

Draining Sustainable Profit Fase 2: laboratoriumexperimenten betreffende benutting van drainwater voor het kweken van algen voor oesterteelt

Pauline Kamermans, Ainhoa Blanco & Emiel Brummelhuis

Rapport C021/09



Institute for Marine Resources and Ecosystem Studies

Wageningen *IMARES*

Vestiging Yerseke

Opdrachtgever: Stichting H2Organic
Groeneweg 28
2691 MP 's Gravenzande

Financiers: Stichting Innovatie Glastuinbouw
en Rabobank Nederland

Publicatiedatum: maart 2009

- 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.

© 2009 Wageningen **IMARES**

Wageningen IMARES is geregistreerd in het Handelsregister Amsterdam nr. 34135929, BTW nr. NL 811383696B04.

De Directie van Wageningen IMARES is niet aansprakelijk voor gevolgschade, noch 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 uit dit rapport mag weergegeven en/of gepubliceerd worden, gefotokopieerd of op enige andere manier gebruikt worden zonder schriftelijke toestemming van de opdrachtgever.

A_4_3_1-V5

Inhoudsopgave

Inhoudsopgave	3
Samenvatting	5
1. Inleiding.....	7
2. Kennisvraag.....	9
3. Methoden	11
3.1. Laboratoriumschaal kweek algensoorten	11
3.1.1. Analyse waterkwaliteit drainwater	11
3.1.2. Bepaling geschiktheid drainwater voor algengroei.....	11
3.1.3. Bepaling groei algen en opname nutriënten.....	11
3.2. Voedingsproef oesters	12
3.2.1. Proef opstelling.....	12
3.2.2. Voedseltoediening en monitoring waterkwaliteit	14
3.2.3. Analyse voedingswaarde algen.....	14
3.2.4. Bepaling voedselopname en groei oesters	14
4. Resultaten en discussie	15
4.1. Laboratoriumschaal kweek algensoorten	15
4.1.1. Waterkwaliteit drainwater	15
4.1.2. Geschiktheid drainwater voor algengroei.....	16
4.1.3. Groei algen en opname nutriënten	24
4.2. Voedingsproef oesters	28
4.2.1. Waterkwaliteit	28
4.2.2. Voedingswaarde algen.....	28
4.2.3. Voedselopname en groei oesters	29
5. Conclusies en aanbevelingen.....	35
5.1. Geschiktheid drainwater voor algengroei.....	35
5.2. Opname nutriënten uit drainwater door groei algen.....	35
5.3. Groei oesters op in drainwater gekweekte algen.....	36
6. Kwaliteitsborging	37
7. Dankwoord	37
Referenties	38
Verantwoording	39

Samenvatting

Drainwater dat vrij komt in de glastuinbouw bevat zouten en voedingsstoffen die bij lozing een belasting op de watersystemen geven, hetgeen lozingsheffingen met zich meebrengt en waardoor tevens waardevolle nutriënten verloren gaan. De uitdaging van het reduceren van de milieubelasting ligt in het hergebruiken van de nutriënten, waardoor een kostenpost kan worden omgezet in een renderende reststroom. Het (beperkte) zoutgehalte (3 promille of in geconcentreerde vorm 12 promille) van het drainwater maakt het water mogelijk geschikt voor de kweek van brakwater (en adaptieve mariene) algensoorten. Hierdoor worden waardevolle nutriënten onttrokken en wordt de anorganische belasting van het drainwater lager. Het gekweekte algenproduct kan geschikt zijn voor een aanvullende teelt van een aquacultuurproduct zoals schelpdieren, deze kunnen aan elkaar gekoppeld worden. Aangezien dergelijke mogelijkheden nieuw zijn, bestaan er nog een aantal onbekende factoren, zoals het selecteren van geschikte soorten algen voor kweek, de voedingswaarde van de oester en voedselveiligheidsrisico's. Deze parameters zijn aan de hand van een desk studie (Fase 1) gekoppeld aan laboratorium experimenten (Fase 2) onderzocht.

Dit is het tweede deel van de studie naar de mogelijkheden voor benutting van drainwater uit de glastuinbouw voor het kweken van algen gekoppeld aan een oesterteelt. In een dergelijke combinatie wordt de milieubelasting gereduceerd door hergebruik van nutriënten uit drainwater en ontstaat tegelijkertijd een mogelijkheid voor het telen van oesters op het land. De hoofdvragen zijn: (1) kunnen algen gekweekt worden met drainwater als nutriënten bron, (2) hoeveel nutriënten worden onttrokken aan het drainwater door de algenteelt en (3) kunnen oesters gekweekt worden met de geproduceerde algen?

De geschiktheid van drainwater voor algengroei is getest in het laboratorium voor vier van de zes in het eerste deel van de studie (deskstudie) geselecteerde algensoorten: *Brachiomonas submarina*, *Chaetoceros muelleri*, *Thalassiosira pseudonana* en *Dunaliella tertiolecta*. De twee andere soorten waren of in slechte conditie aangeleverd door de cultuurbibliotheek (*Skeletonema subsalsum*) of konden gedurende het project niet worden verkregen (*Chlamydomonas pulsatilla*). Daarnaast is *Phaeodactylum tricorutum* later aan de selectie toegevoegd en *Micractinium* sp. spontaan gaan groeien in drainwater. Alle soorten groeiden in 100 ml met een voorbehandeling van het drainwater in de vorm van filtreren in combinatie met steriliseren en toevoegen van vitamines. Opscaling van de cultuur naar 2500 ml was alleen mogelijk voor *Phaeodactylum tricorutum* en *Micractinium* sp. Een quick scan van de literatuur over kweekmedia die over het algemeen worden toegepast voor de teelt van de geselecteerde soorten toonde dat drainwater geen kobalt bevat en dat silicaat en fosfaat, ijzer en mangaan relatief minder aanwezig zijn. Vervolg experimenten liet zien dat de vier geselecteerde soorten bij overenten gebrek kregen aan een bepaalde stof die wel in het standaard medium (Walne) aanwezig is, maar niet in drainwater.

De opname van nutriënten uit het drainwater door groei van algen is getest met culturen van *Micractinium* sp. en *Phaeodactylum tricorutum*. Deze lieten een afname in fosfaatgehalte zien, maar niet in stikstofgehalte. Er is vooralsnog geen sluitende verklaring voor het uitblijven van een afname in stikstof concentratie. Aanvullende experimenten zijn nodig waarin wordt onderzocht welke meststoffen in het drainwater beperkend zijn voor volledige uitputting van stikstof.

De groei van oesters op in drainwater gekweekte algen is getest met de spontaan ontstane algensoort *Micractinium* vergeleken met een standaard dieet voor oesters. De voedingswaarde van *Micractinium* is laag voor oesters. Dit blijkt uit lage gehalten van de vetzuren EPA en DHA, het nog intact zijn van de algencellen na passage door de darmen en een mindere groei van de oesters dan op het standaard dieet. De op drainwater kweekbare algensoort *Micractinium* geeft wel groei van oesters, maar niet met de gewenste efficiëntie.

Aanvullende experimenten waarin het effect van het toevoegen van nu ontbrekende stoffen (zoals kobalt, nikkel, cadmium en seleen) aan het drainwater wordt onderzocht zijn nodig om een eindoordeel te kunnen vormen over de geschiktheid van drainwater voor de groei geselecteerde algensoorten met als doel de uitputting van stikstof en fosfaat en voedselproductie voor platte oesters. Indien deze experimenten succesvol verlopen levert dit perspectief voor de teelt van oesters op het land in combinatie met zuivering van drainwater uit de glastuinbouw.

1. Inleiding

In de glastuinbouw bestaat een wettelijk voorschrift over wateropslag, watergebruik en wateremissie, zowel bij in de grond geteelde – als op substraat geteelde gewassen. Een groot aantal bedrijven zonder voldoende opslag past het gebruik van omgekeerde osmose apparatuur toe. De reststroom afvalwater (brijn) pompt men terug in de bodem. In de toekomst vervalt die mogelijkheid. Daarnaast is het spuien/lozen van drainwater (proces water dat uit het substraat loopt) op het oppervlaktewater uit bemestings- en hygiëneoogpunt niet wenselijk. Dit is eveneens ontoelaatbaar in de toekomst. Het drainwater en het brijn bevatten zouten en voedingsstoffen die bij lozing een belasting op de watersystemen geven, hetgeen lozingsheffingen met zich meebrengt en waardoor tevens waardevolle nutriënten verloren gaan. Het geloosde volume van drainwater in de tuinbouw is momenteel onbekend.

Vanuit het waterbeheer is het wenselijk de lozing volledig te stoppen, het is echter niet mogelijk het volume tot nul terug te brengen. De uitdaging van het reduceren van de milieubelasting ligt dan ook in het hergebruiken van de nutriënten, waardoor een kostenpost kan worden omgezet in een renderende reststroom. Verzamelen van reststromen en centraal verwerken kan de uitstoot van drainwater tot “nul” terug brengen. In het Westland is een aantal Centrale Afvoer voor Drainage en tuinbouw afvalwater (CAD) systemen aangelegd. In het oppervlakte water komen dan geen overtollige meststoffen en andere restproducten meer uit de glastuinbouw terecht. Door het bijeenbrengen van een groot volume drainwater komen grootschalige technieken in beeld voor het zuiveren van het drainwater. Op dit moment zijn dat invangen van slib, voorzuiveren en ontzouten. De zoutrest + water bevat de stikstof, sulfaat en fosfaat en andere mineralen. Als stikstof, sulfaat en fosfaat zijn verwijderd en geen resten van bestrijdingsmiddelen aanwezig zijn, is het water geschikt voor lozen op zee.

Het (beperkte) zoutgehalte (3 promille of in geconcentreerde vorm 12 promille) van het drainwater maakt het water mogelijk geschikt voor de kweek van brakwater (en adaptieve mariene) algensoorten. Hierdoor worden waardevolle nutriënten onttrokken en wordt de anorganische belasting van het drainwater lager. Het gekweekte algenproduct kan geschikt zijn voor een aanvullende teelt van een aquacultuurproduct zoals schelpdieren, deze kunnen aan elkaar gekoppeld worden. Aquacultuur is een gestaag groeiende bedrijfstak. De jaarlijkse globale groei van de aquacultuur is omstreeks 11 %. Dit is veel, vooral vergeleken met de globale jaarlijkse toename van de vleesproductie die 3 % is. De redenen hiervoor zijn o.a. de groeiende vraag naar dierlijk eiwit, toenemende vraag naar aquacultuurproducten, technologische doorbraken, stagnerende opbrengst van de visserij en de gunstige bijdrage aan de gezondheid. Globaal is 30 % van de mondiale productie van de vis, schaal en schelpdieren afkomstig van aquacultuur, in 2030 verwacht men een aandeel van 50 %. De visteelt is een van de snelst groeiende voedselproducerende sectoren in de wereld.

Als aquacultuurproduct is de platte oester een interessante soort. De productie van platte oesters (*Ostrea edulis*) in de Nederlandse buitenwateren is teruggelopen van 1992 tot 2003 tot 1,5 mln stuks, met name door het voorkomen van een oesterziekte genaamd Bonamia. De vraag naar de platte oester is groter dan het huidige aanbod. Door het kweken van platte oesters (vanaf zaad) in een Bonamia-vrije omgeving krijgt de oester geen kans om Bonamia te ontwikkelen, waardoor een volwaardig kwaliteitsproduct geleverd kan worden. Echter, omdat er gewerkt wordt met een nieuwe kweekmethode is het van groot belang dat de voedselveiligheidsrisico's voldoende worden belicht. Er wordt voor oester immers met grondstoffen (drainwater) gewerkt die andere risico's met zich mee kunnen brengen dan in de gangbare kweek beschikbaar zijn, b.v. de aanwezigheid van bestrijdingsmiddelen. Aangezien dergelijke mogelijkheden nieuw zijn, bestaan er nog een aantal onbekende factoren, zoals het selecteren van geschikte soorten algen voor kweek, de voedingswaarde van de oester en voedselveiligheidsrisico's. Deze parameters zijn aan de hand van een desk studie (Fase 1) gevolgd door laboratorium experimenten (Fase 2) onderzocht. De huidige rapportage betreft Fase 2, de laboratorium experimenten. Hieronder worden de resultaten van Fase 1 samengevat.

In Fase 1 is de selectie van algensoorten die kweekbaar zijn op drainwater en geschikt zijn als voer voor oesters op basis van literatuur onderzoek uitgevoerd. De selectie van de algensoorten gebaseerd op de saliniteit van het drainwater, gebruik in aquacultuur, voedingswaarde, grootte, dikte celwand en beschikbaarheid in een algenbibliotheek heeft zes potentiële soorten opgeleverd: *Skeletonema subsalsum*, *Brachiomonas submarina*, *Chaetoceros muelleri*, *Thalassiosira pseudonana*, *Chlamydomonas pulsatilla* en *Dunaliella tertiolecta*. Daarnaast is

een inschatting gemaakt van de productiepotentie van algenkweek en oesterkweek op basis van drainwater. Het drainwater bevat een overmaat aan alle nutriënten die in een regulier kweekmedium aanwezig zijn. De productie potentie van de geselecteerde algen soorten in de kas hangt sterk af van de omstandigheden aldaar en zal proefondervindelijk moeten worden vastgesteld. De algen kunnen potentieel de nutriënten uit het drainwater verwijderen, omdat ook de verhouding tussen de verschillende componenten gunstig lijkt. Concentratie van drainwater niet nodig. Opname van de nutriënten in verschillende stappen lijkt een optie. Dat houdt in algen laten groeien en oogsten en het medium opnieuw gebruiken voor een tweede productie, enzovoort tot de nutriënten limiterend worden. Drie van de geselecteerde algensoorten worden al gebruikt in schelpdier hatcheries (*Chaetoceros muelleri*, *Thalassiosira pseudonana* en *Dunaliella tertiolecta*). De andere drie soorten lijken ook geschikt als voer voor oesters. Dit betekent dat, als de algensoorten succesvol in drainwater gekweekt kunnen worden, de productie van oesters ook succesvol kan zijn. En tenslotte is aandacht besteed aan de risico's voor de voedselveiligheid aan de hand van gegevens over de aanwezigheid van bestrijdingsmiddelen in het drainwater. Momenteel is nog weinig bekend over aanwezigheid van toxische stoffen in drainwater. In een pilot project is het raadzaam mogelijke accumulatie van gewasbeschermingsmiddelen, zware metalen, metaalsporen, PCB en dioxinen in oesters en effecten op de gezondheid bij de waargenomen gehalten te monitoren.

De resultaten van de deskstudie en de experimenten geven inzicht over de potentie voor algen- en oesterkweek op basis van drainwater in de praktijk. Inmiddels is ook bekend dat een pilot project zal worden gestart waarbij de integratie van fase 1 en 2 zal plaatsvinden met een test in de praktijk.

2. Kennisvraag

Het doel van dit verkennende project is een studie uit te voeren naar de mogelijkheden voor benutting van drainwater voor het kweken van algen gekoppeld aan een oesterteelt. De hoofdvragen zijn:

Kunnen algen gekweekt worden met drainwater als nutriënten bron?
Hoeveel nutriënten worden onttrokken aan het drainwater?
Kunnen oesters gekweekt worden met de geproduceerde algen?

In Fase 2 is de kweek van de in Fase 1 geselecteerde algen soorten getest op basis van en lokale omstandigheden. De algensoorten zijn op laboratoriumschaal gekweekt. Daarnaast is een analyse van de voedingswaarde van de algen uitgevoerd. Ook is een voedingsproef met oesters uitgevoerd.

3. Methoden

3.1. Laboratoriumschaal kweek algensoorten

3.1.1. Analyse waterkwaliteit drainwater

Op 16 mei 2008 is drainwater door H2Organic bezorgd bij IMARES. Het ging om drainwater van de volgende gewassen: gerbera, komkommer, tomaat, roos en paprika, steeds 25 liter per soort. Op 11 november 2008 is een tweede batch drainwater door H2Organic bezorgd bij IMARES. Dit maal ging het om gerbera, roos en paprika (25 liter) en tomaat (50 liter). Er is steeds een mengsel gemaakt van de verschillende soorten drainwater. Een aantal maal is in een experiment extra silicaat toegevoegd aan het drainwater om het medium geschikter te maken voor de groei van diatomeeën. De kwaliteit van het gemengde drainwater is op verschillende tijdstippen geanalyseerd. Een maal is een monster uitbesteed aan SGS voor de volgende parameters: K, Na, Mg, NO₃, Cl, SO₄, P, Si, Fe, Mn, Zn, Cu, Mo. Twee maal aan Blgg voor de volgende parameters: NH₄, K, Na, Ca, Mg, NO₃, Cl, S, HCO₃, P, Si, Fe, Mn, Zn, B, Cu, Mo, pH en EC. Daarnaast is vier maal een monster bij IMARES geanalyseerd. P-PO₄, N-NH₄, N-NO₃, N-NO₂ en Si werden bepaald met behulp van een HACH DR/890 Colorimeter), pH met een Hach HQd Field case Cat. no. 58357-000) en zoutgehalte met HQ14d conductivity meter van Hach.

3.1.2. Bepaling geschiktheid drainwater voor algengroei

De geselecteerde algensoorten waren als stock aanwezig bij IMARES (*Dunaliella tertiolecta*, *Chaetoceros muelleri*, *Brachiomonas submarina*, *Thalassiosira pseudonana* en *Phaeodactylum tricornutum*) of zijn aangekocht bij CCAP (Skeletonema subsalsum). Het is niet gelukt een cultuurbibliotheek te vinden die Chlamydomonas pulsatilla kon leveren. Alle soorten zijn in drainwater gekweekt in volumes van 30 ml weefselkweekfles (W/K fles) en 100 ml W/K fles, 250 ml erlenmeyers en 2500 ml erlenmeyers. Het drainwater is direct getest, maar ook gefiltreerd (over 1 µm), en gesteriliseerd door toevoeging van 1 ml chloor per liter en neutralisatie van het chloor na 24 uur door toevoeging van 0.05 mg thiosulfaat per liter. Er werd steeds een maximaal 7 dagen oude cultuur gebruikt om een nieuwe cultuur te starten (3-30 % van het volume). Wanneer de cultuur kleur kreeg werd gecheckt of de juiste soort was gaan groeien. Als dat het geval was werd de behandeling als succesvol aangemerkt. In de andere gevallen (geen groei, of groei van een andere soort) was de behandeling niet succesvol. De volgende behandelingen zijn uitgetest:

Verschillende volumes (30 ml en 100 ml, 250 ml en 2500 ml)

Drainwater direct

Drainwater filtreren

Drainwater steriliseren

Toevoegen vitaminen aan het drainwater

Toevoegen van silicium aan het drainwater

Verhogen zoutgehalte van het drainwater tot 5 ‰

Zwenken van de cultuur ipv doorborrelen

Plastic kweekvat ipv glas

Enten uit drainwater of uit Walne

Mixen van drainwater en Walne

Alle soorten zijn ter controle ook in standaard Walne medium gekweekt.

3.1.3. Bepaling groei algen en opname nutriënten

Van twee algensoorten is bepaald hoe snel de algen konden groeien op drainwater en wat de nutriëntenuitputting was op het moment van hoogste algendichtheid. Hiertoe zijn twee glazen 2500 ml erlenmeyers gevuld met gefiltreerd en gesteriliseerd drainwater met toegevoegde vitaminen en 200 ml entmateriaal uit twee 100 ml W/K flessen.

Dagelijks werden de algen geteld met behulp van een microscoop en een telglaasje (hemacytometer). Daarnaast werd 25 of 50 ml (afhankelijk van de dichtheid van de cultuur) gefiltreerd op een een voorgewogen Whatman

GF/C filter. Het gefiltreerde water werd ingevroren bij $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ voor latere wateranalyses. Ook werd 25 of 50 ml drainwater gefiltreerd als blanco. De filters werden voor een periode van minimal 24 uur bij $70\text{ }^{\circ}\text{C}$ gedroogd. Na 24 uur werden de filters gewogen. Het droog gewicht per algen cel werd dan berekend met de volgende formule: $DW(\text{pg/cell}) = [(DW_A - DW_B) / (N * V)] * 10^{12}$. Hierin is DW_A = droog gewicht algen filter; DW_B = droog gewicht blanco filter, N = cel dichtheid (cellen/ml) en V = volume van de gefiltreerde algencultuur of drainwater.

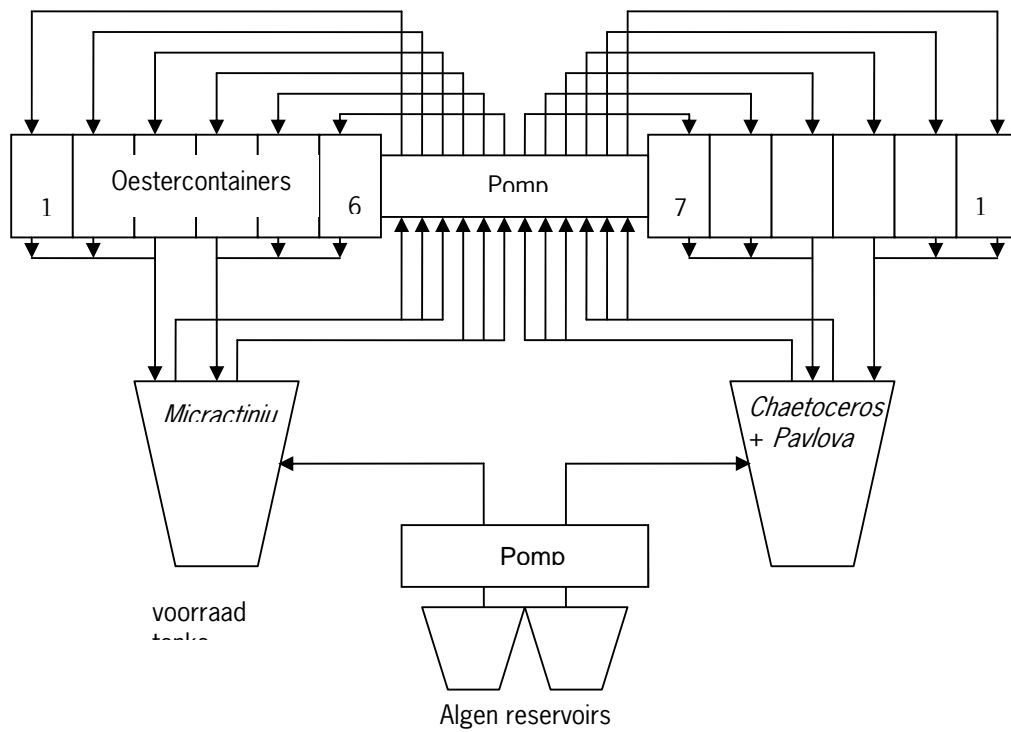
Na ontdooien van de watermonsters werd P-PO₄, N-NH₄+N-NO₃+N-NO₂ en Si bepaald met behulp van een HACH DR/890 Colorimeter), pH met een Hach HQd Field case Cat. no. 58357-000) en zoutgehalte met HQ14d conductivity meter van Hach. Protocollen voor het gebruik van de Hach-kit, pH meter, zoutgehalte meter, het tellen van algencellen en het maken van Walne medium zijn aanwezig bij IMARES.

3.2. Voedingsproef oesters

3.2.1. Proef opstelling

Zoals in 4.1 wordt gepresenteerd zijn *Micractinium* en *Phaeodactylum* de twee algensoorten die op drainwater gekweekt konden worden in 2500 ml. *Phaeodactylum* vormde echter klonten en dat maakte de cultuur ongeschikt als voer voor oesters. Daarom is alleen de voedingswaarde van *Micractinium* getest voor oesters. Deze soort is vergeleken met een standaard dieet. Het systeem bestond uit 2 groepen van 6 containers, volume ca. 400 ml (Fig. 1). Elke container bevatte 1 platte oester. Container 1 tm 6 kreeg als dieet *Micractinium*, 7 tm 12 dienden als controle en kreeg een mengsel van *Pavlova lutheri* en *Chaetoceros calcitrans* waarvan bekend is dat dit een dieet is waar schelpdieren goed op groeien (Helm et al, 2004). Elke container werd continue doorstroomd (ca. 48ml/min) met zeewater (over $1\text{ }\mu\text{m}$ gefiltreerd Oosterscheldewater) vanuit een voorraad tank met behulp van een peristaltische pomp (Watson Marlow 520U, U.K.). De door de oesters opgenomen algen werden vanuit een reservoir tank aangevuld met behulp van een 2de pomp (Watson Marlow 520S, U.K.). De voorraad tanks werden belucht om uitzakken van algen te voorkomen. Om de 2 a 3 dagen werd de algenhoeveelheid in de reservoir tank aangevuld. Twee keer per week zijn de voorraad tanks voor de helft ververs. Vlak voor het verversen werden de algenconcentraties in de voorraad tanks bepaald.

De oesters zijn afkomstig uit het Grevelingenmeer en zijn enkele weken verwaterd in stromend Oosterscheldewater. *Chaetoceros* en *Pavlova* werden gekweekt op Walne medium en *Micractinium* op drainwater.



Figuur 1. Proefopstelling voedingsproef oesters.

3.2.2. Voedseltoediening en monitoring waterkwaliteit

De groeiproef is op 3 november gestart en op 28 november beëindigd. Om te weten hoeveel algen toegevoegd moeten worden is voorafgaand aan de groeiproef gekeken naar de snelheid waarmee de oesters algen opnemen. Hiertoe is de concentratie van de algen aan het begin en aan het einde van een filtratieperiode geteld (tabel 1). Bij deze proef ging het om de opname van cellen en was de beginconcentratie van ondergeschikt belang zolang. Er werd bij beide diëten er geen pseudofeces geproduceerd.

Tabel 1. Resultaten van algenopname proef.

per ml	<i>Micractinium</i>	<i>Pav. + Chaet.</i>
aantal cellen begin	222222	52083
aantal cellen eind	177083	17361
weggefilterd per ml na 3 uur	45139	34722
weggefilterd per totaal volume van 18000 ml	$812.5 \cdot 10^6$	$625 \cdot 10^6$
per dag toe te voegen algen cellen	$6500 \cdot 10^6$	$5000 \cdot 10^6$

In de groeiproef is gestreefd naar een algendichtheid in het voorraadvat van ca. 50.000 cellen/ml. De pomp voor de algentoevoeging draaide met een constante snelheid zodat per dag een vast volume in het voorraadvat werd gepompt. De algen werden voor toedienen in het reservoir geteld en aangevuld met gefiltreerd zeewater tot het benodigde volume.

Eens per week is, voor het verversen, de waterkwaliteit gemeten. Hierbij zijn de volgende parameters bepaald:

- NO₂ met een kolorimetrische test van Merck (gevoeligheid 0.05-1 mg/l NO₂-)
- NH₄ idem (gevoeligheid 0.5-10 mg/l NH₄+)
- zuurstof met de HQ40d multimeter van Hach
- zoutgehalte met de HQ14d conductivity meter van Hach.

3.2.3. Analyse voedingswaarde algen

De voedingswaarde van de algen is bepaald aan de hand van de voedselopname en groei van de oesters zoals beschreven onder 3.2.4. Daarnaast kunnen ook metingen aan de algen zelf worden verricht. Een veelgebruikte maat voor voedingswaarde van algen voor schelpdieren is het gehalte aan onverzadigde vetzuren. De belangrijkste vetzuren zijn EPA (20:5 ω 3) en DHA (22:6 ω 3), omdat dit vetzuren zijn die de dieren zelf niet kunnen maken, wat ze afhankelijk maakt van hun voedselbron (Helm et al, 2004). De algen die aan de oesters werden gevoerd tijdens de groeiproef zijn op 21 november 2008 bemonsterd voor vetzuurgehaltes. Per soort is 20 ml gefiltreerd over een voorgegloeide (4 uur bij 450 °C) Whatman GF/F filter. Daarna is de concentratie aan vetzuren door het NIOO bepaald met behulp van een gaschromatograaf. Per vetzuur is de concentratie is uitgedrukt in μ g per l cultuur. Vervolgens is gehalte EPA en DHA berekend als percentage van het totale gehalte.

Ook het gewicht van de algen is bepaald. Naast drooggewicht (zie 3.1.3) is ook het as-vrij drooggewicht bepaald door de filter 4 uur bij 450 °C te verassen in een moffeloven en opnieuw te wegen.

3.2.4. Bepaling voedselopname en groei oesters

Bij ieder moment van voeren en bij iedere verversing van het water is het aantal algencellen in het water geteld volgens de methode die onder 3.1.3 is beschreven. Door het aantal cellen in het water direct voor verversing af te trekken van het aantal cellen dat bij de laatste verversing was toegediend is het aantal opgenomen cellen bepaald. Dit is vervolgens omgerekend naar as-vrij drooggewicht. Het ADW is op 21 november bepaald.

Voor de oestergroei zijn de volgende parameters bepaald: voor en tijdens de proef natgewicht (WW) en oppervlak en aan eind van de proef droog- (DW) en asvrij droog-gewicht (ADW) van vlees en schelp. Het natgewicht is bepaald, direct vanuit het water, na droogdeppen. Het oppervlak is bepaald in mm² door het maken van een foto en de contouren in een imageanalyse programma (Leica Qwin) met de hand in te tekenen en hiervan het oppervlak te bepalen. Voor het droog- en as-gewicht is het vlees uit de schelp verwijderd en apart gedroogd en verast. Het droog gewicht is bepaald na 2 dagen in een droogstoof bij 70 °C en afkoelen in een exicator. Voor het as-gewicht is het materiaal nog eens 2 uur in een moffeloven verast bij 540 °C.

4. Resultaten en discussie

4.1. Laboratoriumschaal kweek algensoorten

4.1.1. Waterkwaliteit drainwater

Het drainwater toont fluctuaties in de kwaliteit, maar de waarden zijn over het algemeen in dezelfde orde van grootte als de door H2Organic opgegeven gemiddelde waarden (Tabel 2). Opvallend zijn de verschillen in resultaten zoals gevonden door SGS en Blgg. SGS vindt een veel lagere concentratie aan NO₃ en een hogere concentratie aan SO₄ en P. Deze waarden vallen buiten de marges die werden verwacht en werden door de andere analyses niet ondersteund en zijn daarom niet in de beoordeling van de waterkwaliteit meegenomen. Het effect het toevoegen van silicaat aan het drainwater is onverwacht. Het leidt meestal niet tot een verhoging van het silicaatgehalte, maar wel van het Na gehalte. De vorm waarin Si werd toegevoegd was NaSiO₃·9H₂O. Dit verklaard de toename aan Na. Toevoegen van silicaat veroorzaakt zelfs een verlaging van de gehalten aan P, Ca, Mg, Fe, Mn, Zn. Er werd een neerslag gevormd wat een verklaring kan zijn voor de concentratieverlaging van een aantal elementen. Door de oplossing aan te zuren en daarna weer basisch te maken tijdens het toevoegen van silicaat had het vormen van een neerslag waarschijnlijk voorkomen kunnen worden.

Tabel 2. Resultaten van de analyse van drainwater op verschillende tijdstippen en door verschillende bedrijven.

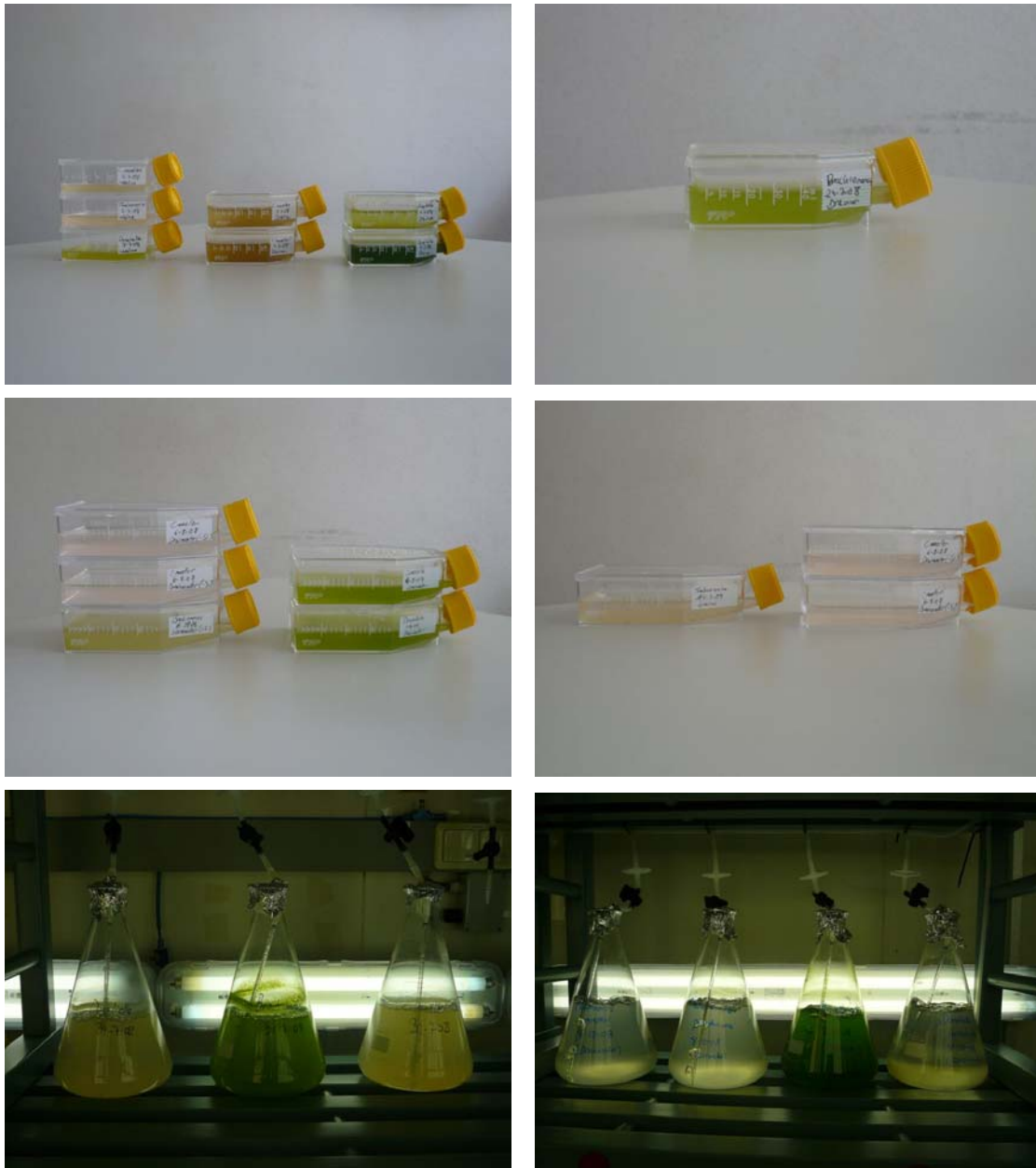
	datum 2008	geen	30-Jun	11-Aug	11-Aug	18-Aug	26-Aug	26-Aug	28-Aug	28-Aug	8-Dec
	bedrijf	opgave H2Organic	IMARES	SGS	SGS	IMARES	IMARES	IMARES	Blgg	Blgg	Blgg
parameter	behandeling	geen	geen	met Si	geen	geen	met Si	geen	met Si	geen	geen
NH ₄	mmol/l	0.05							0.1	0.1	<0.1
K	mmol/l	6.6		5.1	5.6				6.4	6.8	4.1
Na	mmol/l	2.0		13.0	3.2				15.7	3.4	2.0
Ca	mmol/l	7.5							5.2	8.1	3.8
Mg	mmol/l	3.3		0.1	3.6				0.1	3.9	2.2
NO ₃	mmol/l	15.6	13.9	2.9	0.6	4.9			18.2	19.5	12.0
Cl	mmol/l	3.7		2.6	2.8				2.7	3.0	1.8
SO ₄	mmol/l	4.1		14.7	15.6				4.2	4.4	2.3
HCO ₃	mmol/l								0.5	0.3	0.1
P	mmol/l	1.00	3.94	0.03	11.94				0.04	1.16	0.86
Si	mmol/l	1.66	0.59	0.54	0.57		2.32	1.64	0.48	0.53	0.37
Fe	umol/l	24.5		2.3	28.6				2.2	25.0	14.0
Mn	umol/l	5.4		<0.18	4.0				0.5	3.8	1.7
Zn	umol/l	6.1		2.3	5.6				2.5	5.4	3.7
B	umol/l	49							117	95	34
Cu	umol/l	1.0		1.6	1.9				2.3	2.4	1.9
Mo	umol/l	0.9		0.7	0.8				0.8	0.8	2.7
pH		5.5					9.3	6.8	9.2	6.6	6.5
zoutgehalte	‰	3.1					1.5	1.6	3.4	3.6	2.4

4.1.2. Geschiktheid drainwater voor algengroei

De resultaten van de behandelingen zijn weergegeven in tabel 3 en figuur 2. Alle soorten, behalve *Skeletonema subsalsum*, groeiden in het controle medium (Walne) in alle geteste volumes. Alle soorten, behalve *Skeletonema subsalsum*, zijn aangeslagen in 30 ml drainwater. Deze soort was in slechte conditie aangeleverd door CCAP. De andere soorten zijn overgeent door de 30 ml in 100 ml drainwater te brengen. Dit volume liet wisselende resultaten zien. Het filtreren van het drainwater in combinatie met steriliseren en toevoegen vitamines gaf het beste resultaat. Geen van de geselecteerde soorten is aangeslagen in 2500 ml drainwater. Naast de vijf geselecteerde soorten is ook *Phaeodactylum tricornutum* geent. Deze soort was tijdens de desk studie niet opgenomen in de selectie omdat de soort niet als goed voer voor schelpdieren wordt beschouwd. *Phaeodactylum* was de enige soort die in 2500 ml wilde groeien. Daarnaast is spontaan een eencellige groenwier gaan groeien in alle volumes inclusief 2500 ml. Deze algensoort is door CCAP geïdentificeerd als *Micractinium* sp.

Tabel 3. Resultaten van verschillende behandelingen van het eerste experiment. Wanneer de cultuur kleur kreeg werd gechecked of de juiste soort was gaan groeien. Als dat het geval was werd de behandeling als succesvol aangemerkt (+). In de andere gevallen (geen groei, of groei van een andere soort) was de behandeling niet succesvol (-). (1) De meeste cellen waren *Micractinium*, maar *Brachiomonas* was altijd aanwezig in kleinere hoeveelheden. (2) na verloop van tijd ging *Micractinium* domineren.

		Drainwater onbehandeld	Drainwater gefiltreerd	Drainwater gefiltreerd met silica	Drainwater gefiltreerd met chloor	Drainwater gefiltreerd met chloor en vitamines	Walne medium geautoclaveerd
<i>Dunaliella</i>	30 ml	+	+	+	+	+	+
<i>tertiolecta</i> (flagellaat)	100 ml	" +/-	" +/- (2)	" +/-	+	+	+
	2500 ml	-	-	-	-	-	+
<i>Brachiomonas</i> <i>submarina</i> (flagellaat)	30 ml	+	+	+	+	+	+
	100 ml	" +/-	" +/- (2)	" +/-	+	+	+
	2500 ml	-	-	-	-	" +/- (1)	+
<i>Thalassiosira</i> <i>pseudonana</i> (diatomee)	30 ml	+	+	+	" +/-	+	+
	100 ml	" +/-	" +/- (2)	" +/-	" +/-	+	+
	2500 ml	-	-	-	-	-	+
<i>Chaetoceros</i> <i>muelleri</i> (diatomee)	30 ml	+	+	+	" +/-	+	+
	100 ml	" +/-	" +/- (2)	" +/-	" +/-	+	+
	2500 ml	-	-	-	-	-	+
<i>Phaeodactylum</i> <i>tricornutum</i> (diatomee)	30 ml					+	+
	100 ml					+	+
	2500 ml					+	+
<i>Skeletonema</i> <i>subsalsum</i> (diatomee)	30 ml			-	-		
	100 ml						
	2500 ml						



Figuur 2. Enkele voorbeelden van verschillende behandelingen van het eerste experiment in 30 ml (boven van links naar rechts en van boven naar beneden: *Chaetoceros* in Walne aangeslagen, *Thalassiosira* in Walne aangeslagen, *Dunaliella* in Walne aangeslagen, 2x *Chaetoceros* in drainwater aangeslagen, 2x *Dunaliella* in drainwater aangeslagen, *Brachiomonas* in drainwater aangeslagen), 100 ml (midden vlnr en vbnb: 2x *Chaetoceros* in drainwater en 1x *Brachiomonas* in drainwater aangeslagen, 2x *Dunaliella* in drainwater aangeslagen, 1x *Thalassiosira* in drainwater, 2x *Chaetoceros* in drainwater) en 2500 ml (onder vlnr: *Dunaliella* in drainwater, *Brachiomonas* in drainwater - *Micractinium* gaat groeien, *Chaetoceros* in drainwater, *Chaetoceros* in drainwater, *Thalassiosira* in drainwater, *Brachiomonas* in drainwater - *Micractinium* gaat groeien, *Dunaliella* in drainwater).

De opschaling van 100 ml naar 2500 ml werd bewerkstelligd door het enten van 200 ml uit twee 100 ml drainwater W/F flessen. Daarnaast ging het gepaard met een overgang van stilstaand water naar met lucht doorborreld water en een overgang van plastic naar glas. Om het effect van deze veranderingen uit te testen is een tweede experiment opgezet waarbij algen zijn gekweekt in glazen en plastic containers en in stilstaand water, gezwenkt water en met lucht doorborreld water. Daarnaast is ook het zoutgehalte verhoogd tot 5 promille (‰). Van *Brachiomonas* was onvoldoende entmateriaal beschikbaar om het experiment te kunnen starten.

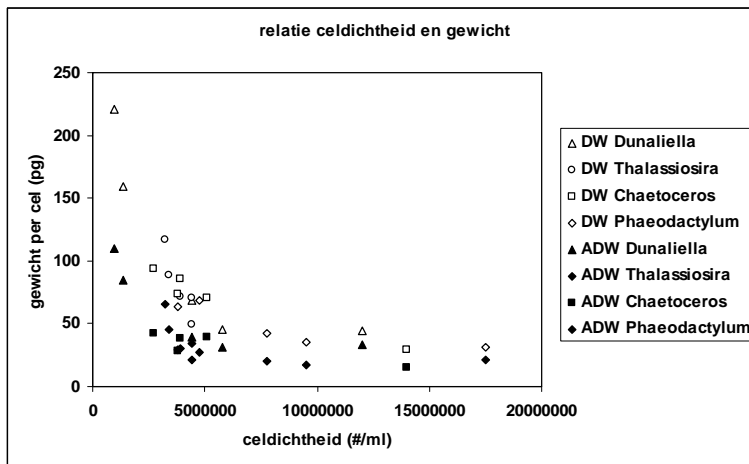
De resultaten van het tweede experiment zijn weergegeven in tabel 4 en figuur 3. Uit het experiment blijkt dat in alle behandelingen algengroei optrad. Bij drie van de vier soorten gaf doorborrelen in een glazen erlenmeyer de hoogste celdichtheid en het hoogste totale gewicht. Alleen *Thalassiosira* week hiervan af met de hoogste celdichtheid in stilstaand water en met zwenken, maar wel het hoogste totale gewicht bij doorborrelen in een glazen erlenmeyer. Het verhogen van het zoutgehalte leverde bij twee van de vier soorten een hogere celdichtheid op. De hoogste waarden voor het zoutgehalte werden gevonden in de behandeling waar extra zout aan was toegevoegd (tabel 4). Daaropvolgend waren de zoutgehalte waarden in de behandeling waarbij met lucht werd doorborreld, waarschijnlijk als gevolg van verdamping. De hoogste gewichten van de cellen werden gevonden bij de laagste celdichtheden (Fig. 4). Dit gold voor alle geteste soorten en voor zowel het drooggewicht als het as-vrij drooggewicht van de cellen. Het celgewicht is een maat voor de celgrootte.

Tabel 4. Resultaten van de behandelingen van het tweede experiment. in (1) 100 ml W/K flessen of (2) 250 ml erlenmeyers aan het einde van het experiment na 10 dagen. De hoogste waarden zijn vet gedrukt.

Behandeling	pH	Zoutgehalte (‰)	Cell dichtheid (cellen/ml)	DW algae (pg/cel)	DW algen totaal (mg/ml)
<i>Dunaliella</i> plastic blanco (1)	6.4	2.5	5800000	46	0.27
<i>Dunaliella</i> plastic 5 ppm (1)	6.6	7.6	4400000	68	0.30
<i>Dunaliella</i> glas zwenken (2)	6.3	2.7	1380000	159	0.22
<i>Dunaliella</i> plastic zwenken (2)	6.4	2.6	980000	220	0.22
<i>Dunaliella</i> glas doorborrelen (2)	6.4	3.1	12000000	44	0.53
<i>Thalassiosira</i> plastic blanco (1)	6.2	2.7	4400000	50	0.22
<i>Thalassiosira</i> plastic 5 ppm (1)	6.6	8.2	3900000	72	0.28
<i>Thalassiosira</i> glas zwenken (2)	6.4	2.5	4400000	70	0.31
<i>Thalassiosira</i> plastic zwenken (2)	6.3	2.5	3400000	88	0.30
<i>Thalassiosira</i> glas doorborrelen (2)	6.3	4.1	3250000	117	0.38
<i>Chaetoceros</i> plastic blanco (1)	6.3	3.2	2700000	93	0.25
<i>Chaetoceros</i> plastic 5 ppm (1)	6.2	7.9	3800000	73	0.28
<i>Chaetoceros</i> glas zwenken (2)	6.4	3.4	5100000	71	0.36
<i>Chaetoceros</i> plastic zwenken (2)	6.3	3.4	3900000	86	0.33
<i>Chaetoceros</i> glas doorborrelen (2)	6.6	5.2	14000000	29	0.41
<i>Phaeodactylum</i> plastic blanco (1)	6.4	3.3	3800000	63	0.24
<i>Phaeodactylum</i> plastic 5 ppm (1)	6.5	9.2	4750000	69	0.33
<i>Phaeodactylum</i> glas zwenken (2)	6.7	4.3	9500000	35	0.34
<i>Phaeodactylum</i> plastic zwenken (2)	6.6	5.1	7750000	43	0.33
<i>Phaeodactylum</i> glas doorborrelen (2)	6.4	6.4	17500000	31	0.55



Figuur 3. Verschillende behandelingen van het tweede experiment om het effect van veranderingen bij opschalen van 100 ml naar 2500 ml te testen (links boven van voor naar achter 100 ml W/K flessen met *Dunaliella*, *Chaetoceros*, *Thalassiosira* en *Phaeodactylum*, steeds drainwater boven, drainwater 5 % midden en Walne onder; rechts boven 250 ml erlenmeyers van links naar rechts *Chaetoceros*, *Phaeodactylum*, *Thalassiosira* en *Dunaliella* op schudtafel in plastic (links) en glas (rechts); onder doorborrelen in 250 ml glazen erlenmeyers van links naar rechts *Chaetoceros*, *Phaeodactylum*, *Thalassiosira* en *Dunaliella*).



Figuur 4. Relatie tussen celdichtheid en drooggewicht of as-vrij drooggewicht van de algen uit het tweede experiment.

Uit het tweede experiment blijkt dat de behandeling met lucht doorborreld water in een glazen erlenmeyer groei laat zien bij de soorten *Dunaliella*, *Brachiomionas* en *Chaetoceros*. In de eerste proef van tabel 3 zijn deze soorten niet aangeslagen in met lucht doorborreld glazen erlenmeyers van 2500 ml. De verandering van plastic naar glas en van stilstaand water naar met lucht doorborreld water kan niet de reden kan zijn dat deze soorten niet zijn aangeslagen. Mogelijk moet de verklaring worden gezocht in de oorsprong van het entmateriaal. Bij het tweede experiment kwam het entmateriaal uit 100 ml Walne medium. Bij het enten van 2500 ml in de eerste proef werd steeds gebruik gemaakt van entmateriaal uit drainwater. Dit verschil kan een mogelijke een rol spelen

in het verschil in resultaten tussen algengroei in een glazen erlenmeyer met doorborrelen in 250 ml en geen algengroei bij dezelfde behandeling bij 2500 ml. Een bepaalde stof kan pas na een aantal keer overenten limiterend worden. Dit wordt bevestigd door een derde experiment waarbij 2500 ml drainwater met 250 ml *Dunaliella* cultuur werd geënt dat uit drainwater of uit Walne kwam. De cultuur met entmateriaal uit Walne sloeg aan en die met entmateriaal uit drainwater niet (Fig. 5).

Drainwater met vitamines bevat een aantal stoffen die niet in andere kweekmedia aanwezig zijn. Tabel 5 geeft de resultaten weer van een quick scan van de literatuur over kweekmedia die over het algemeen worden toegepast voor de teelt van de geselecteerde soorten. Het Walne medium en F2 medium worden gemaakt op basis van gefiltreerd zeewater dat spore elementen bevat die niet in drainwater zitten. Het belangrijkste verschil is dat drainwater geen kobalt en vitamines bevat terwijl de andere media dat wel bevatten (Tabel 5). Toevoegen van vitamines aan het drainwater in 2500 ml volume is uitgetest en leverde niet het gewenste resultaat. Daarnaast hebben Hussonot et al (1997) vastgesteld dat een ratio op basis van molgewicht van 10/4/1/0.7/0.1 voor N/Si/P/Fe/Mn optimaal is voor grootschalige buitenkweek van diatomeeën. Het drainwater heeft een andere verhouding tussen genoemde stoffen (10/0.3/0.6/0.01/0.002). Silicaat en fosfaat, ijzer en mangaan zijn relatief minder aanwezig. Deze afwijkende verhouding kan een verklaring zijn voor het uitblijven van groei in 2500 ml.

Om een eventueel gebrek aan een stof die niet in drainwater zit, maar wel in Walne te onderzoeken is een vierde experiment ingezet in 30 ml W/K flessen waarbij drainwater en Walne medium zijn gemengd en waarbij entmateriaal uit Walne en uit drainwater zijn gebruikt. De resultaten worden weergegeven in tabel 6 en figuur 6. De groei is bepaald aan de hand van de kleur van de cultuur en de kwaliteit van de algencellen onder de microscoop. De beste groei werd gevonden bij de behandeling drainwater met een ent uit Walne, behalve voor *Phaeodactylum*, daar was drainwater met een ent uit drainwater het beste. Het zoutgehalte toonde niet veel variatie. Deze test geeft aan dat er voor de geselecteerde algensoorten een stof ontbreekt in het drainwater.



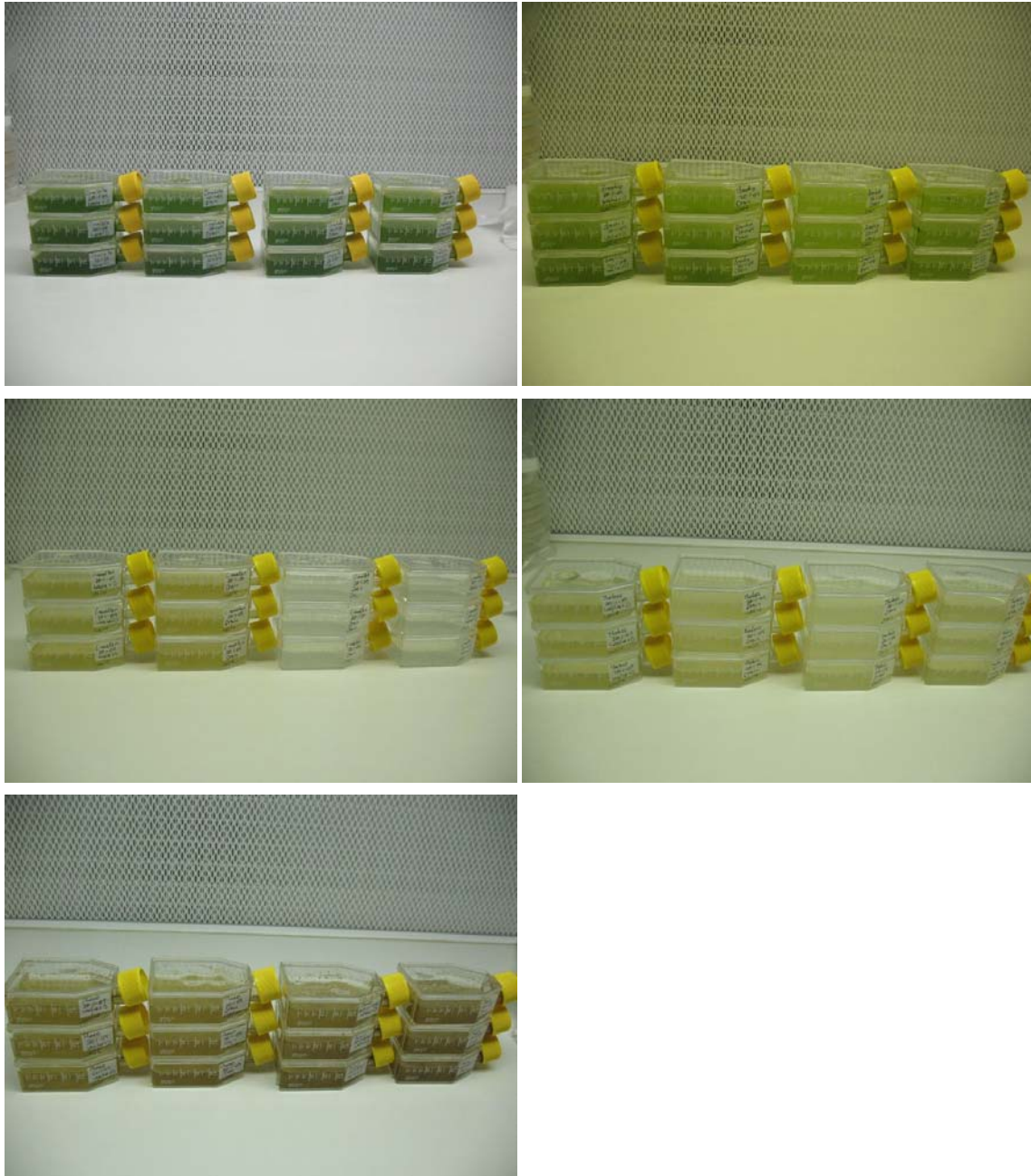
Figuur 5. Resultaten van het derde experiment, 2500 ml drainwater cultuur met 250 ml *Dunaliella* ent uit Walne (links) of 250 ml *Dunaliella* ent uit drainwater (rechts) na 10 dagen (links) en na 18 dagen (rechts).

Tabel 5. Literatuur gegevens over samenstelling media voor geselecteerde algen in vergelijking met drainwater.

	drain	Walne	zeewater	<i>Brachiomonas medium</i>	<i>Micractinium medium</i>	<i>Dunaliella medium</i>	<i>Chaetoceros medium</i>	<i>Thalassiosira medium</i>	<i>Phaeodactylum medium</i>
referenties	Blgg	Walne, 1970	Barnes & Huges, 1982	Tsavalos & Day, 1994	Oron et al, 1981	Sciandra & Ramani, 1994	Liang et al, 2006	Valenzuela-Espinoza et al, 2007	Liang et al, 2006
	SGS	IMARES	Baretta-Bekker et al, 1992		CCAP	F2, Guillard	F2, Guillard	F2, Guillard	F2, Guillard
			Wong & Zhang, 2007						
parameter									
NH4	x	x	x		x				
NO3	x	x	x	x	x	x	x	x	x
NO2			x	x					
P	x	x	x	x	x	x	x	x	x
Si	x	x	x	x	x	x	x	x	x
K	x		x	x	x				
Na	x	x	x	x	x	x	x	x	x
Ca	x		x	x	x				
Mg	x		x	x	x				
Cl	x	x	x	x	x	x	x	x	x
SO4	x	x	x	x	x	x	x	x	x
HCO3	x		x		x				
Fe	x	x	x	x	x	x	x	x	x
Mn	x	x	x	x	x	x	x	x	x
Zn	x	x	x	x	x	x	x	x	x
B	x	x	x	x	x				
Cu	x	x	x	x	x	x	x	x	x
Mo	x	x	x		x	x	x	x	x
Co		x	x	x	x	x	x	x	x
Br			x						
Sr			x						
F			x						
I			x						
Cr			x						
As									
chelaat	x	x		x	x	x	x	x	x
vitaminen		x		x	x	x	x	x	x

Tabel 6. Resultaten van het vierde experiment, drainwater en Walne medium gemengd en ongemengd met entmateriaal uit Walne en uit drainwater getest in 30 ml W/K flessen. Dichtheid na 17 dagen is aangegeven met 0,1,2,3,4: 0 is geen kleur en 4 is donker gekleurd, de kwaliteit is aangegeven met *, **, ***: * is slecht en *** is goed, zoutgehalte aan het eind van het experiment is weergegeven in ‰.

	medium	Drainwater+Walne	Drainwater	Drainwater+Walne	Drainwater
	ent	vanuit Walne	vanuitWalne	vanuit Drainwater	vanuit
algensoor	parameter				Drainwater
<i>Dunaliella tertiolecta</i>	dichtheid	3	4	1	2
	kwaliteit	**	***	*	*
	zoutgehalte	1.5	1.6	1.5	1.4
<i>Brachiomonas submarina</i>	dichtheid	2	4	3	1
	kwaliteit	**	***	**	*
	zoutgehalte	1.5	1.4	1.6	1.6
<i>Chaetoceros muelleri</i>	dichtheid	3	4	0	0
	kwaliteit	***	***		
	zoutgehalte	1.7	1.5	1.5	1.5
<i>Thalassiosira pseudonana</i>	dichtheid	3	4	1	2
	kwaliteit	***	***	*	*
	zoutgehalte	1.4	1.5	1.5	1.4
<i>Phaeodactylum tricornutum</i>	dichtheid	1	2	3	4
	kwaliteit	**	**	*	*
	zoutgehalte	1.7	1.6	1.7	1.4



Figuur 6. Resultaten van het vierde experiment in 30 ml W/K flessen, drainwater en Walne medium gemengd en ongemengd met entmateriaal uit Walne en uit drainwater: *Dunaliella tertiolecta* (links boven), *Brachiomonas submarina* (rechts boven), *Chaetoceros muelleri* (links midden), *Thalassiosira pseudonana* (rechts midden) en *Phaeodactylum tricorutum* (links onder) steeds van links naar rechts in triplo: Drainwater+Walne (vanuit Walne); Drainwater (vanuit Walne); Drainwater (vanuit Drainwater); Drainwater+Walne (vanuit Drainwater).

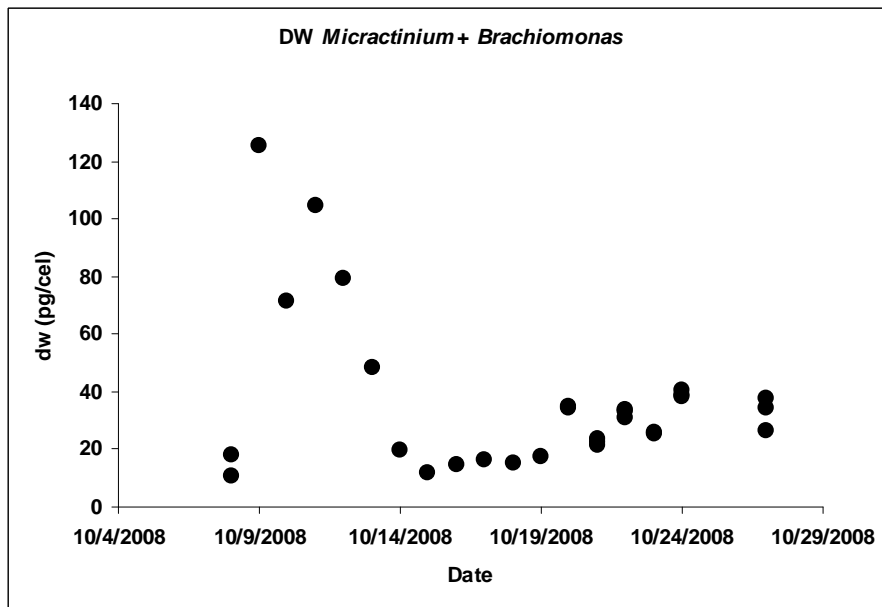
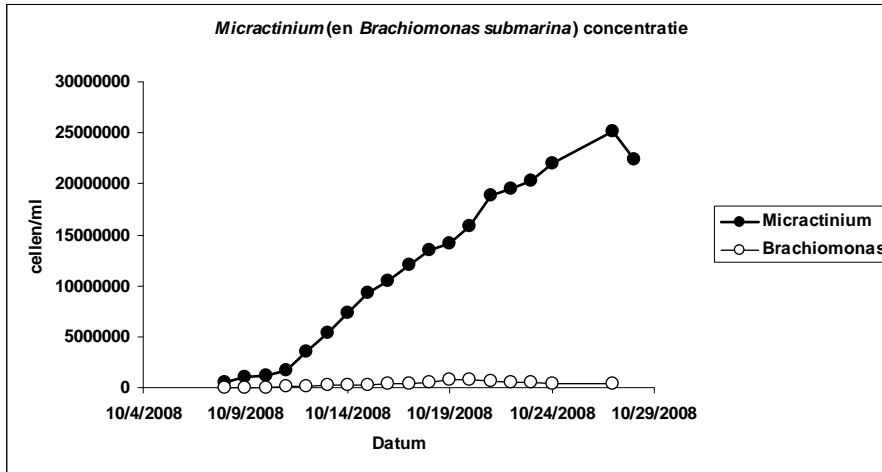
4.1.3. Groei algen en opname nutriënten

Het verloop in celdichtheid van een batch cultuur met mix van *Micractinium* en *Brachiomonas* is weergegeven in figuur 7. *Brachiomonas* bereikte na 12 dagen maar een lage maximale celdichtheid van 800.000 cellen per ml. *Micractinium* bereikte een maximum van 25 miljoen cellen per ml na 19 dagen. De mix heeft bij deze hoogste dichtheid een gewicht van 0.82 mg dw per ml. De algencellen hadden het hoogste drooggewicht op de tweede dag van het experiment. Het verloop in celgewicht is waarschijnlijk een maat voor de celgrootte.

De nutriëntenconcentraties lieten een afname in P zien (tabel 7a). Het Si gehalte nam toe. *Micractinium* en *Brachiomonas* zijn flagellaten die geen Si nodig hebben. De concentratietoename is mogelijk een gevolg van verdamping van het water. Het zoutgehalte en de pH zijn ook toegenomen. Tegen de verwachting in laat het N gehalte geen afname of toename zien. Dit wijst er op dat de opname wordt gecompenseerd door verdamping. Bij de aanname dat de toename van het zoutgehalte van 1,5 naar 8,2 gelijk staat aan de verdamping is de oplossing 5,47 maal (= $8,2 : 1,5$) geconcentreerder geworden. De beginconcentratie voor fosfaat was 31,5 mg in 1 liter. Aan het eind is nog 1,5 mg in 1 liter in de geconcentreerde oplossing over, dus dat was is $1,5/5,47 = 0,27$ mg in de ongeconcentreerde liter. Er is dus $31,5 - 0,27 = 31,32$ mg P verbruikt (tabel 7b). Voor silicaat geldt een beginconcentratie van 4,9 mg in 1 liter. Er was 15,4 mg/l in de geconcentreerde oplossing over, dus is $4,9 - (15,4/5,47) = 2,1$ mg Si verbruikt. Voor stikstof geldt 150 mg per liter aan het begin. Er was 183 mg/l in de geconcentreerde oplossing over, dus er is $150 - (183/5,47) = 116,5$ mg N verbruikt.

De celdichtheid van *Phaeodactylum* bleef lange tijd zeer laag, waardoor de cultuur eigenlijk al was opgegeven. Maar na 16 dagen is toch een dichtheid bereikt van 11 miljoen cellen of 0.32 mg dw per ml (Fig. 8). De algencellen hadden het hoogste drooggewicht op de vierde dag van het experiment. *Phaeodactylum* cellen zijn veel groter dan *Micractinium* cellen. Daarom is het gewicht per cel ook hoger.

De nutriëntengehaltes van de *Phaeodactylum* behandeling zijn op de eerste dag van het experiment veel hoger dan in de *Micractinium* behandeling (tabel 8a). Dit is mogelijk veroorzaakt door de nutriënten die met het overenten uit de 200 ml flessen zijn toegevoegd. Opnieuw is de concentratie van P sterk afgenomen op het moment van hoogste celdichtheid, maar ook nu blijft N, en in dit geval ook Si, gelijk. Dit wijst er op dat de opname wordt gecompenseerd door verdamping. De pH neemt iets af. Het zoutgehalte is toegenomen, waarschijnlijk als gevolg van verdamping. De toename in zoutgehalte van 1,5 naar 4 geeft aan dat de oplossing 2,67 maal (= $4 : 1,5$) geconcentreerder is geworden. De beginconcentratie voor fosfaat was 98 mg in 1 liter. Aan het eind is nog 0,77 mg in 1 liter in de geconcentreerde oplossing over, dus dat was is $0,77/2,67 = 0,29$ mg in de ongeconcentreerde liter. Er is dus $98 - 0,29 = 97,7$ mg P verbruikt (tabel 8b). Voor silicaat geldt een beginconcentratie van 13,8 mg in 1 liter. Er was 15 mg/l in de geconcentreerde oplossing over, dus is $13,8 - (15/2,67) = 8,2$ mg Si verbruikt. Voor stikstof geldt 261 mg per liter aan het begin. Er was 273 mg/l in de geconcentreerde oplossing over, dus er is $261 - (273/2,67) = 158,8$ mg N verbruikt.



Figuur 7. Verloop van de celdichtheid (boven) en drooggewicht (beneden) van de Micractinium Brachiomonas mix gekweekt op drainwater.

Tabel 7a. Nutriëntenconcentraties, pH en zoutgehalte van het drainwater aan het begin van het experiment met *Micractinium* (8/10), gedurende de toename van cellen (17/10) en op het moment van hoogste celdichtheid (27/10).

<i>Micractinium</i>	P (mg/l)	Si (mg/l)	N (mg/l)	pH	zoutgehalte (‰)
10/8/2008	31.5	4.9	150	6.5	1.5
10/17/2008	2.16	14.9	255		
10/27/2008	1.5	15.4	183	8.5	8.2

Tabel 7b. Berekening van verbruik nutriënten door de *Micractinium Brachiomonas mix*.

verbruik nutriënten <i>Micractinium Brachiomonas mix</i>				
volume (ml)		start	einde*	verbruik (mg)
		1000	182,8	
P	mg/l	31.5	1.50	
	mg	31.5	0.27	31.2
Si	mg/l	4.9	15.4	
	mg	4.9	2.82	2.1
N	mg/l	150	183	
	mg	150	33.46	116.5

*Eind volume is gebaseerd op toename in zoutgehalte.

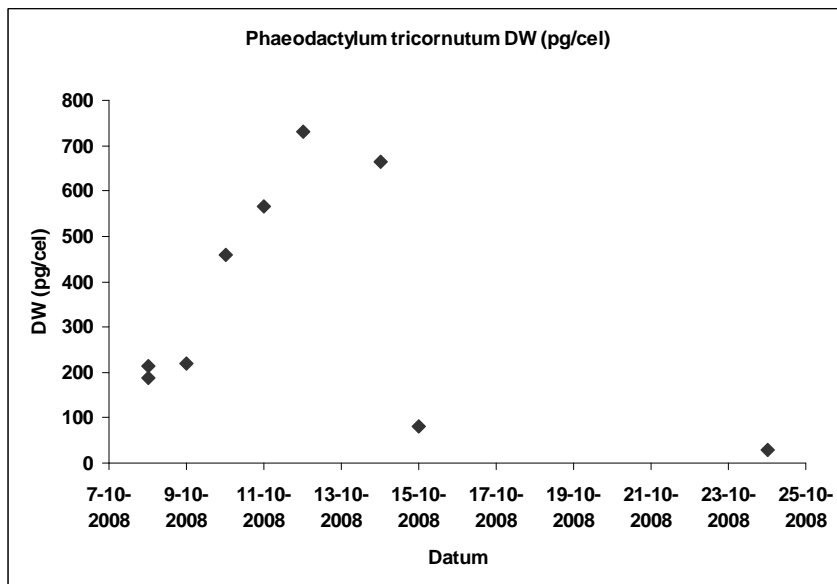
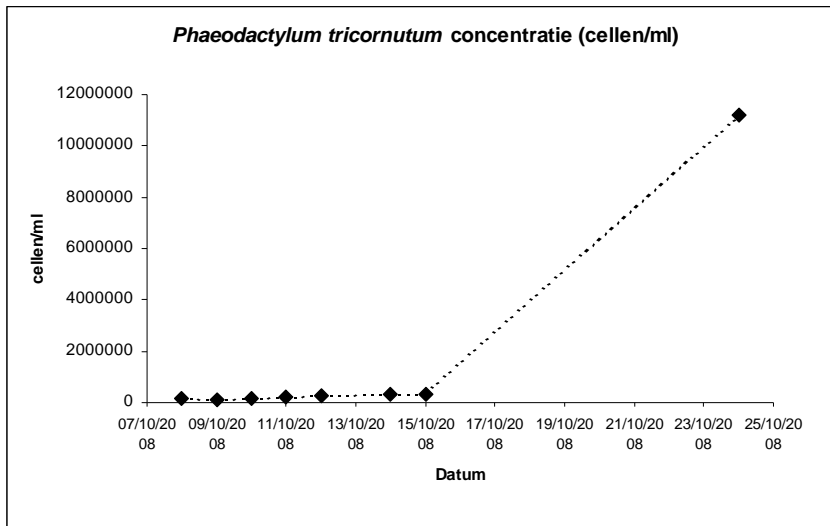
Tabel 8. Nutriëntenconcentraties, pH en zoutgehalte van het drainwater aan het begin van het experiment met *Phaeodactylum* (8/10), en op het moment van hoogste celdichtheid (24/10).

<i>Phaeodactylum</i>	P (mg/l)	Si (mg/l)	N (mg/l)	pH	zoutgehalte (‰)
10/8/2008	98	13.8	261	6.5	1.5
10/24/2008	0.77	15	273	6.0	4.0

Tabel 8b. Berekening van verbruik nutriënten door *Phaeodactylum*.

verbruik nutriënten <i>Phaeodactylum</i>				
volume (ml)		start	einde*	verbruik (mg)
		1000	374	
P	mg/l	98	0.77	
	mg	98	0.29	97.7
Si	mg/l	13.8	15.0	
	mg	13.8	5.61	8.2
N	mg/l	261	273	
	mg	261	102.1	158.9

*Eind volume is gebaseerd op toename in zoutgehalte.



Figuur 8. Verloop van de celdichtheid (boven) en drooggewicht (beneden) van *Phaeodactylum* gekweekt op drainwater.

4.2. Voedingsproef oesters

4.2.1. Waterkwaliteit

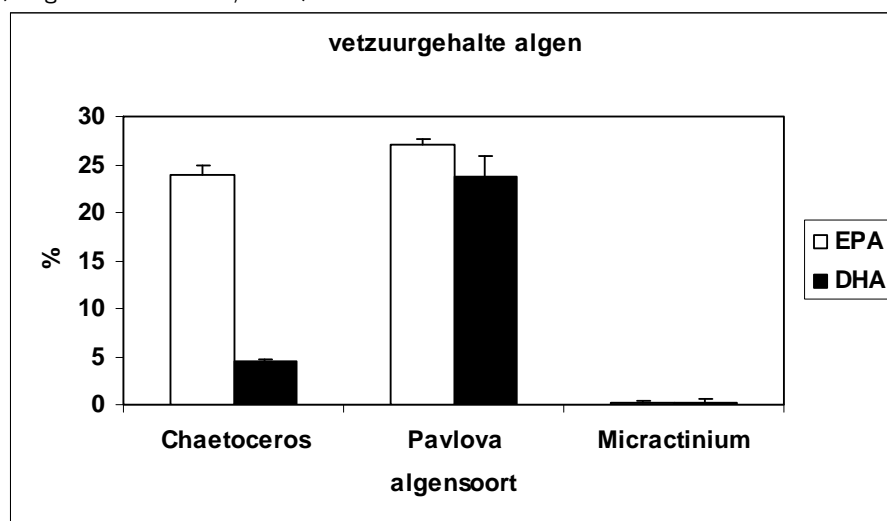
De gehalten aan NO₂ in het water van de oestercontainers varieerde tussen de 0.05 mg/l en 1 mg/l en de gehalten aan NH₄ tussen 0 mg/l en 0.5 mg/l (zie tabel 9). Het zuurstofgehalte was 92-96%. Het zoutgehalte 28-29 ‰ en de temperatuur 18.5 °C. Ervaring van IMARES leert dat dit binnen de grenzen voor een goede waterkwaliteit voor schelpdieren ligt. Het zoutgehalte was iets lager in de *Micractinium* behandeling dan in de controle behandeling. Dit is veroorzaakt doordat in deze behandeling met de algen ook drainwater medium werd geïntroduceerd in de voorraad tank.

Tabel 9. Waterkwaliteitsparameters tijdens de voedingsproef voor de oesters.

dieet	datum	NO ₂ - mg/l	NH ₄ mg/l	% O ₂	sal ‰	temp 0C
Micractinium	7-Nov-08	0.05	0			
	10-Nov-08	0.25-0.5	0			
	14-Nov-08	0.25-0.5	0-0.5	95.8	27.7	18.5
	17-Nov-08	1	0			
	21-Nov-08	1	0	92	27.9	18.5
	28-Nov-08	1	0			
controle	7-Nov-08	0.05-0.1	0			
	10-Nov-08	0.25	0			
	14-Nov-08	0.25-0.5	0-0.5	94.7	28.3	18.5
	17-Nov-08	0.5-1	0			
	21-Nov-08	0.5-1	0	91.6	28.9	18.5
	28-Nov-08	0.5-1	0			

4.2.2. Voedingswaarde algen

De voedingswaarde van de gevoerde algen is weergegeven in figuur 9. *Pavlova* heeft de hoogste percentages gevolgd door *Chaetoceros*. *Micractinium* heeft zeer lage gehalten. De waarden voor *Chaetoceros* en *Pavlova* zijn vergelijkbaar of hoger dan waarden opgegeven door Robert et al (2004): voor *Chaetoceros* EPA 21% en DHA 1%, voor *Pavlova* EPA 24% en DHA 12%. Literatuur gegevens over EPA en DHA gehalten van *Micractinium* zijn niet gevonden. Een verwante groep, *Chlorella* sp, heeft ook lage gehalten aan EPA (4.6%) en DHA (0%) (Yongmanitchia & Ward, 1991).



Figuur 9. EPA en DHA gehalten (berekend uit totale hoeveelheid vetzuren in µg per l cultuur) van *Chaetoceros calcitrans*, *Pavlova lutheri* en *Micractinium*, n=2±sd.

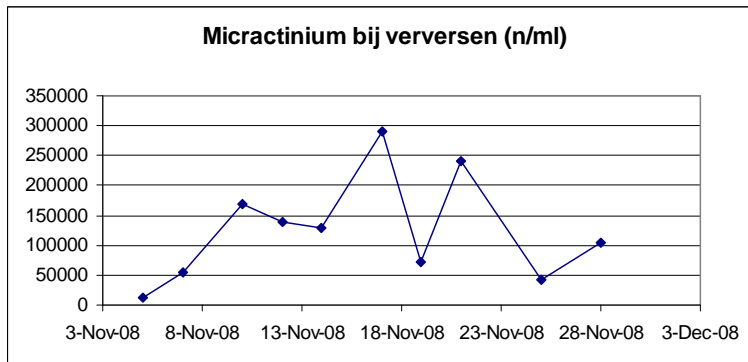
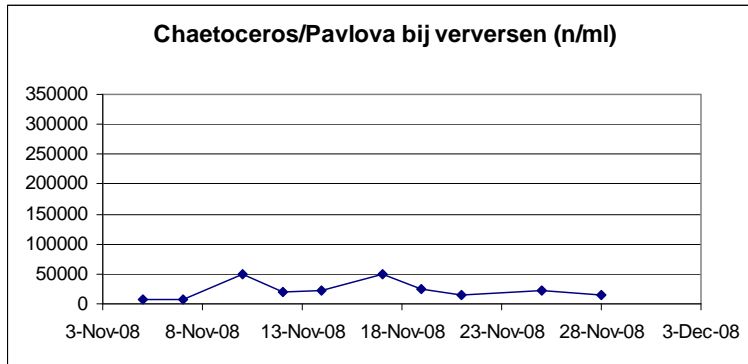
4.2.3. Voedselopname en groei oesters

De concentratie aan algencellen in het voorraadvat vlak voor het verversen van het systeem toont fluctuaties en ligt bij het *Pavlova/Chaetoceros* dieet vaak onder de streefwaarde van 50.000 cellen/ml en voor het *Micractinium* dieet vaak er boven (Fig. 10). In tabel 10 staat de hoeveelheid algen die gedurende de gehele proef zijn opgenomen door de oesters. Er is een groter gewicht aan *Chaetoceros* en *Pavlova* opgenomen dan *Micractinium*. Uit de algentellingen vlak voor verversen van het systeem blijkt dat meer algencellen van het *Micractinium* dieet werd opgenomen dan van de mix van *Chaetoceros* en *Pavlova* (Fig. 11). Dit verschil kan worden verklaard uit het verschil in celgewicht. *Chaetoceros* is veel zwaarder dan *Macractinium* (tabel 10). De aantallen opgenomen cellen per oester per dag zijn veel hoger dan op basis van de resultaten uit tabel 1 werd verwacht. Als de gegevens van die kort durende proef worden doorvertaald naar 24 uur komt dat op 360000 cellen *Micractinium* per oester per dag en 280000 cellen van de mix van *Chaetoceros* en *Pavlova*. Bij de bepaling zoals die is weergegeven in figuur 11 speelt mogelijk mee dat algencellen naar de bodem van het voorraadvat zijn uitgezakt en dan als opgenomen zijn geregistreerd. Het systeem heeft de cellen dan opgenomen, maar niet de oesters. De hoeveelheid opgenomen algen is dus een overschatting.

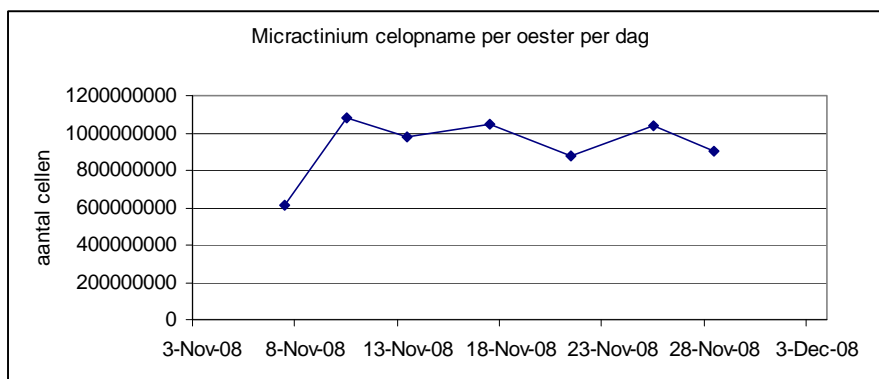
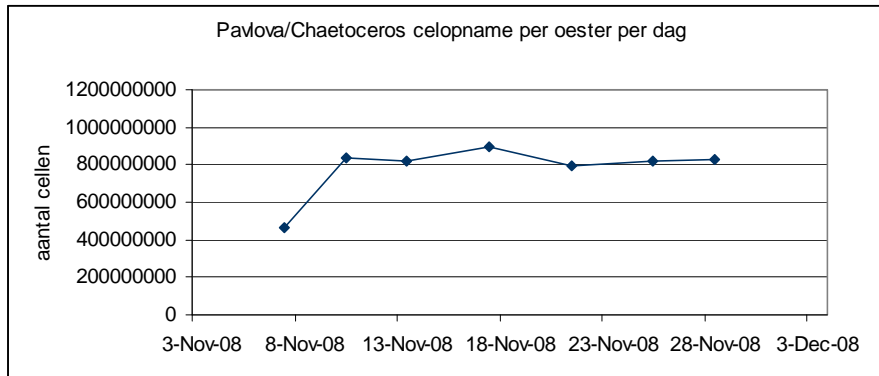
Het op drainwater gekweekte *Micractinium* dieet werd voor de voedselopname proef in een voorraadvat met zeewater gepompt. Microscopische observaties lieten zien dat de cellen van deze zoetwater algensoort intact bleven in het zeewater. In de controlebehandeling met *Chaetoceros* en *Pavlova* was duidelijk feces te zien, maar in de *Micractinium* behandeling werd waren de meeste cellen nog intact na passage door de darmen (Fig. 12). Dit wijst op slechte vertering van de *Micractinium* cellen.

Tabel 10. Hoeveelheid algen in gram as-vrij drooggewicht die gedurende de gehele proef zijn opgenomen door de oesters.

algen soort	as-vrij drooggewicht (pg ADW per cel)	totale hoeveelheid opgenomen in drie weken (g ADW)
<i>Micractinium</i> sp.	26	3.5
<i>Pavlova lutheri</i>	31	5.9
<i>Chaetoceros calcitrans</i>	72	



Figuur 10. Celconcentratie vlak voor het verversen van het systeem van de oestergroeioproef.

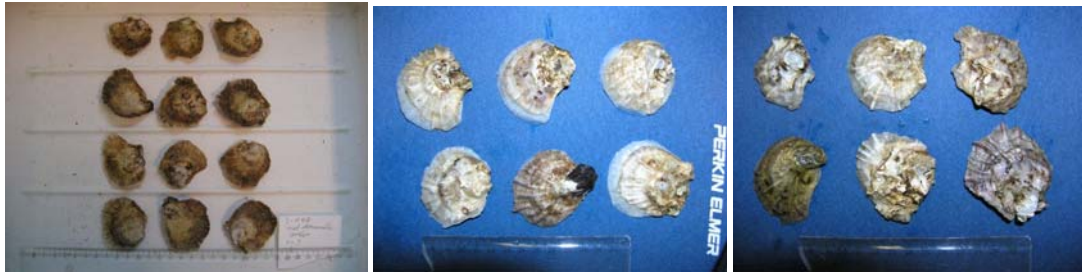


Figuur 11. Celopname per oester per dag tijdens de oestergroeiproef.



Figuur 12. Oesters die *Chaetoceros* en *Pavlova* gevoerd kregen (links) en oesters die *Micractinium* gevoerd kregen (rechts).

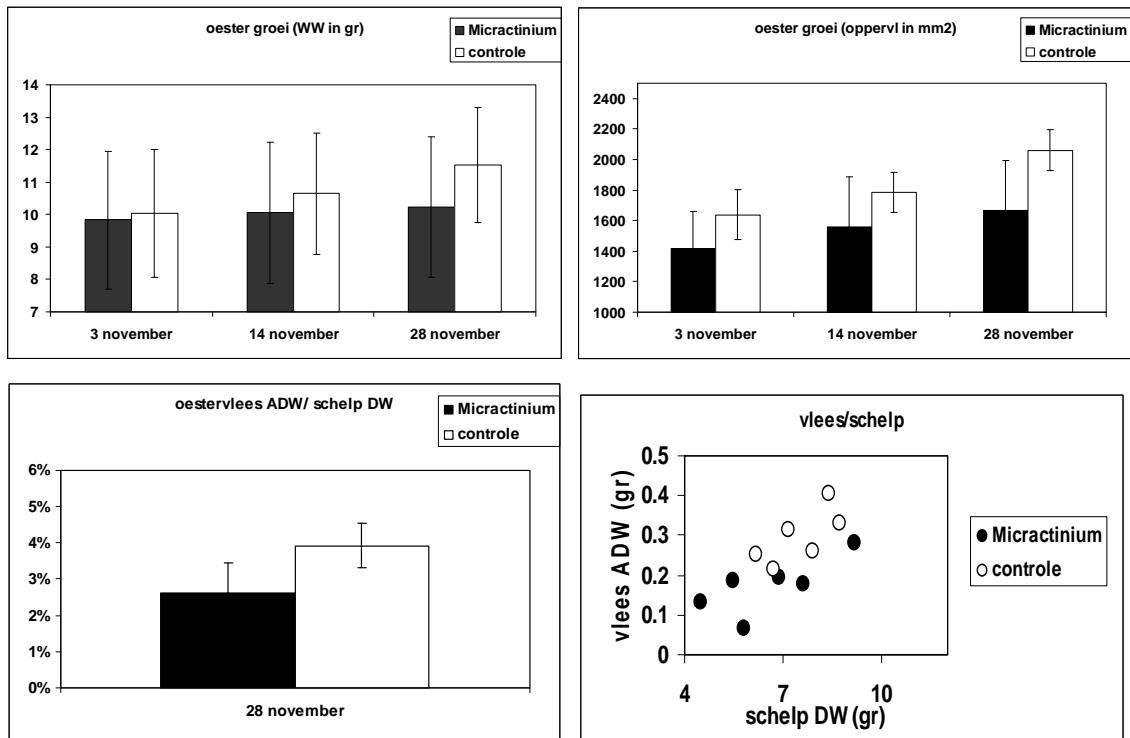
De groei van de oesters was beter in de controle behandeling dan op het *Micractinium* dieet. Dit blijkt uit een grotere toename in schelpoppervlak (26% in controle versus 18% in *Micractinium*) en een significant (ANOVA, $P=0.01$) grotere toename in natgewicht (15% in controle versus 4% in *Micractinium*) (Fig. 13 en Fig. 15). De toename van 15% of 1.5 g van de controle is vergelijkbaar met 2 g gewichtstoename na 25 dagen behaald voor oesters met een begingewicht van 8 gram die *Skeletonema costatum* gevoerd kregen (Baud et al., 1997). Ook de voederconversie was beter in de controle behandeling dan de *Micractinium* behandeling: 5.9 g adw algen voor 9.0 g ww oester = 0.6 in de controle versus 3.5 g adw algen voor 2.4 g ww oester = 1.5 in de *Micractinium* behandeling. Aan het einde van het experiment is de verhouding oestervlees en schelp significant (ANCOVA, $P<0.01$) beter voor de controle behandeling dan voor het *Micractinium* dieet (Fig. 14 en 15).



*Figuur 13. Oesters aan het begin van het experiment op 3 november (links), en na 25 dagen op het controle dieet (midden) of *Micractinium* dieet (rechts).*



*Figuur 14. Oestervlees na 25 dagen op het controle dieet (links) of *Micractinium* dieet (rechts).*



Figuur 15. Natgewicht (g), schelpoppervlak (mm²), drooggewicht (DW, g) en as-vrij drooggewicht (ADW, g) van schelp en vlees gedurende het groei experiment het controle dieet of Micractinium dieet.

5. Conclusies en aanbevelingen

5.1. Geschiktheid drainwater voor algengroei

Van de zes geselecteerde algensoorten *Skeletonema subsalsum*, *Brachiomonas submarina*, *Chaetoceros muelleri*, *Thalassiosira pseudonana*, *Chlamydomonas pulsatilla* en *Dunaliella tertiolecta* is alleen *Skeletonema subsalsum* niet aangeslagen in 30 ml. Deze soort was in slechte conditie aangeleverd door CCAP. *Chlamydomonas pulsatilla* kon gedurende het project niet worden verkregen in een cultuurbibliotheek en is daarom niet getest. In 100 ml was een voorbehandeling van het drainwater in de vorm van filteren in combinatie met steriliseren en toevoegen van vitamines nodig om de overgebleven 4 soorten aan te laten slaan. Geen van de geselecteerde soorten is in dit eerste experiment aangeslagen in 2500 ml drainwater. *Phaeodactylum tricornutum* (later aan de selectie toegevoegd) en *Micractinium* sp. (spontaan gaan groeien) zijn de enige twee soorten die in 2500 ml wilden groeien. Een tweede experiment uitgevoerd om het effect van de veranderingen die gepaard gingen met de opschaling van 100 ml naar 2500 ml liet zien dat de overgang van stilstaand water naar met lucht doorborreld water en van plastic naar glas niet de reden kan zijn dat *Dunaliella*, *Brachiomonas* en *Chaetoceros* niet zijn aangeslagen in 2500 ml.

Een quick scan van de literatuur over kweekmedia die over het algemeen worden toegepast voor de teelt van de geselecteerde soorten toonde dat drainwater geen kobalt bevat en dat silicaat en fosfaat, ijzer en mangaan relatief minder aanwezig zijn. Deze afwijkende samenstelling kan een verklaring zijn voor het uitblijven van groei in 2500 ml. Om 2500 ml te enten is eerst overgeent uit 30 ml en daarna uit 100 ml. Een bepaalde stof kan pas na een aantal keer overenten limiterend worden. Dit wordt bevestigd door een derde experiment waarbij 2500 ml drainwater met *Dunaliella* cultuur werd geënt dat uit drainwater of uit Walne kwam. De cultuur met entmateriaal uit Walne sloeg aan en die met entmateriaal uit drainwater niet. Ook een vierde experiment met *Dunaliella tertiolecta*, *Brachiomonas submarina*, *Chaetoceros muelleri*, *Thalassiosira pseudonana* en *Phaeodactylum tricornutum*, waarbij drainwater en Walne medium zijn gemengd en waarbij entmateriaal uit Walne en uit drainwater zijn gebruikt, liet zien dat over het algemeen betere groei werd gevonden bij de behandeling met een ent uit Walne. Deze resultaten geven aan dat er voor de geselecteerde algensoorten een stof ontbreekt in het drainwater.

Aanvullende experimenten waarin het effect van het toevoegen van nu ontbrekende elementen wordt onderzocht kan uitsluitend geven welk element op termijn noodzakelijk is voor het in stand houden van de groei. De meest voor de hand liggende elementen zijn kobalt (wel aanwezig in Walne en niet in drainwater), seleen, nikkel of cadmium (wel aanwezig in zeewater en niet in drainwater; Mitrovic et al, 2004; <http://www.lennotech.com/elementen-en-water/cadmium-en-water.htm>). Het optimaliseren van het medium zodat maximale groei van de algen wordt bereikt is dan de volgende stap. Hierbij kan gedacht worden aan het toevoegen van extra silicium, fosfaat, ijzer of mangaan.

5.2. Opname nutriënten uit drainwater door groei algen

Culturen van *Micractinium* sp. en *Phaeodactylum tricornutum* lieten een afname in fosfaatgehalte zien op het moment van de grootste celdichtheid. De stikstof- en silicaatgehaltes werden echter niet verlaagd. Een grotere uitputting van fosfaat dan van stikstof sluit aan bij de observatie dat het drainwater fosfaat gelimiteerd is voor algengroei. Een afname van stikstof en, in het geval van de diatomee *Phaeodactylum*, ook silicaat werd echter ook verwacht. Dit wijst er op dat opname van deze stoffen wordt gecompenseerd. Dit kan mogelijk zijn veroorzaakt door het verhogen van de concentratie als gevolg van verdamping. Een toename van het zoutgehalte geeft aan dat verdamping heeft plaatsgevonden. Een tweede mogelijkheid is dat afbraak van dode algencellen of ander materiaal plaats vindt waardoor fosfaat, stikstof en silicaat vrijkomen. Er is vooralsnog geen sluitende verklaring voor het uitblijven van een afname in silicaat en stikstof concentratie. Aanvullende experimenten zijn nodig waarin wordt onderzocht welke meststoffen in het drainwater beperkend zijn voor volledige uitputting van stikstof en silicaat. Optimalisatie van het medium door toevoeging van limiterende stoffen of het aanpassen van de nutriënten verhoudingen is de volgende stap.

Een herhaling van de opname experimenten uitgebreid met een behandeling met drainwater zonder algen en een behandeling met het standaard kweekmedium kan meer helderheid verschaffen over de rol van verdamping en afbraak van mogelijk aanwezig organisch materiaal.

5.3. Groei oesters op in drainwater gekweekte algen

De spontaan ontstane algensoort *Micractinium* is vergeleken met een standaard dieet voor oesters bestaande uit een mix van *Pavlova lutheri* en *Chaetoceros calcitrans*. *Micractinium* heeft veel lagere gehalten aan EPA en DHA, wat aangeeft dat de voedingswaarde laag is. Daarnaast waren de meeste cellen nog intact na passage door de darmen. Dit wijst op slechte vertering van de *Micractinium* cellen. Er zijn meer algencellen van het *Micractinium* dieet opgenomen door de oesters dan van de mix van *Chaetoceros* en *Pavlova*. Maar doordat *Chaetoceros* grotere cellen heeft is een groter gewicht aan *Chaetoceros* en *Pavlova* opgenomen dan *Micractinium*. De oesters toonden een grotere toename in schelpoppervlak en natgewicht en een hogere verhouding oestervlees en schelp in de controle behandeling dan op het *Micractinium* dieet. Ook de voederconversie was beter in de controle behandeling (0.6) in dan de *Micractinium* behandeling (1.5).

Uit deze proef blijkt dat de op drainwater kweekbare algensoort *Micractinium* wel groei van oesters geeft, maar niet met de gewenste efficiëntie. Een globale berekening laat dit zien: voor de teelt van een oester van 80 gram versgewicht is 48 gram drooggewicht aan algen nodig bij een voederconversie van 0.6 en 120 gram drooggewicht aan algen bij een voederconversie van 1.5. Als een oester van 80 gram € 1.00 per stuk opbrengt en de algen € 2.00 euro per kg kosten zullen de kosten van het voer voor één oester € 0.10 zijn bij een voederconversie van 0.6 en € 0.24 bij een voederconversie van 1.5. De eerste optie geeft meer ruimte voor commerciële productie dan de tweede.

Aanvullende experimenten waarin het effect van het toevoegen van nu ontbrekende stoffen aan het drainwater wordt onderzocht zijn nodig om een eendoordeel te kunnen vormen over de geschiktheid van drainwater voor de groei van de geselecteerde algensoorten met als doel de uitputting van stikstof en fosfaat en voedselproductie voor platte oesters. Indien deze experimenten succesvol verlopen levert dit perspectief voor de teelt van oesters op het land in combinatie met zuivering van drainwater uit de glastuinbouw.

6. Kwaliteitsborging

IMARES beschikt over een ISO 9001:2000 gecertificeerd kwaliteitsmanagementsysteem (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 controlebezoek vond plaats op 23-25 april 2008. 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.

7. Dankwoord

Graag bedanken wij Aard Cornelisse voor het aanleveren van de oesters en Daan van Grieken suggesties voor verbetering van de tekst. We would like to thank Isabel Batista for help with the nutrient uptake experiment.

Referenties

- Baud, J.P., Gérard, Y. Naciri-Graven (1997). Comparative growth and mortality of *Bonamia ostreae*-resistant and wild flat oysters, *Ostrea edulis*, in an intensive system. I. First year of experiment. Mar. Biol. 130: 71-79.
- Baretta-Bekker J.G., E.K. Duursma, B.R. Kuipers (1992). Encyclopedia of Marine Sciences. Springer-Verlag, 311 pp.
- Barnes R.S.K. & R.N. Huges, 1982. An introduction to marine biology. Blackwell Sci. Publ, Oxford London, 215 pp.
- Helm, M.M. and Bourne, N., 2004. The hatchery culture of bivalves: a practical manual. FAO Fisheries Technical Paper 471
- Hussenot, J., N. Brossard, S. Lefebvre (1997). Mise au point d'un enrichissement de l'eau de mer pour produire en masse des microalgues diatomées comme fourrage pour les huîtres affines ou stockées en claires. In: Buchet, V, J. Hussenot (Ed.), Marais maritimes et aquaculture: préservation et exploitation des zones humides littorales. IFREMER, pp. 107-115.
- Liang Y., J.Beardall, P. Heraud, 2006 Effects of nitrogen source and UV radiation on the growth, chlorophyll fluorescence and fatty acid composition of *Phaeodactylum tricornutum* and *Chaetoceros muelleri* (Bacillariophyceae) Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology 82: 161–172
- Mitrovic, S.M., Amandi, M.F., McKenzie, L., Furey, A., James, K.J. (2004) Effects of selenium, iron and cobalt addition to growth and yessotoxin production of the toxic marine dinoflagellate *Protoceratium reticulatum* in culture. J. exp. Mar. Biol. Ecol. 313, 337-351
- Oron, G., G. Shelef & A. Levi (1981). Algal polymorphism in high rate wastewater treatment ponds. Hydrobiologia 77: 167-175.
- Robert, R., Chrétiennot-Dinet, M.J., Kaas, R., Martin-Jézéquel, V., Moal, J., Le Coz, J.R., Nicolas, J.L., Bernard, E., Connan, J.P., Le Dean, L., Gourrierc, G., Leroy, B., Quéré, C., 2004. Amélioration des productions phytoplanctoniques en éclosérie de mollusques : caractérisation des microalgues fourrage, RI DRV/RA-2004-05, 149 pp.
- Sciandra A & P Ramani, 1994 The steady states of continuous cultures with low rates of medium renewal per cell J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 178: 1-15
- Tsavalos A.J. & J.G. Day, 1994 Development of media for the mixotrophic/heterotrophic culture of *Brachiomonas submarina* Journal of Applied Phycology 6: 431-433.
- Walne PR (1970) Studies on the food value of nineteen genera of algae to juvenile bivalves of the genera *Ostrea*, *Crassostrea*, *Mercenaria*, and *Mytilis*. Fish. Invest. 26, 162.
- Valenzuela-Espinoza E, Millan-Nunez R, Trees CC, Santamaria-del-Angel E, Nunez-Cabrero F 2007 Growth and accessory pigment to chlorophyll a ratios of *Thalassiosira pseudonana* (Bacillariophyceae) cultured under different irradiances. HIDROBIOLOGICA 17: 249-255.
- Wong G.T.F & L.S. Zhang, 2007 The kinetics of the reactions between iodide and hydrogen peroxide in seawater Marine Chemistry 111: 22–29
- Yongmanitchia W. & O.P. Ward, 1991 Screening of algae for potential alternative sources of eicosapentaenoic acid. Phytochemistry 30: 2963-2967.

Verantwoording

Rapport C021/09
Projectnummer: 4394104601

Verantwoording

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

Akkoord: Prof. Dr. A.C. Smaal
Senior onderzoeker



Handtekening:
Datum: februari 2009

Akkoord: Ir. H. van der Mheen
Afdelingshoofd



Handtekening:
Datum: maart 2009

Aantal exemplaren: 20
Aantal pagina's: 39
Aantal tabellen: 10
Aantal figuren: 15
Aantal bijlagen: 0