

Nederlands Instituut voor Visserijonderzoek (RIVO) BV

Postbus 68
1970 AB IJmuiden
Tel.: 0255 564646
Fax.: 0255 564644
Internet: postkamer@rivo.wag-ur.nl

Postbus 77
4400 AB Yerseke
Tel.: 0113 672300
Fax.: 0113 573477

Intern RIVO rapport

Nummer: 03.018

Kweekopzet van de *Brachionus plicatilis* op basis van kunstmatige voeders

Algenconcentraten en Rotimac als fast-food voor voedseldiertjes

AFSTUDEERVERSLAG

Cristijn M. de Vin



Datum:

11 november 2003

Aantal exemplaren:	10
Aantal pagina's:	34
Aantal tabellen:	5
Aantal figuren:	12
Aantal bijlagen:	1

Voorwoord

Voor u ligt een afstudeerverslag van een student Aquatische Ecotechnologie. Dit verslag is geschreven in de laatste 16 weken van de vier jaar durende opleiding. Een opleiding die zich richt op water, met al haar aspecten. Van dijkenbouw tot riolering en van herinrichting van landschappen tot viskweek.

Viskweek is een steeds vaker in het nieuws. Dit komt onder andere door de groei van de sector. Het is nu al de snelst groeiende voedselproducerende sector ter wereld. Viskweek heeft heel veel relatie met water en daarom ook met een Aquatische Ecotechnoloog.

Dit verslag is een deel van het afstudeerproject. Dit deel kan worden gezien als een achtergronddocument dat is geschreven om het hele onderzoek vast te leggen. Het andere deel, een kweekhandleiding voor het kweken van rotiferen, wordt ingeleid in de bijlagen van dit document. Het document zelf is om onderzoekstechnische redenen hier niet ingevoegd.

Als auteur wil ik graag iedereen bedanken die mij tijdens dit onderzoek, deze stage en deze opleiding heeft geholpen met dit alles. Door mijn opleiding en dit onderzoek heb ik nog meer respect gekregen voor de schepping. Het betekent veel voor me om deze opleiding af te mogen ronden.

Ik wens u veel plezier en interesse toe bij het lezen van dit verslag.

Cristijn de Vin,
7 november 2003

Inhoudsopgave:

Voorwoord	2
Inhoudsopgave:	3
Samenvatting	5
1. Inleiding	7
1.1 Aanleiding	7
1.2 Doelstellingen.....	9
1.3 Hoofdvraag en deelvragen	9
1.4 Leeswijzer	10
2. Theorie over Rotiferen en de kweek ervan	11
2.1 Plaats in het dierenrijk.....	11
2.2 Kenmerken	11
2.3 Toepassing rotiferen in de aquacultuur	13
2.4 Opzet productiecycclus	13
2.4.1 Stockcultuur.....	13
2.4.2 Tussencultuur	13
2.4.3 Massacultuur	14
3. De opzet van een kweekstelsel voor rotiferen	15
3.1 Inleiding	15
3.2 Materialen en methode.....	15
3.3 Resultaten.....	15
3.3.1 Water	15
3.3.2 Lucht.....	16
3.3.3 Voeding	16
3.3.4 Telmethode.....	17
3.3.5 Stelsel voor stockcultuur	17
3.3.6 Stelsel voor tussencultuur	18
3.3.7 Stelsel voor massacultuur	19
3.3.7.1 Bepaling stelsel voor massacultuur.....	19
3.3.7.2 Uitvoering en functioneren	20
3.3.7.3 Cylietenbesmetting.....	21
3.3.8 Een oogststelsel voor <i>B. plicatilis</i>	21
4. Groei van een rotiferenpopulatie in tussencultuur	22

4.	Groei van een rotiferenpopulatie in tussencultuur.....	23
4.1	Inleiding	23
4.2	Materiaal en methode	23
4.3	Resultaten en discussie	24
4.4	discussie.....	25
4.5	Conclusie	25
5	Test van massasysteem, voer en verrijking.....	26
5.1	Inleiding	26
5.2	Materiaal en methode.....	26
5.3	Resultaten.....	27
5.4	Discussie	30
5.5	Conclusies	31
6.	Algemene discussie.....	32
7.	Algemene conclusie	33
8.	Literatuurlijst.....	34

Samenvatting

De aquacultuursector is de snelst groeiende voedselproducerende sector ter wereld. De grootste producent is China, gevolgd door India en Japan. Binnen de Europese Unie is Spanje koploper, gevolgd door Frankrijk en Italië. Nederland komt op de vijfde plaats. Nederland heeft een aquacultuur productie van ongeveer 100.000 ton. Hiervan is 10.000 ton afkomstig uit de visteelt, de andere 90.000 ton is afkomstig uit de schelpdiersector. De meest geproduceerde vissoorten in Nederland zijn paling en meerval. Dit bestand wordt de laatste jaren uitgebreid met soorten als snoekbaars, tarbot en tong.

Door de afname van de vangst van kabeljauw maar door de blijvende vraag voor deze vis, heeft het RIVO besloten voorbereidend onderzoek uit te voeren naar de mogelijkheid van het kweken van kabeljauw. Een cruciale voorwaarde voor het opkweken van kabeljauw is echter dat de kabeljauwlarven met rotiferen (kleine zoö-planktonische organismen) gevoerd moeten worden. Rotiferen moeten ter plaatse worden gekweekt. Hiervoor moest er op het RIVO een kweekinstallatie worden gerealiseerd, waarin rotiferen konden worden gekweekt, met minimale inspanning. Tevens werd gekeken naar de mogelijkheid om de rotiferen met instant voedsel (algenconcentraten en Rotimac) te voeren zodat er geen levende algen gekweekt moesten worden.

Hiervoor is een kweekinstallatie geïnstalleerd, bestaande uit een stockcultuur, tussencultuur en massacultuur. De stockcultuur (in buizen van 50 milliliter) is voor het in leven houden van de populatie. De tussencultuur (literflessen) en massacultuur (40 liter cilindro-conische tanks) zijn voor het op grote schaal produceren van deze voedseldiertjes. De rotiferen werden gekweekt in een saliniteit van 25 promille en een temperatuur van 20 graden. De stockcultuur is gedurende het gehele experiment in leven gebleven. Bij de tussencultuur is experimenteel vastgesteld dat een maximale dichtheid in de flessen iets meer dan 60 individuen per milliliter bedroeg. Vermoedelijk is deze relatief lage dichtheid te wijten aan het gebruikte algenconcentraat dat naar de bodem zinkt en voor waterkwaliteitsproblemen kan zorgen. Ook is de voedingswaarde van deze algenconcentraten te betwijfelen. Hier is echter binnen dit rapport geen onderzoek naar gedaan.

De maximale dichtheid in de massacultuur, de cilindroconische tanks, is wat hoger bij gebruik van algenconcentraten. Deze maximale dichtheid ligt rond de 100 ind/ml. Ten tijde van het onderzoek naar de groei en dichtheid van de populatie in de cilindroconische tanks is een van de drie tanks gevoerd met levende algen. Hierdoor werd duidelijk dat rotiferen, gevoerd met levende algen binnen vijf dagen een 400% grotere populatie creëren dan rotiferen die gevoerd zijn met algenconcentraten. De aangeleverde rotiferenstam is besmet geweest met ciliaten die voedselconcurrerend zijn voor de rotiferen. Dit kan ook invloed hebben gehad op de groei van de populatie.

De conclusies van dit onderzoek zijn dat het mogelijk is rotiferen te kweken, gebruik makende van algenconcentraten en Rotimac. Er vindt toename van de populatie plaats. Het is echter wel zo dat rotiferen die gevoerd zijn met levende algen aanzienlijk beter presteren dan rotiferen die zijn gevoerd met algenconcentraten. De gebruikte opstelling bleek geschikt te zijn om rotiferen in te kunnen kweken.

Summary

Today, aquaculture is the fastest growing food producing industry in the world. The biggest producer is China, followed by India and Japan. Within the European Union is Spain the largest aquaculture producer, followed by France and Italy. The Netherlands are in fifth position with a production of about 100.000 tons. From this number, 10.000 tons are produced by fish-farming, the other 90.000 tons are produced by shellfish-farming.

The most farmed fish-species in the Netherlands are the eel and the African catfish. The last years this group has been expanded with species such as pikeperch, turbot and sole.

Because of the catch-reduction of cod and the growing demand for this species, RIVO decided to research the possibility to farm this species. A crucial condition for successful rearing of cod larvae is that cod larvae must be fed on live rotifers.

These rotifers must be farmed on the fish farm, because they must be fed alive to the larvae. Therefore, an installation for the production of rotifers had to be realised at RIVO to farm rotifers with minimal effort. In order to exclude the need for labour intensive cultivation of live algae, the possibility to feed the rotifers on algae-concentrates and Rotimac was investigated.

For this purpose, a farming installation was installed, existing of a stock-culture (50 ml tubes, for the maintaining a population), intermediate-culture (1l bottles, to scale up from stock- to mass-culture) and a mass-culture (40 l cylindroconical tanks, for the mass production of rotifers). The salinity used for farming was 25 ppt and the temperature was about 20 degrees Celsius. The stock-culture survived during the experiment. For the intermediate-culture it was found that the maximum density was a little over 60 individuals per millilitre. This is presumably caused by the used algae-concentrates. These algae sank to the bottom of the flask so they weren't available anymore for the rotifers and started to pollute the water. There are also some doubts about the nutritional value of these algae concentrates, but within this research this has not been assessed. Mass production of rotifers was investigated in a triplicate set of 40L cylindroconical tanks. Rotifer density and egg ratio were determined daily. Rotifers were initially kept in 10L volumes and fed on algaeconcentrates. The maximum rotifer density that could be reached in the mass-culture fed algae concentrates was a little higher than could be reached in the intermediate-culture. A maximum density of approximately 100 individuals/ml was reached in the mass-culture. After 10 days one tank was fed 1L of live algae daily for 5 days. Within these 5 days the rotifer population grew 400% bigger than the two cultures fed on algae concentrates. This suggests that production of rotifers on algae concentrates is sub-optimal. During rotifer production ciliate infestations were observed regularly. As ciliates compete for food with rotifers, rotifer production has most likely been affected by the ciliate infestations. In that case prevention of ciliate infestations will result in better rotifer production than presently reported

The conclusions of this research are that it is possible to farm rotifers on algae concentrates and on Rotimac. There is a slight increase of the population. On the other hand, rotifers being fed on live algae grow significantly faster than rotifers being fed on algae concentrates. The used installation proved to be suitable for the farming of rotifers.

1. Inleiding

1.1 Aanleiding

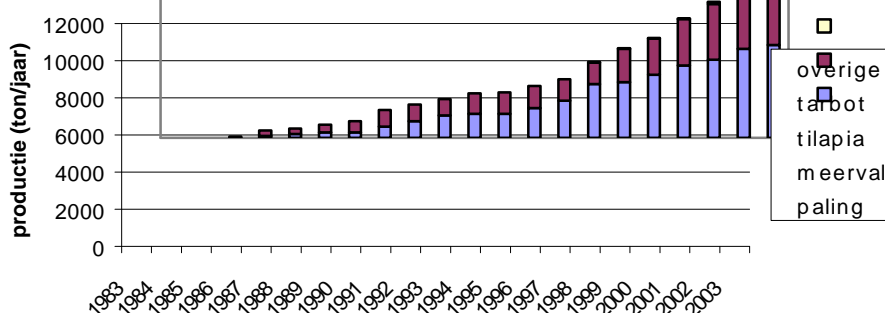
Aquacultuur¹ is zo'n 4000 jaar geleden ontstaan in China. In dit land is visteelt (als vorm van aquacultuur) uitgevonden en wordt het kweken van karpers al millennia lang beoefend. Nog steeds is China wereldleider waar het de omvang van de aquacultuur productie (>30 miljoen ton in 2001) betreft. Ook andere landen, zoals India (>2 miljoen ton) en Japan (1.3 miljoen ton) staan hoog in de lijst van aquacultuur productieomvang. (Europese Commissie, 2001).

In Europa steekt Noorwegen met kop en schouders boven de andere Europese landen uit. Hoewel Noorwegen geen lidstaat is van de Europese unie, heeft het wel de grootste aquacultuur productieomvang van het werelddeel Europa. Dit betekent voor Noorwegen dat dit land geen aquacultuursubsidie ontvangt vanuit de Europese Unie.

De grootste producenten binnen de Europese Unie zijn Spanje (>320.000 ton), Frankrijk (270.000 ton) en Italië (250.000 ton). Nederland staat op de vijfde plaats met iets meer dan 100.000 ton per jaar met zowel schelpdier als kweekvis (Europese Commissie, 2001).

In zo'n 20 jaar is de Nederlandse visteeltsector uitgegroeid tot een sector die meer dan 10.000 ton consumptievis per jaar produceert. De andere 90.000 ton is afkomstig uit de veel oudere schelpdiersector. Juist die consumptievissector heeft de potentie om uit te groeien naar een grote, samenwerkende sector die een grote diversiteit aan verschillende vissoorten kweekt. De schelpdiersector is echter veel ouder en heeft haar plafond bereikt. Vandaag de dag (2003) worden in Nederland voornamelijk paling en meerval gekweekt. Tevens wordt er op kleine schaal snoekbaars, tarbot, forel en tong (experimenteel) gekweekt. (De Vin, 2003).

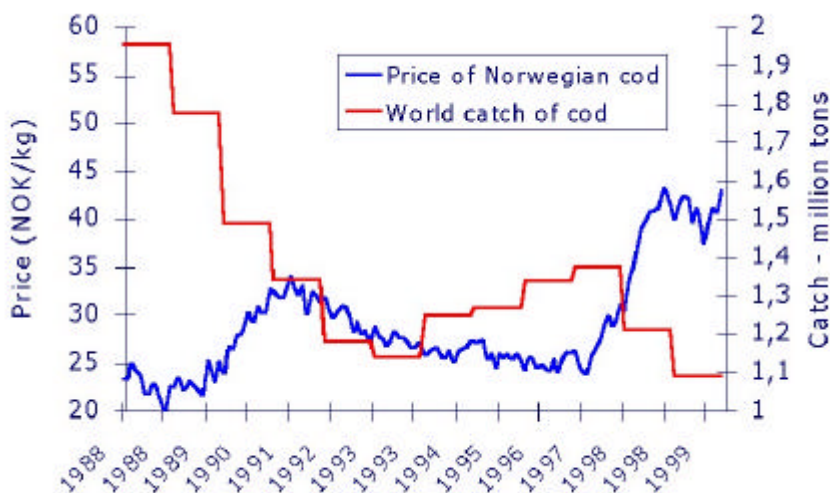
Figuur 1; De kweekvisproductie vanaf 1983 tot en met 2003 in Nederland. (Van Zwieten, 1998 aangevuld met data uit persoonlijke communicatie)



Een van de mogelijk nieuw te kweken soorten is kabeljauw. Onderstaand figuur illustreert de vangst van kabeljauw en haar oplopende prijs.

¹ onder aquacultuur wordt het kweken van waterorganismen, waaronder vis, weekdieren, schaaldieren en planten verstaan" (Europese Commissie, 2001)

Figuur 2; De wereldwijde vangsthoeveelheden en Noorse marktprijs van kabeljauw over de periode 1988-2000 (Bron: Asche en Tveteras, 2002)



Het Nederlands Instituut voor Visserijonderzoek (RIVO) heeft voor de meeste van de in Nederland gekweekte vissoorten zowel fundamenteel als toegepast onderzoek gedaan. Om de vraag van onderzoek naar kweekvis voor te zijn, voert het RIVO op eigen initiatief onderzoek uit naar het kweken van kabeljauw. Het RIVO verwacht dat er binnenkort wellicht een onderzoeksvraag komt naar het kweken van kabeljauw omdat de aanvoer vanuit de visserij afneemt maar de vraag zal blijven. Gekweekte kabeljauw zal in deze vraag kunnen voorzien door haar constante aanvoer en kwaliteit.

Kabeljauw is een roofvis die van nature voorkomt in de noordelijke Atlantische oceaan. Volwassen exemplaren eten hoofdzakelijk vis en inktvis. Een kabeljauw ontstaat als larve uit een eitje dat door de ouderdieren is afgezet en bevrucht. De larve zal de eerste vijf dagen overleven op zijn dooierzak. Daarna zal hij in een natuurlijke situatie zich voeden met zooplankton gedurende twee weken. Vervolgens zal de kabeljauwlarve zich richten op grotere planktonische pelagische organismen.

Een belangrijke voorwaarde van het *kweken* van kabeljauw is dat de millimeters kleine kabeljauwlarven gevoerd moeten worden met een planktonsoort die tot de orde der Rotiferen behoort; de *Brachionus plicatilis*. De *B. plicatilis* is een soort die van oorsprong voorkomt in zoute wateren en relatief eenvoudig te kweken is. In hoofdstuk 2 is een beschrijving van de soort te vinden. Randvoorwaarde voor het voeren van rotiferen aan vissenlarven is dat deze ter plaatse moeten worden opgekweekt en moeten worden verrijkt.

Verrijken houdt in dat de rotiferen worden voorzien van essentiële vetzuren en vitaminen.

Deze zijn van belang voor de ontwikkeling van bijvoorbeeld pigmentatie. Het RIVO zal dus, om kabeljauwlarven op te kunnen kweken moeten beschikken over zelf gekweekte en verrijkte rotiferen. Op deze manier kan het onderzoek naar kweekkabeljauw als aanvulling voor wildvang worden uitgevoerd.

1.2 Doelstellingen

Zoals hierboven is vermeld, zal het RIVO zich moeten voorbereiden op een mogelijke aanvraag tot onderzoek naar het kweken van kabeljauw. Het RIVO zal dit doen door op kleine schaal te experimenteren met het hatchen ('uitbroeden') en opkweken van kabeljauwlarven. Om dit hatchen en opkweken mogelijk te maken, zijn levende rotiferen nodig die dienen als voedsel(drager) voor de kabeljauwlarven. Het doel van dit afstuderen was om het RIVO te voorzien van een geschikte productiemethode voor rotiferen. De opzet van een rotiferen kweekstelsel is de eerste stap in de ontwikkeling van kabeljauwkweek op het RIVO. Het is de bedoeling de rotiferen op te kweken met instant voedsel. Dat wil zeggen: geen levend voedsel (zoals algen). Er zijn diverse middelen op de markt die wellicht goed kunnen functioneren als vervangers van algen. De praktijk wijst uit dat wereldwijd de meeste rotiferen worden opgekweekt met levende algen als voedselbron. Het kweken van levende algen is echter erg arbeidsintensief. Het RIVO wil daarom zo min mogelijk tijd investeren in het kweken van rotiferen, maar wel een goed eindproduct verkrijgen. Daarom heeft het RIVO gekozen voor onderzoek naar het gebruik van instant producten als voedsel voor rotiferen.

Om aan bovenstaande doelstelling te voldoen, is er een tweedeling gemaakt in het kweken van de rotiferen. Enerzijds is er een stockcultuur gehouden die met minimale inspanning onderhouden wordt, maar die in staat is een massa cultuur op te starten. Anderzijds is er een massacultuur gehouden die grote hoeveelheden rotiferen kan produceren die geschikt zijn als voedsel voor de kabeljauwlarven.

1.3 Hoofdvraag en deelvragen

De hoofdvraag bij dit onderzoek is:

*Hoe kan de *Brachionus plicatilis*, gevoerd door instant-voedsel, gekweekt en gebruikt worden als geschikte voedselbron voor kabeljauwlarven?*

Deze hoofdvraag is op te splitsen in verschillende deelvragen. De deelvragen waren:

1. Welke systemen worden gebruikt voor de kweek van rotiferen en welke is voor het RIVO het meest geschikt?
2. Moet dit systeem worden aangeschaft of zelf worden gebouwd?
3. Is het mogelijk rotiferen in leven te houden en te laten groeien?
4. Welke dichtheid (rotiferen per milliliter) kan maximaal worden gehaald?
5. Lukt het om de rotiferen te verrijken als geschikte voedselbron voor kabeljauwlarven?

1.4 Leeswijzer

Hoofdstuk 2, Theorie, zal gaan over de biologische kenmerken, toepassing en het kweken van *B.plicatilis*. het daarop volgende hoofdstuk 3, de opzet van een kweekstelsel voor rotiferen zal gaan over welk systeem voor dit onderzoek is ontworpen en opgezet. Ook staan hier de opgedane kweekervaringen in beschreven.

Hoofdstuk 4 zal gaan over de groei van een rotiferenpopulatie in een tussencultuurflask.

Vervolgens zal hoofdstuk 5 gaan over de een rotiferenpopulatie in een massacultuurtrechter, gevolgd door hoofdstuk 6, de discussie welke wordt gevolgd door de conclusie, in hoofdstuk 7.

Het document wordt afgesloten door de literatuurlijst en de bijlagen.

2. Theorie over Rotiferen en de kweek ervan

Binnen dit hoofdstuk wordt ingezoomd op de classificatie (plaats in het dierenrijk) van rotiferen, wat de kenmerken zijn van *B.plicatilis* en wat hun toepassing is binnen de aquacultuur. Tevens wordt bekeken hoe de opzet van een productiecycclus is, ter verduidelijking voor de rest van het verslag, onderverdeeld in stockcultuur, tussencultuur en massacultuur.

2.1 Plaats in het dierenrijk

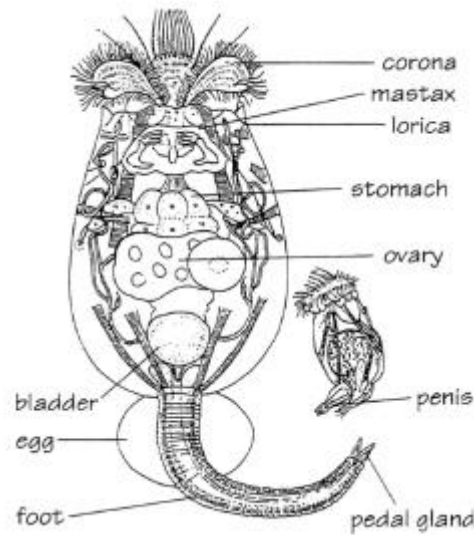
De familie van de brachionidae behoort tot de stam van de Rotatoria. Het zijn organismen die net niet met het blote oog te zien zijn. Het is een planktonsoort. Er zijn meer dan 2000 soorten rotiferen, waarvan de meeste voorkomen in zoet water. Enkele soorten komen voor in vochtige grond of zeewater. Het zijn ongesegmenteerde, bilateraal-symmetrische pseudocoelomaten. (Shiri Harzevili, 1998).

Rijk:	Animalia (dieren)
Stam:	Rotatoria (raderdieren)
Klasse:	Eurotatoria
Onderklasse:	Pseudotrocha
Orde:	Transversiramida
Familie:	Brachionidae
Genus:	<i>Brachionus</i>
Soort:	<i>Brachionus plicatilis</i>

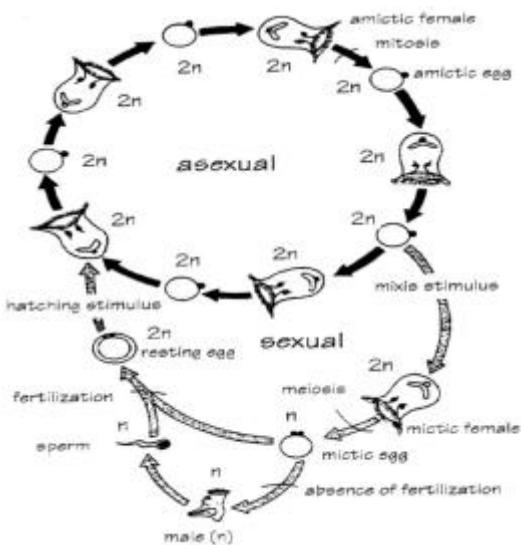
2.2 Kenmerken

De hier gebruikte rotiferensoort is de *Brachionus plicatilis* (*B. plicatilis*). De lengte van deze mariene soort varieert tussen de 220-320 µm. De vrouwelijke exemplaren bereiken altijd veel grotere lengtes (300% groter) dan de mannelijke exemplaren van dezelfde soort. Rotiferen voeden zich door middel van hun corona, een ronddraaiende krans met cilia (kleine "trilhaartjes"). Door deze bewegingen ontstaat er een vortex (een soort draaikolk) waardoor voedsel naar binnen wordt gezogen. Ook zorgt deze beweging voor een voortstuwing. Bij de vrouwtjes zit in het midden van het lichaam de maag. Deze is vaak goed te zien door het eten dat is opgenomen door de corona en in de maag zit. Mannetjes hebben geen spijsverteringsstelsel en blaas, maar zijn in het bezit van een zeer grote testis gevuld met sperma. Bij bevruchting zal het mannetje met zijn penis de huid van het vrouwtje doorboren. Dit is alleen mogelijk bij jonge vrouwtjes waarvan de huid nog zacht is. De *B. plicatilis* heeft een voet waarmee hij zich kan vastzetten en zich kan sturen in zijn voortbeweging. De vrouwelijke *B. plicatilis* kunnen eieren bij zich dragen. Deze (meestal één, een enkele keer twee) hangen in de lengterichting onder het lichaam. Zie figuur 3 voor de ligging van de verschillende onderdelen.

Figuur 3; Weergave van Brachionus plicatilis
(bron: Lavens en Sorgeloos, 1996)



De voortplanting van de *B. plicatilis* is zowel geslachtelijk als ongeslachtelijk. Meestal vindt een ongeslachtelijke voortplanting plaats. Vrouwjes produceren eitjes waaruit weer vrouwjes voortkomen. Dit is de gewenste (kweek)situatie. Als er veel eidragende vrouwjes zijn, is dit het teken dat de populatie in goede conditie is. Onder specifieke milieuomstandigheden zoals tekort aan voedsel, afnemende waterkwaliteit, plotselinge temperatuurs- en saliniteitswisseling kan er echter ook een geslachtelijke voortplanting plaatsvinden (Shiri Harzevili, 1998). Door meiose produceren de vrouwjes dan haploïde cellen die, als ze niet bevrucht worden, uitgroeien tot mannetjes. Als ze wel bevrucht worden, ontstaat er een zogenaamde cyste. Door een bepaalde stimulus (temperatuur, voedseltekort en/of populatiedichtheid) zal de cyste uitkomen waaruit een ongeslachtelijk vrouwtje uit zal groeien. In figuur 4 is de levensloop van de *B. plicatilis* weergegeven.



Figuur 4; Weergave van de voortplantingscyclus van Brachionae.
(Bron: Lavens en Sorgeloos, 1996)

2.3 Toepassing rotiferen in de aquacultuur

Rotiferen worden gebruikt voor het opkweken van meer dan 60 mariene vissoorten en meer dan 18 soorten Crustaceëen. (Shiri Harzevili, 1998) De kweek van rotiferen is ca. 30 jaar geleden ontstaan toen de kweek van mariene organismen op gang kwam. De bekendste vissoorten die opgekweekt worden met behulp van rotiferen zijn de tarbot (*Scophthalmus maximus*), zeebaars (*Dicentrachus labrax*), zeebrasem (*Sparus auratus*), heilbot (*Hippoglossus hippoglossus*) en tenslotte kabeljauw (*Gadus morhua*).

In de visteelt wordt twee soorten brachionis gebruikt: *Brachionus rotundiformis* (S-type) en *Brachionus plicatilis* (L-type). Het zijn daadwerkelijk twee aparte soorten omdat onderling kruisen niet mogelijk is. De S-type rotifeer is een stuk kleiner (loricalengte 130-220 micrometer) dan de L-type (220-320 micrometer). Het is ook bekend dat de S-type rotifeer een hogere optimumtemperatuur heeft dan de L-type.

De rotiferen in Zuid-Europa die worden gekweekt voor voornamelijk zeebaars en zeebrasem, kunnen worden gekweekt in batchcultures, maar voornamelijk in semi-continu cultures (zie volgende paragraaf). In Azië worden ook rotiferen gekweekt. In Japan is een systeem ontwikkeld waarmee in batch systemen rotiferen gekweekt worden met volumes die op kunnen lopen tot 200 m³ waar met een inzet van 80-200 individuen per ml een dagelijkse oogst van $2 \cdot 6 \cdot 10^9$ rotiferen mogelijk is (Shiri Harzevili, 1998).

2.4 Opzet productiecyclus

De populatie van een batchcultuur zal in het begin (eerste 4-5 dagen) een exponentiele groei vertonen. Na deze dagen zal de groei afnemen en vervolgens zal het aantal individuen in de populatie afnemen doordat de omstandigheden minder optimaal zijn geworden om goed te kunnen vermeerderen. Door de verhoogde mortaliteit zullen uiteindelijk de omstandigheden dusdanig slecht worden dat er uiteindelijk geen levend individu meer overblijft. De groeicurve is te omschrijven als een S-curve (eerst exponentiele groei, daarna afvlakking, vervolgens afname van aantal individuen). Het is bij het kweken van rotiferen van belang dat ze feitelijk permanent in exponentiele fase worden gehouden.

2.4.1 Stockcultuur

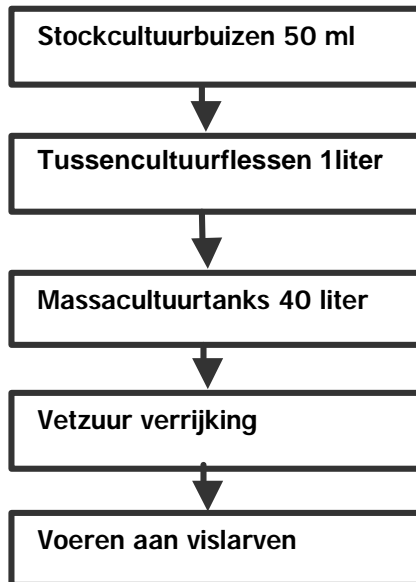
Het doel van een stockcultuur is het in leven houden van een rotiferen populatie met minimale inspanning. Het principe van het houden van een stockcultuur is deze over een bepaalde periode laten groeien waarna de cultuur wordt verdund en verversd.

2.4.2 Tussencultuur

Een tussencultuur is nodig om de stap te maken tussen een stockcultuur en een massacultuur. Reden is dat er voor een massacultuur toch veel meer rotiferen nodig zijn (bij inzet) dan een stockcultuur op kan leveren. Het doel van een tussencultuur is de rotiferen in korte tijd een toename in het aantal individuen (=groei van de populatie) te laten maken door een exponentiele fase te creëren.

2.4.3 Massacultuur

In een massacultuur die volgt op de tussencultuur, worden rotifera voor productie gekweekt. Er zijn, zoals verder uit dit rapport blijkt (zie paragraaf 3.3.7.1), diverse mogelijkheden om een massacultuur te houden. De drie belangrijkste zijn: batchcultuur, semi-continu cultuur en continu cultuur. Hoe de keuze van het systeem dat binnen dit onderzoek is gebruikt is gemaakt, staat verderop in dit verslag beschreven.



Figuur 5; Schematische weergave van de kweek van Brachionis plicatilis

3. De opzet van een kweekstelsel voor rotiferen

3.1 Inleiding

De belangrijkste voorwaarden voor het kweken van rotiferen zijn de beschikbaarheid over water van goede kwaliteit, geschikt voer en een goede temperatuur. Er zijn binnen dit onderzoek voor de productie van rotiferen een drietal culturen nodig: een stockcultuur, een tussencultuur en een massacultuur, welke verder in dit hoofdstuk zullen worden beschreven. De rotiferen zijn afkomstig van een leverancier (Dennis Bakker, Koraalzo B.V.) die zich toelegt op de Nederlandse en Duitse zeewater siervisteelt. Binnen dit hoofdstuk wordt opgesomd hoe het stelsel en methodiek is ontstaan en samengesteld. In materiaal en methode wordt duidelijk hoe aan de informatie is gekomen om het stelsel te bouwen. Vervolgens worden in de resultaten alle parameters besproken en als afsluiting van het hoofdstuk worden de stock-, tussen- en massacultuur besproken.

3.2 Materialen en methode

Voor dit onderzoek zijn verschillende wegen bewandeld om informatie te verkrijgen voor het kweken van rotiferen

De voornaamste methode is een deskstudie geweest. Er is aan informatie gekomen via het internet maar ook door wetenschappelijke publicaties en boeken over het kweken van rotiferen en kabeljauw.

Ten tweede is er een veldbezoek gebracht aan Diergaard Blijdorp waar binnen het Oceanium rotiferen worden gekweekt. Dit bezoek was een bron van inspiratie en informatie voor aanpassingen en verbeteringen.

Een derde manier hoe de hier toegepaste methode is ontstaan is door trial & error. Door een bepaalde techniek te proberen kan worden bekeken of deze techniek toereikend is of niet.

Zonodig worden verbeteringen uitgevoerd en worden deze ook weer getest.

3.3 Resultaten

Binnen deze paragraaf zullen alle parameters, instellingen en kweeksystemen worden besproken.

3.3.1 Water

Het water dat gebruikt moet worden heeft een saliniteit van 25 promille. (website Reed-mariculture en Lavens&Sorgeloos, 1996). *Brachionis plicatilis* heeft een hoge tolerantie (1-97 promille) maar reproduceert het beste bij een saliniteit rond 25 promille. Het water is afkomstig uit een mengsel van 2.7 delen zeewater (34 promille) en 1 deel kraanwater.

Het zeewater is afkomstig van de Noordzee en is per schip naar het RIVO vervoerd. Daar is het gefilterd via actief kool en nabehandeld met behulp van ultraviolet licht. Voor het zoetwater is

gebruik gemaakt van kraanwater. Nadat het water is samengevoegd, wordt het door een papieren vouwfilter geleid met een maximale maaswijdte van 4 micron om eventuele ongewenste deeltjes en organismen te verwijderen. Het water bevat zo min mogelijk nutriënten door zo zuiver mogelijk water te nemen. Nadat het water gefilterd is wordt het opgeslagen in een voorraadvat. Dit wordt voorzien van een verwarmingselement en warm gehouden op 20° Celsius (Laterveer & Alsemgeest, 2002), Dit is de beste temperatuur voor *B.plicatilis* omdat hierbij de levensduur van de volwassen vrouwelijke exemplaren lang is en de tijd tussen twee legsels het beste overeenkomt met de tijd waarbij het vrouwtje haar eerste nakomeling krijgt. Hierdoor kan een optimale populatiegroei worden bereikt. Tabel 1 illustreert dit feit. (Lavens & Sorgeloos, 1996). De buizen en flessen worden in een waterbad geplaatst met een temperatuur van 20° Celsius.

Tabel 1; Het effect van temperatuur op de rotifeer *Brachionus plicatilis*. (Lavens & Sorgeloos, 1996)

Temperatuur (°C)	15°C	20°C	25°C
Duur van de embryonale ontwikkeling (dagen)	1.3	1.0	0.6
Dag waarop een vrouwtje voor het eerst nakomelingen krijgt	3.0	1.9	1.3
Tijdsduur tussen twee legsels (uren)	7.0	5.3	4.0
Levensduur vrouwtjes (dagen)	15	10	7

3.3.2 Lucht

De lucht die wordt gebruikt voor het beluchten van de rotiferen dient te worden gefilterd (Lavens & Sorgeloos, 1996) omdat perslucht ongewenste stoffen als olie en vuil kan bevatten. Binnen de in dit onderzoek gebruikte opstelling is een persluchtfilter van 4 micron aangeschaft om schadelijke deeltjes (olie en vuil) uit de lucht te verwijderen. Na het filter is een wasfles geplaatst met een bruissteen. Hierdoor worden hele fijne luchtbelletjes verder gezuiverd en wordt de lucht bevochtigd waardoor er minder verdamping van het water uit de buizen en flessen optreedt.

3.3.3 Voeding

Binnen dit onderzoek zijn twee verschillende soorten voer gebruikt om de brachionispopulatie te voeren. Voor de stockcultuur en de tussencultuur wordt een algenconcentraat gebruikt. Dit concentraat bestaat uit dode, gezeefde *Nannochloropsis* algen in een concentratie van ongeveer 68 miljard cellen per milliliter. Deze algensuspensie heeft als nadeel dat de algen, indien ze te weinig in suspensie worden gehouden, ze naar de bodem zakken en daar een bron van voedsel voor ciliaten (zie paragraaf 3.3.7.3) en waterverontreiniging vormen. De massacultuur wordt daarentegen gevoerd met Rotimac. Dit is een uit Amerika afkomstig product dat een enkele keer in Noorwegen wordt gebruikt om rotiferen te voeden. Het is een voer dat hoofdzakelijk uit gevriesdroogde algen bestaat, aangevuld met gist en mineralen. Het is makkelijk in gebruik en vervuult bijna niet waardoor de waterkwaliteit gehandhaafd blijft. Het dient 2x daags in afgemete hoeveelheden te worden toegediend.

3.3.4 Telmethode

Het zorgvuldig tellen van rotiferen is noodzakelijk om een goede inschatting te maken van de omvang van de populatie. De onderstaande methode is gebaseerd op telmethodieken van James & Abu-Rezeq, (1989), en Suantika et al, (2000).

Benodigdheden:

- ~~///~~ Automatische Pipet (100-1000 microliter)
- ~~///~~ Labyrintbakje
- ~~///~~ Pipet met jodiummethanoloplossing (1:10)
- ~~///~~ Binoculair

Methode:

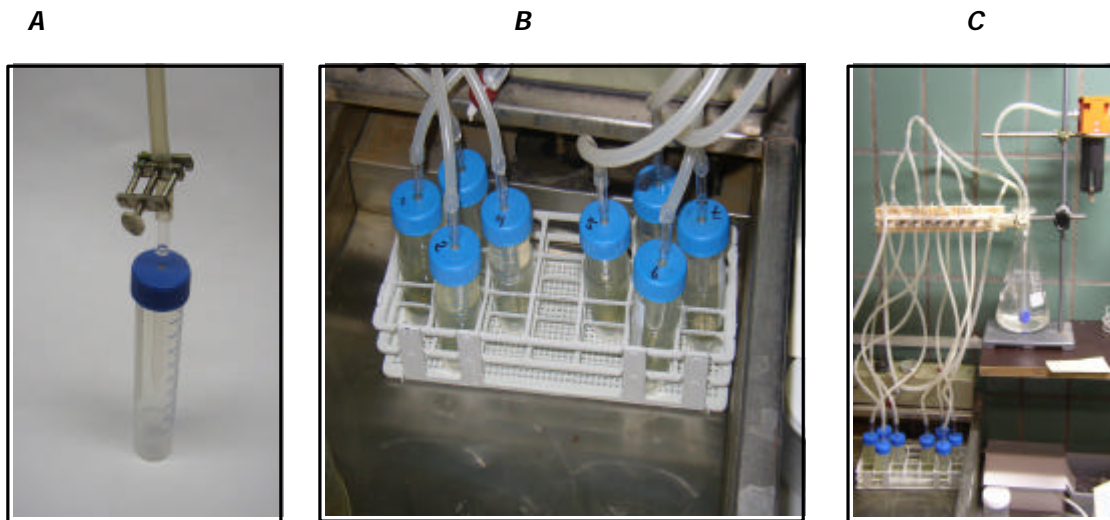
Neem uit een goed gemengd vat een viertal monsters van 500 microliter.

Doe deze in het labyrintbakje, elk op een andere plaats. Voeg per monster twee druppels jodiummethanoloplossing toe om de rotiferen te immobiliseren. Wacht tot de rotiferen niet meer bewegen en tel alle aanwezige gezond uitzierende rotiferen. De lege schaaltes (lorica's) van de rotiferen moeten niet meegeteld worden. Na het tellen wordt het gemiddelde berekend van de vier samples. Dit wordt vervolgens met twee vermenigvuldigd om het aantal rotiferen per milliliter te berekenen.

3.3.5 Systeem voor stockcultuur

Het op het RIVO ontworpen systeem bestond uit een achttal 50 ml analysepotjes met deksels waar door middel van een gaatje een glazen pasteurs pipet gestoken kan worden dat voor beluchting zorgt. De buizen werden behandeld als aangegeven in paragraaf 3.3.1 tot en met 3.3.4. Om de groei van algen te verhinderen werd de stock opstelling zoveel mogelijk verduisterd. Zie figuur 6a, b en c voor een illustratie van deze opstelling.

Figuur 6A, 6B en 6C: A: Weergave van een stockcultuurbuis voor het houden van rotiferen B: Stockcultuurbuizen in het waterbad. C: de gehele stockinstallatie (buizen, beluchting, waterbad)



3.3.6 Systeem voor tussencultuur

De bij dit onderzoek gebruikte tussencultuur opstelling bestond uit glazen literflessen die belucht werden door glazen pasteurs pipetten te gebruiken. De flessen werden behandeld als beschreven in paragraaf 3.3.1 tot en met 3.3.4. Een stockcultuur levert hoogstens 300 ind/ml. Er zit 50 ml in de buizen van de stockcultuur, dus er zijn $300 \times 50 = 15000$ rotiferen. Voor de opstart van een massacultuur van 10 liter zijn al snel 30 ind/ml nodig om de cultuur goed te laten groeien. Voor de opstart van een massacultuur zijn dus wel $10000 \times 30 = 300000$ rotiferen nodig. Een tussencultuur moet dus kunnen voorzien in ongeveer 300 rotiferen per liter, uitgegaan van literflessen

Figuur 7; Voorbeeld van een tussencultuur fles om rotiferen door te kweken vanuit een stockcultuur naar een massacultuur.



3.3.7 *Systeem voor massacultuur*

3.3.7.1 Bepaling systeem voor massacultuur

Het kweken van rotiferen is mogelijk in drie verschillende systemen. Een batchsysteem, een semi-continu systeem en een continu systeem. Het lijkt van belang dat, voordat er gekweekt wordt, besloten wordt in wat voor systeem er wordt gekweekt. Onderstaand zijn de systemen beschreven.

Batch cultuur

Er zijn minimaal **vier** bassins waarin per dag in een bak een kleinere cultuur (startcultuur) wordt uitgezet. Deze cultuur wordt gevoerd en zal na een aantal dagen uitgroeien tot een grotere cultuur van oogstbaar niveau. Om financiële (prijs van de bassins) en chemische (waterkwaliteit) redenen is het verstandig een batch niet langer dan vier dagen te laten groeien. Hoe meer bassins er moeten worden aangeschaft, hoe hoger de prijs wordt. Als iedere dag een bassin wordt ingezet, wordt het na vier dagen mogelijk uit het eerste bassin een geschikte hoeveelheid rotiferen te oogsten. Daarna worden deze bassins schoongemaakt en weer ingezet met een stockcultuur. Het is eenvoudig in gebruik en makkelijk in onderhoud.

Semi-continu cultuur

Een semi-continu systeem lijkt op een batchsysteem met rotiferen maar wordt eens in de vier dagen **gedeeltelijk** geoogst. Daarna kan de populatie weer aangroeien tot oogstbaar niveau. Een semi-continu systeem hoeft dus niet telkens opgestart te worden, maar blijft "permanent" in leven. Doordat er iedere vier dagen geoogst wordt, moeten er, voor een dagelijkse aanvoer van rotiferen, **vier** semi-continu tanks naast elkaar draaien. Een semi-continu systeem kan een aantal keer (min 3-4) worden geoogst. (Er wordt dan 75 % van het bestand verwijderd waarna er ongeveer 50 ind/ml wordt ingezet.) Na een aantal keer (3-4) kan het mogelijk zijn dat vermoedelijk door vervuiling en ciliaten een cultuur instort. Dan moet de tank worden stopgezet en schoongemaakt. Dan moet het weer worden opgestart met een startcultuur (tussencultuur). Het systeem is eenvoudig te gebruiken en is wereldwijd het meeste toegepast (Schram, 2003).

Continu cultuur

Een continu systeem bestaat uit **een** chemostatische tank (Shiri Harzevili, 1998) waarin permanent vers water, voedsel en eventueel zuurstof in wordt gebracht. Tegelijkertijd verlaten faeces en ongewenste stoffen zoals stikstof het systeem. Hierdoor worden de rotiferen dusdanig in staat gesteld om goed te kunnen groeien. Er kunnen extreem hoge dichtheden worden bereikt (tot 35.000 #/ml, P.Dhert et al, 2001), onder andere veroorzaakt door het feit dat de rotiferen permanent in de exponentiele fase blijven, waardoor de snelste toename in aantal bereikt wordt. De productie van rotiferen in een continu systeem is aanzienlijk hoger dan in andere systemen (Shiri Harzevili, 1998). Dit systeem is echter complex in onderhoud wat het onaantrekkelijk maakt om te gebruiken. Dit systeem is (nog) niet in gebruik bij rotiferen kwekende bedrijven.

Tabel 2, Eigenschappen van Batchsysteem, semi-continusysteem en continu systeem.

	Batch systeem	Semi-continu systeem	Continu systeem
Aantal tanks	Minimaal 4	Minimaal 4	1
Onderhoud/gebruik	veel	veel	Matig
gebruiksgemak	Eenvoudig	Redelijk eenvoudig	Complex
Aanschafkosten	Laag/middel	Laag/middel	Middel
Betrouwbaarheid	betrouwbaar	Redelijk betrouwbaar	Matig betrouwbaar
Maximale dichtheid (# dagen)	200-350 #/ml (4)	300-1000 #/ml (3-7)	Tot 35000 #/ml

Keuze:

Op basis van bovenstaande eigenschappen is gekozen voor een semi-continuu systeem. De redenen hiervoor zijn de lage aanschafkosten, de betrouwbaarheid en de relatief hoge opbrengst. Ook is voor dit systeem gekozen omdat de opzet weinig arbeidsintensief is.

Opzet van systeem voor massacultuur

Het systeem werd gedeeltelijk zelf gebouwd en gedeeltelijk aangeschaft. Er zijn vier cilindroconische tanks met een inhoud van 40 liter aangeschaft bij *Schiphorst Trading* te Deventer. Alle overige zaken zoals stellages, waterbaden, flessen, buizen en erlenmeyers zijn allemaal uit eigen voorraad gebruikt.

3.3.7.2 Uitvoering en functioneren

Het gebruikte systeem binnen dit onderzoek is een semi-continuu-systeem. Het staat ook wel bekend als het zogenaamde verdunningssysteem. (Shiri Harzevili, 1998.) Het principe berust op een viertal cilindro-conische tanks, waarvan er iedere dag van een 75% wordt geoogst. De overige 25 % wordt weer met vers water aangevuld tot 100% om na 4 dagen weer te worden geoogst. De verwarming van het water vond plaats door de tanks individueel te voorzien van verwarmingselementen. Ook werden de tanks voorzien van beluchting.

Figuur 8; Massakweekinstallatie voor het kweken van *Brachionis plicatilis*, gebruikt op het RIVO in IJmuiden



Onderstaande tabel geeft een samenvatting van bovenstaande parameters die betrekking hebben op de stock-, tussen- en massacultuur

Tabel 3, *Samenvatting van kweekparameters voor stock-, tussen- en massacultuur.*

	Stockcultuur	Tussencultuur	Massacultuur
Saliniteit	25 promille	25 promille	25 promille
Lucht	Gefilterd	Gefilterd	Ongefilterd
Voeding	Algenconcentraat	Algenconcentraat	Rotimac
Licht	Geen	Geen	Geen
Temperatuur	20 graden	20 graden	20 graden
volume	50 milliliter	1 liter	40 liter

3.3.7.3 Cyliatenbesmetting

De aangeleverde rotiferenstam was besmet met cyliaten. In de stock en tussencultures waren deze cyliaten vermoedelijk geen bedreiging voor de rotiferen omdat ze daar niet gevonden zijn. In de massacultuur kwamen deze cyliaten explosief tot groei en vormden hierdoor een reële voedselconcurrentie voor de rotiferen. Diverse maatregelen zijn uitgevoerd om de cyliaten te verwijderen. Deze waren echter probleemgericht en niet brongericht. Een van de maatregelen was het uitspoelen van de populatie. De cyliaten zijn aanzienlijk kleiner dan de rotiferen. Hierdoor konden ze worden uitgezeefd. Dit leek effectief, maar na enkele dagen verschenen er toch weer cyliaten. Een andere optie voor het verwijderen van de cyliaten was het voeren met tetraselmis algenconcentraat. Deze algencellen zijn voor cyliaten te groot om te eten. Door de rotiferen met deze algensoort te voeren was de verwachting dat de cyliaten verhongerden. Deze maatregel had echter geen effect. Het probleem werd ondervangen door de rotiferen met een overmaat te voeren zodat er geen tekort aan voedsel voor de rotiferen zou ontstaan. Deze besmetting is echter wel voor een deel verantwoordelijk geweest voor de relatief lage groei van de rotiferen.

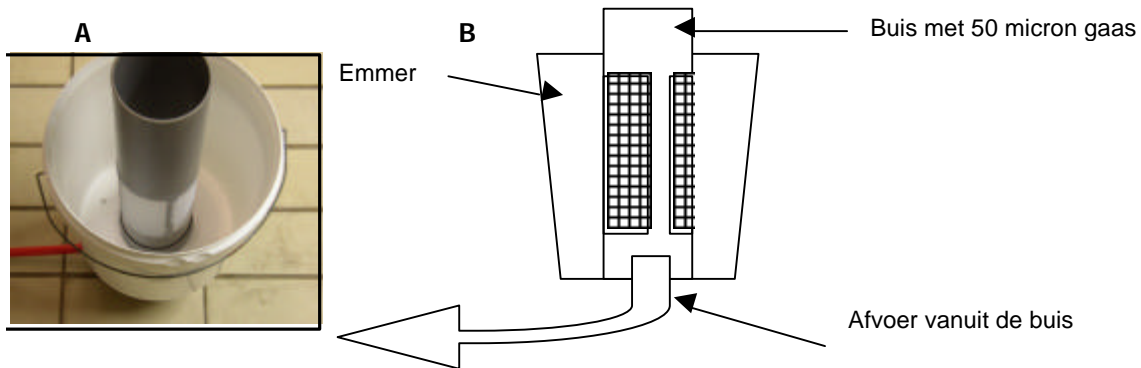
3.3.8 *Een oogststelsel voor B. plicatilis*

Om de rotiferen te oogsten is een oogstapparaat ontwikkeld. Het principe is gebaseerd op een trommelfilter. Het water uit de massacultuur wordt opgevangen in een emmer waarin een buis is gemonteerd. De buis is gedeeltelijk opengewerkt en beplakt met gaas met een maaswijdte van 50 micron. In de buis is een doorvoer door de bodem van de emmer, waardoor het water afgevoerd kan worden. Het water met de rotiferen komt uit de trechter in de emmer terecht. Het water zal door het gaas stromen en worden afgevoerd. De rotiferen blijven in de emmer achter.

Figuur 9A en 9B;

A: foto van oogststelsel waarmee rotiferen kunnen worden geoogst.

B: schematische weergave van een oogststelsel waarmee rotiferen kunnen worden geoogst.



4. Groei van een rotiferenpopulatie in tussencultuur

4.1 Inleiding

In dit hoofdstuk wordt het experiment beschreven dat is uitgevoerd om de maximale dichtheid in een erlenmeyer te bepalen. Het doel is om als tussencultuur, uit te vinden hoeveel rotiferen per milliliter kunnen worden gevonden als er wordt gevoerd met een nannochloropsis concentraat.

4.2 Materiaal en methode

Drie erlenmeyers van 500 ml waren elk gevuld met 433 ml gefilterd zeewater met een zoutgehalte van 25 promille, en 67 ml rotiferencultuur met een dichtheid van 75 ind/ml. Hierdoor werd een dichtheid van 10 rotiferen per ml bereikt. De rotiferen waren afkomstig uit een voor experimenten op het RIVO gehouden populatie.

Elke erlenmeyer werd zachtjes belucht met behulp van een glazen pipet met ca vijf belletjes per seconde om voldoende zuurstof in het water te houden en de rotiferen en voer goed in suspensie te houden. De lucht werd voorbehandeld als beschreven in hoofdstuk drie. Tevens werden de erlenmeyers in een waterbad geplaatst onder de in hoofdstuk drie aangegeven condities. Instraling van licht werd zoveel mogelijk vermeden om aangroei van algen te voorkomen. De erlenmeyers werden vooraf gedesinfecteerd met behulp van een 70% ethanoloplossing om de kans op groei van ongewenste organismen zoveel mogelijk tegen te gaan. Voor gebruik zijn de erlenmeyers gedroogd zodat er geen ethanolresten waren. Het experiment had een looptijd van acht dagen.

Voeding:

Dagelijks werden de rotiferen gevoerd met een automatische pipet waarmee 100 µl Nannochloropsis concentraat werd toegediend. Het concentraat had een dichtheid van ca 68 miljard cellen per ml. De voederhoeveelheid is gebaseerd op empirische bepaling bij voorgaand onderzoek naar het in leven houden van de populatie.

Monstername:

De monstername voor dit experiment staat beschreven in hoofdstuk drie.

Aan het einde van de proef werden er watermonsters genomen, gefiltreerd en ingevroren voor analyse van Ammonia en Nitriet. Dit is uitgevoerd met behulp van een Merck-set, methode 1.M544.0001 en 1.M776.001.

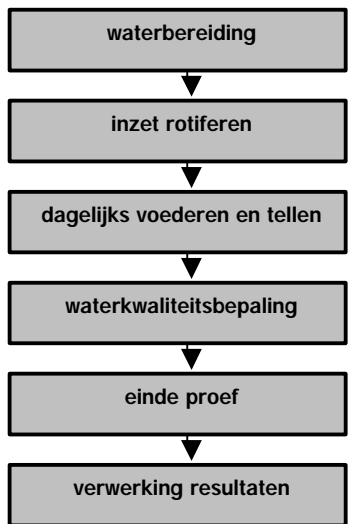
Berekeningen:

Het aantal ind/ml werd berekend door de formule:

$$C = \frac{? \cdot S1, S2, S3, S4}{2}$$

Waarin C het aantal individuen per ml is.

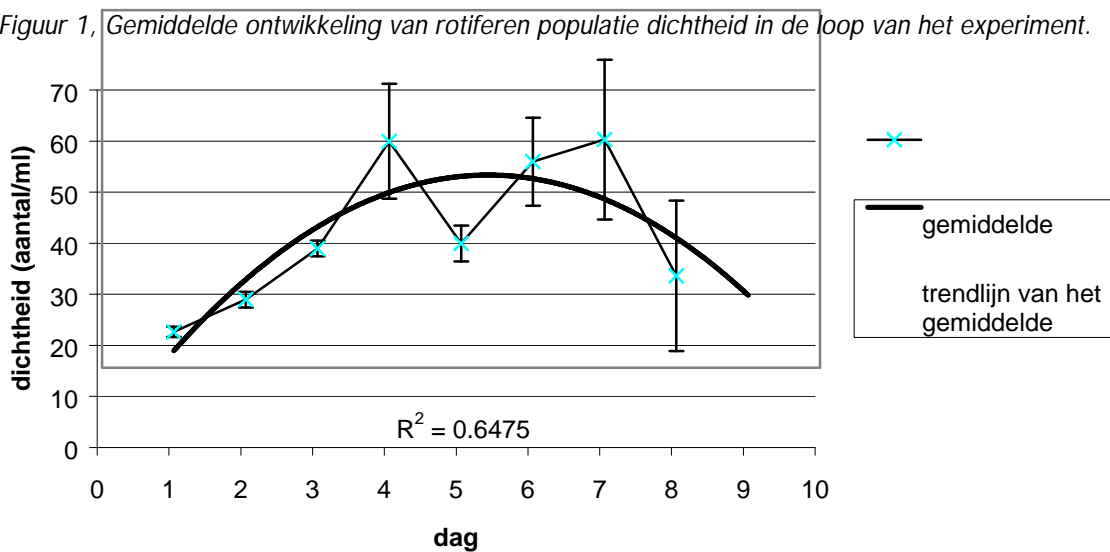
Figuur 10; Schematische werkwijze van een experiment om de toename van een rotiferen populatie te onderzoeken



4.3 Resultaten en discussie

In onderstaande figuur is de gemiddelde dichtheid van de drie duplo's uitgezet tegen de tijd. Tevens is de spreiding van de drie herhalingen weergegeven.

Figuur 1, Gemiddelde ontwikkeling van rotiferen populatie dichtheid in de loop van het experiment.



In bovenstaande figuur is de gemiddelde groei van de duplo's in de tijd weergegeven. De groei gedurende de eerste drie dagen, bedraagt gemiddeld 85% (100 % zou een dagelijkse verdubbeling zijn).

Wat van belang is voor de conclusie is dat de hoogst gehaalde dichtheid in dit experiment tegen de 60 ind/ml aan zit. Dit is relatief laag, gezien het feit dat volgens de literatuur dichtheden van ten minste 200-300 ind/ml gehaald kunnen worden (Shiri Harzevili, 1998).

4.4 discussie

De dip (dag 5) in de figuur, die bij alle herhalingen voorkomt, zou mogelijk ontstaan kunnen zijn door een weekend-voerbeurt die niet goed is uitgevoerd. *B.plicatilis* is gevoelig voor een tekort aan voer (Shiri Harzevili, 1998). De vermoedelijke reden waardoor bij dit experiment een lage maximum dichtheid is bereikt, kan te maken hebben met het feit dat de startconcentratie te laag is geweest om een hoge dichtheid te bereiken. Er is namelijk een bepaalde "kritische massa" noodzakelijk om een populatie van formaat te laten groeien. Deze grens ligt vanaf de 50 ind/ml. Hierdoor kan de waterkwaliteit goed genoeg blijven om de rotiferen tot een hogere dichtheid door te laten groeien (bijvoorbeeld 200 ind/ml). Indien met een lagere dichtheid wordt begonnen, duurt het langer voordat de populatie een dichtheid van 200 ind/ml heeft bereikt (50->100->200 gaat sneller dan 2 -> 4 -> 8). Dit gaat dan ten kosten van de waterkwaliteit waardoor er geen 200 ind/ml gehaald kan worden. Een andere mogelijke oorzaak van de populatie afname en lage maximale dichtheid kan zijn dat het voer van onvoldoende kwaliteit is. Doordat de gevoerde algen dood zijn zinken ze naar de bodem en slaan daar neer. Hierdoor zweven ze niet meer vrij rond in het water en zijn niet meer beschikbaar voor de rotiferen. Deze algen vormen een bron van waterverontreiniging omdat hier afbraakprocessen in ontstaan. In grootschalige hatchery's voor vislarven worden hoofdzakelijk levende algen gekweekt en gevoerd aan de rotiferen omdat deze niet neerslaan. Het is te betwijfelen of de gevoerde hoeveelheid genoeg is geweest doordat een mogelijk groot deel van het voer naar de bodem is gezonken en daardoor niet meer beschikbaar was voor de rotiferen.

4.5 Conclusie

- ~~///~~ Met een inzet van minder dan tien individuen per ml is in een batchcultuur een dichtheid, hoger dan 60 individuen, binnen dit experiment blijkbaar niet mogelijk geweest in. Indien er een hogere initiële dichtheid geweest zou zijn, was naar alle waarschijnlijkheid de maximaal gehaalde dichtheid hoger geweest dan 60 #/ml/
- ~~///~~ Naar alle waarschijnlijkheid heeft het overslaan van een voederbeurt negatieve effecten op de populatie.
- ~~///~~ Bij de vervolgprouven in dit experiment is het van belang dat de initiële dichtheid hoger moet zijn dan tien individuen per ml.
- ~~///~~ Het gebruikte voedsel lijkt ongeschikt ten opzichte van levende algen omdat dode algenconcentraten bezinken en daardoor niet meer beschikbaar zijn als voer en mogelijk de waterkwaliteit beïnvloeden

5 Test van massasysteem, voer en verrijking

5.1 Inleiding

Er zijn voor rotiferenteelt enkele instant producten op de markt. Onder andere algenconcentraten en poedermixen die aangemaakt moeten worden met water. Bij dit onderzoek is gebruik gemaakt van Nannochloropsis- en Tetraselmisconcentraat en Rotimacpoeder als voedselbron. Na de proef wordt er een vetzuuranalyse uitgevoerd om de geschiktheid van de rotiferen als voedselbron voor kabeljauwlarven te onderzoeken. Vetzuren zijn van belang voor de eerste ontwikkelingen van vislarven. Twee vetzuren zijn het belangrijkste: DHA en EPA. Deze zijn bijvoorbeeld van belang voor de ontwikkeling van pigmentatie.

5.2 Materiaal en methode

Systeempopzet

Aanvankelijk wordt er eerst gekweekt in 5 liter, gevoerd met om een hoge dichtheid te behouden. Vervolgens zal worden opgeschaald naar 40 liter.

Drie cilindroconische tanks zijn ieder gevuld met zeewater (25 promille) en rotiferen. De rotiferen zijn afkomstig uit dezelfde trechters maar zijn gespoeld en van schoon water voorzien. Het zeewater is afkomstig uit het recirculatiesysteem van het Rivo, (34.6 promille) en werd behandeld met actief kool en ultraviolet licht. Het water is gemengd met kraanwater met een verhouding van 2.7/1 (zeewater/kraanwater). De trechters zijn voor ingebruikname voor dit experiment geschrobd met Soda en 3x nagespoeld om mogelijk aanwezige cyliaten te doden. De trechters werden voorzien van een verwarmingselement van 300 watt en een regelbare thermostaat. De temperatuur werd ingesteld op 20 graden. Aanwezigheid van een directe lichtbron wordt gemeden. De tanks zijn voorzien van beluchting middels perslucht die via een 10mm pvc-buis in het systeem is aangebracht. De beluchting geeft ca 10 bellen per seconde. Het experiment had een looptijd van 16 Dagen.

Planning van productie

De behandeling van de proef is verdeeld in 2 stappen. Een kweek met klein volume (5 liter, gekweekt op algenconcentraten) en een kweek met groot volume (gekweekt op Rotimac).

Stap 1:

De trechters worden ingezet met 5 liter water en 250000 rotiferen. (25 ± 1 /ml)

Na inzet van de trechters werden de rotiferen dagelijks gevoerd met Nannochloropsis en tetraselmis concentraat. Er werd gevoerd tot het water lichtgroen gekleurd was, met een evengrote hoeveelheid druppels concentraat. Dit concentraat was afkomstig van Koraalenzo BV.

Nadat 200 rotiferen per ml was bereikt, werden de rotiferen geoogst, gespoeld en nieuw ingezet in dezelfde, nu schoongemaakte trechters met 40 liter water van bovenstaande kwaliteit.

Stap 2:

De rotiferen hadden na inzet in 40 liter een dichtheid van 25 stuks per ml. Gedurende de groeiperiode werden de rotiferen gevoerd met Rotimac, toegediend in de aangegeven dosering (0.5 gram/miljoen rotiferen). Nadat de 200 ind/ml is bereikt werden de rotiferen geoogst en gespoeld. Ze werden opnieuw ingezet en gedurende 3 uur lang verrijkt met Algamac. Het verrijken had als doel de rotiferen te voorzien van de juiste vetzuren. Hierna werden de rotiferen nogmaals geoogst. Een kwart van het totaalmonster werd weer ingezet in de trechters om door te kunnen groeien. De overige driekwart van het totaalmonster werd geconcentreerd en ingevroren voor een vetzuuranalyse.

Monstername

Om de dagelijkse dichtheid vast te kunnen stellen moest er dagelijks een monster worden genomen van de populatie. Dit werd uitgevoerd door per populatie 4 x een sample te nemen van 500 microliter met behulp van een automatische pipet. De samples werden gefixeerd door het toevoegen van 2 druppels 1:10 jodiummethanoloplossing en werden met behulp van een binoculair bekeken en geteld bij een vergroting van 25x. Van de genomen monsters werden ook het aantal aanwezige rotiferen-eieren geteld. Dit aantal werd vervolgens gedeeld door het aantal aanwezige rotiferen. Hierdoor kan de egg-ratio (e.r.) worden bepaald.

Berekeningen

De dichtheid per ml werd berekend door de volgende vergelijking: $C = \frac{S1, S2, S3, S4}{2}$

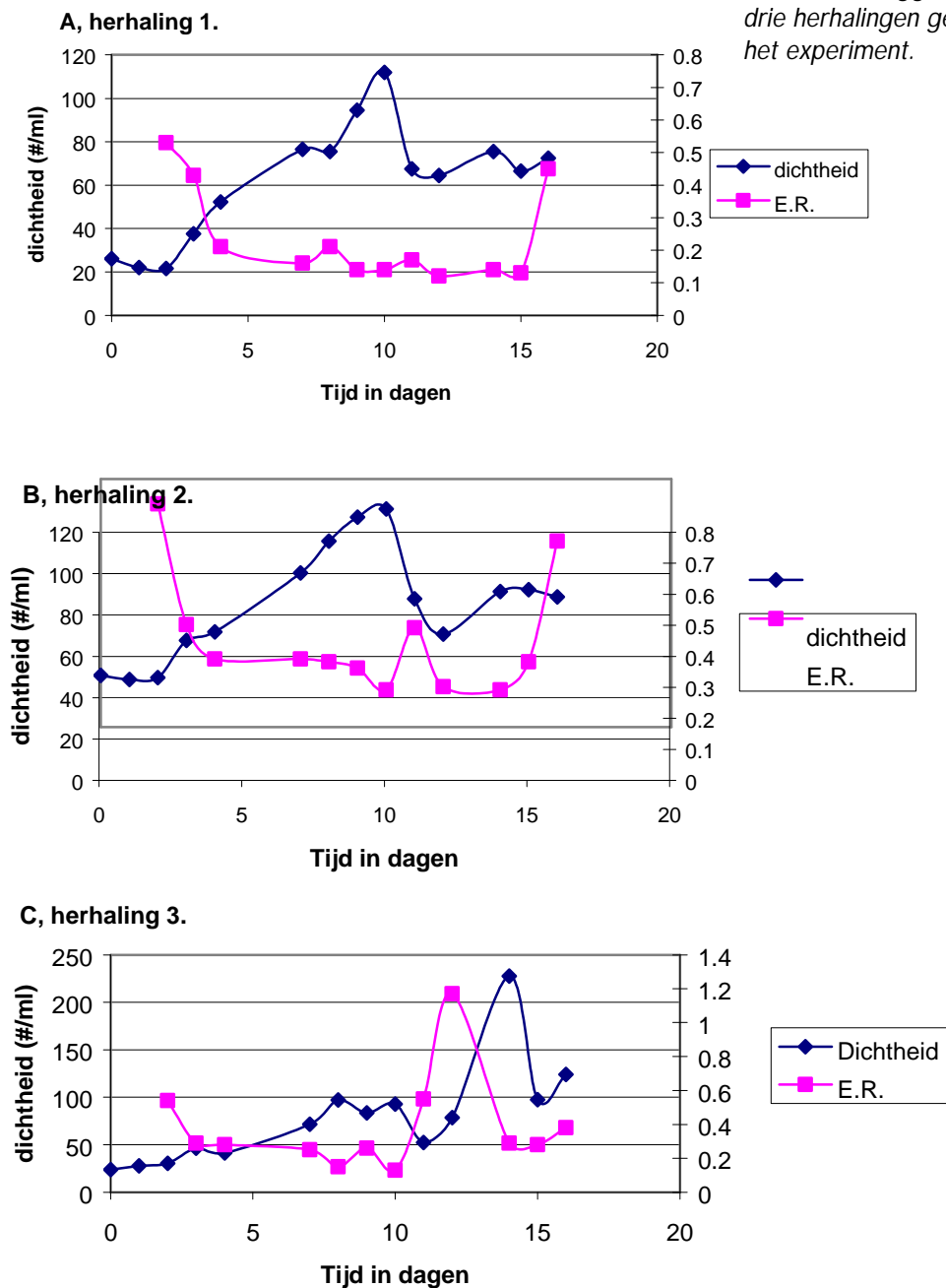
C is hier het aantal rotiferen per ml.

De egg-ratio wordt berekend door: $e.r. = \frac{(\#eieren1, \#eieren2, \#eieren3, \#eieren4) / 2}{C}$

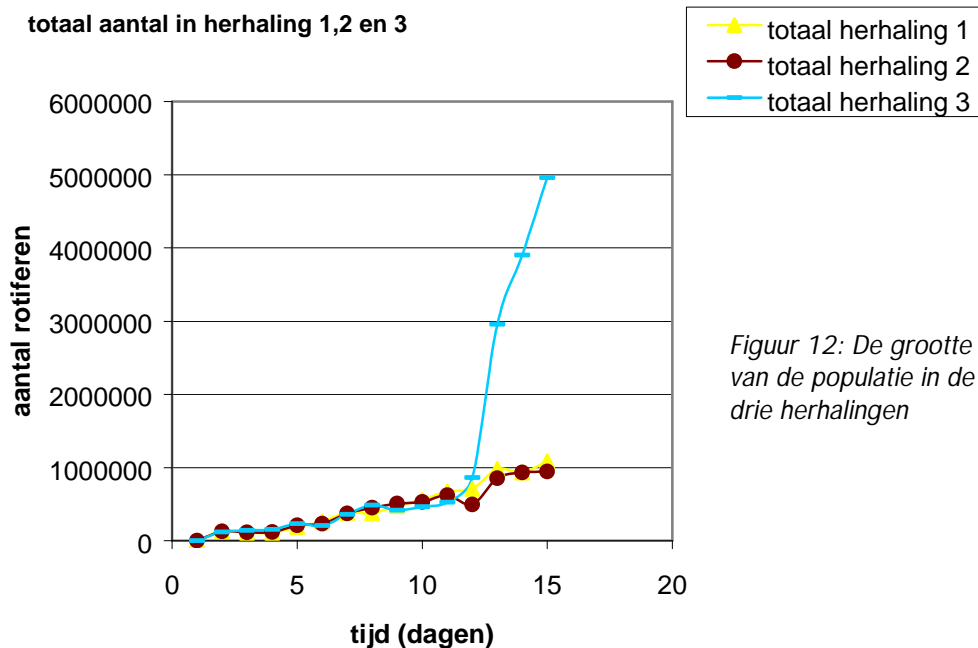
5.3 Resultaten

De groei van de 3 rotiferenpopulaties en de egg-ratio staat weergegeven in figuur 11A, 11B en 11C.

Figuur 11a,b en c: De dichtheid en egg-ratio van de drie herhalingen gedurende het experiment.



De bovenstaande grafieken zijn absoluut. Dit houdt in dat dit de werkelijk getelde aantallen zijn. In de loop van het experiment is water toegevoegd bij de herhalingen. Hierdoor is de concentratie afgenomen. De populaties groeien echter wel in de loop van het experiment. Figuur 12 illustreert dit.



Figuur 12: De grootte van de populatie in de drie herhalingen

In de loop van het experiment zijn levende algen gebruikt. Deze waren afkomstig van de RIVO vestiging in Yerseke, het Centrum voor Schelpdier Onderzoek (CSO). Het betrof hier een Tetraselmis-alg en een Pavlova-alg. Deze zijn vanaf dag 10 gevoerd aan herhaling 3 omdat deze ten tijde van dag 10 de laagste dichtheid had ten opzichte van de twee andere herhalingen. Doordat herhaling 3 dagelijks van een liter algen werd voorzien (500 ml. Tetraselmis en 500 ml. Pavlova) werden de andere herhalingen ook aangevuld met een liter water om zo de dichtheid met dezelfde factor te verdunnen. In tabel vier staat aangegeven hoeveel liter water er per dag in de trechters aanwezig was.

Dag\trechter	1	2	3
0	5	5	5
1	5	5	5
2	5	5	5
3	5	5	5
4	5	5	5
7	5	5	5
8	5	5	5
9	5	5	5
10	5	5	5
11	10	10	10
12	11	11	11
14	13	13	13
15	14	14	40
16	15	15	40

Tabel 4; Weergave van de inhoud van de trechter per herhaling. Dag 5,6 en 13 viel binnen een weekend en heeft daardoor geen waarnemingen

Door herhaling 3 te voeren met levende algen bleek dat dit een aanzienlijke toename in aantal te veroorzaken. In tabel 5 staat weergegeven wanneer waar met welk voer werd gevoerd.

Tabel 5; Weergave van het gevoerde voer per dag en per herhaling (Nan + Tet staat voor Nannochloropsis en Tetraselmis concentraat. Dr. Staat voor druppels).

Dag 5,6 en 13 viel binnen een weekend en heeft daardoor geen waarnemingen

Dag	Voedsel	Herhaling 1	Voedsel	Herhaling 2	Voedsel	Herhaling 3
		Hoeveelheid		Hoeveelheid		Hoeveelheid
0	Nan + Tet	5+5 dr.	Nan + Tet	5+5 dr.	Nan + Tet	5+5 dr.
1	Nan + Tet	5+5 dr.	Nan + Tet	5+5 dr.	Nan + Tet	5+5 dr.
2	Nan + Tet	6+6 dr.	Nan + Tet	6+6 dr.	Nan + Tet	6+6 dr.
3	Nan + Tet	6+6 dr.	Nan + Tet	6+6 dr.	Nan + Tet	6+6 dr.
4	Nan + Tet	7+7 dr.	Nan + Tet	7+7 dr.	Nan + Tet	7+7 dr.
7	Nan + Tet	7+7 dr.	Nan + Tet	7+7 dr.	Nan + Tet	7+7 dr.
8	Nan + Tet	8+8 dr.	Nan + Tet	8+8 dr.	Nan + Tet	8+8 dr.
9	Nan + Tet	8+8 dr.	Nan + Tet	8+8 dr.	Nan + Tet	8+8 dr.
10	Nan + Tet	9+9 dr.	Nan + Tet	9+9 dr.	Algen	2x 500 ml
11	Nan + Tet	9+9 dr.	Nan + Tet	9+9 dr.	Algen	2X 500 ml
12	Nan + Tet	10+10 dr.	Nan + Tet	10+10 dr.	Algen	2x 500 ml.
14	Algen	2x 500 ml	Algen	2x 500 ml	Rotimac	3 gram
15	Algen	2x 500 ml	Algen	2x 500 ml	Rotimac	4 gram
16	Algen	2x 500 ml	Algen	2x 500 ml	Rotimac	5 gram

Door de explosieve groei van herhaling drie (zie figuur 12) werd na vier dagen besloten herhaling 1 en 2 ook te voeren met levende algen.

5.4 Discussie

Door het gebruik van algenconcentraten is een lage groeisnelheid ontstaan. Hierdoor kwam de populatie niet tot hoge dichtheid en nam, vermoedelijk door verminderde waterkwaliteit, de egg-ratio af. Hierdoor werd duidelijk dat er geen tot weinig groei meer gerealiseerd kon worden.

De egg-ratio blijkt een management-tool te kunnen zijn voor het managen van rotiferen. Uit de egg-ratio kan worden afgeleid hoe de populatie gesteld is. Is de egg-ratio hoog(>0.3), dan is het goed gesteld met de populatie en vindt er een betekenisvolle groei plaats van ten minste twee eieren per dag op 10 rotiferen (natuurlijke mortaliteit bedraagt 0.1.). Wanneer de egg-ratio lager komt dan 0.3, gaat het minder goed met de populatie. Een egg-ratio van 0.1 is het teken dat, zonder ingrijpen, een populatie zal crashen.

Vermoedelijk is het gebruik van levende algen zeer positief voor het kweken van rotiferen in dit massasysteem. Het is echter zonder herhaling getest en geeft daarbij geen significant bewijs dat de conclusies van dit onderzoek op waarheid zijn gebaseerd.

De laatste drie dagen is herhaling 3 gevoerd met Rotimac. Volgens figuur 12 heeft dit positief effect op de groei van de populatie. Er is echter niet gespoeld tussen het voeren van algen en het voeren van Rotimac. Hierdoor is het mogelijk dat er bij de gevoerde Rotimac ook nog levende algen aanwezig zijn geweest. Hierdoor is het niet met zekerheid te zeggen of de groei op dag 15 en 16 puur veroorzaakt is door het voeren met Rotimac.

5.5 Conclusies

- ~~///~~ Het gebruik van algenconcentraten is mogelijk voor het kweken van rotiferen, maar is inefficiënt en niet aan te raden.

- ~~///~~ Levende algen leveren significant grotere populaties binnen vier dagen ten opzichte van algenconcentraten.

- ~~///~~ Het gebruik van Rotimac lijkt geschikt te zijn om rotiferen te kweken in een massacultuur.

6. Algemene discussie

In deze discussie zullen diverse zaken worden besproken die de uitkomsten van dit onderzoek beïnvloed kunnen hebben. Deze discussie zal er voor zorgen dat de conclusies in het juiste perspectief zullen worden gezien.

- ✍ Een belangrijk gegeven bij onderzoek naar de massacultuur is dat de rotiferenstam die aangeleverd is, besmet is geweest met cyliaten. Deze kleine organismen (rond de 20-40 μ) zijn voedselconcurrenten van rotiferen. Ze hebben een grotere reproductiesnelheid dan de rotiferen. Op deze manier kunnen de cyliaten woekeren. Cyliaten groeien vooral op een voedsel overschot en zijn dus vaak het gevolg van overvoeren. Het grote nadeel van niet-levend voedsel is dat het minder goed in suspensie blijft dan levende algen. Hierdoor bezinken de algen en vormt dit een voedselbron voor cyliaten en ander zooplankton. Rotiferen zijn daarentegen pelagische organismen. Ze zwemmen vrij rond in het water en komen daardoor eerder voedsel tekort doordat het voedsel naar de bodem zinkt. Dit heeft een vertraging opgeleverd in de groei van rotiferen.
- ✍ De keuze om een semi-continusysteem aan te schaffen is vermoedelijk goed geweest. Echt bewijs hiervoor is echter niet geleverd. Het systeem heeft niet in volle productie gedraaid doordat de groeisnelheid tegengevallen is door het gebruikte voedsel voor de rotiferen. Hierdoor is het feitelijk niet mogelijk geweest om een dichtheid te halen waarmee het systeem in bedrijf kon gaan. In een vervolgstudie kan verder worden onderzocht of dit wel lukt.
- ✍ Het verrijken van de rotiferen ten behoeve van een vetzuuranalyse is niet mogelijk geweest. Door tegenvallende groeieresultaten is de planning dusdanig opgerekt dat er geen tijd meer over was voor het laten uitvoeren van een vetzuuranalyse.

7. Algemene conclusie

Binnen dit hoofdstuk zullen de deelvragen uit hoofdstuk 1 worden teruggekoppeld.

- ~~///~~ Naar alle waarschijnlijkheid is het een goede keuze geweest voor het RIVO om een semicontinu-systeem te realiseren.
- ~~///~~ Het bleek de beste oplossing om gedeeltelijk het systeem aan te schaffen en gedeeltelijk zelf te bouwen.
- ~~///~~ Het is in theorie mogelijk om rotiferen in leven te houden en te laten groeien maar het is echter wel zo dat de bereikte groeisnelheden op algenconcentraten onvoldoende hoog waren om rotiferen efficiënt te kunnen kweken.
- ~~///~~ Op algenconcentraten kan geen hogere dichtheid dan ca 100 ind/ml worden bereikt.
- ~~///~~ Op Rotimac kan echter een beduidend hogere dichtheid van 130 ind/ml (en waarschijnlijk nog hoger) worden bereikt.
- ~~///~~ Het verrijken van rotiferen is binnen het tijdsbestek van dit onderzoek niet mogelijk geweest. Hierdoor is geen conclusie te verbinden aan het verrijken van rotiferen.

8. Literatuurlijst

- /// Asche, F. en R. Tveteras, nadere gegevens onbekend, 2002
- /// Dhert, P et al, Advancement of rotifer culture and manipulation techniques in Europe, Ghent, 2001
- /// Eijk, W van, persoonlijke communicatie, Rijswijk, 2003
- /// Europese Commissie, Het GVB gevat in getallen, basisgegevens over het gemeenschappelijk visserijbeleid, Luxemburg 2001
- /// James, C.M. and T.S Abu-rezeq. An intensive chemostat culture system for the Production of Rotifers for Aquaculture, Kuwait, 1989
- /// Kamstra, A, persoonlijke communicatie, IJmuiden 2003
- /// Laterveer, M en A. Alsemgeest, Werkvoorschrift voor het kweken van Raderdierjes, Rotterdam, 2002
- /// Lavens P & P. Sorgeloos, Manual on the Production and Use of Live Food for Aquaculture, FAO Rome, Ghent, 1996
- /// Rijsingen, J. van, persoonlijke communicatie, Helmond, 2003
- /// Schram, E, persoonlijke communicatie, IJmuiden, 2003
- /// Shiri Harzevili, A.R, Microbial control in the intensive culture of the marine rotifer *Brachionus plicatilis* and its possible application in aquaculture, Ghent, 1998
- /// Suantika G, et al, High density production of the rotifer *Brachionus plicatilis* in a recirculation system: Consideration of water quality, zootechnical and nutritional aspects, Ghent, 2000
- /// Vin, C de, Knelpunten Analyse Visteelt, van Glasaal tot Sectorgroei, Den Haag, 2003
- /// Zwieten, P.A.M. van, Kansen en bedreigingen voor aquacultuur in Nederland, Den Haag, 1998

Bijlage 1

Verantwoording naar rotiferen kweekhandleiding

Ter afsluiting van vier jaar opleiding Aquatische Ecotechnologie is 16 weken afstuderen. Voor het afstuderen is in dit geval onderzoek gedaan naar het kweken van rotiferen op basis van instant-voedsel.

De verslaglegging van deze stage is opgesplitst in twee delen. Enerzijds het afstudeerverslag waarin is beschreven hoe het onderzoek naar het kweken van rotiferen op instant voedsel is beschreven. Dit document is geschreven voor de beoordeling door de Hogeschool Zeeland.

Anderzijds is er een kweekhandleiding geschreven voor het RIVO waarin alle kweekervaring die is opgedaan tijdens deze afstudeerperiode is vastgelegd. Dit document moet vooral bruikbaar zijn om op het RIVO rotiferen te kweken. Het is in de vorm van een planning die duidelijk weergeeft wat wanneer en waar gedaan moet worden. Deze planning heeft betrekking op het houden van een stockcultuur, tussencultuur en massacultuur en is ook voorzien van een planning voor het kweken van levende algen.