

Nederlands Instituut voor Visserij Onderzoek (RIVO) BV

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

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

Intern rapport

Nummer: 05.007

Titel

Optimalisatie van de algenkweek ten behoeve van een mosselhatchery

Auteur	Matthijs Koole
Project nummer:	Hatchery & Nursery 2005.08
Datum:	30 november 2005

Aantal exemplaren:	12
Aantal pagina's:	33
Aantal tabellen:	1
Aantal figuren:	24
Aantal bijlagen:	3

Optimalisatie algenkweek ten behoefte van een mosselhatchery

Optimalisatie mosselhatchery

Stageverslag (definitief)



Auteur: Matthijs Koole

Yerseke, november 2005

In opdracht van Hogeschool Zeeland, RIVO en Roem van Yerseke

Optimalisatie algenkweek ten behoeve van een mosselhatchery

Optimalisatie mosselhatchery

Stageverslag (definitief)

Stagebedrijf: RIVO-DLO Centrum voor scheldieronderzoek
Korringaweg 5
4401 NT Yerseke



Begeleiding: Hogeschool Zeeland, Aquatische Ecotechnologie (J. Heringa)
Edisonweg 4
4382 NW Vlissingen



Stagiair: Matthijs Koole
Buitenhovelaan 247
4337 HL Middelburg

Stagedocent: J. Heringa

Stagebegeleidster: P. Kamermans

Stageverslag akkoord door stagebegeleiding Hogeschool Zeeland.

Naam: Handtekening:

Stageverslag akkoord door stagebegeleiding RIVO.

Naam: Handtekening:

Samenvatting

In het kader van een mosselhatchery/nursery optimalisatieproject heb ik als stageopdracht een onderzoek uitgevoerd naar de optimalisatie van de algenkweek. In de hatchery worden mossellarven gekweekt en die moeten gevoed worden met algen. De algen in de hatchery worden in plasticzakken gekweekt. Het was echter de vraag of dat wel een efficiënte methode is en of de methode misschien verbeterd kon worden.

De vraag die na het einde van het onderzoek beantwoord moest worden was: Door welke ingrepen kan de algenkweek in plasticzakken in de mosselhatchery verbeterd worden?

Om de methode tegen het licht te houden is er een vergelijking gemaakt die gebaseerd is op drie verschillende onderdelen. Dat waren vergelijkingen tussen 25 en 50 liter zakken, tussen 50 liter zakken met en zonder toevoeging van CO₂ en tussen 50 liter zakken met verschillende belichtingssterkte. Door deze drie onderdelen te toetsen is naar voren gekomen dat de methode die wordt toegepast voor verbetering vatbaar is.

Bij de vergelijking tussen 25 en 50 liter zakken waren er geen grote verschillen waar te nemen. De behaalde concentraties in de 25 liter zakken waren aan de lage kant, terwijl de waarden van de 50 liter zakken normaal waren.

Bij de proef met het toevoegen van CO₂ was er wel een groot verschil te zien. De algenconcentraties in de zakken die CO₂ toegediend kregen waren ongeveer twee maal zo hoog als in de zakken die geen CO₂ kregen.

De proef met de lichtintensiteit gaf geen grote verschillen. De zak die het sterkst belicht werd behaalde de hoogste dichtheid.

Concluderend kan gesteld worden dat de algenkweek in de hatchery voor verbetering vatbaar is. Het zou zeer lonend zijn om in de toekomst algen te kweken in 50 liter zakken met toevoeging van CO₂, omdat daarmee de hoogste dichtheden bereikt kunnen worden. Dit kan ruimte, tijd en kosten besparen.

Summary

Within the framework of the mussel hatchery/nursery optimisation project I have conducted an investigation as training period task to the optimisation of the algae cultivation. In the hatchery mussel larvae are grown and they must be fed with algae. The algae in the hatchery are grown in plastic bags. It was however the question if that is an efficient method and if the method could be improved.

The main question which had been answered after the end of the research was: By which interventions can the algae cultivation in plastic bags be improved in the mussel hatchery?

A comparison has been made there which is based on three different components. Those were comparisons between 25 and 50 litres bags, between 50 litres bags with and without additive of CO₂ and between 50 litres bags with different illumination strength. By reviewing these three components has forward come that the method can be improved.

At the comparison between 25 and 50 litres bags there were observe no large differences. Gained the concentrations in the 25 litres bags were on the low side, whereas the values of the 50 litres pockets were normal.

At the test with adding CO₂ there was, however, a large difference. The alga concentrations in the bags with additive of CO₂ administered were approximately two times higher than in the bags which got none CO₂.

The test with the light intensity gave no large differences. The bag which was illuminated with the highest light intensity reached the highest alga concentration.

Concluding can be stated that the algae cultivation in the mussel hatchery can be improved. It would be very good if the algae cultivation in the future will take place in 50 litres bags with additive of CO₂, because this is the best method. This can save space, time and costs.

Inhoudsopgave

Inhoudsopgave.....	6
Voorwoord.....	7
1 Inleiding	8
1.1 Achtergrond project.....	8
1.1.1 Aanleiding van het project	8
1.1.2 Doelstelling van het project	8
1.1.3 Mijn rol binnen het project	9
1.2 Doel- en vraagstelling.....	10
2 Fytoplankton.....	11
2.1 Algemene informatie over algen.....	11
2.2 Algenkweek.....	14
3 Mosselen.....	17
3.1 Levenscyclus mosselen.....	17
3.2 Mosselkweek (traditioneel).....	19
3.3 Mosselhatchery	19
3.4 Watersysteem in de hatchery.....	22
4 Materiaal en methode	25
4.1 Materiaal.....	25
4.2 Methode	27
4.3 Aandachtspunten bij de methode	31
5 Resultaten	32
6 Discussie	36
7 Conclusie	37
8 Lijst van geraadpleegde literatuur	38
Bijlagen.....	39
Bijlage 1: Walne medium en vitamine oplossing.....	39
Bijlage 2: Het tellen van algen.....	40
Bijlage 3: Resultaten statistische vergelijking	41

Voorwoord

Dit stageverslag is tot stand gekomen gedurende mijn stageperiode bij het RIVO. Het is de verslaglegging van het onderzoek dat ik uitgevoerd heb naar de optimalisatie van de algenkweek. Het verslag is in de eerste plaats bedoeld voor de stagebegeleider en de stagedocent, zodat zij mijn werk kunnen beoordelen. Daarnaast kan het een handig hulpmiddel zijn voor studenten Aquatische Ecotechnologie, met name voor het zoeken van een stageplaats.

Dit verslag was nooit tot stand gekomen als het RIVO en de Roem van Yerseke mij deze stageplaats niet hadden aangeboden. Het was heel leuk om het 'hatchery gebeuren' mee te kunnen maken. In het bijzonder wil ik nog bedanken Pauline Kamermans en Jouke Heringa voor de begeleiding, Ainhoa Blanco en Nancy Nevejan voor alles wat jullie mij geleerd hebben en Peter-Paul Stehouwer voor de fotografie. Zonder jullie hulp was alles veel moeilijker geweest, bedankt!

Matthijs Koole

1 Inleiding

1.1 *Achtergrond project*

Het project waarbinnen ik mijn onderzoek uit zal voeren is de optimalisatie van de mosselhatchery/nursery. Het project is een samenwerking tussen het RIVO, de Roem van Yerseke, INVE en de Hogeschool Zeeland. De Roem van Yerseke is een schelpdierkwekerij die naast mosselen ook oesters kweekt. Tot dit jaar viste men ook op kokkels. Het bedrijf verwerkt jaarlijks grote hoeveelheden mosselen en oesters. INVE is een van oorsprong Belgisch bedrijf dat diervoeders en voedingssupplementen vervaardigd. INVE heeft vestigingen over de hele wereld en groeit nog steeds. Dit bedrijf voert in het project proeven uit met voedingssupplementen. Het project wordt gefinancierd door de Roem van Yerseke en het RIVO. Tevens is er een subsidie verkregen via de Provincie Zeeland. De subsidie dekt ongeveer de helft van de kosten van het gehele project.

1.1.1 *Aanleiding van het project*

Het natuurlijke aanbod van mosselzaad vertoont jaarlijks sterke fluctuaties. Ook is de visserij op mosselzaad in de Waddenzee en Oosterschelde gelimiteerd in verband met de voedselbeschikbaarheid voor vogels. Hierdoor is het aanbod van consumptiemosselen niet toereikend. Om deze redenen is er behoefte aan nieuwe technieken ten behoeve van de zaadvoorziening. Om het tekort aan zaad aan te vullen en voor veredeling van mosselen is er behoefte aan gecontroleerde productie van mosselzaad in een hatchery/nursery. Deze techniek is nog niet operationeel voor de mossel, maar er kan wel gebruik gemaakt worden van bestaande expertise bij de kweek van andere tweekleppigen.

1.1.2 *Doelstelling van het project*

Het doel van dit project is te onderzoeken op welke manier de mosselhatchery/nursery geoptimaliseerd kan worden op praktijkschaal. Uiteindelijk moet er een goed werkende mosselzaadkwekerij worden opgezet. In de hatchery (broedkamer) worden ouderdieren (broedstock) aangezet tot voortplanten en de larven worden opgekweekt tot broed. In een nursery (kinderkamer) wordt het broed opgekweekt tot zaad. Het zaad wordt vervolgens tot eindproduct opgekweekt in hangcultuur of op kweekpercelen. Deze techniek biedt niet alleen de mogelijkheid om mosselzaad te produceren als aanvulling op de natuurlijke aanwas, maar ook om de beschikbaarheid van zaad te realiseren, onafhankelijk van de tijd van het jaar. Tevens is het dan mogelijk om zaadveredeling toe te passen, gericht op betere groei, afwezigheid van allergenen e.d. Dit alles moet leiden tot een goed functionerend hatchery/nursery systeem dat mosselzaad kan produceren als aanvulling op het natuurlijke bestand.

Ter voorbereiding van het project werd in de eerste helft van 2004 een pilot op labschaal uitgevoerd. In de tweede helft van 2004 werd gestart met de opschaling, gericht op de nursery van mosselen. In 2005 werd de verdere opschaling van hatchery en nursery ingepland. In de pilotfase werden stockcultures van algen opgezet en doorgekweekt tot batchcultures van 5 liter, daarnaast werd mosselbroedstock aangezet tot paaien en werden de larven opgekweekt in 100 liter containers

1.1.3 Mijn rol binnen het project

Binnen het mosselhatchery project heb ik een eigen onderzoek uitgevoerd naar de optimalisatie van de algenkweek in de hatchery. Het efficiënt kweken van grote hoeveelheden algen voor de mosselhatchery is van groot belang, want zonder goede voeding groeit het mosselbroed niet. Voor de toekomstige hatchery/nursery is het van groot belang dat het kweken van de algen soepel verloopt. Dat wil zeggen dat er op een efficiënte en goedkope manier heel veel algen moeten worden geproduceerd. Omdat de kosten van de algenkweek ongeveer 40 % van de totale kosten voor de schelpdierkweek bedraagt (Helm et al, 2004), is het van groot belang om de algenkweek zo efficiënt mogelijk te maken. Want als de kosten voor de algenkweek al erg hoog zijn, is het niet meer rendabel om de mosselen in een hatchery te kweken.

Leeswijzer

Het verslag is ingedeeld in 8 hoofdstukken. Het eerste hoofdstuk is de inleiding, hierin staat een beschrijving van het stageverlenende bedrijf, achtergrondinformatie over de opdracht en de opdrachtformulering en doel- en vraagstelling. Hoofdstuk 2 gaat over fytoplankton, dit geeft algemene informatie over algen. In hoofdstuk 3 wordt een beschrijving gegeven van de levenscyclus van mosselen. Daarnaast is er informatie opgenomen over mosselkweek en over de mosselhatchery. Vanaf hoofdstuk 4 gaat het inhoudelijk echt over het onderzoek. In hoofdstuk 4 een beschrijving van materialen en de toegepaste methoden. Hoofdstuk 5 geeft de resultaten van het onderzoek weer. In de daarop volgende afsluitende hoofdstukken 6 en 7 staan de discussie en de conclusie.

1.2 Doel- en vraagstelling

De broedstock, de larven en het mosselzaad moeten gevoerd worden met een algensuspensie. Deze algen worden momenteel gekweekt in speciale plasticzakken met een inhoud van 25 of 50 liter. Enkele tests hebben echter uitgewezen dat de algenkweek in de hatchery niet optimaal functioneert. Met de methode van de plasticzakken zouden hogere dichtheden bereikt moeten kunnen worden dan dat nu het geval is. Vooral de kweek in zakken met een inhoud van 50 liter wil nog niet goed lukken. Omdat er wel vraag is naar grote hoeveelheden algen is het belangrijk om in een zo kort mogelijke tijd zoveel mogelijk algen te kweken. Daarom wil men naast de 25 liter zakken ook gaan werken met 50 liter zakken. Omdat de kweek in de 50 liter zakken nog niet naar wens gaat, de bereikte concentraties zijn erg laag, is er onderzoek nodig naar het optimaliseren van de algenkweek. Er is een duidelijk verschil in de maximale algendichtheid tussen de 25 en de 50 liter zakken. Dit verschil wordt waarschijnlijk veroorzaakt doordat er in de 50 liter zakken na enkele dagen een tekort ontstaat aan koolstof. De 25 en 50 liter zakken worden met dezelfde hoeveelheid lucht doorborreld, dus in de 25 liter zak komt relatief gezien 2 keer zoveel lucht, en CO₂!, dan in een 50 liter zak. Hierdoor wordt koolstof in de 50 liter zakken na enkele dagen de limiterende factor voor de groei van de algen. Een andere verklaring voor de mindere groei in de 50 liter zakken zou foto-inhibitie kunnen zijn. Dat houdt in dat de algen in het begin te sterk belicht worden waardoor de groei minder snel verloopt. De doelstelling van het onderzoek is dus het optimaliseren van de algenkweek in plastic zakken ten behoeve van de mosselhatchery.

De vraag die na het uitvoeren van het onderzoek beantwoordt moet worden luidt:

Door welke ingrepen kan de algenkweek in plasticzakken in de mosselhatchery verbeterd worden?

Om een goed antwoord op de hoofdvraag te kunnen geven is er een aantal deelvragen opgesteld:

- 1 A. Is er significant verschil in de maximale algendichtheid tussen 25 en 50 liter zakken?
 B. Is er significant verschil in de tijdsduur totdat de maximale algendichtheid wordt bereikt tussen 25 en 50 liter zakken?
- 2 A. Is er significant verschil in de maximale algendichtheid tussen zakken met en zonder toevoeging van CO₂?
 B. Is er significant verschil in de tijdsduur totdat de maximale algendichtheid wordt bereikt tussen zakken met en zonder toevoeging van CO₂?
- 3 A. Is er significant verschil in de maximale algendichtheid tussen zakken met verschillende belichtingssterkte?
 B. Is er significant verschil in de tijdsduur totdat de maximale algendichtheid wordt bereikt tussen zakken met verschillende belichtingssterkte?

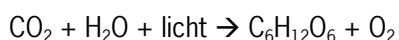
2 Fytoplankton

Omdat mijn onderzoek zich op fytoplankton (algen) richt is hier een hoofdstuk opgenomen met informatie over algen en algenkweek.

2.1 Algemene informatie over algen

Algen zijn planten die behoren tot de meest primitieve subgroep van het plantenrijk doordat ze geen wortels, bladeren of bloemen hebben. De meeste algen behoren tot het plankton. Plankton is de verzamelnaam voor alle vrij in het water zwevende organismen. Plankton is onder te verdelen in fyto- en zoöplankton, fytoplankton is het plantaardige deel van het plankton. Het fytoplankton is op haar beurt weer onder te verdelen in verschillende typen. Er bestaan onder andere algen mét zweephaartjes (flagel) en algen zonder zweephaartjes. De zweephaartjes gebruiken algen om zich door het water voort te bewegen. Fytoplankton met zweephaartjes worden flagelaten genoemd. Daarnaast is er ook een groep die een skelet van kiezelzuur maakt, dat zijn de diatomeeën of kiezelwieren. (Hoff en Snell, 2001)

Fytoplankton zijn plantaardige organismen die vrij in het water zweven of zwemmen. Alle leven in het water voedt zich - direct of indirect - met algen. Algen zijn in staat om, met behulp van zonlicht als energiebron, organische stoffen te maken. Dat proces heet fotosynthese. Het licht wordt opgenomen door chlorofyl en met behulp van de energie uit het licht wordt water en koolstofdioxide omgezet in glucose en zuurstof. In formulevorm ziet dat er als volgt uit:



Bij dit proces van fotosynthese komt zuurstof vrij dat in het water of in de lucht terecht komt. Het overige leven in het water kan zelf geen organische stoffen maken (uitgezonderd sommige bacteriën) en is dus vrijwel volledig afhankelijk van het fytoplankton als voedselbron. De vrijkomende zuurstof is een belangrijke aanvulling van de voorraad zuurstof die voor dieren noodzakelijk is. Algen zijn de belangrijkste fotosynthetiserende organismen op onze aarde en gebruiken meer zonlicht en produceren meer zuurstof dan alle overige planten bij elkaar.

Algen komen niet alleen voor in oceanen en zeeën, maar ook in allerlei zoete wateren. Eigenlijk komen in vrijwel alle wateren op aarde algen voor. In het water van de Noordzee komen gemiddeld genomen tussen de honderdduizend en honderdmiljoen algen per liter voor. Algen groeien snel waardoor de massa per week een veelvoud kan toenemen. Hierdoor ontstaat aan de basis van de voedselketen een grote hoeveelheid voedingsstoffen.



De groei van algen vindt plaats wanneer voldoende voedingsstoffen en licht beschikbaar zijn. Die groei kan snel gaan, met wel elke dag één deling. De groei van algen gaat als volgt: de alg is eencellig en door zichzelf in tweeën te splitsen komen er 2 algen. Deze 2 algen gaan vervolgens groeien totdat ook zij zich weer gaan delen. Op die manier zijn ze in staat om zich enorm snel te vermenigvuldigen. Bij de groei wordt de in het zeewater opgeloste nitraat, fosfaat en silicium (in het geval van diatomeeën) verbruikt. Het silicium wordt gebruikt voor de vorming van de kiezelschaaltjes, het nitraat en fosfaat voor de vorming van bouwstoffen (organische stoffen zoals koolhydraten, eiwitten en vetten). Hiernaast hebben algen ook nog vitamines en spore elementen nodig om te kunnen groeien.

Figuur 2.1: Voorbeeld van een diatomee: *Chaetoceros gracilis*.

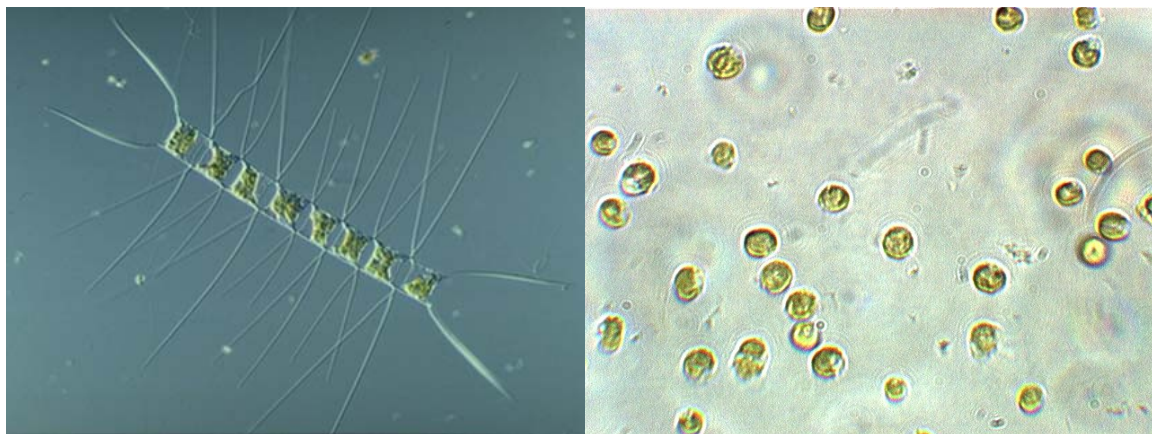
De meeste algen zijn alleen met een microscoop te zien. Ze hebben vaak mooie vormen en de meeste bestaan uit één cel, maar er komen ook kolonies van meerdere cellen voor. Voor het fytoplankton is het belangrijk om in de bovenste waterlaag te kunnen blijven zweven en niet naar de bodem te zinken. Aan het wateroppervlak blijven is voor de meeste algen een levensvoorwaarde, want zonder zonlicht sterven ze af. Een van de redenen dat algen zo klein en licht zijn, is dat ze aan de oppervlakte kunnen verblijven. Door de afmetingen van algen hebben ze een meer gunstige verhouding tussen lichaamsoppervlak en lichaamsgewicht. Hoe kleiner je bent, des te groter is het oppervlak in verhouding tot het gewicht. En hoe groter je oppervlak naar verhouding is, hoe langzamer je zinkt. Bij diatomeeën wordt het drijfvermogen vergroot door allerlei uitsteeksels in de vorm van haren en stekels. (www.natuurinformatie.nl/ecomare.devleet/natuurdatabase.nl/i000327.html)

Naast de microscopisch kleine algen (microalgen) komen er ook grotere algensoorten voor, dat zijn de zogenaamde macroalgen. Hiertoe behoren onder andere algen die zich ophouden tussen waterplanten of aangroeiende vormen op takken, stenen of bodem. Ook zeevieren langs de kust behoren tot de macroalgen.

Voor mijn onderzoek heb ik gebruik gemaakt van twee soorten algen, namelijk *T. Iso* (*Isochrysis galbana*) en *Chaetoceros gracilis*. *T. Iso* is een bepaalde stam van *Isochrysis galbana* die men in Tahiti geïsoleerd heeft, vandaar de T.

Isochrysis behoort tot de flagelaten, dat betekent dat het een alg is die zich voortbeweegt met flagella. *Isochrysis* heeft 2 flagella die dicht bij het eind van de cel zitten. De cellen bewegen zich snel door het water voort, en ze roteren als ze zwemmen. Het is een ronde alg met een diameter van 4 tot 8 µm. De kleur is goud en gewoonlijk hebben ze een rode oogvlek. De reproductie vindt plaats door eenvoudige splitsing van de moedercel in twee dochtercellen. *Isochrysis* wordt vaak gebruikt als voer voor raderdierpjes, schelpdieren en garnalen. (www.isochrysis.com)

Chaetoceros behoort tot de diatomeeën, het is een eencellige alg die kettingen kan vormen door stekels van aangrenzende cellen onderling te verbinden. Het lichaam is gevormd als een petrischaal. Vanaf de zijkant gezien lijken de individuele cellen vierkant met in de hoeken uitsteeksels. De lengte varieert van 6 tot 9 µm. De cellen kunnen kettingen van 10-20 cellen vormen die 200 µm in lengte kunnen bereiken. Als *Chaetoceros* wordt gecultiveerd met sterke beluchting vormen ze geen kolonies. De grote culturen zijn bruin van kleur en de individuele cellen zijn goudbruin van kleur met een doorzichtige celwand. Ook *Chaetoceros* wordt vaak gebruikt als voedsel voor raderdierpjes, schelpdieren en garnalen. (www.advancedaquarist.com/issues/aug2002/breeder.htm)



Figuur 2.2 en 2.3: Links *Chaetoceros* sp. en recht *Isochrysis galbana*

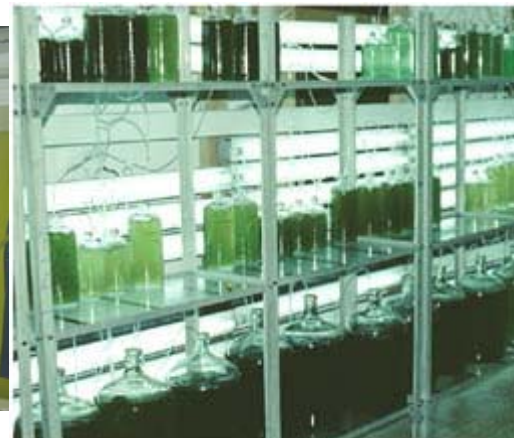
2.2 Algenkweek

Redenen om algen te kweken

In de eerste plaats worden algen gekweekt als voedselbron voor andere organismen. Zo worden er bijvoorbeeld algen gekweekt als voedsel voor gekweekt zoöplankton en schelpdieren. Veel van deze gekweekte organismen zijn voor hun voedsel volledig afhankelijk van algen, daarom zijn er wereldwijd vele algenkwekerijen. Naast voedselbron voor andere organismen worden algen ook gekweekt voor allerlei andere doeleinden. Zo worden er uit algen vele verschillende stoffen gewonnen waaruit weer diverse producten worden gemaakt. Uit algen worden onder andere oliën, chemische producten, geneesmiddelen en polysacchariden gemaakt (Hoff en Snell, 2001).

Verskillende methoden van algenkweek

Er zijn vele verschillende manieren om algen te kweken: in plastic zakken, in vijvers, grote tanks, doorzichtige kunststof cilinders, buizenstelsel, platte panelen. Sommige algen worden gewoon in de buitenlucht gekweekt en maken gebruik van zonlicht. Hierbij treedt wel vaak een probleem op met oververhitting (te hoge temperaturen). Dat moet dan opgelost worden door koeling. Bij de kweek in open vijvers of tanks doen zich vaak problemen voor met contaminatie. Zo is het bijvoorbeeld zeer lastig om in de buitenlucht een monocultuur te kweken. Een monocultuur is een algencultuur van slechts 1 algensoort. Daarnaast bestaat er ook de polycultuur waarin meerdere algensoorten door elkaar heen in een cultuur worden gekweekt. Het kweken van een monocultuur in de open lucht lukt tot op heden slechts met een beperkt aantal soorten, veelal zijn dat algen die onder extreme omstandigheden kunnen leven. Veel algen worden daarom binnen gekweekt, in enkele gevallen worden ook deze algen door de zon belicht. Veel vaker wordt er gebruik gemaakt van kunstmatige verlichting. Een voordeel van het



binnen kweken is dat de temperatuur redelijk eenvoudig kan worden gereguleerd. Verder kan ook de lichtintensiteit en –duur gemakkelijk worden geregeld (Helm et al, 2004).

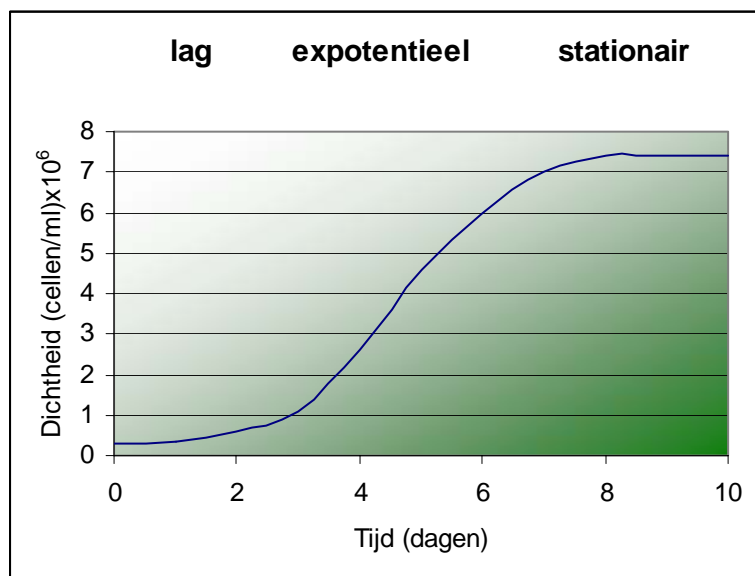
Figuur 2.4:
Verskillende
algenkweek
methoden.



(bron: Hatchery culture of bivalves)

Groefasen van een algencultuur

De algenkweek in plasticzakken zoals die wordt toegepast in de hatchery is een batchcultuur. Dat houdt in dat er eenmalig nutriënten worden toegevoegd en dat na afloop van de cultuur de zak wordt weggegooid en er gestart wordt met een nieuwe zak. De tegenhanger van de batchcultuur is de continuecultuur (of semi-continue), hierbij stroomt aan de ene kant van het systeem water met nutriënten naar binnen en aan de ander kant stroomt water met algen naar buiten. Bij de algenculturen in plasticzakken in de hatchery liggen de startconcentraties na de inoculatie (ent) ongeveer tussen de 20 en 50 cellen per ml. Voordat de groei van de algen echt goed op gang komt hebben de algen even de tijd nodig om te acclimatiseren aan de omstandigheden in de cultuur. Deze periode van acclimatisatie duurt ongeveer 2 á 3 dagen en wordt ook wel de lagfase genoemd. Als de algen eenmaal gewend zijn aan de omstandigheden, zal de celdeling versnellen en de toename van het aantal algen wordt logaritmisch. Deze periode die ongeveer 4 tot 6 dagen duurt wordt de exponentiele fase genoemd. Hierna neemt de snelheid van celdeling af doordat er een bepaalde factor limiterend wordt voor de groei. Deze factoren kunnen zijn: nutriënten, licht, koolstof. De cultuur komt dan in de stationaire fase. Bij flagelaten kan deze periode vele dagen duren, bij diatomeeën is dat maar enkele dagen. (Helm et al, 2004)



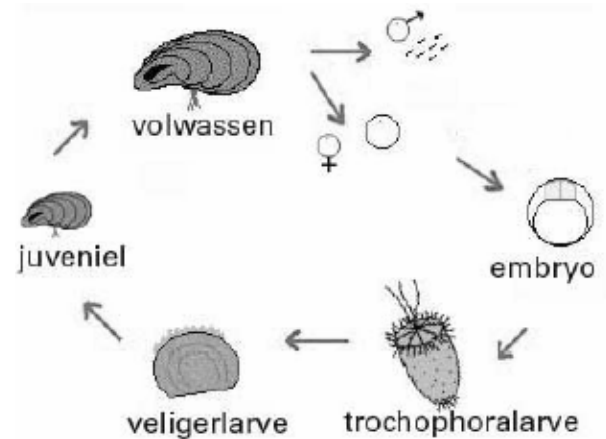
Figuur 2.2: De verschillende groefasen van een algencultuur.

3 Mosselen

De mossel (Latijn: *Mytilus edulis*) is een van de meest bekende scheldieren. Hij behoort tot de bivalven of tweekleppigen. Dat wil zeggen dat deze schelpdieren omsloten worden door twee scharnierende kleppen. Mosselen zijn weekdieren, die vooral in kustgebieden leven. In de Oosterschelde en de Waddenzee komen ze in grote aantallen voor.

3.1 Levenscyclus mosselen

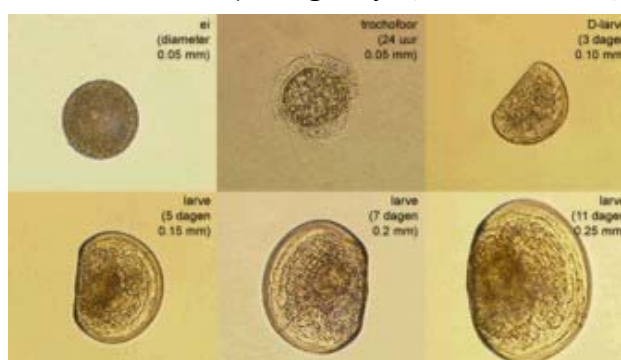
Mosselen leven in de getijdenzone, vastgehecht aan substraat (hout, stenen) door byssusdraden. Als de mossel wil gaan eten, opent de schelp zich lichtjes en kan water in de mantelholte binnenstromen. Dit gebeurt via de instroomopening of ventrale sifo die afgeboord is met een gekartelde rand. Een waterstroom wordt dan op gang gebracht via de instroomopening over de kieuwen. Het water verlaat de mossel langs de uitstroomopening of dorsale sifo. De waterstroom wordt veroorzaakt door het gecombineerde effect van de vele trilhaartjes (cilia) op het trilhaarepitheel van de kieuwen. De mossel filtert haar voedsel uit het



Figuur 3.1: Levenscyclus van de mossel.

binnenstromende water. De kleine voedseldeeltjes worden vastgehouden in het slijm (mucus) dat de kieuwen bekleedt. De cilia zorgen voor een constante mucusstroom die het voedsel naar een groeve onderaan de kieuwen brengt en vandaar naar de mond. Rond de mondopening bevinden zich vier mondlappen, eveneens met trilharen bezet. Die sorteren het voedsel op grootte, gewicht en concentratie. Alleen het kleinste materiaal wordt opgenomen en verteerd in het spijsverteringssysteem. De grotere deeltjes worden terug naar buiten gevoerd. De belangrijkste voedingsbron is het fytoplankton. (www.natuurwetenschappen.be/educa/pdf/dossiers/nl/didactisch_dossier_mosselen.pdf)

Mosselen zijn van gescheiden geslacht. De eicellen en spermacellen van duizenden mossels worden tijdens de voortplantingsperiode (van de lente tot de zomer) bijna tegelijkertijd uitgestoten. De bevruchting vindt in het zeewater plaats. Tijdens de ontwikkeling kan men twee larvale stadia onderscheiden: de trochophora- en de veligerlarve. Enkele uren na de bevruchting ontstaat de trochophoralarve en na amper één dag wordt de trochophora een veligerlarve, (figuur 3.1) die al een schelpje vormt. Na de bevruchting ontwikkelt zich binnen een paar dagen een larfje met schelpje uit de bevruchte eicel. Omdat het schelpje eruit ziet als een hoofdletter D, wordt het ook wel een D-larfje genoemd (figuur 3.2). Het is dan ongeveer 100 micrometer (éentiende millimeter) groot. Een paar dagen later heeft de D-larf een velum ontwikkeld: een zwem- en filtreerorgaan, waarmee het zich voortbeweegt door de zee en waarmee het geschikt fytoplankton uit het water filtreert. Na 2 à 3 weken is de jonge mossel klaar voor de metamorfose: het zwemorgaan verdwijnt en een voetje verschijnt. Het mosseltje gaat zich op de bodem vestigen. Na ongeveer 2 jaar is de mossel volwassen en vanaf dat moment zal hij elk voorjaar/zomer deelnemen aan de voortplanting. (Bayne, 1976) (Vlasblom, 1963)



Figuur 3.2: De verschillende larvale stadia van de mossel (bron: NIOO)

3.2 Mosselkweek (traditioneel)

Mosselen worden al vele jaren gekweekt voor consumptie. De kweekmethode die in Nederland het meeste wordt toegepast is de bodemcultuur. Bij deze methode wordt allereerst mosselzaad uit de Waddenzee en de Oosterschelde opgevist. Mosselzaad zijn kleine mosseltjes. Deze kleine mosseltjes worden opgevist en vervolgens op diep water uitgezaaid over de bodem. Hier groeien de mosselen op tot halfwas formaat. Vervolgens worden de mosselen opnieuw opgevist en verplaatst naar percelen waar ze verder groeien tot consumptiemosselen. Nadat de volwassen mosselen zijn opgevist, worden ze door de mosselkwekers op de veiling van Yerseke (de enige in Nederland) aangeboden aan mosselhandelaren. De mosselen hebben echter bij het opvissen zand en slib binnen gekregen, en om dat er uit te krijgen worden de mosselen door de handelaren weer in de Oosterschelde op beschutte plaatsen uitgezet, de zogenaamde verwaterplaatsen. In het buitenland worden ook andere kweekmethoden toegepast, zo worden in Frankrijk mosselen op palen gekweekt en in Spanje heb je de zogenaamde hangculturen. Sinds een aantal jaar wordt in Nederland ook op kleine schaal gebruik gemaakt van hangculturen. Hierbij wordt het mosselzaad niet op de bodem uitgezaaid maar hechten de zadjes zich aan touwen die aan drijvers hangen. (www.hollandsepot.dordt.nl/artikelen/artikelen.htm)

3.3 Mosselhatchery

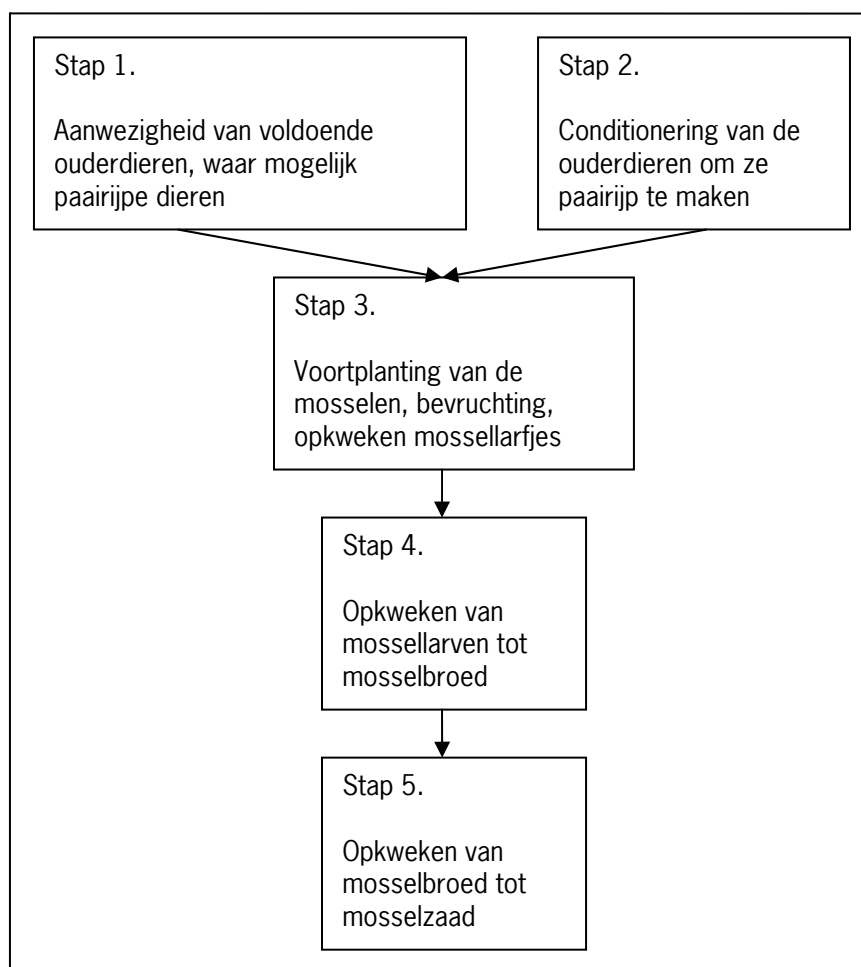
Omdat er behoefte is aan een grotere hoeveelheid mosselzaad, is het mosselhatchery project gestart. Het mosselzaad dat in de hatchery geproduceerd wordt zal een aanvulling zijn op de natuurlijke zaadval. Het is afwachten of deze aanvulling toereikend zal zijn om aan de vraag te kunnen voldoen. De mosselhatchery is in feite een geconditioneerde mosselzaadkwekerij op het land. Het productieproces van het mosselzaad bestaat uit een aantal stappen:

Stap 1. Er moeten voldoende volwassen mosselen, zogenaamde ouderdieren, aanwezig zijn die voor nakomelingen kunnen zorgen. Dit is niet eenvoudig omdat mosselen in natuurlijke omstandigheden alleen in een bepaalde tijd van het jaar geslachtsrijp (paairijp) zijn.

Stap 2. Conditionering. Als er geen paairijpe mosselen uit de natuur geleverd kunnen worden zullen er volwassen mosselen geconditioneerd moeten worden. Dat houdt in dat de mosselen gedurende een aantal weken worden klaargestoomd voor de voortplanting. Dit gebeurt door de mosselen extra voeding te geven en eventueel met een verandering van de watertemperatuur. De mosselen die op deze manier worden geconditioneerd worden ook wel het broedstock genoemd. In een hatchery zal er naar gestreefd worden om een voortdurende productie van zaad te realiseren, daarom is het van belang om elk moment over paairijpe mosselen te beschikken.

Stap 3. Voortplanten van de mosselen. Dit wordt, net als bij vissen, ook wel paaien genoemd. Er zijn verschillende omgevingsfactoren die een rol spelen bij het loslaten van de gameten (geslachtcellen). Zo zijn de watertemperatuur en de saliniteit bijvoorbeeld van invloed op het tijdstip van voortplanten. In de hatchery zijn volwassen mosselen hetzij geconditioneerd (broedstock) hetzij zo uit de natuur aangespoord tot paaien. Dit gebeurt door de mosselen eerst flink te laten stressen, dus eerst worden ze flink schoongeschrobd. Het schoonmaken van de mosselen is ook van belang om andere organismen te verwijderen. Deze organismen zouden bij de zaad- en eicellen terecht kunnen komen en dat moet voorkomen worden. Na het schoonmaken worden de mosselen in bakken gelegd die gevuld zijn met water. De watertemperatuur in de bakken moet ongeveer 10 graden hoger zijn dan de opslagtemperatuur van de mosselen. Door deze temperatuurschok zullen de mosselen gaan paaien. Dit is echter wel een geduldig werkje omdat de mosselen vaak niet direct gaan paaien. Vaak duurt het wel enkele uren. Gedurende deze tijd worden de mosselen bijgevoerd met algen en de waterbaden worden om het uur verwisseld van koud naar warm. De mosselen die gaan paaien worden uit de bak verwijderd en in een klein potje met water gestopt. Hierin gaat de mossel gewoon

verder met het loslaten van zijn gameten. Mosselen zijn eenslachtig, dat wil zeggen dat er zowel mannelijke als vrouwelijke mosselen zijn. Aan een mossel kan je niet zien of het een mannetje of vrouwtje is, dit kan je pas zien als de mossel gaat paaien. De mannetjes spuwen een witte vloeistof uit die in het water suspendeert. De vrouwtjes daarentegen spuwen een oranje/roze substantie uit die langzaam naar de bodem zinkt. Om dit goed te kunnen zien wordt er onderin de bakken zwart folie gelegd. Na bepaalde tijd worden er monsters genomen van de zaad- en eicellen en worden ze gecontroleerd op vorm en de zaadcellen op beweeglijkheid. Daarna wordt de inhoud van de potjes met vrouwtjes over een zeef gegoten en voorzichtig afgespoeld zodat eventueel vuil verwijderd wordt. De zeef die hiervoor gebruikt wordt heeft een maaswijdte van 30 micron (30 μm). Daarna worden de eicellen verzameld in een bekersglas met zeewater. Deze wordt aangevuld tot 1 liter waarna de inhoud wordt gehomogeniseerd met een "plunger". Dit is een schijf met gaatjes, door deze op en neer te bewegen in het bekersglas wordt de inhoud goed gemengd. Vervolgens worden er een aantal monsters genomen en daarvan wordt geteld hoeveel eicellen ze bevatten. Met een eenvoudige berekening kan daarna het aantal eicellen in het bekersglas worden bepaald. Dit is van belang omdat aan de hand van het aantal eicellen de hoeveelheid toe te voegen sperma wordt bepaald. Als de berekening is gemaakt kan de berekende hoeveelheid sperma worden toegevoegd aan het bekersglas met eicellen. Dan vindt de bevruchting plaats. Door monsters te nemen en deze onder de microscoop te bekijken kan men dit proces volgen. Als er veel eicellen niet bevrucht zijn kan er extra sperma worden toegevoegd. De embryo's die zijn ontstaan kunnen worden opgeslagen in tanks die belucht worden. Na een dag is er een mossellarfje ontstaan.



Figuur 3.3: Schematische weergave van het kweekproces van mosselen in de hatchery.

De eerste twee dagen hoeven de mossellarven niet gevoerd te worden omdat ze dan nog geen orgaan hebben waarmee ze kunnen eten. Twee dagen na de bevruchting hebben de larven wel een orgaan waarmee ze kunnen zwemmen en eten, dus vanaf dat moment moeten de larven worden gevoerd. Het voedsel bestaat uit algen. In de hatchery krijgen de larven twee soorten algen: *T. Iso* en *Chaetoceros gracilis* (zie §2.1). Deze soorten kunnen goed worden gekweekt in plastic zakken of met andere kweekmethoden (zie §2.2). De tanks waarin de larven opgekweekt worden moeten regelmatig worden leeggehaald waarbij de larven op zeven worden afgevangen. De tanks moeten dan schoongemaakt worden om bacteriegroei te voorkomen en om algenresten te verwijderen. De tanks worden schoon- gemaakt met een ontsmettingsmiddel. Overigens moeten alle materialen waarmee de larven in aanraking komen worden ontsmet om ziekten te voorkomen. Tijdens de schoonmaak kunnen de larven worden onderzocht op hun groei. Daarna kunnen de tanks weer gevuld worden.

Stap 4. Na zo'n drie weken zijn de mossellarven klaar om zich te gaan settelen, dat betekent dat ze zich op de bodem willen gaan vestigen. De larven hebben dan een lengte bereikt van ongeveer 250 μm (0,25 mm). Op dat moment moeten de larven worden overgeplaatst naar een andere behuizing. Dat zijn bakken waarin een geschikt substraat aanwezig is waarop de larven zich kunnen vestigen. Dat kunnen touwen of schelpen zijn, maar dat kan ook gaas zijn dat aan de onderkant van een emmer is bevestigd zoals in figuur 3.3. In deze bakken kunnen de larven verder groeien totdat ze naar het buitenwater worden verplaatst. Het is nog niet precies bekend bij welke afmeting dit mogelijk is.

Stap 5. Vervolgens kunnen de larven naar buiten. Ze gaan dan bijvoorbeeld in een flupsy (FLoating UPweller SYstem). Dat is een soort vlot met verschillende silo's waarin het mosselbroed op gaas ligt. Door de silo's vindt een continue waterstroom plaats waardoor de mosseltjes voortdurend voedsel tot hun beschikking hebben. De flupsy kan op een beschutte plaats in zee worden geplaatst. In de flupsy kan het mosselbroed verder worden opgekweekt tot mosselzaad waarna het op de traditionele methode kan worden uitgezaaid. De flupsy is momenteel nog niet operationeel.



Figuur 3.4: Downweller systeem.

3.4 Watersysteem in de hatchery

Het water dat in de hatchery wordt gebruikt is afkomstig van de verswaterleiding (uit de Oosterschelde) waarop allerlei bedrijven in Yerseke zijn aangesloten. De inlaat van deze leiding ligt ongeveer een kilometer West van de haveningang van Yerseke. Voordat het water gebruikt kan worden voor de algenkweek of voor de mosselen en de larven wordt eerst gefilterd. Het water komt via een leiding het gebouw binnen waarna het over een metalen filter gaat die het grove vuil eruit vangt. Vervolgens komt het water in een opvangbak terecht. In deze bak zijn twee schotten geplaatst, de eerste steekt boven het wateroppervlak uit en loopt tot op 10 cm vanaf de bodem. De tweede gaat vanaf de bodem tot aan het wateroppervlak. Het water stroomt aan de linkerkant de bak in, gaat onderdoor het eerste schot en vervolgens over het tweede schot. Op deze manier wordt de rest van het grove vuil verwijderd. De waterstroom komt opgang omdat achter het tweede schot een pomp zit die dat reservoir leegpompt. Als er geen water wordt gebruikt komt er ook geen water binnen.

De pomp zorgt er daarna voor dat het water door twee zandfilter heen gaat, vervolgens gaat het water door een vijftal filters.

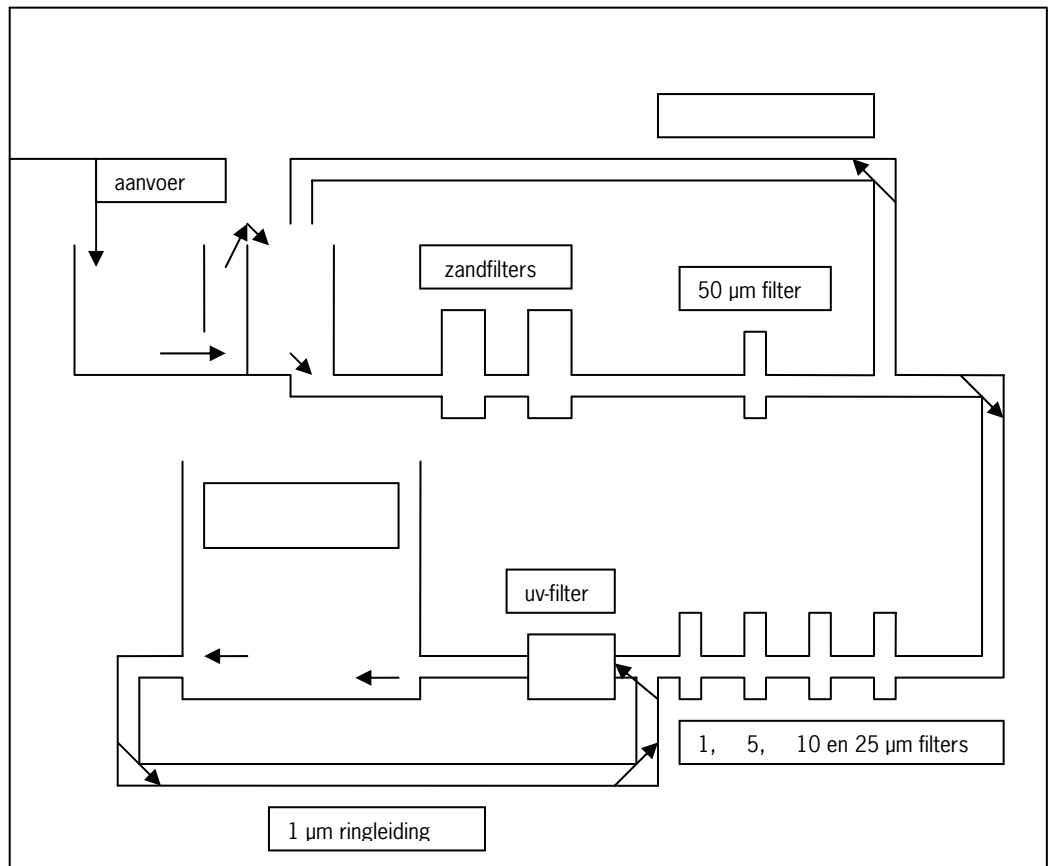
Achtereenvolgens zijn dat filters van 50, 25, 10, 5 en 1 μm . Deze zorgen ervoor dat ook de kleinste deeltjes, zoals algen en bacteriën, uit het water worden gehaald. Daarna gaat het water nog langs een uv-filter waarna het in een groot reservoir terechtkomt. Vanuit dit reservoir



wordt het water vervolgens door een ringleiding door heel het gebouw gepompt. Om bacterie- en algengroei in het water tegen te gaan als het water niet stroomt wordt het continue rondgepompt waarbij het telkens langs het uv-filter gaat om bacteriën te doden.

Figuur 3.5: Waterzuivering in de hatchery.

In de ringleiding zijn verschillende punten waar er water afgetapt kan worden. Naast deze 1 μ m leiding is er ook een 50 μ m leiding, het water uit deze leiding gaat alleen door het 50 μ m filter. In het systeem is ook nog een verwarmder en een koeler opgenomen zodat er altijd water van constante temperatuur is. In figuur 3.6 staat een schematische weergave van het watersysteem in de hatchery.



Figuur 3.6: Schematische weergave van het watersysteem in de hatchery.

4 Materiaal en methode

4.1 *Materiaal*

Er is een opstelling gemaakt om de proeven uit te voeren. De opstelling bestond uit twee steigers, aan elke kant in de algenkamer een. Voor de 25 liter zakken is een steiger gebouwd met 2 liggers op verschillende hoogte zodat er 2 rijen zakken boven elkaar kunnen hangen. Voor de 50 liter zakken is dat niet mogelijk dus is er maar 1 rij liggers nodig. Achter de steigers is de verlichting aangebracht in de vorm van tl-lampen. De tl-lampen hebben een lengte van 1,5 meter. Het type lamp dat wordt gebruikt is de fluorescentielamp van het merk Mazdafluor, serienummer TF58W/BI. Verder is er aan een van de liggers een zuurstoftoevoerbuis bevestigd die voor de beluchting zorgt. Tevens is een opstelling gemaakt om stockcultures en voorkweken te maken. In dit geval een open metalen kast met verschillende planken. Aan de muur werden ook hier weer tl-balken bevestigd. Ook werd weer een luchtsysteem bevestigd.

Rol(len) met plastic
Sealapparaat
Autoclaaf
Silicaat
Vitamine (zie bijlage 1)
Walne medium (zie bijlage 1)
Slangen voor de zuurstofaansluiting, aftapkraantjes en CO₂ toevoer
lazen pipetjes met een filtertje
Glazen pipetjes
Automatische pipet van 1 tot 10 ml
Mondjes voor de automatische pipet
Haemocytometer met dekglasje(s)
Erlenmeyers met een inhoud van 2,5 en 0,25 liter
Aluminiumfolie
Watten
Gasfles met een brander
Fles alcohol (ontsmetten van materialen en handen)
Fles dettol (ontsmetten van de werkplek)
Maatcilinders van verschillende formaten
Bekerglaasjes
Trechter
Stift
Microscoop
Lugol (als fixatief)
Chloor
Thiosulfaat (neutraliseren van het chloor)
Balans
Lepeltjes voor het wegen van het thiosulfaat
Luxmeter voor het meten van de lichtintensiteit



Figuur 4.1: Kast met stockcultures (onder) en grote erlenmeyers (voorkweek voor de zakken).

4.2 Methode

Om een monocultuur te starten is er als eerste natuurlijk een startcultuur van de bepaalde algensoort nodig. Deze startcultuur is te koop bij gespecialiseerde bedrijven die algen kunnen isoleren. Zij zijn dus in staat om één algensoort te isoleren. Als de startcultuur aanwezig is kan men beginnen met de algenkweek.

- 1 A: De voedingsstoffen voor de algen worden geprepareerd. De vitamine, het walne medium en het silicaat worden na bereiding gesteriliseerd in de autoclaaf. Een autoclaaf is toestel waar door middel van hete stoom onder druk instrumenten, glas en andere materialen gesteriliseerd kunnen worden. Dit gebeurt meestal bij een temperatuur tussen de 120 en 130 °C. Hierdoor worden besmettingen voorkomen doordat alle leven in de autoclaaf gedood wordt. (ingrediënten en bereidingswijze van het walne medium en vitamine staan in bijlage 1)
 - B: Er worden erlenmeyers van verschillend formaat geautoclaveerd. Voor het autoclaveren worden de erlenmeyers gevuld met 0,25 of 2,5 liter 1 µm gefilterd zeewater, afhankelijk van het formaat. Op de hals wordt aluminiumfolie bevestigd om de erlenmeyer af te sluiten.
 - C: Als de erlenmeyers geautoclaveerd zijn kan er voeding aan het water worden toegevoegd. De voeding bestaat uit walne-medium, vitaminen en voor diatomeeën (*Chaetoceros*) ook nog silicaat. De hoeveelheden zijn respectievelijk 1 ml, 0,1 ml en 4 ml per liter water. Voor de erlenmeyers met 250 ml water wordt dat dus 0,25 ml walne, 3 a 4 druppels vitamine en 1 ml silicaat. Voor de erlenmeyers van 2,5 liter wordt dat 2,5 ml walne, 0,25 vitamine en 10 ml silicaat. Er moet steriel gewerkt worden, bij het openen en voor het sluiten dient de opening van de erlenmeyers door een vlam te worden gehaald. Vooraf moet de werkplaats schoon zijn gemaakt met alcohol.
- 2 A: De volgende stap in het inoculeren (enten) van de erlenmeyers met algen. (Inoculeren is niks anders dan een (kleine) hoeveelheid algenmedium uit een bestaande cultuur overbrengen in een nieuwe algencultuur). Hiertoe wordt bijna de volledige inhoud (ongeveer 240ml) van een gereedstaande kleine erlenmeyer overgegoten in een grote. De rest gaat in een nieuwe kleine erlenmeyer. Er wordt een steriele plastic pipet in de erlenmeyer gestoken en de erlenmeyer wordt afgesloten met een prop watten en daaroverheen met aluminiumfolie.
 - B: Nu zijn de voorkweken klaar om te gaan groeien, ze worden in de kast geplaatst en worden middels de plastic pipet aangesloten op de beluchting.
 - C: Het duurt minimaal een week voordat de voorkweken gebruikt kunnen worden als inoculum voor de plasticzakken.
- 3 A: Er moeten plasticzakken worden gemaakt van respectievelijk 25 en 50 liter. Het benodigde plastic zit op rollen en wordt met behulp van een speciaal apparaat op de gewenste afstand dichtgeseald. Bovenaan de zak komt een soort lus waarmee de zak kan worden opgehangen. Op de gewenste afstand (= bij een bepaalde inhoud, dus 25 of 50 liter) wordt een streepje gezet zodat duidelijk is tot waar de zak gevuld moet worden. Een centimeter of tien hoger dan dat streepje wordt met een scherp mesje een opening in de zak gemaakt zodat de zak gevuld kan worden.
 - B: De plastic zakken worden opgehangen met vierkante rvs profielen, deze worden dwars op de liggers geplaatst.
 - C: Om contaminatie te voorkomen is het van groot belang dat er altijd steriel wordt gewerkt. Dus dat betekent dat de handen worden ontsmet met alcohol en alle materialen waarmee gewerkt wordt ook ontsmet dienen te zijn.
- 4 A: De plastic zakken worden gevuld met 1 µm gefilterd zeewater. Daarna worden de plastic zakken gechloreerd, hiertoe wordt per liter water een halve milliliter chloor toegevoegd.

Dus voor een 25 liter zak wordt 12,5 ml chloor toegevoegd en voor de 50 liter zakken het dubbele. Hierna worden de openingen bovenaan de zak dichtgeplakt met plakband/tape.

- B: Nu moeten de plasticzakken minimaal 24 uur met rust worden gelaten zodat het chloor het water kan desinfecteren.
- C: Nu kan de beluchting worden aangesloten evenals een aftapkraantje. Aan een van de kraantjes aan de hoofdleiding van de lucht wordt een slangetje bevestigd. Aan het uiteinde komt een glazen pipet met een filtertje om contaminatie zoveel mogelijk te voorkomen. Om steriel te werk te gaan wordt het gedeelte van de zak waar de slangetjes inkomen bespoten met alcohol en met een doekje uitgeveegd. Vervolgens wordt het glazen pipetje simpelweg in de zak geprikt. De procedure voor het aftapkraantje gaat vrijwel hetzelfde met dit verschil dat er met een glazen pipetje een gaatje wordt gemaakt waar daarna het slangetje ingestoken kan worden. De slangetjes en pipetten dienen steriel te zijn, waar mogelijk geautoclaveerd. De beluchting wordt nog niet in werking gesteld, anders heeft het chloreren geen effect.
- D: De volgende stap is het neutraliseren van het water, hiertoe wordt per liter water 0,05 gram thiosulfaat afgewogen en aan het water toegevoegd. Voor een 25 liter zak is dat dus 1,25 gram en voor de 50 liter zakken 2,50 gram. Als dit is afgewogen wordt het thiosulfaat toegevoegd aan een kleine hoeveelheid water uit de betreffende zak. Dit kan bijvoorbeeld in een plastic bakje met deksel. Vervolgens wordt er gewacht totdat het thiosulfaat volledig is opgelost, dan kan de suspensie worden toegevoegd aan de inhoud van de zak.

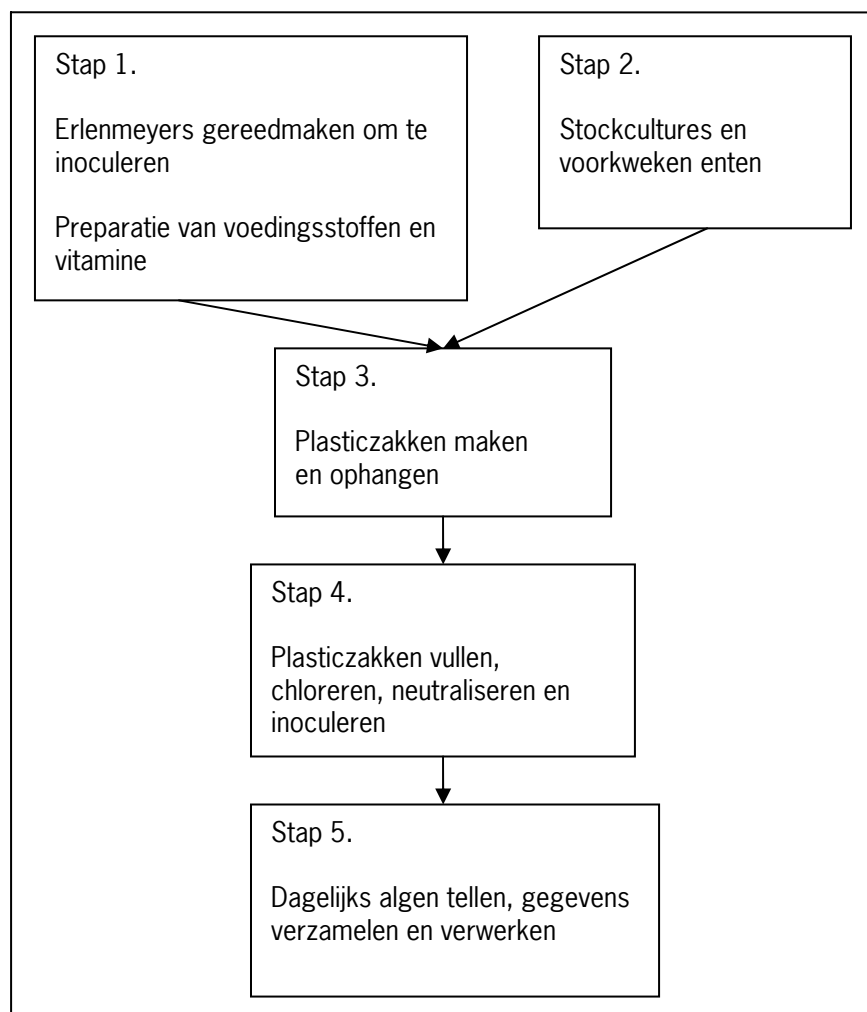


Figuur 4.2: Close up van drie 25 liter zakken, links *Isochrysis*,
 Figuur 4.2: Close up van drie 25 liter zakken, links *Isochrysis*,
 midden en rechts verschillende stadia van *Chaetoceros*.

- E: De beluchting wordt in werking gesteld.
- F: Vervolgens wachten we af totdat het thiosulfaat zijn werk gedaan heeft, dit kunnen we controleren door een monster uit de zak te nemen en een chloortest te doen. Als er geen chloor meer in de zak aanwezig is gaan we naar de volgende stap.
- G: Nu kunnen de voedingsstoffen voor de algen aan het water worden toegevoegd. Voor de 25 liter zakken bestaat de voeding uit 2,5 ml vitamine, 25 ml walne en voor *Chaetoceros* ook nog 100 ml silicaat. Voor de 50 liter zakken is dit het dubbele. Het toevoegen gebeurt met een pipet, voor de grotere hoeveelheden kan een maatcilinder worden gebruikt. Ook hier moet steriel gewerkt worden, dus alle benodigde materialen, de werkplek en de handen moeten eerst ontsmet worden.
- H: Na het voeden van de zak kan er geïnoculeerd worden. Hiervoor gebruiken we de inhoud van een grote erlenmeyer, de voorkweek. De inhoud wordt verdeeld over twee zakken. Bij 2 zakken met dezelfde inhoud wordt in elke zak dus 1,25 liter algensuspensie toegevoegd. Bij een 25 en 50 liter zak gaat dit iets anders, hierbij

krijgt de 50 liter zak 2 keer zoveel inoculum als de 25 liter zak. Dat komt dus neer op 1600 ml voor de 50 liter zak en 800 voor de 25 liter zak. Op deze manier weten we zeker dat de startconcentratie in de zakken vrijwel gelijk is.

- I: Op de zak schrijven we wanneer deze is gechloreerd, geneutraliseerd en geïnoculeerd. Ook kan de zak gemerkt worden met een bepaalde code zodat de zakken uit elkaar kunnen worden gehouden.
- 5
- A: Na de inoculatie wordt er ongeveer een uur gewacht voordat het eerste monster wordt genomen om te tellen. Hierdoor heeft de inhoud van de zak de tijd om zich te homogeniseren. Er wordt een kleine hoeveelheid monster genomen in een bekersglas.
 - B: Nu kan de algenconcentratie in de zak bepaald worden door twee tellingen te doen met behulp van de haemocytometer. De uitleg van deze methode staat in bijlage 2.
 - C: Het tellen wordt elke dag herhaald, zorg ervoor dat dit steeds op ongeveer hetzelfde tijdstip gebeurt. Als het niet mogelijk is om op een dag te tellen, bijvoorbeeld in het weekend, dan kan een ander voor je tellen, of nog beter die kan een monster nemen in een reageerbuis en die fixeren met lugol. Het is belangrijk om bij het nemen van het monster eerst het restant uit het aftapslangetje te laten lopen omdat de dichtheid daarvan verschilt met de werkelijke dichtheid in de zak.
 - D: De gegevens die verzameld worden moeten uiteraard goed gedocumenteerd worden, eerst op papier en (meteen) daarna bijvoorbeeld in een excel file.



Figuur 4.3: Weergave van de methode.

4.3 Aandachtspunten bij de methode

De temperatuur in de algenkamer en in de kamer met de stockculturen en voorkweken moet zo constant mogelijk worden gehouden. De beste temperatuur voor de algen die gebruikt worden is 20°C.

Voor het CO₂ experiment wordt na het aansluiten van de beluchting en het aftapkraantje ook de CO₂ toevoer in de zak gestoken. Maar voordat dit kan gebeuren moet eerst bekend zijn (of gemeten worden) hoeveel lucht er per minuut in de zak komt. Dit getal is nodig omdat we dan weten hoeveel CO₂ er toegevoegd moet worden om een percentage van 1 % CO₂ te verkrijgen. De CO₂ die wordt toegevoegd komt uit een gasfles, vanuit deze fles loopt een simpel slangetje direct naar de zakken toe, aan het eind van het slangetje komt een glazen pipet die in de zak wordt gestoken.

Bij het CO₂-experiment is het van belang dat dagelijks de pH wordt gemeten om te voorkomen dat de pH te laag wordt. Als de pH te laag wordt, wat een negatief effect heeft op de groei van de algen, moet de CO₂-toevoer zachter worden gezet. Eventueel moet de toevoer tijdelijk worden stopgezet. De optimale pH voor algen ligt tussen 7 en 8,5. Omdat het toevoegen van CO₂ er voor zorgt dat de pH omlaag gaat, is het belangrijk om niet te veel toe te voegen. Er moet in elk geval zorg voor worden gedragen dat de pH niet daalt tot onder de 7. Bij hogere dichtheden kan er meer CO₂ worden toegevoegd omdat de pH dan hoger wordt doordat de algen meer CO₂ opnemen voor de fotosynthese.

Voor de proef met de lichtintensiteit worden er twee zakken belicht met een verschillende sterkte. De ene zak wordt belicht met 4 tl-lampen en de andere zak met 2 lampen. Hierbij moet er wel op worden gelet dat er niet te veel licht van andere tl-lampen op de zakken schijnt, hierdoor kunnen de resultaten beïnvloed worden. De lichtintensiteit van vier lampen is ongeveer 4000 lux en 2 lampen geven 2000 lux.

Als alle gegevens eenmaal verzameld zijn kunnen de gegevens worden ingevoerd in een excel sheet. Van deze gegevens worden grafieken gemaakt, waarin met behulp van de foutmarges het verschil tussen 2 zakken wordt weergegeven. Op de x-as wordt de tijd in dagen uitgezet en op de y-as de dichtheid.

Om de resultaten statistisch met elkaar te kunnen vergelijken werd er gebruik gemaakt van het statistisch programma Systat, versie 9. Dit programma werd gebruikt om de resultaten van de 25-50 liter zakken en de CO₂-zakken statistisch met elkaar te kunnen vergelijken. Hiervoor is gebruik gemaakt van de two sample t-test. De statistische vergelijking is gemaakt met de eindconcentraties (hoogste dichtheid) van de zakken omdat dat de parameter is die we willen vergelijken. De tijdsduur voordat de maximale dichtheid wordt bereikt is niet statistisch met elkaar vergeleken omdat al deze waarden gelijk waren. De bereikte eindconcentraties (variabele) zijn dus uitgezet tegen de soort behandeling van de zakken (25/50 liter, met of zonder CO₂).

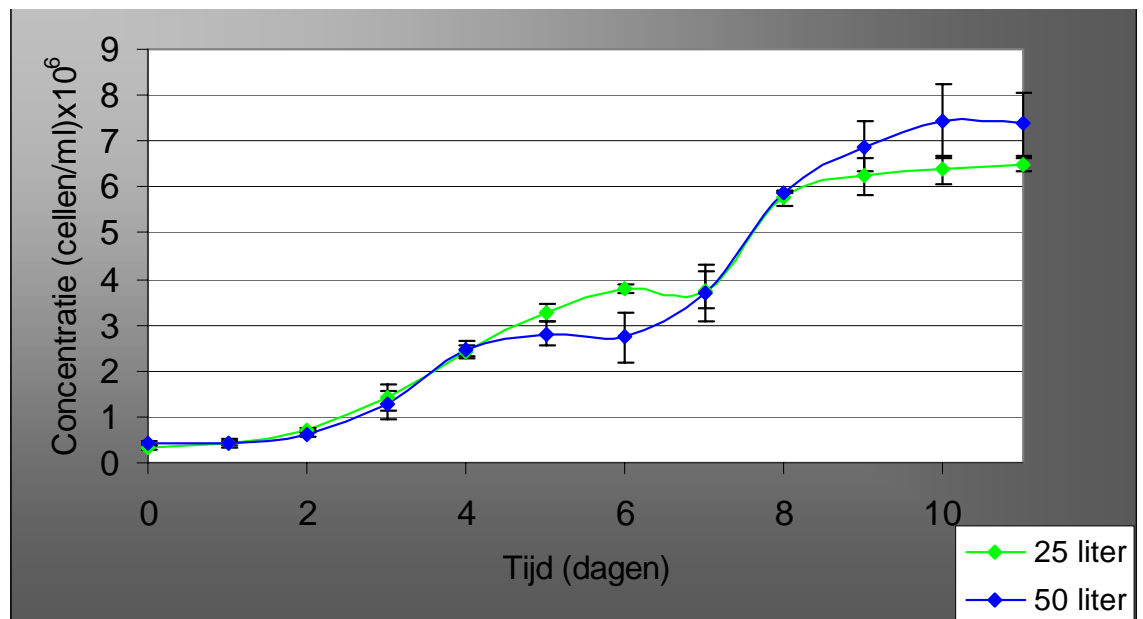
De tijdsduur per proef was gemiddeld 12 dagen. Om ervoor te zorgen dat de uitkomsten van de proef nauwkeurig zijn werden de proeven minstens 2 maal uitgevoerd zodat er een statistische onderbouwing kan worden gegeven over de resultaten.

Bij de proeven is er gebruik gemaakt van twee algensoorten te weten: *T. Iso* en *Chaetoceros gracilis*. Het gaat dan om een monocultuur van de diatomee *Chaetoceros* en de flagellaat *T. Iso*. De totale tijdsduur van de proeven heeft enkele weken beslagen.

5 Resultaten

Vergelijking 25 en 50 liter zakken

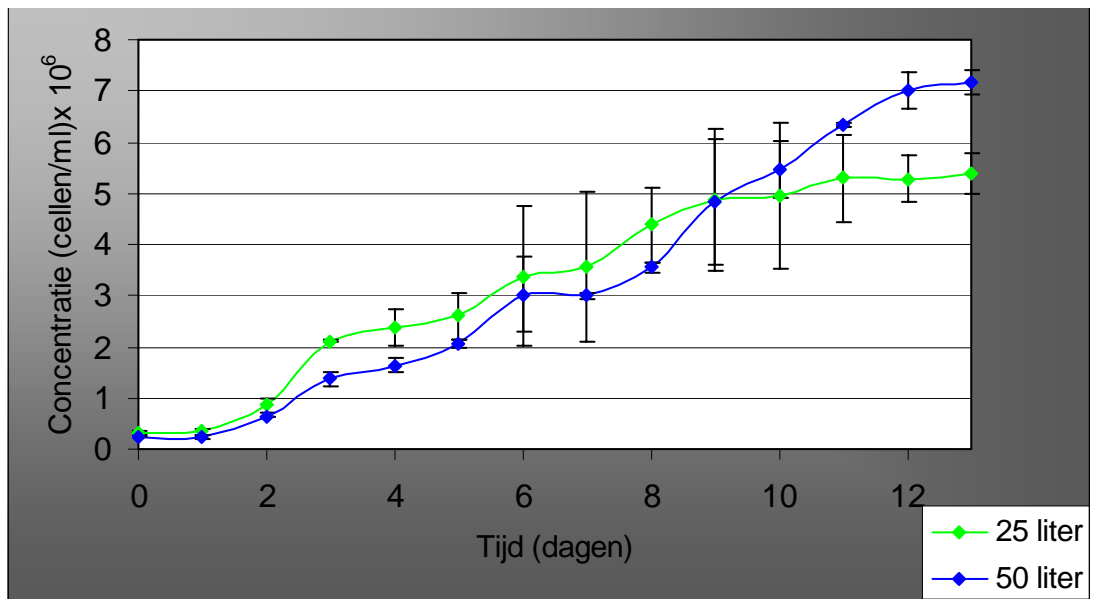
Bij de vergelijking tussen de 25 en 50 liter zakken is de proef uitgevoerd met beide soorten algen. In figuur 5.1 is het resultaat weergegeven van de vergelijking bij *T. Iso*. De foutmarges in de grafieken geven de standaarddeviatie weer tussen twee zakken, de proef is namelijk in duplo uitgevoerd. Het verschil in concentratie tussen de 25 en 50 liter zakken is niet groot. Tot dag zeven is de dichtheid in de 25 liter zak wat hoger dan in de 50 liter zak. Echter vanaf dag negen is dat juist andersom. De maximale dichtheid die wordt bereikt in de 25 liter zak is 6,6 miljoen algen per ml. In de 50 liter zak is dat 7,3 miljoen. Zowel bij de 25 als de 50 liter zakken duurt het 10 dagen voordat de maximale concentratie bereikt wordt.



Figuur 5.1: Vergelijking 25 en 50 liter zakken met *T. Iso*.

Bij de vergelijking met *Chaetoceros* zien we ongeveer hetzelfde (figuur 5.2). Tot dag negen is de concentratie in de 25 liter zakken hoger dan in de 50 liter zakken. Daarna is de concentratie in de 50 liter zakken juist hoger. Het verschil in de einddichtheid tussen de 25 en 50 liter zak is hier wel groter dan bij de proef met *Isochrysis*. De maximale dichtheid in de 25 liter zakken is namelijk 5,6 miljoen en in de 50 liter zakken 7,1 miljoen algen per ml. Ook hier is de tijdsduur voordat de maximale algendichtheid wordt bereikt gelijk, namelijk 13 dagen voor beide volumes.

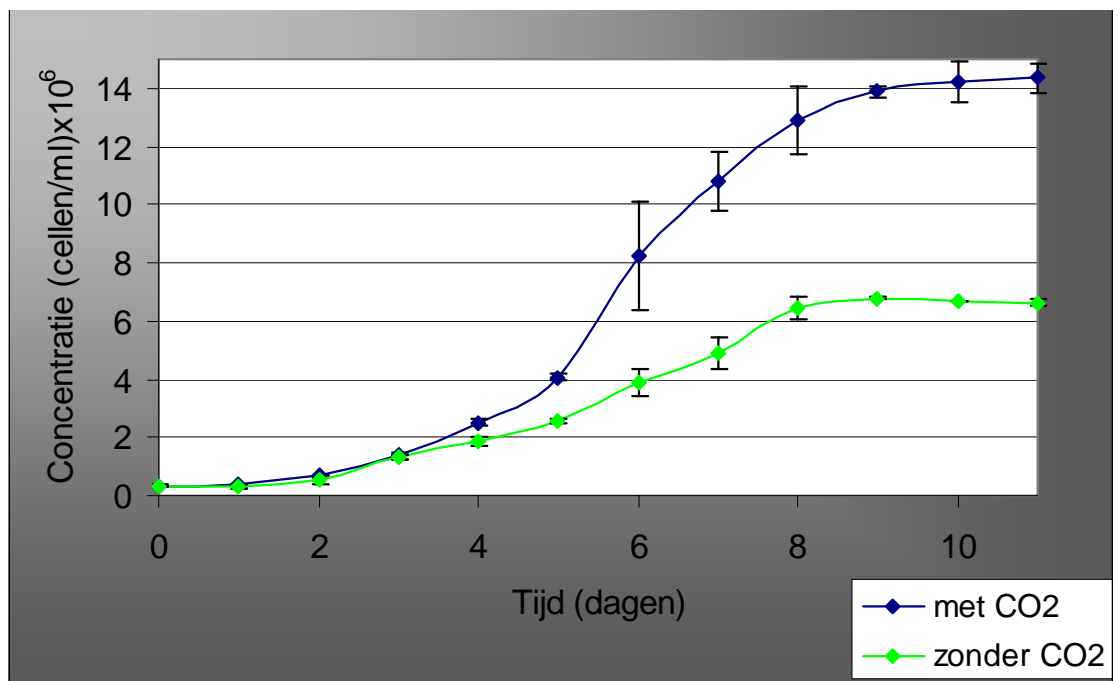
Uit beide grafieken kan ook nog het verschil in groeisnelheid worden opgemaakt. Bij *Isochrysis* duurt het 10 dagen voordat de maximale dichtheid wordt bereikt, terwijl dat bij *Chaetoceros* 13 dagen is.



Figuur 5.2: Vergelijking 25 en 50 liter zakken met *Chaetoceros gracilis*.

Vergelijking met en zonder toevoeging van koolstofdioxide

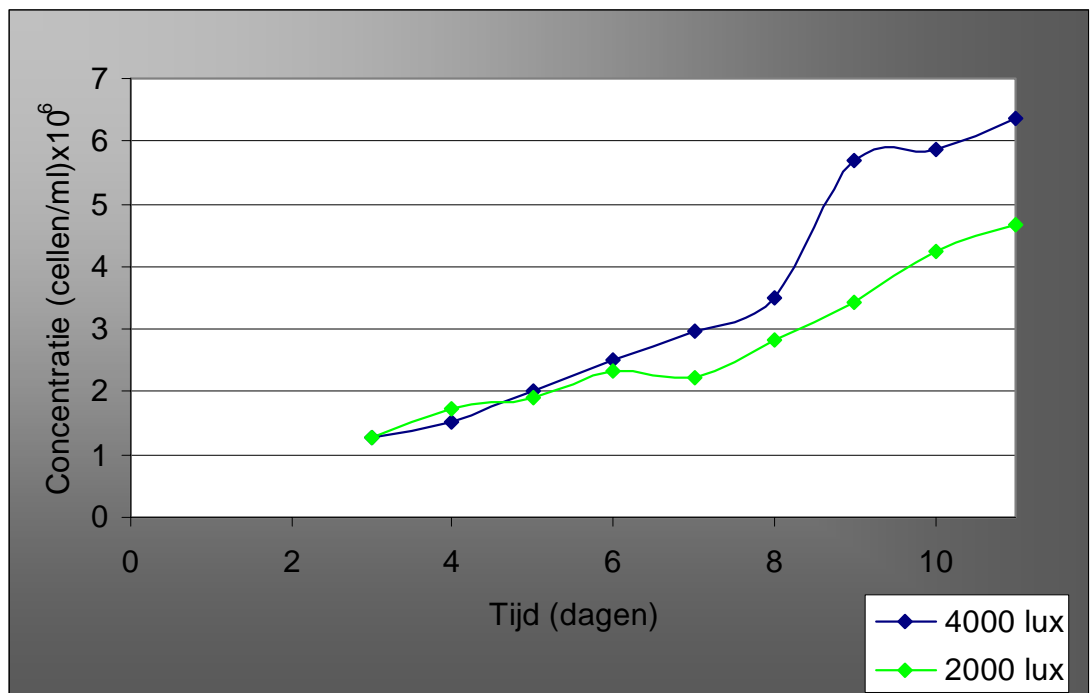
Bij de vergelijking tussen 50 liter zakken met en zonder toevoeging met CO₂ is de proef alleen uitgevoerd met *Isochrysis*. In figuur 5.3 is het resultaat van de vergelijking weergegeven. De foutmarges in de grafiek geven weer de standaarddeviatie aan tussen twee zakken. Het verschil in eindconcentratie tussen de zakken met en zonder toevoeging van CO₂ is groot. Echter tot dag 4 gaan de concentraties gelijk op. Daarna groeien de algen in de zakken met toevoeging van CO₂ sneller. De maximale dichtheid die wordt bereikt in de zakken met toevoeging van CO₂ is 14,4 miljoen algen per ml. In de zakken zonder toevoeging van CO₂ is dat 6,8 miljoen. Dat is dus ruim 2 keer minder dan in de zakken met CO₂. Bij beide behandelingen duurt het 11 dagen totdat de maximale dichtheid wordt bereikt.



Figuur 5.3: Vergelijking 50 liter zakken met en zonder toevoeging van CO₂.

Vergelijking verschillende lichtintensiteiten

Bij deze vergelijking is één zak verlicht met 2 lampen in plaats van 4. Twee lampen geven ongeveer 2000 lux en 4 lampen geven 4000 lux. Deze proef is niet in duplo uitgevoerd, daarom zijn er geen foutmarges in de grafiek te zien. Ook zijn er in de eerste drie dagen geen monsters genomen dus ontbreken daarvan de gegevens. De proef is alleen uitgevoerd met *Chaetoceros*. Tot dag zes zijn de dichtheden in beide zakken min of meer gelijk. Daarna groeien de algen in de zak met 4000 lux belichting sneller dan in de zak met 2000 lux belichting. Het verschil in de eindconcentratie is ongeveer 1,7 miljoen algen per ml. Echter aan de vorm van de grafiek te zien hadden beide zakken hun hoogste concentratie nog niet bereikt. Dit is te zien doordat de stijgende lijn nog niet afvlakt.



Figuur 5.4: Vergelijking 50 liter zakken met verschillende belichtingssterkte. Deze test is alleen met *Chaetoceros* uitgevoerd.

Statistische vergelijking

Er is onderzocht of de opgetreden verschillen tussen de zakken significant zijn. Dit is gebeurd met de t-test. Er is gewerkt met een betrouwbaarheid van 95%. Het verschil is significant als de p-waarde kleiner is dan 0,05.

Tabel 5.1: Statistische uitkomsten van de vergelijkingen.

25/50 liter zakken, <i>T.Iso</i>		25/50 liter zakken, <i>Chaetoceros</i>		met en zonder toevoeging CO_2	
<i>n</i> -waarde	<i>p</i> -waarde	<i>n</i> -waarde	<i>n</i> -waarde	<i>p</i> -waarde	<i>n</i> -waarde
2	0,108	2	2	0,108	2

De t-test is uitgevoerd met de eindconcentraties. Bij de vergelijking tussen de 25 en 50 liter zakken is het verschil in de eindconcentratie niet significant. De p-waarde is zowel bij *Isochrysis* als bij *Chaetoceros* groter dan 0,05, dus zijn de verschillen niet significant. Bij de CO_2 -test is het verschil in de eindconcentratie wel significant, want de p-waarde is kleiner dan 0,05. Het

resultaat van de proef met de verschillende lichtintensiteiten kan niet statistisch onderbouwd worden omdat die niet in duplo is uitgevoerd.

6 Discussie

Vergelijking 25 en 50 liter zakken

De bereikte dichtheden zijn wat aan de lage kant. Bij andere bedrijven worden dergelijke dichtheden al na 6 à 7 dagen bereikt (Pers. Comm. R. Robert en N. Nevejan). Dit in tegenstelling tot de hatchery waar dat 10 à 13 dagen duurt, dus bijna twee keer zo lang. Verder zien we zowel bij *Chaetoceros* als bij *Isochrysis* dat in het begin de 25 liter zakken een hogere dichtheid hebben dan de 50 liter zakken (zie figuur 5.1 en 5.2). Later is het juist precies omgekeerd. Dit verschil wordt waarschijnlijk veroorzaakt doordat de groei van de algen in de 25 liter zakken eerder op gang komt dan in de 50 liter zakken. Maar de verwachting was dat de 25 liter zakken tot het eind een hogere dichtheid zouden hebben dan de 50 liter zakken, omdat koolstof de limiterende factor zou worden in de 50 liter zakken. Dit is dus niet het geval, de 50 liter zakken behalen de hoogste dichtheden. De verschillen zijn echter niet significant.

Gedurende mijn stage zijn in sommige 25 liter zakken wel een stuk hogere dichtheden bereikt dan tijdens de proeven. Dit in tegenstelling tot de 50 liter zakken, want daarin zijn nooit hogere dichtheden bereikt dan zo'n 8 miljoen. Dit geeft dus aan het er wel degelijk een verschil is, dit is met de test alleen niet naar voren gekomen. Wat precies de oorzaak is geweest van het resultaat is moeilijk te zeggen. Er zijn wel enkele factoren die een rol kunnen hebben gespeeld. De kwaliteit van de voorkweken is gedurende enkele weken niet zo goed geweest. Echter hier hadden zowel de 25 als 50 liter zakken mee te maken. Een andere oorzaak kan contaminatie zijn. Dit is een probleem dat bij meerdere zakken gespeeld heeft. Het is niet duidelijk waarmee de zakken besmet zijn geweest, maar naar alle waarschijnlijkheid zijn het bacteriën of schimmels geweest. Ook dit kan zijn invloed hebben gehad. Verder zijn de tests niet gelijktijdig uitgevoerd omdat dat eigenlijk niet mogelijk was. Hierdoor zijn er dus kleine verschillen geweest in bijvoorbeeld de temperatuur. Als laatste factor kan ook de waterkwaliteit invloed hebben gehad. Sommige zakken zijn namelijk niet gechloreerd, het water is dan door een 0.2 µm filter gegaan. Hiermee zouden (vrijwel) alle bacteriën uit het water moeten zijn, maar dat was niet het geval.

Vergelijking 50 liter zakken met en zonder toevoeging van CO₂

Het verschil in maximale algendichtheid tussen de zakken met en zonder toevoeging van CO₂ is significant. Dit ligt ook in de lijn der verwachting. De reden voor dit verschil zit hem in de limitatie van CO₂ voor de algen. In de grafiek (figuur 5.3) is duidelijk te zien dat het verschil tussen de zakken in het begin nihil is. Pas na een paar dagen wordt het verschil duidelijk zichtbaar, en aan het eind is de maximale dichtheid van de een twee keer zo hoog als bij de ander. In het begin van de cultuur is er geen verschil omdat de algen in hun groei niet gelimiteerd worden door een bepaalde factor. Later wordt CO₂ in de zak zonder toevoeging van CO₂ de limiterende factor voor de groei van de algen.

Vergelijking 50 liter zakken met verschillende lichtintensiteit

Het verschil tussen de maximale dichtheden is ongeveer 1,7 miljoen. De hoogste dichtheid wordt bereikt in de zak met de "normale" verlichting van 4000 lux. Blijkbaar treedt er toch geen foto-inhibitie op waardoor de algen minder snel groeien. Een belichting van 2000 lux is waarschijnlijk niet voldoende op een optimale groei te realiseren. Dit is niet met zekerheid te zeggen omdat de proef niet in duplo is uitgevoerd waardoor er geen statistische onderbouwing kan worden gegeven.

7 Conclusie

- 1a *Is er significant verschil in de maximale algendichtheid tussen 25 en 50 liter zakken?*
b *Is er significant verschil in de tijdsduur totdat de maximale algendichtheid wordt bereikt tussen 25 en 50 liter zakken?*

Het verschil in de maximale algendichtheid tussen de 25 en 50 liter zakken is niet significant. Ook het verschil in de tijdsduur tot het bereiken van de maximale dichtheid is niet significant. Dit geldt zowel voor *Chaetoceros* als *Isochrysis*.

- 2 a *Is er significant verschil in de maximale algendichtheid tussen zakken met en zonder toevoeging van CO₂?*
b *Is er significant verschil in de tijdsduur totdat de maximale algendichtheid wordt bereikt tussen zakken met en zonder toevoeging van CO₂?*

Het verschil in de maximale algendichtheid tussen zakken met en zonder toevoeging van CO₂ is significant. De maximale algendichtheid in zakken die CO₂ toegevoegd krijgen is ongeveer 2 keer zo hoog als bij zakken die geen CO₂ toegevoegd krijgen. Het verschil in de tijdsduur tot het bereiken van de maximale dichtheid is niet significant.

- 3 a *Is er significant verschil in de maximale algendichtheid tussen zakken met verschillende belichtingssterkte?*
b *En is er significant verschil in de tijdsduur totdat de maximale algendichtheid wordt bereikt tussen zakken met verschillende belichtingssterkte?*

Op beide vragen is eigenlijk geen eenduidig antwoord te geven omdat de zakken nog niet hun maximale dichtheid hadden bereikt. Het leek er echter wel op dat de zak met de sterkste belichting de hoogste dichtheid zou bereiken.

Door welke ingrepen kan de algenkweek in plasticzakken in de mosselhatchery verbeterd worden?

Het is overduidelijk dat het toevoegen van CO₂ een zeer positief effect heeft op de maximale algendichtheid die kan worden bereikt in de plastic zakken van 50 liter. Door het toevoegen van CO₂ kunnen er veel meer algen worden gekweekt in dezelfde tijd als voorheen. Het kweken in 50 liter zakken met toevoeging van CO₂ kan behoorlijk lonend zijn voor de hatchery als er grote hoeveelheden algen gekweekt moeten worden.

Eventueel kan er als vervolgstudie nog onderzoek worden gedaan naar toevoeging van CO₂ aan 25 liter zakken. Ook kan er verder onderzoek worden gedaan naar het verschil tussen 25 en 50 liter zakken omdat de verwachtingen nu niet zijn uitgekomen.

Ook kan er nog een aanvullend (literatuur) onderzoek worden gedaan naar de optimale belichtingssterkte voor de algen.

Door het onderzoek is verder naar voren gekomen dat de algenkweek in plasticzakken eenvoudig is, iedereen kan het bij wijze van spreken doen. De kweek in plastic zakken is weinig intensief. Er worden zakken gemaakt, ze worden gebruikt, en je gooit ze na afloop weg. Het is dus niet nodig om na een kweek de zak te reinigen omdat je gewoon een nieuwe maakt. Bij andere methoden kan dat toch wel wat tijd en geld kosten. Daarnaast is het qua oppervlakte-inhoud-verhouding een redelijk gunstige methode. Op een beperkte oppervlakte kunnen toch veel algen gekweekt worden.

8 Lijst van geraadpleegde literatuur

Boeken:

- Bayne B.L., *Marine mussels: their ecology and physiology*, Cambridge 1976
- Helm M.M. and Bourne N., *Hatchery culture of bivalves: A practical manual*, Rome 2004
- Hoff F.H. & Snell T. W., *Plankton culture manual fifth edition*, Fifth edition, Dade City 2001
- Richmond A., *Handbook of Microalgal Culture, Biotechnology and Applied Phycology*, Oxford 2004
- Vlasblom A.G., *Het schelpdierlarvenonderzoek in het laboratorium te Wemeldinge*, Wemeldinge 1963

Internet:

- www.advancedaquarist.com/issues/aug2002/breeder.htm
- www.hollandsepot.dordt.nl/artikelen/artikelen.htm
- www.isoehrysis.com
- www.natuurinformatie.nl/ecomare.devleet/natuurdatabase.nl/i000327.html
- www.nioo.nl
- www.nioz.nl
- www.rivo.nl

Bijlagen

Bijlage 1: Walne medium en vitamine oplossing

Solution 2

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

Bovenstaande wordt toegevoegd aan 100ml demiwater en 1 ml HCL (36%) om een goede oplossing te verkrijgen.

Solution 1

Na ₂ EDTA	45g
H ₃ BO ₃	33.60g
NaH ₂ PO ₄ .2H ₂ O	20g
MnCl ₃ .4H ₂ O	0.36g
FeCl ₃ .6H ₂ O	1.30g
Solution 2	1ml

Bovenstaande wordt toegevoegd aan 1000ml demiwater

Voor gebruik moet het walne medium geautoclaveerd worden.

Vitamine oplossing

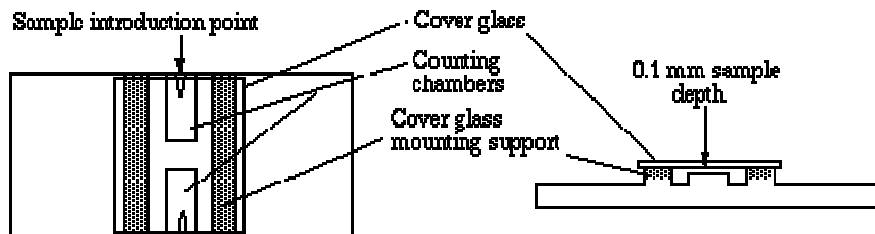
Thiamin chlohydrate	200mg
Cyanocobalamin	10mg

Bovenstaande wordt toegevoegd aan 100ml gesteriliseerd demiwater. Gebruik steriele materialen om de oplossing te prepareren.

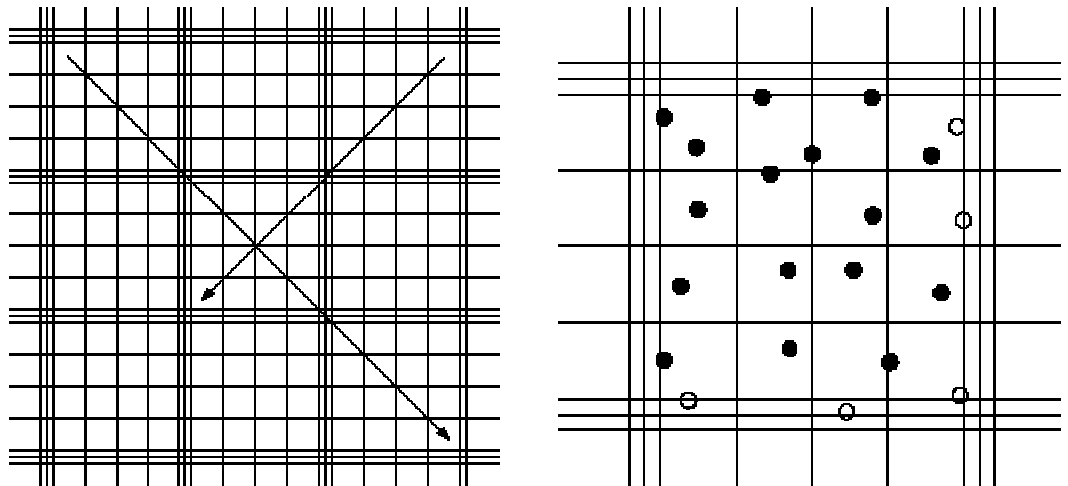
Bewaar de vitamineoplossing bij -18 °C.

Bijlage 2: Het tellen van algen

Algen kan je op verschillende manieren tellen. Deze tellingen vinden vaak plaats onder de microscoop. Een van deze methoden is de haemocytometer. De haemocytometer is een dik plaatje glas waarin zich in een verdieping 2 telkamers bevinden. De telkamers zijn verdeeld in vierkantjes. Door een algensuspensie in de haemocytometer te brengen en het aantal algen in een bepaald aantal vierkantjes (25) te tellen, kan de algendichtheid worden berekend. Nadat de algensuspensie in de haemocytometer is gebracht moet men eerst 5 minuten wachten voordat men kan gaan tellen. Dit dient om de algen de gelegenheid te geven te bezinken, zodat echt alle aanwezige algen geteld worden. De uitkomst van de telling geeft het aantal algencellen per $0,1\mu\text{l}$. Om dit om te rekenen naar het aantal cellen per ml wordt de uitkomst vermenigvuldigd met 10.000 (10^4). Voor de nauwkeurigheid worden van één monster twee tellingen gedaan, de uitkomsten daarvan worden dan gemiddeld. Als de concentratie in het monster dusdanig hoog is dat het tellen erg lastig wordt, moet het monster verdund worden. Er wordt dan 1 ml monster genomen en 9 ml water, de verdunning is dan 10 maal. De uitkomst van de telling moet dan met 10 vermenigvuldigd worden om het correcte aantal algen te weten. In onderstaande figuur is een haemocytometer afgebeeld.



Figuur 9.1: De haemocytometer.



Figuur 9.2: Detailbeeld van de telkamer. In een raster worden 25 hokjes geteld, en wel door de twee diagonalen te volgen (dat zijn 24 hokken) en een hokje naast het laatst getelde hok. In de rechterafbeelding een close-up van 1 hokje. De cellen die de linker of bovenlijn raken worden meegeteld (•) en degene die de rechter of onderlijn van het hokje raken worden niet meegeteld(o).

Bijlage 3: Resultaten statistische vergelijking

Er wordt onderzocht of de opgetreden verschillen tussen de zakken significant is. Dit doen we met de t-test. Er is gewerkt met een betrouwbaarheid van 95%. Als er een significant verschil aangetoond is, moet de p kleiner zijn dan 0.05.

Vergelijking 25-50 liter zakken met *T. Iso*

Two-sample t test on VAR00005 (eindconcentraties) grouped by VAR00001 (behandeling 25 of 50 liter)

Group	N	Mean	SD
25	2	6500000.000	141421.356
50	2	7447500.000	774281.925

Separate Variance t = -3.836 df = 1.4 Prob = 0.108
 Difference in Means = -1675000.000 95.00% CI = -4.684E+06 to 1.334E+06

Er is geen significant verschil omdat de Prob(ability) groter is dan 0.05.

Vergelijking 25-50 liter zakken met *Chaetoceros*

Two-sample t test on VAR00002 (eindconcentraties) grouped by VAR00001 (behandeling 25 of 50 liter)

Group	N	Mean	SD
25	2	5500000.000	565685.425
50	2	7175000.000	247487.373

Separate Variance t = -1.702 df = 1.1 Prob = 0.326
 Difference in Means = -947500.000 95.00% CI = -7.056E+06 to 5.161E+06

Er is geen significant verschil omdat de Prob(ability) groter is dan 0.05.

Vergelijking 50 liter zakken met en zonder toevoeging van CO₂

Two-sample t test on VAR00002 (eindconcentraties) grouped by VAR00001\$ (behandeling met of zonder CO₂)

Group	N	Mean	SD
+CO2	2	1.43 500E+07	4949 74.747
-CO2	2	6800 000.000	7071 0.678

Separate Variance t = 21.355 df = 1.0 Prob = 0.027
 Difference in Means = 7550000.000 95.00% CI = 3.453E+06 to 1.165E+07

Er is een significant verschil tussen de zakken met en zonder toevoeging van CO₂ omdat de Prob(ability) kleiner is dan 0.05.

Voor de test met de verschillende lichtintensiteiten kan geen statistische onderbouwing worden gegeven omdat die test niet in duplo is uitgevoerd.