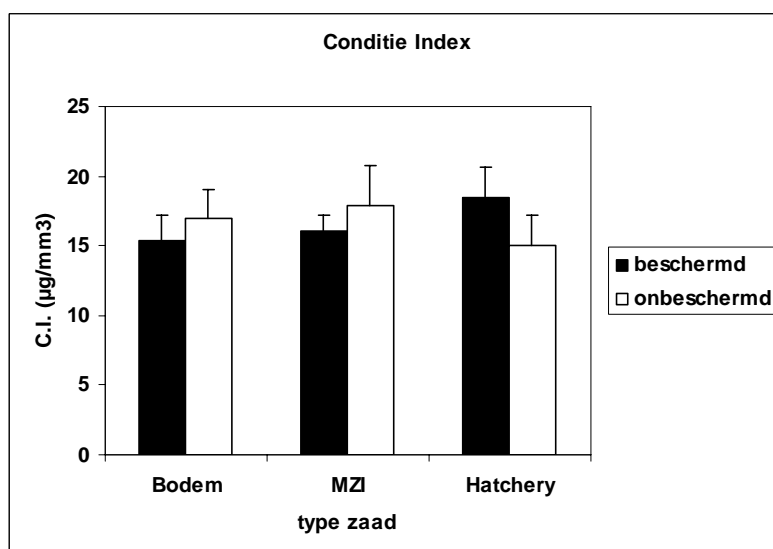
Figuur 31 Gemiddelde migratie van mosselzaad van bodem, MZI en hatchery in beschermd en onbeschermd vakken op vier tijdstippen ($n=3$ met sd), behalve voor hatchery zaad, daar is $n=2$



Figuur 32. Gemiddeld aantal lege schelpen van mosselzaad van bodem, MZI en hatchery in beschermd en onbeschermd vakken op vier tijdstippen ($n=3$ met sd), behalve voor hatchery zaad, daar is $n=2$



Figuur 33. Gemiddelde schelpdikte van mosselzaad van bodem, MZI en hatchery in beschermde en onbeschermde vakken na 26 dagen ($n=3$ met sd), behalve hatchery zaad, daar is $n=2$)



Figuur 34. Gemiddelde conditie index van mosselzaad van bodem, MZI en hatchery in beschermde en onbeschermde vakken na 26 dagen ($n=3$ met sd), behalve voor hatchery zaad, daar is $n=2$)

Conclusies

- De overleving van hatchery zaad is beter wanneer het beschermd is dan wanneer het onbeschermd is.
- Onbeschermd is de overleving van hatchery zaad vergelijkbaar met MZI zaad.
- Migratie van hatchery zaad is zeer variabel.
- De aanwezigheid van lege schelpen is zeer variabel bij hatchery zaad.
- De schelpdikte van het mosselzaad was toegenomen gedurende de periode van het experiment. Er was een grotere toename voor onbeschermd zaad. Hatchery zaad had een schelpdikte die vergelijkbaar was met MZI en bodemzaad.
- De conditie index van hatchery zaad was vergelijkbaar met MZI en bodemzaad.

Achtergrond grow-out: SHANGO perceel proef 2007

Doel van dit experiment was het volgen van het rendement van mosselzaad van verschillende oorsprong (hatchery, MZI of bodem) op een perceel in de Oosterschelde. In dit experiment is perceel 37a van de Roem van Yerseke in de Oosterschelde geselecteerd. Op gemarkeerde perceelgedelen werd mosselzaad verzaait dat afkomstig is uit het wild (de Waddenzee), van MZI's en uit de hatchery van Roem van Yerseke. Van het verzaaide zaad werd de overleving en groei gevolgd in de tijd. Daarnaast is een aantal factoren gemonitord die deze groei en overleving naar verwachting beïnvloeden.

Methode

Voor het experiment is het perceel geselecteerd op basis van een beschutte ligging (Fig. 35). Er is een ontheffing aangevraagd en verkregen bij de Provincie Zeeland. Mosselzaad is verzameld van wilde zaadbanken in de Waddenzee (32kg) en de MZI's van de Roem van Yerseke op de Voordelta (23kg) en de hatchery van Roem van Yerseke (7 kg). Zaad werd op woensdag 12 september bij zeer rustig weer uitgezaaid in het litoraal, op de LWL en in het sublitoraal, -1m t.o.v. de LWL.



Figuur 35. Perceel 37a van de Roem van Yerseke. De staken geven het zaaigebied aan. Te zien is dat er veel zeesla aanwezig was op het moment van uitzaaien van het zaad.

Het zaad was van verschillende oorsprong: hatchery, MZI en wild bodemzaad. Het bodemzaad was getrost, en het MZI zaad was een klein beetje getrost. Onder het MZI zaad was sterfte, waarschijnlijk door het oogsten en het transport. Het uitzaaien vond plaats in porties van 3kg op een cirkel met een diameter van 125cm. Hatchery zaad was minder beschikbaar en is daarom uitgezaaid in porties van 1kg op een cirkel met een diameter van 75 cm. In het litoraal zijn in totaal 15 plots uitgezaaid en in het sublitoraal 11. Daarnaast is er nog 15kg MZI zaad uitgezaaid over een oppervlakte van 3x3m en 2x 7kg wild bodemzaad op twee plots van 2x2m.

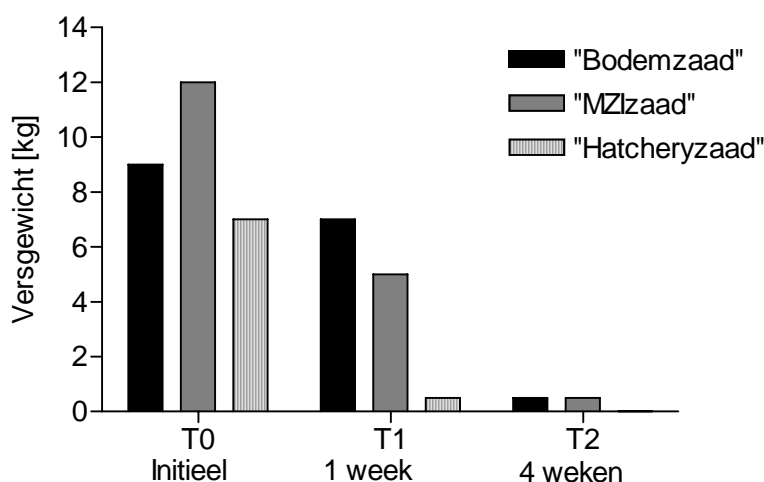
T0 was op 12 september	0 weken
T1 was op 18 september	1 weken
T2 was op 9 oktober	4 weken

De sedimentatiesnelheid en stroomsnelheid zijn gemeten en gerelateerd aan de groeisnelheid en overleving van het zaad. Om de sedimentatiesnelheid te bepalen zijn zogenaamde sediment-catchers geplaatst. Ingevangen sediment is gedroogd en gewogen. Voor het bepalen van de maximale stroomsnelheid werd gebruik gemaakt van imitatiemossels met verschillende dichtheden. Het al dan niet verplaatsen van de imitatiemossels door stroming hangt af van de stroomsnelheid.

Resultaten

Mosselzaad

Figuur 36 laat zien dat bodemzaad beter presteerde in vergelijking tot MZI zaad. Na één week was, ondanks het rustige weer erg veel mosselzaad van de plots verdwenen. Het bodemzaad laat de minste verliezen zien. Van het grote plot (15kg) MZI zaad was een patch over van ongeveer 3kg. Het hatchery zaad was bijna volledig verdwenen. Van de grote plots bodemzaad (7 kg) was één plot nog aardig vol zaad (5kg). De andere was dood door bedekking met zeesla (*Ulva* spp.). Ditzelfde zagen we in het sublitoraal, waar het merendeel van de plots verdwenen was. Van de overige plots was >95% bedekt met zeesla. Alleen van het bodemzaad was ook in het sublitoraal nog wat terug te vinden. De ruim ingezaaide plots waren veranderd in kleine patches van dicht samengepakte mosselen. De mosselen hadden veel materiaal (schelpen, etc.) uit hun omgeving in de mosselbank(jes) verwerkt. Op T1 zijn geen monsters genomen omdat de verliezen reeds groot waren. Na vier weken waren alleen nog kleine hoeveelheden bodemzaad en MZI zaad terug te vinden. Het MZI zaad dat in het experiment is gebruikt had een bredere grootteklasse verdeling en was gemiddeld groter dan de andere twee zaad typen (Fig. 37). Op T2 is het resterende mosselzaad bemonsterd. De grootteklasse verdeling van het resterende bodem- en MZI zaad had een gemiddelde lengte van 18mm. Voor het bodemzaad is er geen verschil met de T0, voor het MZI zaad is duidelijk dat alle grotere klassen waren verdwenen. Op T0 was de conditie van het MZI zaad significant hoger dan dat van het MZI zaad (Fig. 38). Hatcheryzaad en bodemzaad verschilt niet van elkaar. Op T2 was de conditie van het zaad significant (One Way ANOVA) toegenomen t.o.v. de initiële monsters. Bodemzaad en MZI zaad verschilden niet meer van elkaar.



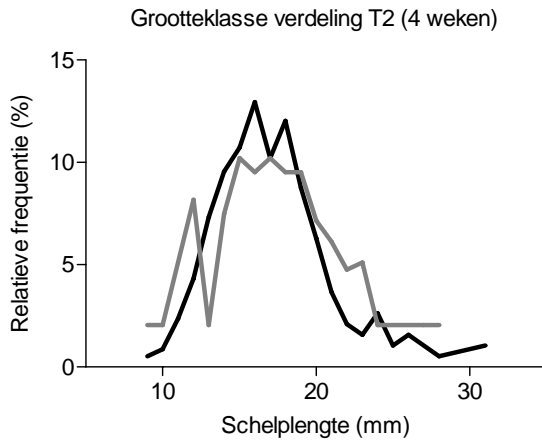
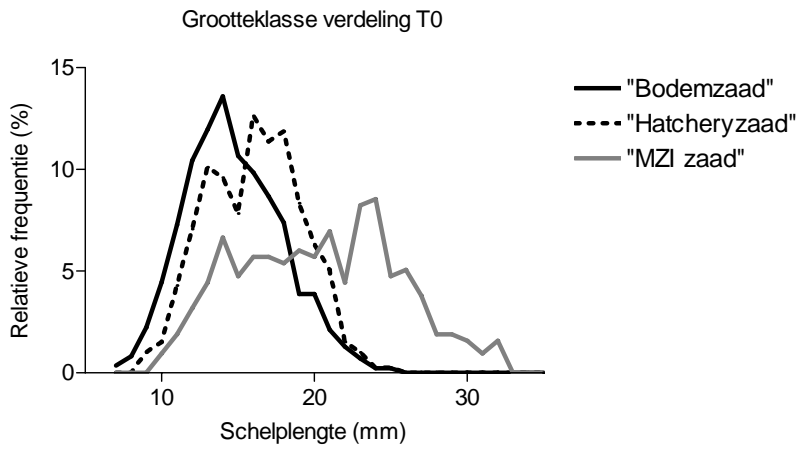
Figuur 36. Versgewicht van totale hoeveelheid mosselzaad van verschillende oorsprong op experimentele plots in het litoraal, na 0, 1 en 4 weken.

Predatie

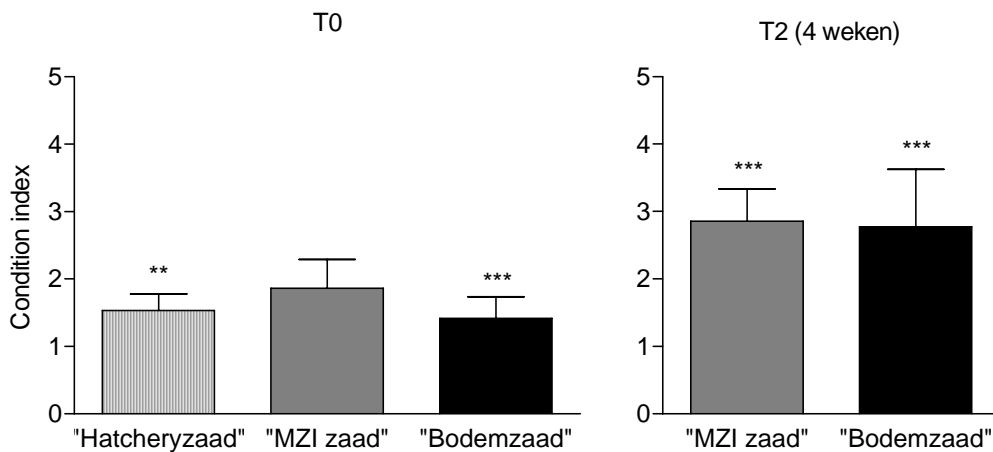
Na drie weken waren er in het litoraal geen tekenen van predatie. In het sublitoraal daarentegen zijn duidelijk sporen van activiteit van grote krabben gevonden. Tijdens de T1 zijn geen zeesterren aangetroffen.

Sedimentatie en stroomsnelheid

Op T1 was er geen sprake van sedimentatie in de sedimentcatchers. Om de mate van turbulentie te schatten zijn op T0 schijven van verschillende dichtheid in het veld geplaatst. Echter, op T0 waren alle schijven nog in hun oorspronkelijke positie, i.e. de golfslag was zeer beperkt. Op T2 lagen alleen de schijven met de hoogste dichtheid nog op hun plaats, hetgeen indicatief was voor een matige golfslag (niet nader gekwantificeerd).



Figuur 37. Grootteklasse verdeling van bodemzaad, MZI zaad en hatchery zaad; initiële monsters (boven) en op T2 (onder).



Figuur 38. De conditie index van het mosselzaad (drooggewicht / lengte tot de derde macht) van de verschillende zaadtypen op T0 (rechts) en de conditie index van het mosselzaad van de resterende zaadtypen op T2 (links).

Discussie

Het experiment was bedoeld om een aantal maanden te duren. Het feit dat het na vier weken is afgerond geeft aan dat het niet verliep zoals gehoopt was. De grote verliezen waren niet veroorzaakt door de stroming, golfslag of predatie. Het was heel duidelijk dat het invangen van zeesla tot verstikking van de mossel leidde. Bovendien spoelde veel mosselzaad weg juist doordat het aan grote stukken zeesla hechtte. Dit proces was tijdens de T0 duidelijk waarneembaar. Tijdens de T1 werd duidelijk dat de accumulatie van zeesla en andere wieren leidde tot verstikking, i.e. zuurstofloosheid en sulfaatreductie. Bodemzaad liet minder grote verliezen zien dan MZI zaad en hatchery zaad het meest. Dit was gerelateerd aan de mate van getrostheid. Bodemzaad was sterk getrost en MZI zaad matigen het hatcheryzaad was niet getrost, omdat het de ochtend van de T0 van het substraat (net) was verwijderd. Getroste mossels hebben veel minder de neiging om zich aan nieuw substraat te hechten (in dit geval zeesla). De mate van getrostheid bepaalde dus in sterke mate hoeveel zeesla er accumuleerde. Bovendien spoelen kleine trossen en individuele mosselen sneller weg dan grote trossen. De sterk toegenomen conditie van het mosselzaad gedurende vier weken suggereert dat de waterkwaliteit (voedselaanbod) niet de oorzaak was van grote verliezen.

Proef perceel Koninklijke Prins & Dingemansse

Een tweede growout experiment in 2007 betreft doorgroei aan bestaande MZI netten.

Net is opgehangen in juli 2007, aan reeds 1 x geogost netwerk van MZI KPD in Malzwin.

Mosselzaad is niet of nauwelijks door gegroeid, mogelijk re-settlement of mortaliteit door transport (2,5 uur).

Na 1 maand waren de mazen ook begroeid met *Ulva* sp.

Geen oogst mogelijk, slechts deze lengte bepaling eind september.

12,5	
11,4	
14,5	
9,7	
4,5	
10,6	
6,8	
6,5	
4,9	
12,6	
12,1	
19,4	
8,7	
7,9	
6,9	
8,7	
8,2	
4,6	
6,9	
8,9	
11,4	
12,5	
19,6	
9,99	AVG
4,09	STDEV



Mosselzaadinvang Koninklijke Prins & Dingemansse

Proef growout proef percelen in 2008

In 2008 is in eigen beheer, na sluitingsdatum 1 juni 2008, nog een aanvullend experiment uitgevoerd op het perceel de Vlieter 110 van Koninklijke Prins & Dingemanse in de Waddenzee. Op 6 augustus is mosselzaad uit de hatchery/nursery van de Roem van Yerseke tezamen met MZI zaad op het perceel uitgezaaid. Nabij het perceel zijn predatie beschermingsmiddelen (krabben potten) opgesteld. Tabel 10 laat zien hoe groot de plots waren, en hoeveel liter zaad en hoeveel liter schelpen zijn uitgezaaid.

Tabel 10. Zaaidichtheden grow-out experiment 2008.

plot nummer	type zaad	m2	zaad (L)	schelpen (L)	verhouding
1	MZI	3	30	0	1:0
2	MZI	3	30	30	1:1
3	MZI	3	30	60	1:2
4	MZI	3	30	90	1:3
5	Hatch groot	6	60	60	1:1
6	Hatch klein	1	10	20	1:2

Een uur na het zaaien ligt het MZI zaad redelijk vast aan elkaar en aan schelpjes. Het grote hatchery zaad klit aan elkaar, maar niet aan schelpen. Het kleine hatchery zaad klit niet aan elkaar en ook niet aan schelpen, en een deel stroomt weg. Op 13 augustus (na een zomerstorm) zijn de markeringen van de plots weg en is het zaad voor een deel onder of weggespoeld. De meeste mosselen zijn nog aanwezig op plot 3 en 4 (de hoogste schelpen zaaidichtheid). Al het hatchery zaad is verdwenen. Dit heeft tot gevolg dat er aan de 2006 en 2007 data geen nieuwe informatie over de ontwikkeling van hatchery zaad op percelen toegevoegd kan worden.

Achtergrond SHANGO upweller proef 2007

Doel van dit experiment was het volgen van de groei van mosselbroed in de grow-out fase in een down-weller en een up-weller op het land in vergelijking met hangcultuur in het veld.

Methode

Mossellarven zijn geproduceerd in de experimentele hatchery van IMARES. Deze larven zijn opgekweekt tot broed en vervolgens overgebracht in een down-welling systeem in de nursery en daarna in een up-weller in de buitenlucht (Fig. 39). Het broed kreeg als dieet *Phaeodactylum tricornutum*. Deze alg werd in grote buitentanks van 2000 liter gekweekt als semi-continu cultuur (Fig. 39). Er werd gevoerd met een voedingsratio van 0.4 (Helm et al, 2004). Dit houdt in dat per week 0.4 mg drooggewicht aan algen per mg nat gewicht aan mosselen werd gevoerd. Daarnaast werd de concentratie aan algencellen op respectievelijk 65.000 cellen per ml in de down-weller en 100.000 cellen per ml in de up-weller gehouden.

De proef in de down-weller werd gestart op 5 maart met zaad van 9 mm. Het begin gewicht van de totale hoeveelheid mosselzaad was 525 gram. Op 20 april werd het broed overgeplaatst naar de up-weller. Vanaf 27 april een deel verplaatst naar een kooi in het buitenwater (Fig. 40). Iedere 1-3 weken werd het broed in de down- of up-weller en de kooi, opgemeten en zijn de zeven dan wel kooien schoongemaakt. Om aan de voedselbehoefte van het groeiende gewicht aan zaad te kunnen blijven voldoen is nog drie maal (op 12 april, 20 april en 16 juli) de helft van het zaad in de up-weller verplaatst naar kooien in het buitenwater. Op 2 november is de proef in de up-weller beëindigd en op 5 november in het buitenwater.

Resultaten

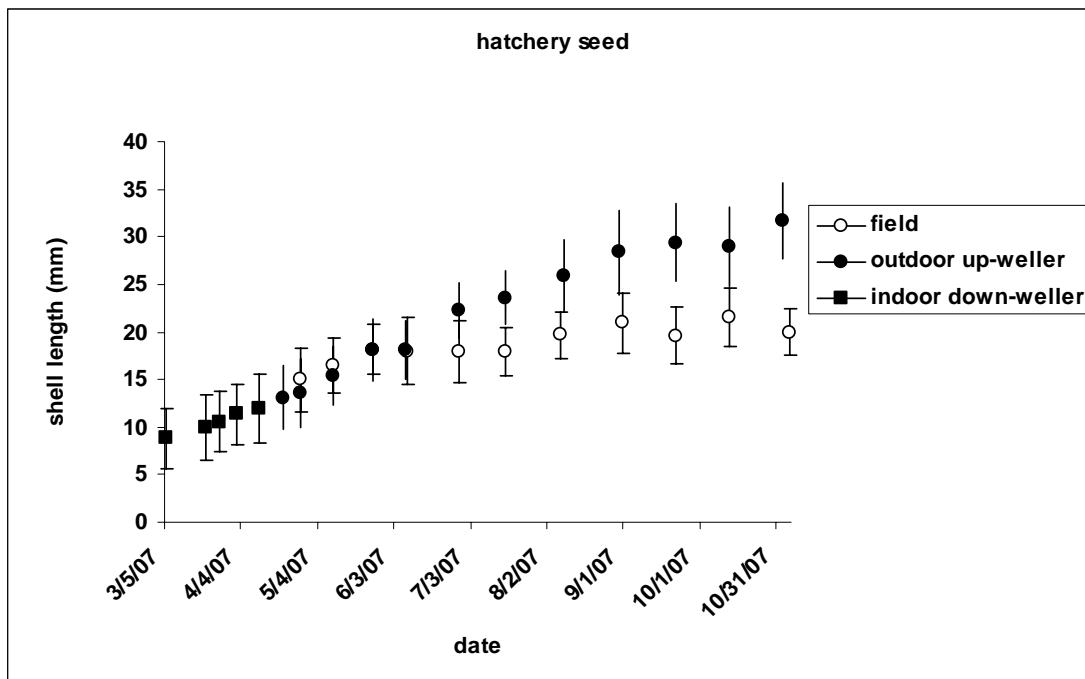
In het totaal is in de periode van 5 maart tot en met 2 november is 69.200 liter *Phaeodactylum* met gemiddelde concentratie van 1.6 miljoen cellen per ml gevoerd aan de down- en up-weller. Het zaad is in die periode gegroeid van 9 mm naar 30 mm (Fig. 41). Het zaad in de up-weller werd significant groter dan in de kooi in het veld (Fig. 3, t-test, $P < 0.05$). Wanneer gecorrigeerd wordt voor het opsplitsen is het zaad in de down- en up-weller in gewicht toegenomen van 525 mg op 5 maart naar 5775 mg op 21 september (Fig. 42



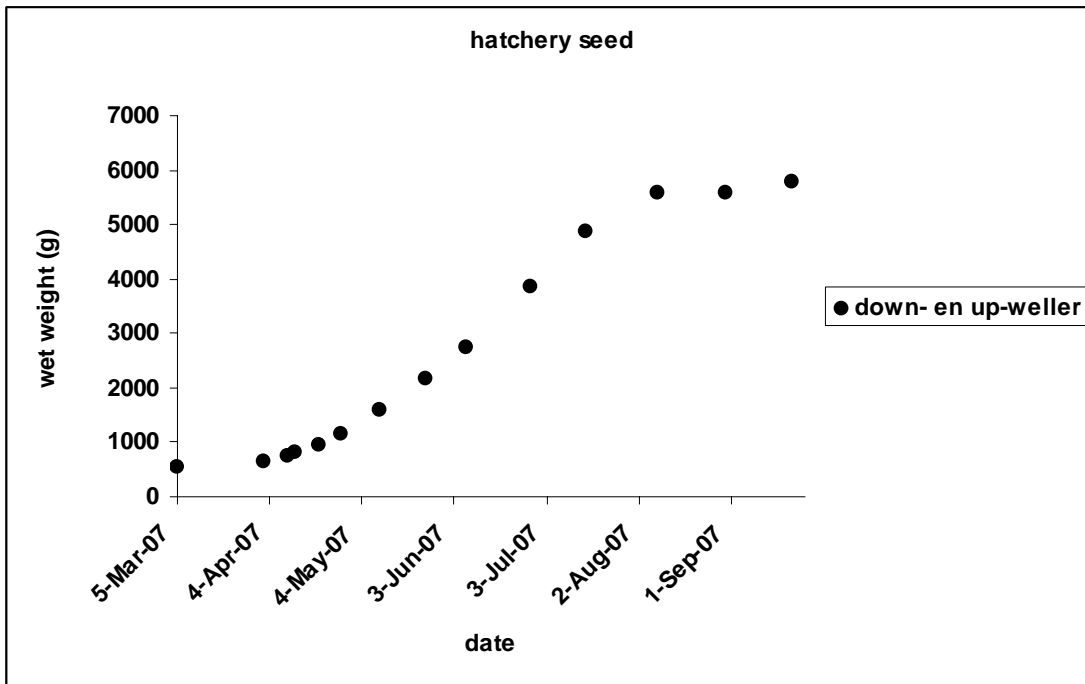
Figuur 39. Down-weller (boven) en up-weller (beneden) gekoppeld aan *Phaeodactylum* cultuur.



Figuur 40. Locatie van de kooi aan het ponton van de reddingsboot bij de stormvloedkering.



Figuur 41. Schelpenlengte van hatchery zaad in een up-weller op het land en in een kooi in het veld.

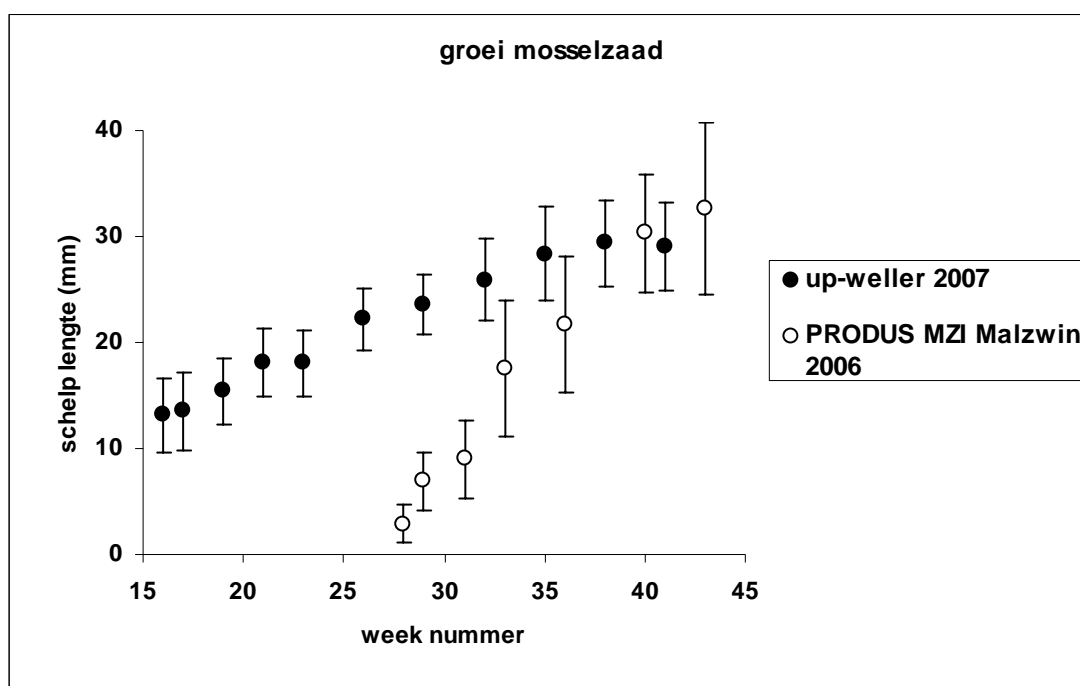


Figuur 42. Gewicht van het zaad. Op 12 april, 20 april en 16 juli is de helft van het zaad verwijderd, maar hier is voor gecorrigeerd door het gewicht daarna met respectievelijk 2, 4 en 8 te vermenigvuldigen.

Discussie

Uit de resultaten blijkt dat het zaad op het land sneller groeide dan het zaad in de kooi. Dit kan verschillende oorzaken hebben. (1) De hoeveelheid beschikbaar voedsel was groter in de down- en up-weller dan in de kooi in het buitenwater. In de monding van de Oosterschelde varieert de celdichtheid aan algen van ongeveer 1.200 tot 35.000 cellen per ml (Koeman et al, 2005), terwijl in de opstelling een concentratie van 65.000-100.000 cellen per ml werd aangehouden. (2) De opname van voedsel werd belemmerd in het buitenwater door aangroei van de kooien. Wanneer we de resultaten van de groei op het land vergelijken met groeigegevens van MZI zaad uit het PRODUS project is te zien dat mosselzaad veel sneller kan groeien aan een MZI (Fig. 43).

Concluderen kan worden gesteld dat grow-out van mosselzaad tot halfwas op het land mogelijk is, maar dat er veel algen voor nodig zijn. Dit laatste kan echter nog minder worden bij optimalisatie.



Figuur 43. Schelp lengte van hatchery zaad in een up-weller op het land en MZI zaad aan een net in het Malzwin.

Achtergrond SHANGO upweller proef 2008

Doel van dit experiment was het volgen van de groei van mosselbroed in de grow-out fase in een up-weller bij de hatchery van de Roem van Yerseke. Drie inzet gewichten van het zaad en het gebruik van het INVE dieet MySpat zijn getest.

Methode

Voor het experiment is gebruik gemaakt van een mix van hatchery zaad dat aanwezig was in de nursery van Roem van Yerseke en hatchery zaad dat een periode uitgegroeid is aan een net in de Oosterschelde (zie figuur 44). Het zaad werd verdeeld in drie hoeveelheden (16.6 kg, 11.0 kg en 8.6 kg) en iedere hoeveelheid werd apart in een cilinder met een diameter van 70 cm geplaatst. De up-weller bestond uit een bak waarin de drie cilinders met gazen bodem zijn geplaatst. Het water werd vanuit een verzamelbak naar de bak met de cilinders gepompt, waarbij het water via de gazen bodem naar een uitlaat stroomde en weer terug naar de verzamelbak (zie figuur 45). Bij de proef werd het zaad gevoerd met water dat werd aangevoerd uit de hatchery. De eerste proef startte op 28 mei en duurde tot 11 juni. Op 18 juni is het zaad herverdeeld over de drie cilinders (11.4 kg, 9.5 kg en 7.1 kg). Bij deze tweede proef werd het zaad gevoerd met water dat werd aangevoerd uit de hatchery aangevuld met INVE MySpat dieet (tweemaal per dag 200 gram). Deze

proef startte op 18 juni en duurde tot 9 juli. Bij beide proeven werd een maal per week van een sub monster per cylinder het versgewicht van de mosselen en de lengte van de mosselen bepaald. Uit deze versgewichten en lengtes zijn groeisnelheden berekend met de volgende formule: $[(\ln \text{ lengte of gewicht op } t_x - \ln \text{ lengte of gewicht op } t_0) / \text{aantal dagen } x] * 100$ (Clausen & Riisgard, 1996). Daarnaast werd drie maal per week de temperatuur, het zuurstofgehalte en het aantal deeltjes in het water bepaald in de toevoer van de hatchery, de verzamelbak, de up-weller buiten de cilinders en in de drie cilinders.

Resultaten

De mosselen uit het experiment zonder MySpat dieet lieten alleen een toename in schelpenlengte zien bij het laagste inzet gewicht, maar wel een toename in versgewicht voor alle laag dikten zien (Fig. 46, 47 en tabel 6). Opvallend is dat bij het laagste inzet gewicht de kleine mosseltjes na een week waren verdwenen (Fig. 47b). Er werd geen significant effect van inzet gewicht gevonden. De temperatuur fluctueerde tussen de 18.6 en 22.2°C en vertoonde geen consistente verschillen tussen de monster locaties (Fig. 48). Het zuurstof gehalte fluctueerde tussen 6.8 en 8.0 mg/l en was over het algemeen het laagst bij het hoogste inzet gewicht (Fig. 48). Het aantal deeltjes per ml varieerde tussen 10 en ruim 2000 per ml (Fig. 48). De up-weller had over meestal een hogere dichtheid dan de verzamelbak.

Tabel 6. Groeisnelheden van mosselzaad bij verschillende inzet gewichten en met en zonder MySpat dieet.

inzet gewicht (kg) test 1		8.6	11.0	16.6
groeisnelheid in lengte zonder MySpat (% per dag)	IMARES	0.77	-0.58	-0.36
groeisnelheid in gewicht zonder MySpat (% per dag)	IMARES	2.61	3.34	3.40
inzet gewicht (kg) test 2		7.1	9.5	11.4
groeisnelheid in lengte met MySpat (% per dag)	INVE	0.61	0.59	0.43
	IMARES	0.64	0.78	0.64
groeisnelheid in gewicht met MySpat (% per dag)	INVE	1.35	1.47	1.26
	IMARES	1.36	1.17	1.07

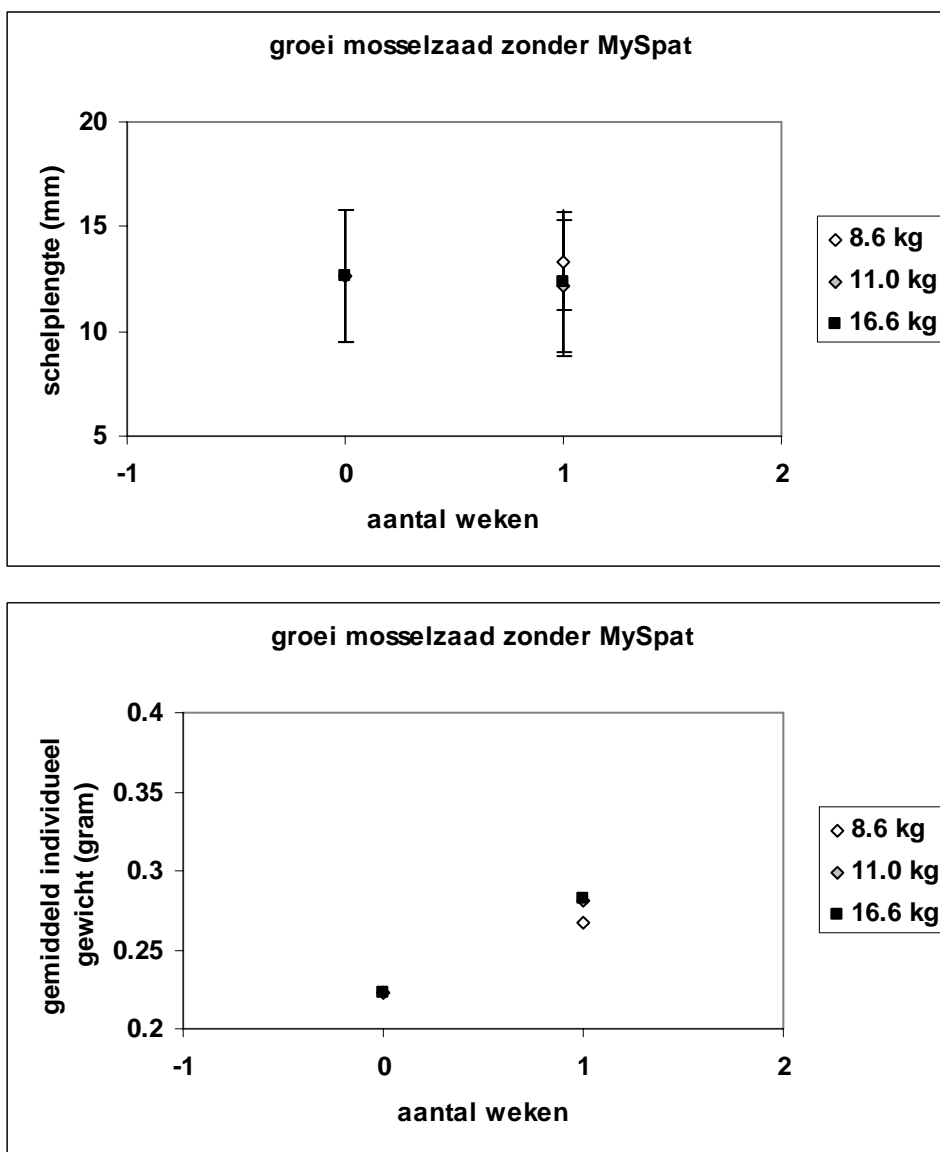
Zaad dat MySpat werd gevoerd toonde een toename in lengte en gewicht (Fig.49, 50 en tabel 6). Er werd geen effect van inzet gewicht gevonden. De temperatuur fluctueerde tussen de 18.2 en 22.8 °C (Fig. 51). De toevoer had over het algemeen de laagste temperatuur en de verzamelbak de hoogste. Het zuurstof gehalte fluctueerde tussen 6.0 en 8.1 mg/l (Fig. 8). De up-weller en de verzamelbak hadden meestal de hoogste waarden. Het aantal deeltjes per ml varieerde tussen 80 en 3000 per ml (Fig.51). Ook in deze proef had de up-weller meestal een hogere dichtheid dan de verzamel bak.



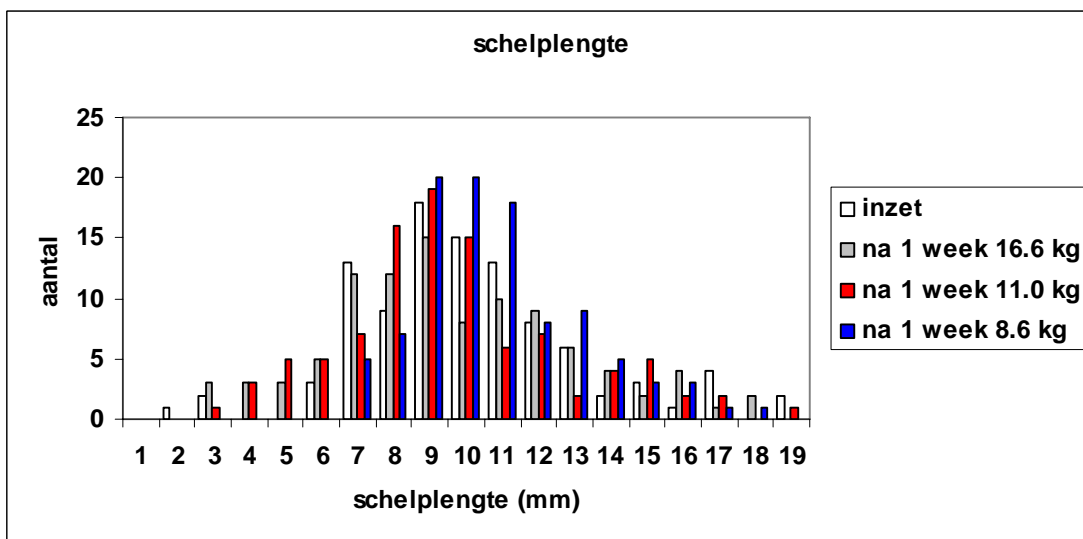
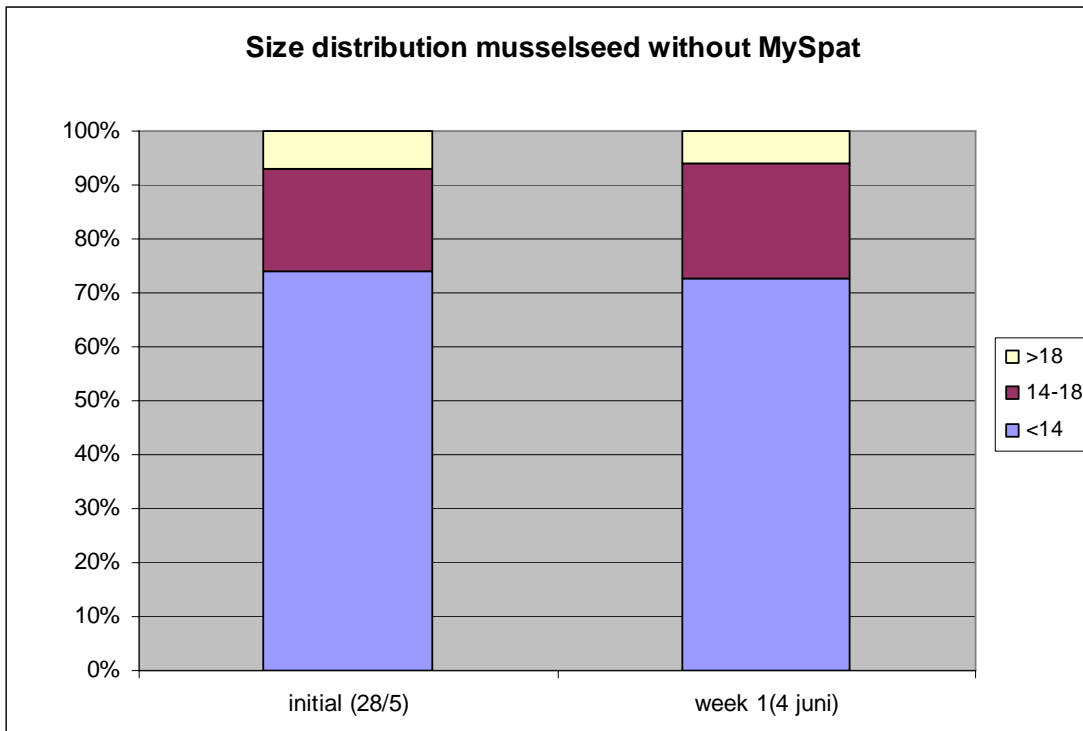
Figuur 44. Hatchery zaad dat aan een net is uitgegroeid bij het begin van test 1.



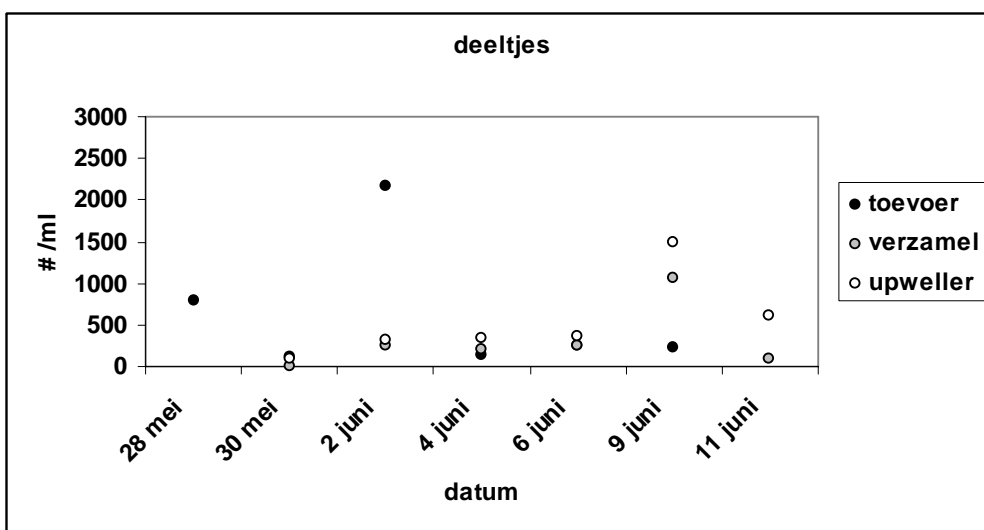
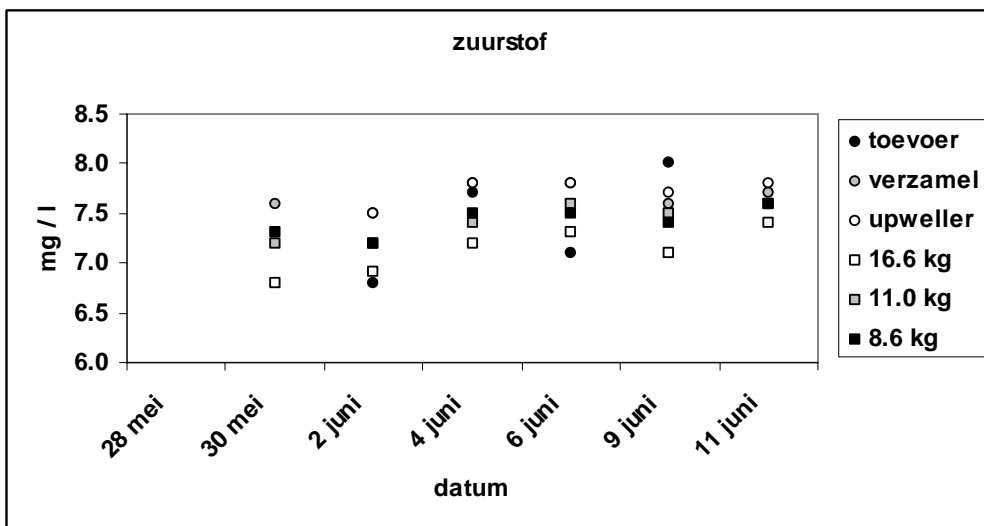
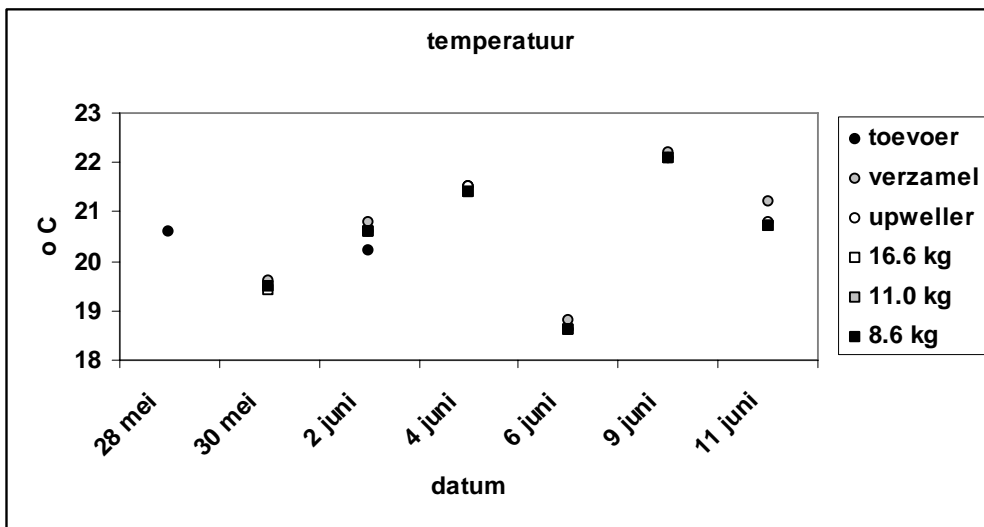
Figuur 45. Up-weller met drie cylinders (links) en verzamel bak (rechts) met up-weller op de achtergrond.



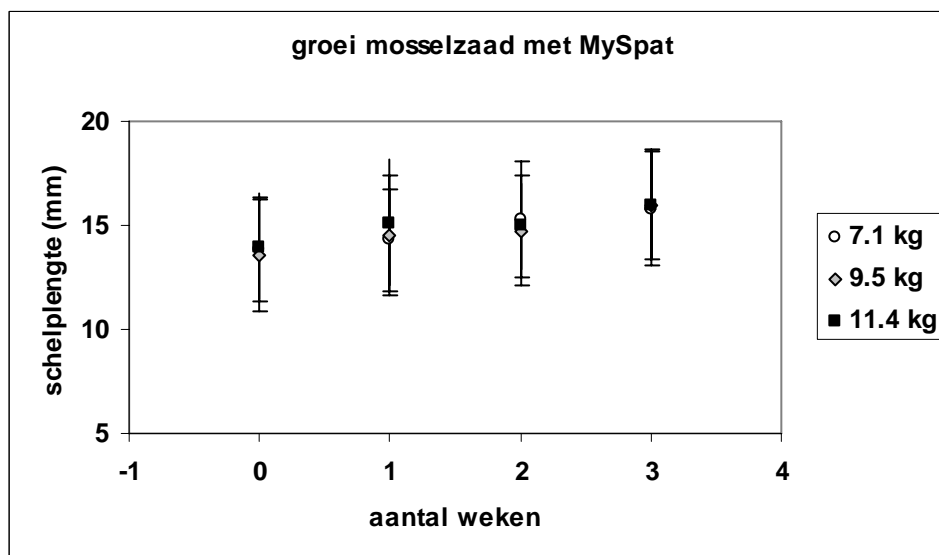
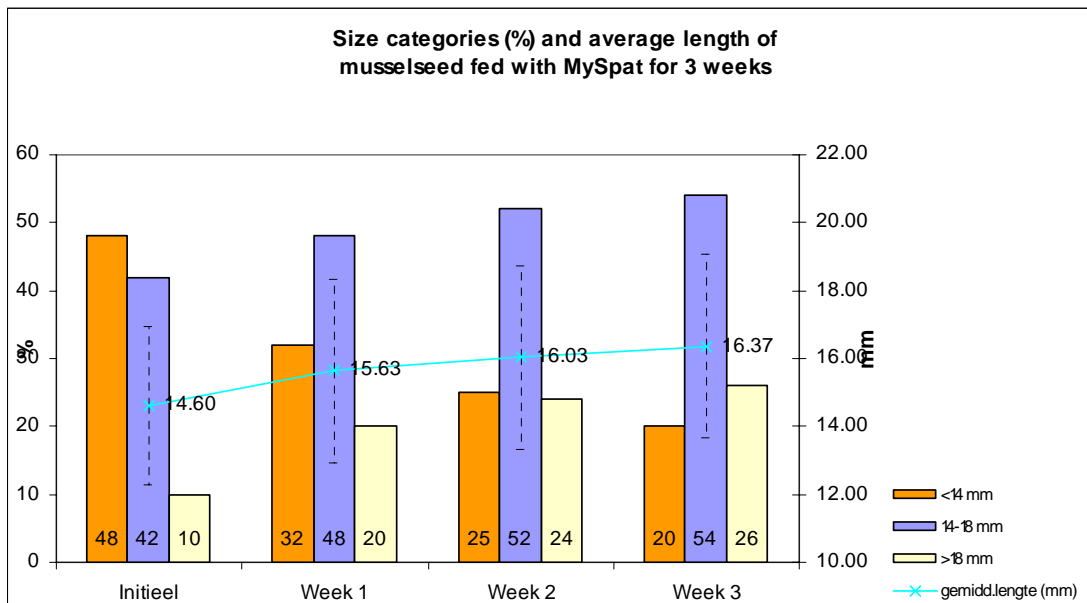
Figuur 46. Schelpenlengte en gewicht van hatchery zaad in test 1 bij drie verschillende inzet gewichten in een up-weller op het land.



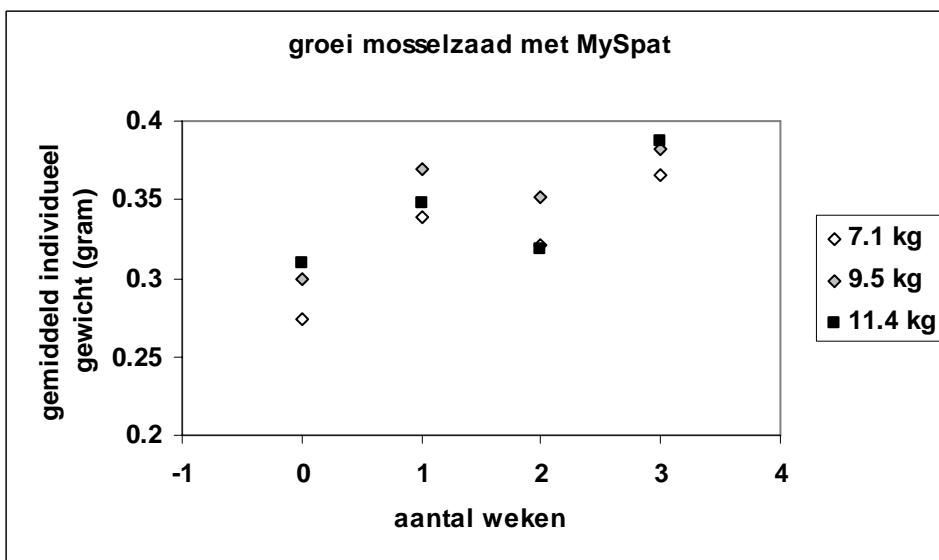
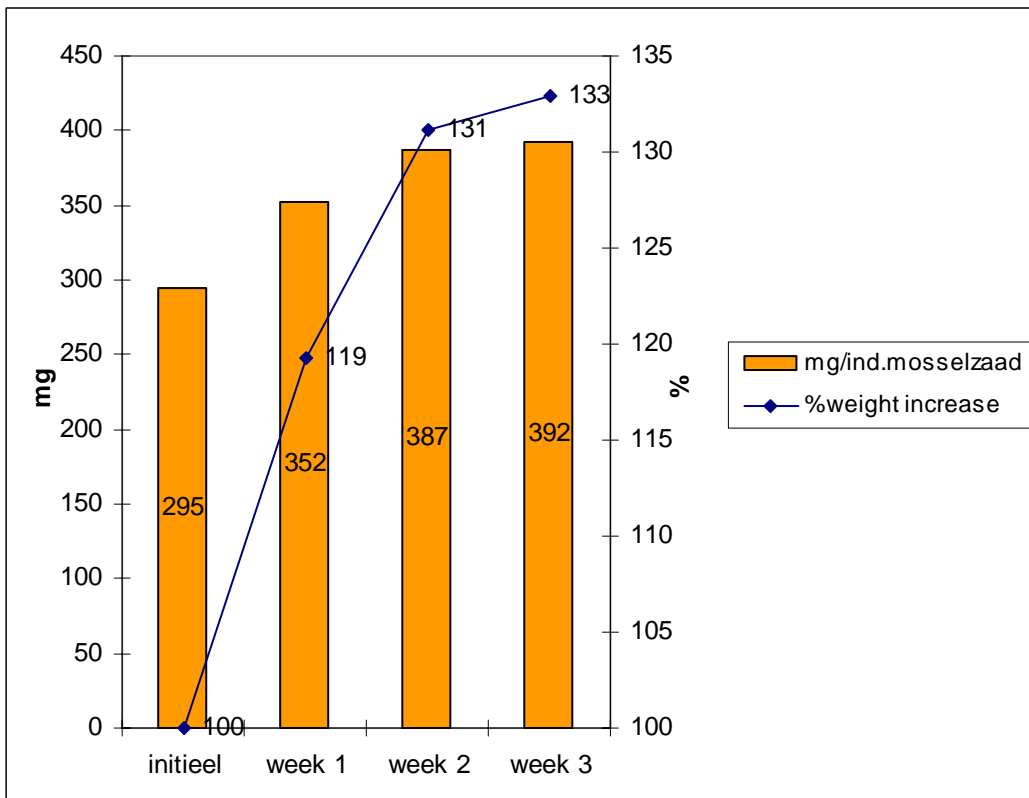
Figuur 47. Lengte verdeling hatchery zaad van test 1 (a) onderverdeeld in drie categorieën voor alle drie de cilindres samen en (b) in mm klassen voor de drie cilindres apart.



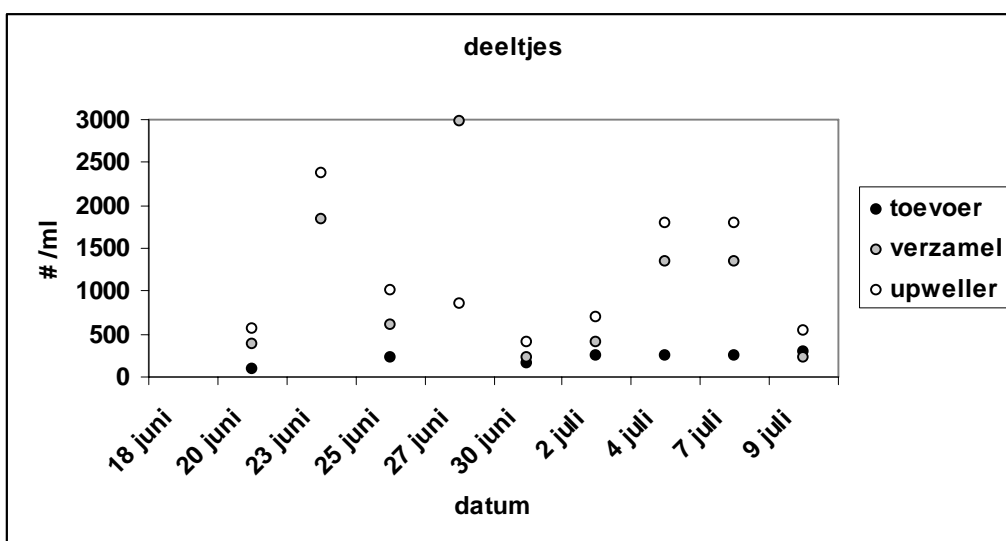
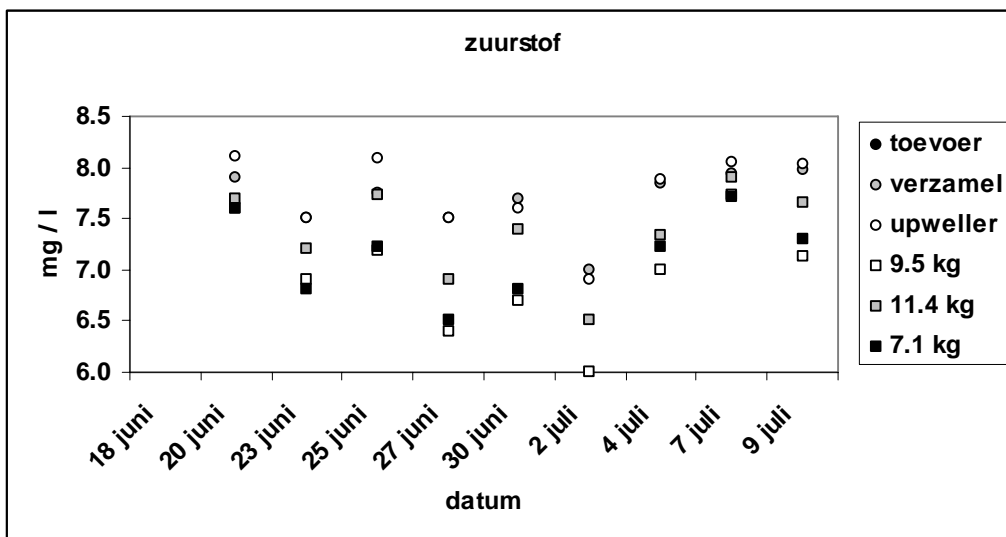
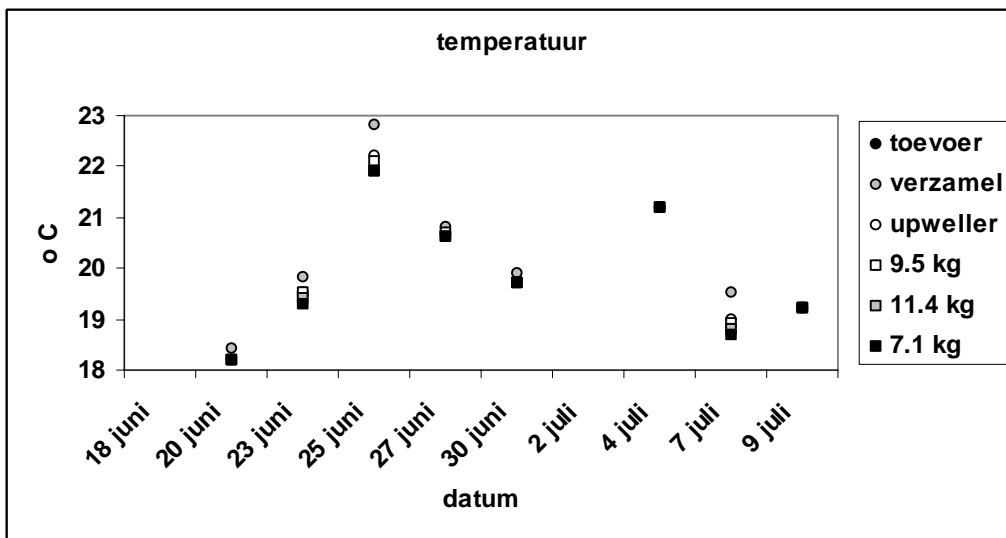
Figuur 48. Temperatuur, zuurstof en aantal deeltjes in het water op drie locaties in test 1.



Figuur 49. Schelplengte van hatchery zaad in test 2 bij drie verschillende inzet gewichten in een up-weller op het land (a) voor alle drie de cylinders samen en (b) voor de drie cylinders apart.



Figuur 50. Gewicht van hatchery zaad in test 2 bij drie verschillende inzet gewichten in een up-weller op het land (a) voor alle drie de cilindres samen en (b) voor de drie cilindres apart.



Figuur 51 Temperatuur, zuurstof en aantal deeltjes in het water op drie locaties in test 2.

Discussie

Uit de resultaten blijkt dat de mosselen groeisnelheden in gewicht tot 3.4% per dag en in lengte tot 0.8 % per dag behalen. De lengte groei kan worden vergeleken met gegevens van MZI mosselen. In de Waddenzee werden in 2006 groeisnelheden tot 3.6% behaald (Kamermans et al, in prep). Dit geeft aan dat de up-weller nog geen optimale groei opleverde. De meest waarschijnlijke oorzaak is dat het aanbod van algen laag was. Het aantal deeltjes was nooit hoger dan 3000 per ml. In het buitenwater varieert de celdichtheid aan algen van ongeveer 1.200 tot 35.000 cellen per ml (Koeman et al, 2005).

In de eerste proef werd een afname in schelpenlengte en een toename in gewicht van het zaad gevonden. Dit zijn tegenstrijdige resultaten die alleen verklaard kunnen worden doordat om een onbekende reden bij het eerste monster uit het subsample voor gewicht relatief meer grote mosselen zijn opgemeten. Een effect van inzet gewicht van het zaad werd niet gevonden in deze proef. Ook de tweede proef liet geen effect van inzet gewicht op de groei zien. Hierbij dient te worden opgemerkt dat de range aan inzet gewichten veel kleiner was (7.1-11.4 kg) dan in de eerste proef (8.6-16.6 kg).

De huidige resultaten kunnen geen uitsluitel geven over het effect van toevoeging van MySpat in vergelijking met toevoeging van alleen algen, omdat de beide tests niet gelijktijdig zijn uitgevoerd. De mosselen in test 2 (met MySpat) zijn beter gegroeid dan in test 1 (zonder MySpat). Deze vergelijking is echter gebaseerd op een korte reeks zonder MySpat, waarbij het algen aanbod zeer laag was en een afname in schelpenlengte wijst op een bemonsteringsprobleem.

Concluderen kan worden gesteld dat groei in een up-weller met een begin gewicht van 16.6 kg per cilinder mogelijk is. Voor het bereiken van goede groei van mosselen zal het voedsel aanbod moeten worden verhoogd.

4.5.2 Protocollen growout upweller/percelen

Transport

De methoden zijn nog onvoldoende uitgewerkt om te kunnen resulteren in standaard protocollen.

4.6 Technisch/economische beschouwing

De kostprijs van het product moet voldoende laag zijn om verdere economisch rendabele exploitatie van de hatchery te waarborgen. Reeds bestaande commerciële kwekerijen van schelpdieren in andere delen van de wereld illustreren dat dit in principe moet kunnen. Met behulp van een model is een inschatting gemaakt van de productiekosten van hatchery zaad bij een productie van 500 miljoen stuks per jaar. Hierbij is uitgegaan van ervaringen die tot nu toe zijn opgedaan. Deze kosten zijn vergeleken met kosten van huidige zaadwinning methoden zoals visserij en mosselzaadinvang (MZI).

Het model bestaat uit verschillende onderdelen:

1. Biologische sleutelvariabelen
2. Investeringskosten
3. Operationele kosten

Tabel 12 tot en met 14 geven de waarden aan die in het model zijn gebruikt. Tabel 15 geeft de kostprijs zoals uitgerekend door het model. Hierin staan ook gegevens van twee commerciële mossel hatcheries en een recent EU project (BLUE SEED) waar IMARES coördinator van was.

Tabel 7. Biologische sleutelvariabelen zoals gebruikt in het model. Bij de hoeveelheid algen is uitgegaan van een Isochrysis cultuur van 8 miljoen cellen per ml voor de larven en een gebaseerd op Phaeodactylum cultuur van 5 miljoen cellen per ml voor het broed en zaad.

Biologische sleutelvariabelen	
productie capaciteit (kg per jaar)	60000
aantal batches per jaar	12
aantal larven per ouderdier	2500000
overlevingspercentages bij 17°C (%)	
<i>embryo tot D-larve</i>	<i>80%</i>
<i>D-larve tot vestiging</i>	<i>48%</i>
<i>vestiging - 10 mm broed</i>	<i>70%</i>
totale overleving (embryo tot 10 mm broed)	27%
duur van teelt bij 17°C (dagen)	
<i>embryo tot D-larve</i>	<i>3</i>
<i>D-larve tot vestiging</i>	<i>20</i>
<i>vestiging - 10 mm broed</i>	<i>85</i>
totale duur (embryo tot 10 mm broed)	108
hoeveelheid algen (aantal l per miljoen dieren)	
<i>embryo tot D-larve</i>	
<i>D-larve tot vestiging</i>	0.50
<i>vestiging - 10 mm broed</i>	6000

Technisch-economische berekening

Voor de technisch-economische berekening wordt uitgegaan van de aanwezig zijnde locatie en gebouwen. De in de tabel aangegeven kosten betreffen de benodigde aanpassingen. Met betrekking tot de benodigde arbeidskosten is uitgegaan van 3 fte op jaarbasis voor het runnen van de hatchery/nursery en voor 2 fte voor de growoutpercelen.

Tabel 8. Investeringskosten.

investeringskosten	
locatie	€20,000
gebouw	€300,000
kweek tanken	€20,000
water systeem (pompen en behandeling)	€40,000
water (toevoer en afvoer), licht	€10,000
verwarming	€10,000
algen productie	€50,000
lab en kantoor	€5,000
vergunningen, inspecties	€25,000
onvoorzien	€20,000
totaal	€500,000

Tabel 9. Operationele kosten.

operationele kosten	
broedstock	€30
arbeid	€2,500,000
electriciteit, water, telefoon	€73,000
nutrienten voor algen	€8,400,000
onderhoud	€3,500
klein materiaal	€7,000
vervoer	€2,470
verzekering	€14,000
onvoorzien	€1,000,000
totaal	€12,000,000

Tabel 10. Uitkomst van de modelberekening vergeleken met twee commerciële mossel hatcheries en gegevens uit het BLUE SEED project.

type zaad	bron van informatie	soort	grootte zaad (mm)	prijs per 1000 zaad	gewicht van 1000 zaad (gram)	# per kg	prijs per kg zaad
hatchery zaad	SHANGO project	<i>Mytilus edulis</i>	5	€3.28	0.0179	55776	€ 182.67
hatchery zaad	SHANGO project	<i>Mytilus edulis</i>	10	€6.31	0.1044	9580	€ 60.48
hatchery zaad	IAP, Canada	<i>Mytilus galloprovincialis</i>	8	€7.45	0.0592	16892	€ 125.84
hatchery zaad	Shellfish Culture Hatchery, Australia	<i>Mytilus edulis</i>	4	€1.65	0.0102	98343	€ 162.27
hatchery zaad	BLUE SEED project	<i>M. edulis & galloprovincialis</i>	5	€7.71	0.0179	55776	€ 430.03
MZI zaad	BLUE SEED project	<i>Mytilus edulis</i>	5				€ 1.35
gevist zaad	BLUE SEED project	<i>Mytilus edulis</i>	5				€ 0.31

Uit de vergelijking blijkt dat hatchery zaad een lagere prijs heeft dan de twee commerciële hatcheries, maar een stuk duurder is dan MZI of gevist zaad (ruim 60 euro tegen 1.35 of 0.31 euro). Naarmate het zaad groter is, is de prijs per kg lager omdat er minder individuen per kg nodig zijn. De twee genoemde commerciële hatcheries leveren zaad voor hangcultuur en verkopen altijd per aantal en niet per kg. Bovendien leveren zij in gebieden waar geen natuurlijke broedval van mosselen is en waar het product meer opbrengt dan in Nederland. Het verschil in prijs met de BLUE SEED schatting wordt veroorzaakt door een ander formaat zaad (10 mm i.p.v. 5 mm), en enkele andere aannamen voor de biologische randvoorwaarden (betere overlevingswaarden, meer larven per ouderdier, meer batches per jaar en meer productie per jaar). Een mogelijke kostenbesparing zou kunnen zijn om de larven direct na vestiging op bijv. touwen of netten naar buiten te brengen en in een MZI-installatie.

5. Conclusies

Algemeen

In de project periode 2006-2008 is het gelukt om de ambitie te realiseren voor een hatchery productie van minstens 500 miljoen mosselbroed. Echter het is (nog) niet gelukt hiervan voldoende zaad levensvatbaar te krijgen op de percelen. Op kleine schaal is door middel van het nemen van beschermende maatregelen op de percelen wel aangetoond dat de growout met een factor twee is te verbeteren. Opschaling van dergelijke maatregelen tegen predatie, migratie en wegspoelen is praktisch (nog) niet haalbaar. De hatchery resultaten zijn gehaald en kunnen indien gewenst verder opgeschaald worden. Maar de zwakste schakel in de keten zijn de nursery-growout experimenten gebleken. Deze zijn sterk achtergebleven en hebben niet tot de oplossingen geleid waarmee een rendabele productie van schelpdierbroed gerealiseerd kan worden. Het belangrijkste knelpunt is dat de afweging om tot een goede overleving van het zaad op de percelen te kunnen komen, deze zo lang mogelijk in de nursery (kinderkamer) te houden, maar hiervoor zijn zeer grote hoeveelheden algen nodig. Maar dit soort kweeksystemen zijn commercieel nog niet op de markt. Wel is aangetoond dat met het commercieel verkrijgbaar algenkweekstelsel (SeaCaps) goed te voorzien is in de algenbehoefte tot 2 mm. Voor uitgroei tot 10 mm zal het SeaCap nog aanzienlijk opgeschaald moeten worden dan wel aangeleverd worden door specifieke algenkwekers. Gaande het project zijn er in Nederland een paar algenkweekbedrijven gestart (Ingrepo, Aquavite, Technogrow), maar ze zijn nog niet in bedrijf voor de productie van schelpdieren. Naast het opgeschaalde SeaCaps systeem is op labniveau de algenkweek productiviteit van de vlakke plaat bioreactor eveneens getest. De productie bleef nog ver achter. Bij een verdere technische optimalisatie kan er momenteel een theoretische productiviteit bereikt worden, die vergelijkbaar is met het SeaCap systeem. Maar dan zal het systeem op vele technische punten een verbeteringsslag moeten ondergaan. Ook is nog niet bekend welk bedrijf dit concept in productie gaat nemen. Om de hatchery en nursery kosten te verlagen zal de hoeveelheid algen voor de larven en broedjes in de hatchery en nursery systemen zo laag mogelijk gehouden moeten worden. Hiervoor zijn tezamen met het bedrijf INVE experimenten uitgevoerd met voedingssupplementen. Voor de nursery fase is het reeds gelukt en is het inmiddels ook commercieel verkrijgbaar. De voedingssupplement experimenten voor de growout fase laten ook mogelijkheden zien, maar deze moeten nog verder ontwikkeld worden.

Technieken en ontwerp

Om tot opschaling te kunnen komen, is in het project een aantal technieken verder ontwikkeld. In de eerste plaats zijn de technieken voor de selectie en conditionering van de ouderdieren sterk verbeterd en zijn deze in werkbare en reproduceerbare protocollen vastgelegd. Voor de hatchery fase is voor de algenkweek het commercieel verkrijgbare systeem SeaCaps verder opgeschaald en kosten-efficiënt gebleken. Het gebruik hiervan is eveneens in werkbare protocollen vastgelegd. Dit kweekstelsel en ook het geteste vlakke plaat concept (bio reactor) is nog ontoereikend gebleken voor voldoende volumes algen voor de nursery fase. Omdat deze grote productie en de verdere ontwikkeling voor de SHANGO bedrijven te kostbaar wordt, zijn er inmiddels commerciële algenkweekbedrijven op deze markt ingesprongen; niet alleen voor de mosselproductie, maar ook voor andere kweeksoorten. Voor de SHANGO nursery doeleinden en mogelijke verdere ontwikkeling zijn werkbare protocollen opgesteld. In het SHANGO project is ruim voldoende aangetoond dat de hatchery technieken goed werken, maar dat de nursery technieken nog een aanzienlijke ontwikkelingsslag moeten ondergaan. Niet de basistechnieken, deze zijn ook in protocollen vastgelegd, maar hoe men komt tot een kosten efficiënte opschaling. De zwakste schakel in de schelpdier hatchery/nursery en growout keten is de overleving in het buitenwater. Op grond van de slechte ervaringen in 2007 zijn in 2008 verbeterde experimenten en proeven gedaan. Niet alleen op de buiten percelen, maar ook mbv van een extra groei tussenstap na de nursery fase. De broedjes zijn na een kortstondige nursery verblijf (minder algen, lagere kosten) in op het land geplaatste upwellers geplaatst voor een additionele groei boost. Deze proeven, incl. het toevoegen van voedingssupplementen leveren daadwerkelijk een verbetering op. Deze ontwikkeling zal in het verdere nursery-growout verbeter traject meegenomen moeten worden.

Hoe sneller het broed de nursery kan verlaten hoe minder arbeid, voedsel en energie en water, dus kosten er voor de schelpdierproductie nodig is.

Een technisch/economische beschouwing laat met huidige gehanteerde technieken zien dat de kostprijs nog te hoog is om een rendabele exploitatie te waarborgen. Voor andere soorten bestaan er in het buitenland reeds commerciële kweekbedrijven. Met behulp van het schelpdierrekenmodel zijn de productiekosten van hatchery zaad van 500 miljoen stuks per jaar ingeschat en vergeleken met de kosten van de huidige zaadwinning methoden.

De benodigde m², het technisch ontwerp en layout voor een productie van 500 miljoen broedjes hebben gedurende het project niet tot problemen geleid. De basistechnieken, layout en benodigheden zijn op systeemniveau beschreven. Verdere opschaling en kostenefficiëntie behoren tot de mogelijkheden, zij het dat in de growout problematiek eerst een aanzienlijke verbetering gemaakt moet worden.

aanbevelingen

Een follow-up aanbeveling is om alvorens het hatchery zaad op de percelen te brengen, deze eerst met behulp van mosselzaad invanginstallaties in de waterkolom te laten groeien. Dan heeft men minder last van predatie en wegspoelen. Wel kan dit alleen op locaties plaatsvinden waar geen natuurlijke zaadval het hatchery zaad gaat bedekken.

Tenslotte om de kosten van de hatchery mosselzaad productie te verlagen is net als bij de viskweekbedrijven het geval is, ook voor mosselzaad een centrale coöperatieve hatchery/nursery op te richten. De participerende bedrijven nemen dan dit zaad af voor doorkweek op de percelen

Kwaliteitsborging

IMARES beschikt over een ISO 9001:2000 gecertificeerd kwaliteitsmanagement systeem (certificaatnummer: 08602-2004-AQ-ROT-RvA). Dit certificaat is geldig tot 15 december 2009. De organisatie is gecertificeerd sinds 27 februari 2001. De certificering is uitgevoerd door DNV Certification B.V. Het laatste controle bezoek vond plaats op 16-22 mei 2007. Daarnaast beschikt het chemisch laboratorium van de afdeling milieu over een NEN-EN-ISO/IEC 17025:2000 accreditatie voor testlaboratoria met nummer L097. Deze accreditatie is geldig tot 27 maart 2009 en is voor het eerst verleend op 27 maart 1997, deze accreditatie is verleend door de Raad voor Accreditatie. Het laatste controlebezoek heeft plaatsgevonden op 12 juni 2007.

Dankwoord

Vanwege de complexiteit van het project hebben vele mensen input gehad in dit SHANGO project. In het bijzonder gaat dank uit naar:

-Wageningen Imares:

Armi Dumadag, Isabel Batista, Ainhoa Blanco, Emiel Brummelhuis, Johan Jol, Arno Dekker, Arnold Bakker, Jeroen Jansen, Ad van Gool, Jacob van Capelle,

-Roem van Yerseke:

Peter Schauwaert, Silke Donner, Nancy Nevejan

Referenties

- Clausen, I. & H.U. Riisgard, 1996. Growth, filtration and respiration in the mussel *Mytilus edulis*: no evidence for physiological regulation of the filter-pump to nutritional needs Mar. Ecol. Prog. Ser. 141: 37-45
- Frandsen, R.P. & P. Dolmer (2002). Effects of substrate type on growth and mortality of blue mussels (*Mytilus edulis*) exposed to the predator *Carcinus maenas* Marine Biology 141: 253–262.
- Hawkins, C.M., Rowell, T.T., & Woo, P. (1987) The importance of cleansing in the calculation of condition index in the soft-shell clam, *Mya arenaria* (L.). *J. Shell. Res.*, **6**, 29-36.
- Helm, M., Bourne, N & Loviatelli, A.(2004) Hatchery culture of bivalves: a practical manual, FAO Fisheries (Food and agriculture organisation) Technical Paper 471.
- Jansen, M. (2007) Microalgae as feedstock for biodiesel ?, Presentatie, International Conference on Molluscan Shellfish Restoration, ICSR November 2007, Vlissingen, the Netherlands.
- Kamermans, P., M. Poelman, E. Meesters, I. De Mesel, C. Smit, S. Brasseur, Eindrapport PRODUS 1c: Mosselzaadinvangsystemen. IMARES Rapport.
- Koeman, R.P.T, C.J.E. Brochard, M.J.J.E. Loonen & K. Fockens, 2005. Geannoteerde soortenlijst biomonitoring fytoplankton Nederlandse zoute wateren 1999-2004.
- Postma, J.F., S. de Valk, M. Dubbeldam, J.L. Maas, M. Tonkes, C.A. Schipper & B.J. Kater (2002). Confounding factors in bioassays with freshwater and marine organisms. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 53: 226-237.
- Seed, R. & Brown, R.A. (1977) A Comparison of the Reproductive Cycles of *Modiolus modiolus* (L), *Cerastoderma (= Cardium) edule* (L.), and *Mytilus edulis* L. in strangford Lough, Northern Ireland. *Oecologia (Berl.)*, **30**, 173-188.
- Sokal, R.R., Rohlf, F.J. (1995). *Biometry*. Third edition. WH Freeman and company
- Stralen, M.R.van, 1988. Het functioneren van mossel percelen in de Oosterschelde. Deelstudie: Mosselgroei Dgw. RIVO Directie Landbouw Onderzoek, RWS. Maart 1988

Verantwoording

Rapport C065/08
Projectnummer: 4394100201

Dit rapport is met grote zorgvuldigheid tot stand gekomen. De wetenschappelijke kwaliteit is intern getoetst door een collega-onderzoeker en beoordeeld door of namens het Wetenschapsteam van Wageningen IMARES.

Akkoord: ir. H.W. van der Mheen
Afdelingshoofd Aquacultuur

Handtekening:



Datum: 25 oktober 2008

Akkoord: Prof.Dr. A. Smaal
Wetenschapsteam IMARES

Handtekening:



Datum: 25 oktober 2008

Aantal exemplaren:	15
Aantal pagina's:	76
Aantal tabellen:	15
Aantal figuren:	51
Aantal bijlagen:	1

Bijlage

Hulpmiddelen en invenstarislijst

Broedstock

Onderdelen broedstock	Aantal/ Hoeveelheden
1.0 Houden: -Bakken -Koelsysteem -Ongefiltreerd zeewater	
2.0 Conditioneren: -500 l tanks -1 µm gefiltreerd zeewater (UV-licht bestraald) -25 l emmers -Slangen - <i>Isochrysis</i> (T-ISO) en <i>Chaetoceros gracilis</i> culturen	
3.0 Paaien en bevruchten -Mosselen (meer dan 100) -Bakken -Rol zwart plastic -Water verwarmingselementen -Plastic potjes (250 ml) -Viltstift -3-5 liter van <i>Isochrysis</i> (T-ISO) en <i>Chaetoceros gracilis</i> 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 -Microscop	

Hulpmiddelen/benodigdheden

Algencultures	Aantal/hoeveelheden
1.0 Cultuur medium -Demiwater -1 L glazen flessen -10 ml buizen -0.45 µm membraan filter -Injectie naalden -Steriel spuiten -Nutriënten -Analytische balans -Schaaltjes	
2.0 Algen voorraad cultuur, start cultuur en plastic zak culturen 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	
3.0 Plastic zak culturen 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	
4.0 Het bepalen van de algendichtheid -Microscope -Burker Hematocytometer -Pasteur pipet -Lugol -Teller	

Hulpmiddelen/benodigdheden hatchery/nursery

<p>1.0 Larven</p> <ul style="list-style-type: none"> -60-90-150-200 µm zeven -1 µm gefiltreerd zeewater (ultraviolet bestraald) -Geperforeerde bak -<i>Isochrysis</i> (T-ISO) en <i>Chaetoceros gracilis</i> 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) 	
--	--

Hulpmiddelen/benodigdheden

Nursery	Aantal/hoeveelheden
<p><i>1.0 Broed binnen</i></p> <ul style="list-style-type: none"> 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 <i>Chaetoceros gracilis</i> en <i>Isochrysis</i> (T-Iso) culturen 	