Wageningen IMARES
Institute for Marine Resources & Ecosystem Studies

Vestiging IJmuiden
Postbus 68
1970 AB IJmuiden
Tel.: 0255 564646
Fax: 0255 564644

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

Vestiging Den Helder
Postbus 57
1780 AB Den Helder
Tel.: 0223 63 88 00
Fax: 0223 63 06 87

Vestiging Texel
Postbus 167
1790 AD Den Burg Texel
Tel.: 0222 369700
Fax: 0222 319235

Internet: www.wageningenimares.wur.nl
E-mail: imares@wur.nl

Rapport
Nummer: 07.008
4 juni 2007

Onderzoek naar een optimaal algendieet voor kunstmatig gekweekte mossellarven (*Mytilus edulis*)

Evelien Marteijn

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

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

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

Voorwoord

Als afronding van de opleiding Aquatische Ecotechnologie aan de Hogeschool Zeeland worden er in het laatste jaar alleen nog stages gevolgd. De afstudeerstage is de laatste opdracht waarmee je de opleiding afrond. Deze stage is gericht op het zelfstandig uitvoeren van een project of opdracht binnen een professionele werkomgeving. Er wordt een verslag gemaakt van de resultaten gevolgd door een presentatie en verdediging van de inhoud. Met behulp van de afstudeerstage is het mogelijk om vakkennis te verbreden en te verdiepen.

Het onderzoek is uitgevoerd door Evelien Marteijn, 4e jaars studente Aquatische Ecotechnologie aan de Hogeschool Zeeland. Mijn afstudeerstage van 5 maanden heb ik gevolgd bij Wageningen IMARES (Institute for Marine Resources & Ecosystem Studies) te Yerseke. Tijdens de afstudeerstage heb ik me voornamelijk gericht op het kunstmatig kweken van mosselen (larvale stadium) en het onderhouden van algencultures.

Het rapport: 'Onderzoek naar een optimaal algendieet voor kunstmatig gekweekte mossellarven (*Mytilus edulis*)' is geschreven in opdracht van Wageningen IMARES. Het onderzoek is een onderdeel van het Europese BLUE SEED project waarbij Wageningen IMARES onderzoek doet naar het kunstmatig kweken van mosselen. Dankzij Wageningen IMARES heb ik de mogelijkheid gekregen om zelfstandig onderzoek te doen en met de juiste begeleiding heb ik mijn steentje kunnen bijdragen aan het BLUE SEED project.

Ik wil Pauline Kamermans bedanken omdat zij het mogelijk heeft gemaakt dat ik kon afstuderen bij Wageningen IMARES en voor de juiste begeleiding tijdens het uitvoeren van het onderzoek. Ik vond het erg leuk en leerzaam om zelfstandig dit onderzoek op te stellen en uit te voeren. Ook wil ik Ainhoa Blanco bedanken voor alle hulp en adviezen. We hebben samen de mosselen laten paaien en metingen verricht aan mossellarven en algen. Verder wil ik alle medewerkers van IMARES Yerseke bedanken voor de prettige samenwerking. Het is fijn om op deze manier ontvangen te worden bij een bedrijf! Als laatste wil ik de heer Piet Elenbaas bedanken voor zijn inzet en begeleiding vanuit de opleiding Aquatische Ecotechnologie.

Evelien Marteijn

4 juni 2007

Inhoudsopgave

Voorwoord 2

Inhoudsopgave 3

Samenvatting 5

Summary 7

1. Inleiding 9

1.1 Achtergrond 9

1.2 Project 9

1.3 Probleemstelling & doelstelling 10

1.4 Onderzoeksvragen 11

1.5 Opdrachtformulering 12

1.6 Leeswijzer 12

2. Literatuurstudie 13

2.1 Methode 13

2.2 Mossellarven (*Mytilus edulis*) algemeen 13
2.2.1 Paaien van mosselen in de natuur 13
2.2.2 De bevruchting (ontstaan van mossellarven) 13
2.2.3 Groei van mossellarven 14
2.2.4 Metamorfose van mossellarven 14
2.2.5 Settelen van mossellarven 15

2.3 Voedselaanbod voor mossellarven 15
2.3.1 Voedselaanbod voor mossellarven in het wild 15
2.3.2 Voedselaanbod voor mossellarven in een mosselhatchery 15

2.4 Factoren die de groei en overleving beïnvloeden van mossellarven 15
2.4.1 Invloed ouderdieren op mossellarven 15
2.4.2 Invloed van abiotische omgevingsfactoren op mossellarven 15
2.4.3 Invloed van biotische omgevingsfactoren op mossellarven 15
2.4.4 Overleving van mossellarven 15

2.5 Kunstmatig kweken van bivalven 15
2.5.1 Hatchery/nursery mosselen (*Mytilus edulis*) 15
2.5.2 Hatchery/nursery andere bivalven 15
2.5.3 Voor- en nadelen kweek hatchery/nursery van mosselen 15
2.5.4 Mogelijkheden voor kweek van mosselen (*Mytilus edulis*) 15

3. Methode & materialen 15

3.1 Voorbereiding op de experimenten 15
3.1.1 Opzetten en onderhouden algenkweek: 15
3.1.2 Bepalen algendichtheden: 15
3.1.3 Opstelling: 15
3.1.4 Ouderdieren conditioneren: 15
3.1.5 Mosselen laten paaien en de bevruchting: 15

3.2 Uitvoering experimenten 15
3.2.1 Verdeling mossellarven: 15
3.2.2 Voeren van de larven 15
3.2.3 Verversen van de larven: 15
3.2.4 Overleving en lengte mossellarven 15
3.2.5 Waarnemingen en statistische analyse: 15

4. Resultaten 15

4.1 Experiment 1: Combinatie van algensoorten 15
4.1.1 Groeisnelheid 15
4.1.2 Overleving 15

4.2 Experiment 2 15
4.2.1 Groeisnelheid 15
4.2.2 Overleving 15

5. Discussie 15

6. Conclusie 15

7. Aanbevelingen 15

8. Verklarende woordenlijst 15

9. Verwijzingen 15

Bijlage 1: Algemeen literatuuronderzoek 15

Bijlage 2: Protocol bevruchting 15

Bijlage 3: Algentelling 15

Bijlage 4: Formules 15

Bijlage 5: Statistische analyse experiment 1 15

Bijlage 6: Statistische analyse experiment 2 15

Bijlage 7: Methode van algenkweek in plastic zakken 15

Samenvatting

De traditionele Nederlandse mosselkweek is in 1825 ontstaan en bestaat voornamelijk uit bodemcultuur en voor een klein deel uit hangcultuur. Voor de bodemcultuur wordt het mosselzaad opgevist uit de Waddenzee en uitgezaaid op mosselpercelen in de Waddenzee en de Oosterschelde. De overheid heeft quota opgesteld omdat bij het opvissen van het mosselzaad de natuur mogelijk aangetast wordt. Verder zijn er sterke fluctuaties in het aanbod van mosselzaad en moet er rekening gehouden worden met de Vogel- en Habitat richtlijnen (voedselvoorziening voor vogels). Om het tekort aan grondstof (mosselzaad) aan te vullen zijn innovaties op het gebied van zaadvoorziening nodig.

Om het tekort aan mosselzaad aan te vullen hebben de mosselvissers zaad geïmporteerd uit lerland en zijn er MZI's (mosselzaadinvanginstallaties) uitgehangen. Een MZI wordt gevormd door substraat dat in het water gehangen wordt zodat de larven tijdens de natuurlijke broedval aan het substraat hechten. Een andere oplossing om het tekort aan te vullen is het kunstmatig kweken van mosselen in een hatchery (broedhuis) en nursery (kinderkamer). Het BLUE SEED project (www.blueseedproject.com) is een Europees project dat onderzoek doet naar het ontwikkelen van een mosselhatchery/nursery. In een hatchery/nursery worden de ouderdieren geconditioneerd en door middel van een temperatuurshock aangezet tot paaien. De eicellen worden onder gecontroleerde omstandigheden bevrucht. De larven die ontstaan worden opgekweekt tot mosselbroed en uiteindelijk tot mosselzaad. Het kunstmatig gekweekte zaad zal onafhankelijk van de tijd van het jaar geleverd kunnen worden

Het voedselaanbod voor mossellarven bestaat uit fytoplankton, namelijk flagellaten en diatomeeën. Een combinatie van diatomeeën en flagellaten levert een hogere groeisnelheid op dan het voedselaanbod van één soort algen. Het doel van een hatchery is een hoge groeisnelheid met een hoog overlevingspercentage te bereiken. Het onderling vergelijken van verschillende algensoorten en algenconcentraties laat zien welk algendieet optimaal is voor het opkweken van mossellarven. Uit experimenten van het BLUE SEED project is gebleken dat bij het voeren van de algencombinaties bestaande uit de flagellaten *Isochrysis galbana* of *Pavlova lutheri,* en de diatomeeën *Chaetoceros calcitrans* of *Chaetoceros gracilis* een optimaal dieet samengesteld kan worden.

Het eerste experiment was gericht op het onderzoeken van de optimale combinatie van algensoorten. Het experiment is uitgevoerd met een verhouding 1:1 tussen flagellaten en diatomeeën. De statistische analyse wijst uit dat er een significant verschil bestaat tussen de behandelingen *Chaetoceros gracilis* + een flagellaat en *Chaetoceros calcitrans* + een flagellaat ($p<0,01$). Er is geen significant verschil tussen de behandelingen *Pavlova + Chaetoceros calcitrans* en *Isochrysis + Chaetoceros calcitrans* ($p=0,841$). De mossellarven zijn bij alle behandelingen in schelplengte toegenomen. De larven die geen algen kregen hadden zich niet verder ontwikkeld dan een D-larve maar hadden het experiment wel overleefd. Uit de statistische analyse blijkt dat er geen significant verschil bestaat tussen de overleving van alle behandelingen ($p=1$). Dit houdt in dat het overlevingspercentage bij alle behandelingen ongeveer gelijk is. De overleving nam bij alle behandelingen af wanneer de larven in lengte toenamen en ouder werden.

Experiment 2 was ingezet met de algencombinatie *Pavlova + Chaetoceros calcitrans*. Uit experiment 1 was gebleken dat de combinatie van *Pavlova* of *Isochrysis* met *Chaetoceros calcitrans* optimaal was voor de groei van mossellarven. De algencultuur van *Pavlova* was op het moment van experiment 2 van betere kwaliteit dan *Isochrysis*. Daarom was er gekozen om *Pavlova* als flagellaat te gebruiken.

Experiment 2 richtte zich op het behalen van de optimale groeisnelheid door verschillende algenconcentraties te testen. Uit de statistische analyse blijkt dat behandelingen 1,2,3 en4 (begin 25.000 of 50.000 – eind 25.000 t/m 200.000) significant verschillen met behandeling 5 (begin 50.000- eind 400.000 cellen/ml) en behandeling 6 (begin 100.000- eind 800.000

cellen/ml) ($p<0,017$). De larven van alle behandelingen waren nog in het veliger stadium, hadden de vorm van een D-larve en hadden nog geen oogvlek of voet ontwikkeld. Ondanks de lage groeisnelheid bij de larven van experiment 2, vergeleken met experiment 1, was de overleving nagenoeg gelijk. Uit de statistische analyse blijkt dat er geen significant verschil bestaat tussen de overleving van alle behandeling ($p>0,632$). Ook bij dit experiment is de overleving bij alle behandelingen nagenoeg gelijk. Doordat de kwaliteit van de algencultuur sterk achteruit ging is er besloten om het experiment voortijdig af te breken.

Uit de experimenten is gebleken dat mossellarven (*Mytilus edulis*) een optimale groei hebben bij het algendieet *Isochrysis* of *Pavlova* in combinatie met *Chaetoceros calcitrans* en een algenconcentratie van 25.000 cellen/ml per dag. De optimale groeisnelheid die gemeten is, bedraagt 9,4 µm/dag bij een temperatuur van 17 ^{0}C.

Summary

The traditional Dutch mussel industry started in 1825. The greatest part of this industry exist as bottom culture and a small part as off bottom culture (rope culture). In case of the bottom mussel culture mussel seed is dredged in the Wadden Sea and spread out on culture plots in the Oosterschelde and the Wadden Sea. There is not enough mussel seed available to comply the demand. The Dutch government decreased the fishing quota for mussel seed because of the possible damage on nature during the fishing on the mussel seed. The mussel seed supply fluctuates every year and the fisherman's have to considerate the Bird- and Habitat directive (food supply for birds). To fill this shortness, a lot of innovations in the area of seed supply are needed.

One of the innovations to increase to demand the seed supply is the MZI (mussel seed catch installation). The principle behind this technique is to let the wild larvae settle down on objects. Another possible solution is to import Irish mussels into the Dutch waters. The latest technique is to breed seed in a hatchery/nursery. The BLUE SEED project (www.blueseedproject.com) is an European project which investigates the development of a mussel hatchery/nursery. The parental mussels are conditioned so they develop gonads. It is possible to let them spawn by lowering or rising the water temperature. The breeding of mussel seed in a hatchery/nursery is independent of season and year.

The food supply for mussel larvae consist of phytoplankton, namely flagellates and diatoms. The combination between flagellates and diatoms gives a higher growth rate than the feeding of one species of algae. The goal of a mussel hatchery is a high growth rate with a high survival for the larvae. The mussel larvae need an optimal algae diet with different algae species and different algae concentrations. It appears from experiments from the BLUE SEED project that the algae combination of flagellates *Isochrysis galbana* or *Pavlova lutheri,* and the diatoms *Chaetoceros calcitrans* or *Chaetoceros gracilis* has a high growth rate.

The first experiment examines the combination of different algae species for a optimum growth rate. The experiment is carried out with a ratio of 1:1 between flagellates and diatoms. A statistical analysis showed a significant difference between the treatment *Chaetoceros gracilis* + flagellate and *Chaetoceros calcitrans* + flagellate ($p<0,01$). There was no significant difference between the treatments *Pavlova + Chaetoceros calcitrans* and *Isochrysis + Chaetoceros calcitrans* ($p=0,841$). The larvae of all treatments had an increased shell length. The larvae which were not fed did not develop beyond the D-shape, but they survived the experiment. The statistical analysis proved no significant difference for surviving between the treatments ($p=1$). This means that the survival of the treatments was almost the same. The survival of the larvae decreased when they grew and got older.

The optimum algae diet for mussel larvae exist of *Pavlova* or *Isochrysis* with *Chaetoceros calcitrans*. At the beginning of experiment 2 the flagellate *Isochrysis* was in bad condition so we have used *Pavlova.* The second experiment was started with the algae combination of *Pavlova + Chaetoceros calcitrans*.

Experiment 2 examined an optimum growth rate because of different algae concentrations of the algae species *Pavlova + Chaetoceros calcitrans*. The statistical analysis provided a significant difference ($p<0,017$) between the treatments 1,2,3 and 4 (begin 25.000 or 50.000 - end 25.000 till 200.000 cells/ml) and 5 (begin 50.000- end 400.000 cells/ml) and 6 (begin 100.000- end 800.000 cells/ml). The larvae from all treatments were in the veliger stadium, were D-shaped and had not developed an eye spot or foot. The survival of larvae was almost the same as in experiment 1. The statistical analysis provided no significant difference between the 6 treatments ($p>0,632$). Survival between the treatments was almost the same as experiment 1. Because of the decreasing quality of algae we decided tot quit the experiment.

The mussel larvae (*Mytilus edulis*) had an optimum growth rate of 9,4 µm/day with a temperature of 17 ^{0}C when they were fed with the algae diet of *Isochrysis* of *Pavlova* with *Chaetoceros calcitrans* and an algae concentration of 25.000 cells/ml/day.

1. Inleiding

1.1 Achtergrond

De hedendaagse mosselkweek is in 1825 ontstaan. De traditionele Nederlandse mosselkweek bestaat voor een groot deel uit bodemcultuur en een klein deel hangcultuur. Het mosselzaad[1] wordt opgevist uit de Waddenzee en uitgezaaid op mosselpercelen, voornamelijk in de Waddenzee. Sinds 1870 worden de mosselpercelen verpacht door de overheid. De kwaliteit van het perceel wordt bepaald door het voedselaanbod, de bodemgesteldheid, de aanwezigheid van predatoren en de stroming. Het mosselzaad worden uitgezaaid op percelen in de Oosterschelde en de Waddenzee om verder uit te groeien tot consumptiemosselen. In de Waddenzee is een groot voedselaanbod wat nodig is voor de groei van mosselzaad. In de Oosterschelde is de kans op stormschade kleiner.

Tegenwoordig kan er niet meer onbeperkt op mosselzaad gevist worden. De overheid heeft beperkingen opgelegd omdat bij het opvissen van het mosselzaad de natuur waarschijnlijk aangetast wordt. Bij het gebruik van korren wordt de bodem omgewoeld waardoor bodemorganismen mogelijk verstoord worden. Door de natuurlijke fluctuaties in de Waddenzee is het aanbod van mosselzaad niet ieder jaar hetzelfde. Hierdoor mogen de mosselvissers niet ieder jaar dezelfde hoeveelheid mosselzaad opvissen omdat er genoeg zaad over moet blijven voor de vogels. Door quota[2] op te stellen wordt er rekening gehouden met de Vogel- en Habitat richtlijnen. De quota zijn opgesteld door het Ministerie van LNV (Landbouw, Natuur en Voedselkwaliteit). Doordat de vraag naar mosselen groot blijft, is de beperking op het vangen van wild mosselzaad door de overheid een groot probleem voor de mosselkwekers. De vraag naar consumptierijke mosselen is groter dan het aanbod. Als gevolg hiervan zijn de mosselvissers opzoek naar oplossingen om het te kort aan mosselzaad aan te vullen. Op dit moment wordt er mosselzaad geïmporteerd uit Ierland. Het gevaar is dat er exoten[3], in de vorm van uitheemse organismen die zich op de mosselen bevinden, worden verspreid.

Er zijn de laatste tijd vele ontwikkelingen geweest op het gebied van Aquacultuur, specifiek in de schelpdierensector. Aquacultuur is met 9% groei per jaar dan ook de snelst groeiende primaire voedselproductie. Om het tekort aan mosselzaad op de langere termijn aan te vullen zijn er innovaties nodig op het gebied van zaadvoorziening. Dit wordt gedaan door middel van een MZI[4] (mosselzaad-invanginstallatie). Een MZI bestaat uit netten of ander substraat[5] waarop de mossellarven tijden de natuurlijke broedval[6] kunnen settelen[7]. De MZI's worden in de Noordzee, Oosterschelde en Waddenzee uitgehangen. Een andere recente innovatie is de ontwikkeling betreffende het kunstmatig kweken van mosselen in een hatchery[8]/nursery[9]. Het kweken van schelpdierzaad op het land (in een hatchery/nursery) wordt al gedaan voor andere schelpdiersoorten zoals de oester. Het kunstmatig kweken van mosselzaad in een broedhuis is nieuw en daarom zijn er verschillende onderzoeken noodzakelijk. Het kweken van mosselzaad moet zo geoptimaliseerd worden dat er kwalitatief goed zaad ontstaat dat zich kan meten met het wild gevangen mosselzaad. Ook moet er in het voedselaanbod in de vorm van algen worden voorzien door algenkweken op te zetten.

1.2 Project

Het onderzoek is uitgevoerd door Evelien Marteijn, 4e jaars studente Aquatische Ecotechnologie aan de Hogeschool Zeeland. Het onderzoek vormt een afstudeeropdracht en wordt gedaan bij Wageningen IMARES (Institute for Marine Resources & Ecosystem Studies).

De opdrachtgever is Wageningen IMARES. Wageningen Wageningen IMARES richt zich op strategisch en toegepast marien ecologisch onderzoek. Het instituut is medio 2006 opgericht en is samengesteld uit het RIVO, onderdelen van Alterra en de afdeling Ecologische Risico's van

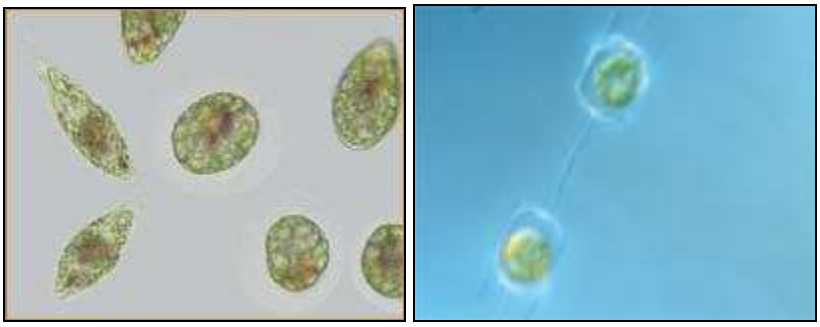
TNO. De afdeling Aquacultuur houdt zich hoofdzakelijk bezig met gezonde, veilige en diervriendelijke aquacultuur in een gezonde omgeving, het ontwikkelen van vormen van (extensieve) aquacultuur waarmee ook natuurwaarden kunnen worden versterkt en primaire proces technologie m.b.t. kweektechnieken (www.wageningenimares.wur.nl).

Het onderzoek vormt een onderdeel van het BLUE SEED project, een Europees project dat zich richt op de ontwikkelingen van mosselhatcheries (www.blueseedproject.com). Het doel van het BLUE SEED project is het opzetten van een goed functionerende hatchery/nursery. Het zaad dat hiervan afkomstig is zorgt voor een aanvulling van het natuurlijke mosselzaad. Het kunstmatig gekweekte zaad zal onafhankelijk van de tijd van het jaar geleverd kunnen worden.

1.3 Probleemstelling & doelstelling

Het grootste probleem van de mosselkweek in een hatchery/nursery is het voorzien in voedselaanbod. De voedselbehoefte van mossellarven is anders dan de voedselbehoefte van mosselbroed[10] en mosselzaad. Doordat larven kleiner van formaat zijn kunnen ze alleen de kleinere soorten algen opnemen. De hoeveelheid algen die gevoerd wordt is bepalend voor de groeisnelheid en de overleving van de mossellarven. Bij een tekort aan voedsel groeien de larven niet optimaal. Bij een overschot aan voedsel vermindert de groei waarschijnlijk ook doordat er mogelijk inefficiënte opname van algen plaatsvindt. Waarschijnlijk zal eenzijdig voedsel, bestaande uit één algensoort, niet optimaal zijn. Dit is al aangetoond voor oesterlarven (Ponis & Robert, 2006). Een combinatie van verschillende soorten algen zal een hogere groeisnelheid opleveren (Lang & Millican, 1986).

Het voedselaanbod voor mossellarven bestaat uit fytoplankton[11]. Er komen voornamelijk twee groepen fytoplankton voor in zoutwater, namelijk de flagellaten[12] en de diatomeeën[13] (fig. 1.1). De flagellaten bezitten zweepharen, zwemmen vrij rond in het water en zijn kleiner dan diatomeeën. De diatomeeën (kiezelwieren) hebben een skeletje van kiezelzuur waardoor ze sneller bezinken dan flagellaten.



Figuur 1.1: Voorbeeld van flagellaten (links) en diatomeeën (rechts).

Het doel van dit onderzoek is om een zo optimaal mogelijk algendieet samen te stellen voor mossellarven in een hatchery. Dit onderzoek is nodig omdat er verschillende soorten algen gevoerd kunnen worden en er onduidelijkheden bestaan over de juiste hoeveelheid voer die mossellarven nodig hebben. Dit onderzoek spitst zich voornamelijk op de combinatie van verschillende algensoorten en de algendichtheid. De algensoorten die gebruikt worden voor dit onderzoek zijn de flagellaten *Isochrysis galbana* en *Pavlova lutheri,* en de diatomeeën *Chaetoceros calcitrans* en *Chaetoceros gracilis.*

Om een goed beeld te krijgen van de groeisnelheid en de overleving van de mossellarven moet er gemonitord worden. De monitoring bestaat uit het volgen van de groei en de overleving van de mossellarven met verschillende schelplengtes. Door verschillende dichtheden van algen en combinaties van algensoorten te voeren kan het optimale algendieet bepaald worden voor de mossellarven van verschillende leeftijden. De voedselbehoefte van mossellarven zal waarschijnlijk afhankelijk zijn van de leeftijd. Dit is al aangetoond voor oesterlarven (Ponis & Robert, 2006).

De conclusie van de experimenten zal bestaan uit een overzicht van de optimale algendiëten voor mossellarven van verschillende leeftijden. Het optimale algendieet zorgt voor een goede groei en hoge overleving van de mossellarven.

1.4 Onderzoeksvragen

Wat is het algendieet, d.w.z. welke combinatie van algensoorten en de algendichtheid, van de algensoorten *Isochrysis galbana, Pavlova lutheri, Chaetoceros calcitrans* en *Chaetoceros gracilis* voor een optimale groei en overleving van mossellarven (*Mytilus edulis*) van verschillende leeftijden binnen een hatchery?

Experiment 1:
Welke combinatie van flagellaten en diatomeeën van de algensoorten *Isochrysis galbana, Pavlova lutheri, Chaetoceros calcitrans* en *Chaetoceros gracilis* vormt een optimaal dieet voor de groei en overleving van mossellarven van verschillende leeftijden?

- ✓ Bestaat er een significant verschil in toename van schelplengte tussen de mossellarven die gevoerd worden met de flagellaat *Pavlova lutheri* of *Isochrysis galbana*?
- ✓ Bestaat er een significant verschil in mortaliteit/overleving (geboorte – sterfte = overleving) van mossellarven die gevoerd worden met de flagellaat *Pavlova lutheri* of *Isochrysis galbana*?

- ✓ Bestaat er een significant verschil in toename in schelplengte van de mossellarven die gevoerd worden met de diatomeeën *Chaetoceros calcitrans* of *Chaetoceros gracilis*?
- ✓ Bestaat er een significant verschil in mortaliteit/overleving (geboorte – sterfte = overleving) van mossellarven die gevoerd worden met de diatomeeën *Chaetoceros calcitrans* of *Chaetoceros gracilis*?

- ✓ Is er een significant verschil in toename van schelplengte en mortaliteit tussen de mossellarven die een algendieet krijgen en mossellarven die als controle (blanco) geen voer krijgen?

Experiment 2:
Welke algendichtheid (cellen/ml) van de beste combinatie van algensoorten uit experiment 1 (*Isochrysis galbana* of *Pavlova lutheri* en *Chaetoceros calcitrans* of *Chaetoceros gracilis*) vormt een optimaal algendieet voor de groei en overleving van mossellarven van verschillende leeftijden?

- ✓ Neemt de voedselbehoefte van mossellarven toe naarmate mossellarven ouder worden en in omvang toenemen (bij toename van schelplengte)?
- ✓ Is er een significant verschil tussen de toename van schelplengte en de mortaliteit/overleving van mossellarven die met de referentie van 25.000 cellen/ml gevoerd worden en de andere concentratie cellen/ml?
- ✓ Wat is de optimale algenconcentratie in het medium voor mossellarven die net ontstaan zijn?
- ✓ Wat is de optimale algenconcentratie voor mossellarven die een voet gaan vormen en willen settelen?
- ✓ Zijn er negatieve gevolgen van het toedienen van een te hoge algenconcentratie aan mossellarven?

1.5 Opdrachtformulering

Om de hoofdvraag te kunnen beantwoorden is er een onderzoek ontwikkeld dat bestaat uit twee experimenten. Experiment 1 beantwoordt de vraag welke combinatie van de bovengenoemde algen voor de beste groei van mossellarven zorgt. Met de beste algencombinatie uit experiment 1 wordt experiment 2 ingezet. Bij experiment 2 worden de mossellarven met verschillende algendichtheden gevoerd. Met beide experimenten wordt het kweekproces tot het settelen van de mossellarve gevolgd. Het proces bestaat uit het voortplanten van de mosselen, het opkweken van de mossellarven tot mosselbroed en het voeren van algen aan de mossellarven. Van dit onderzoek wordt een verslag gemaakt waarin de deelvragen (en daarmee de probleemstellingen) worden beantwoord.

Opdracht:
Onderzoek welk algendieet, bestaande uit een combinatie van algensoorten en verschillende algendichtheden, van de algensoorten *Isochrysis galbana, Pavlova lutheri, Chaetoceros calcitrans* en *Chaetoceros gracilis* resulteert in een optimale groei van schelplengte en overleving van mossellarven (*Mytilus edulis*) van verschillende leeftijden binnen een hatchery.

1.6 Leeswijzer

Dit rapport is geschreven om een duidelijk beeld te geven van het onderzoek dat gedaan is. Hoofdstuk 2 bestaat uit de inhoudelijke oriëntatie. Voorafgaande aan het onderzoek is een literatuurstudie gedaan naar de voedselbehoefte van mossellarven (en andere schelpdieren). Aan de hand van deze informatie zijn experimenten opgesteld. Hoofdstuk 3 beschrijft de methode & materialen. Er wordt uitgelegd hoe het experiment is voorbereid en hoe de metingen gedaan zijn. Dit alles met bijbehorende materialen. De resultaten van experiment 1 en 2 worden beschreven in hoofdstuk 4. Dit hoofdstuk wordt gevolgd door een discussie (hoofdstuk 5), een conclusie (hoofdstuk 6) en de aanbevelingen (hoofdstuk 7). In hoofdstuk 8 is een verklarende woordenlijst opgenomen. Het laatste hoofdstuk (hoofdstuk 9) betreft de verwijzingen naar literatuur. Daaropvolgend staan de bijlagen vermeld.

2. Literatuurstudie

Dit rapport is geschrevene in het kader van de studie Aquatische ecotechnologie. Het is daarom van belang om ook de maatschappelijk relevantie van dit onderzoek te vermelden. Dit wordt gedaan aan de hand van de literatuurstudie. Zo wordt er een vergelijking tussen kunstmatig kweken en de hedendaagse mosselvisserij gemaakt. Verder gaat de literatuurstudie voornamelijk in op het larvale stadium van kunstmatig gekweekte mosselen.

2.1 Methode

Voor de literatuurstudie is gebruik gemaakt van diverse artikelen van Wageningen Universiteit (WUR). Deze artikelen zijn te vinden op de site http//:libary.wur.nl . Verder zijn er boeken van de bibliotheek van IMARES Yerseke en eerder gemaakte rapporten geraadpleegd. Een klein deel van de informatie is afkomstig van internet, waarvoor de zoekmachine www.google.nl is gebruikt.

De informatie die gebruikt is voor dit rapport gaat hoofdzakelijk over de hatchery. Het algemene literatuuronderzoek is al eerder gedaan en is te vinden in bijlage 1. Er is informatie gezocht over mossellarven in hun natuurlijke habitat. Vervolgens is er informatie gezocht over eerder gedane onderzoeken naar mossellarven, hatchery/nursery van mosselen en andere bivalven[14] en naar verschillende algensoorten en concentraties die gevoerd worden.

2.2 Mossellarven (*Mytilus edulis*) algemeen

2.2.1 Paaien van mosselen in de natuur

In de natuur is gebleken dat de mosselen gaan paaien[15] als de temperatuur hoger of lager wordt (Barber & Blake, 1991) en onder invloed van voedselaanbod (Sastry, 1966, 1968 & 1970; Sastry & Blake, 1971). In gebieden waar de temperatuur van het water stabiel is, zoals een tropisch klimaat, zijn de mosselen gevoelig voor saliniteit[16]. De mosselen gaan dan paaien als er veranderingen optreden in saliniteit van het water (Gosling, 2003). Mosselen hebben een gescheiden geslacht. Het is niet aan de buitenkant van de schelp te zien of een mossel mannelijk of vrouwelijk is. Mosselen kunnen in hun eerste levensjaar al gonaden[17] aanmaken (Seed & Suchanek, 1992) en hebben een bepaalde cyclus die ieder jaar gevolgd wordt. Tijdens het najaar en de winter worden de eicellen en zaadcellen aangemaakt. Deze zijn tegen het voorjaar genoeg ontwikkeld (rijp). In het voorjaar vindt de paaiing plaats. In de zomer worden de eicellen/zaadcellen opnieuw aangemaakt en ontwikkelt zodat er in de late zomer nogmaals een paaiing kan plaatsvinden (Gosling, 2003).

2.2.2 De bevruchting (ontstaan van mossellarven)

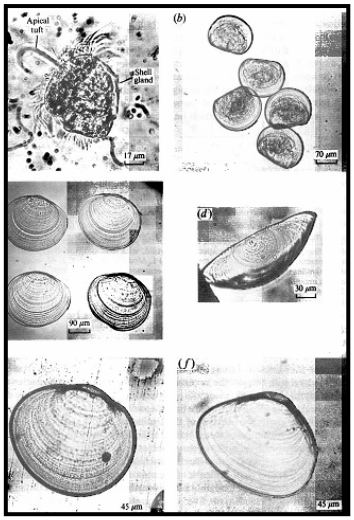
Tijdens het paaien worden de eicellen en zaadcellen in de waterkolom losgelaten door de ouderdieren, waar de bevruchting plaatsvindt door de beweging van het water (Gosling, 2003). Een vrouwelijke mossel kan 7 tot 40 miljoen eitjes produceren, afhankelijk van de schelplengte (Thompson, 1979). De eicellen van mosselen zijn 4-6 uur goed en de spermacellen 1-2 uur (Bayne, 1965). Binnen deze tijd moet de meiose[18] plaatsvinden. De eicellen hebben een afmeting van 70 µm (met een omhulsel van 0,5 tot 1 µm) op het moment van bevruchting (de Zwann & Mathieu, 1992). De samensmelting van de eicellen met de spermacellen en de celdeling duurt bij elkaar 1 uur. Na de bevruchting ontstaat er een embryo dat na 4 tot 5 uur rondzwemt in de waterkolom.

2.2.3 Groei van mossellarven

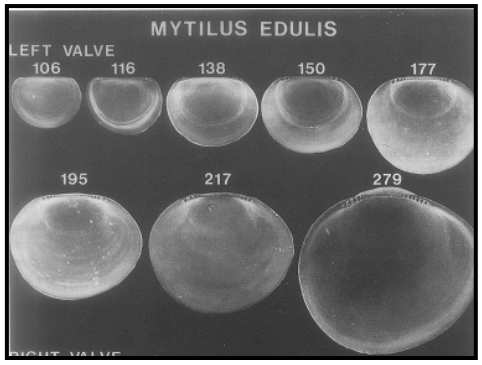
De mossellarven groeien doordat ze tijdens het zwemmen algen eten die in de waterkolom voorkomen. Tijdens het larvale stadium wordt het velum[19] gebruikt om algen op te nemen en zich als een spiraal voort te bewegen (Bayne, 1976). Periodes van horizontaal stijgen worden afgewisseld met naar de bodem zinken (Isham & Tierne, 1953; Konstantinova, 1966).

Na de bevruchting veranderd de embryo in een trochophore larve[20]. De trochophore larve wordt 24-48 uur na de bevruchting bereikt. De larve heeft dan nog geen schelp (Bayne, 1976). Kort hierop (2-3 dagen na bevruchting) vormt de larve een eerste schelp, genaamd prodissoconch I[21] (La Barbera, 1974). De schelp heeft de vorm van een D en wordt ook wel een D-larve[22] genoemd. De larve is dan 100-120 µm en kan zich in de waterkolom bewegen door het velum te gebruiken (Jablonski & Lutz, 1980; Sprung, 1984). De tweede schelp wordt kort na de eerste gevormd en heet prodissoconch II [23] Dit wordt later de mantel[24] van de schelp met de groeilijnen (Millar, 1968). De larve bevindt zich dan in het veliger stadium[25] (Werner, 1939). De larve groeit in deze weken van 120 tot 250 µm in schelplengte (Bayne, 1976). De pediveliger[26] is het laatste stadium waarin de larve nog kan zwemmen. Dit is het stadium waarbij de oogvlek[27] ontstaat en de larve een voet[28] ontwikkelt. De pediveliger larve is 210 – 300 µm (Gosling, 2003). Figuur 2.1 laat de toename in schelplengte zien van mossellarven.

Het laatste stadium van de mossellarve bestaat uit de metamorfose. Het velum verdwijnt en er wordt een voet ontwikkeld. Dit is een orgaan waarmee de larve zich kan voortbewegen in plaats van met het velum (Gosling, 1992). De verschillende stadia van de larve duren minimaal 1 week tot maximaal 4 weken (Bayne, 1976). Er zou dagelijks 13% van de totale hoeveelheid larven dood gaan in het wild (Bayne, 1976).



A



B

Figuur 2.1: De toename van schelplengte van mossellarven (*Mytilus edulis*). A) is afkomstig uit Bayne, 1984. B) is afkomstig uit Gosling, 1992

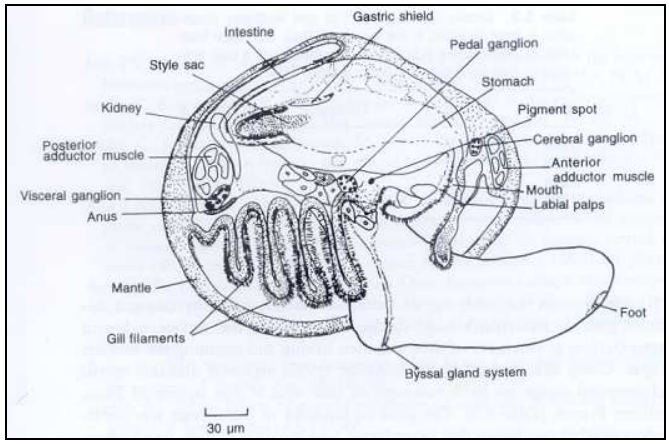
2.2.4 Metamorfose van mossellarven

voet wordt ontwikkeld en is te zien bij en grootte van 195-210 µm. Dit stadium is te herkennen aan de pigmentvlek, ook wel oogvlek genoemd. Deze wordt aangemaakt door de larve en is te zien op de schelp (Gosling, 1992). Tijdens het stadium van metamorfose heeft de larve een velum en een voet. Dit wordt ook wel pediveligers genoemd. De perdiveliger heeft nog niet de behoefte om te settelen en komt ook niet in contact met substraat. Hierdoor heeft de larve de kans om binnen 40 dagen de metamorfose te doen (Caddiker, 1961). In die tijd kunnen de byssusdraden[29] ontwikkeld worden voor het settelen. Dit wordt ook wel het postlarvale stadium[30] genoemd (Bayne, 1965 & 1976). Binnen 1 tot 3 dagen na het aanmaken van byssusdraden ontstaan de mondlappen[31] en kieuwlamellen[3]. Met de mondlappen kan een mossel het voedsel transporteren dat via de kieuwen de schelp binnenkomt. Tijdens de metamorfose kan de larve niet eten en doet daarom een beroep op reserves. Vanaf dat

moment bezit het mosselbroed/mosselzaad een ander verteringsmechanisme. Het is dan mogelijk om water te filteren en actief voedsel op te nemen (Bayne, 1976). De mortaliteit tijdens de metamorfose kan erg hoog zijn, mogelijk 99% van de totale hoeveelheid larven (Bayne, 1976).

2.2.5 Settelen van mossellarven

Het proces van settelen begint als de larve byssusdraden kan aanmaken. Als het velum langzamerhand verdwijnt kan de larve niet meer zwemmen en zakt naar de bodem. Met de ontstane voet (figuur 2.2) kan de larve zich over de bodem verplaatsen door te kruipen. De larve is dan bijna mosselbroed van de grootte 210 – 300 µm. Na enige tijd rondkruipen zorgen de byssusdraden ervoor dat de larve zich gaat hechten aan substraat (Bayne, 1965). Het is dan niet langer een larve maar mosselbroed. Onder settelen verstaat men dat mossellarven niet meer kunnen zwemmen, byssusdraden ontwikkelen en vastzitten aan substraat. Als de postlarvale mossel met succes zich heeft gesetteld dan noemt men het een plantigrade[33] (Bayne, 1976). Als de temperatuur, saliniteit en voer optimaal zijn, is de ontwikkeling van larve tot broed binnen 20 dagen voldaan (Bayne, 1965; Sprung, 1984). De mortaliteit onder mossellarven is erg hoog tijdens de plankton fase.



Figuur 2.2: De ontwikkelde voet bij een mossellarve (*Mytilus edulis*). Figuur is afkomstig uit Bayne, 1971.

2.3 Voedselaanbod voor mossellarven

De mosselen voeden zich met zwevende deeltjes die voorkomen in het water. Deze zwevende deeltjes worden plankton[34] genoemd. Plankton is een verzamelnaam voor alle vrij in het water zwevende organismen. Zooplankton[35] wordt gevormd door dierlijke organismen terwijl fytoplankton wordt gevormd plantaardige organismen (algen). De mossel voedt zich voornamelijk met het fytoplankton. Algen zorgen ervoor dat anorganische[36] stoffen worden omgezet in organische[37] stoffen waardoor het ook voor andere organismen beschikbaar wordt. Verder zet het fytoplankton koolstofdioxine (CO_2) om in zuurstof (O_2) door middel van fotosynthese[38] (lichtenergie wordt omgezet in chemisch gebonden energie) (Smaal, 1988).

Algen nemen nutriënten[39] op uit het water waardoor ze kunnen groeien en vermenigvuldigen. Als mosselen de algen eten krijgen ze deze nutriënten en andere voedingsstoffen binnen. Algen kunnen snel in aantal groeien. Ze vormen de basis van de voedselketen doordat ze voedingsstoffen bevatten voor vele andere organismen. Er komen voornamelijk twee groepen fytoplankton voor in zoutwater, namelijk de flagellaten en de diatomeeën (www.natuurwetenschappen.be).

2.3.1 Voedselaanbod voor mossellarven in het wild

Het voedsel voor mossellarven in het wild bestaat voornamelijk uit fytoplankton en ultraplankton[40] (met een celgrootte die kleiner is dan 5-10 µm en een hoge voedingswaarde). Het ultraplankton vormt 50% van het totaal in het wild voorkomende fytoplankton. Ultraplankton wordt aangemaakt in estuaria[41] en is een belangrijke voedselbron voor bivalve larven (Gosling, 1992). De eetbare deeltjes worden door de mossel verteerd en de niet eetbare deeltjes scheidt de mossel uit als pseudofeces[42]. Het voedsel dat na de mond niet verteerd kan worden scheidt de mossel uit als feces[43] (A.C. Smaal, 1988).

Een larve heeft nog niet hetzelfde verteringssysteem als mosselbroed of mosselzaad. Door de stroming van het water krijgen de larven de algen binnen. De algen worden opgenomen door middel van stroming en kleine trilhaartjes[44] die zich op het velum bevinden. Door de stroming van het water komen de algen in de larve terecht, waarna het voedsel direct wordt opgenomen in de mond en andere deeltjes worden uitgescheiden (Bayne, 1976). De energie haalt de mossel uit het opgeloste organische deel, afkomstig van algen, die de nutriënten omzetten naar organische stoffen die de mossel kan opnemen (Bayne, 1976).

Er is bewezen dat er een nauwe relatie bestaat tussen de opname van algencellen (algenconcentratie) en de groeisnelheid van larven (Bayne, 1976). Bij een lage concentratie van algencellen neemt de snelheid waarmee water gefilterd wordt af (Bayne, 1976). Een mossellarve heeft een voedselaanbod van algen nodig van 30-60% van het eigen gewicht per dag. Voor een efficiëntere groei is 60-70% van het eigen gewicht per dag nodig (Sprung, 1984). Een larve weegt in het beginstadium 0,1 mg en in het eindstadium 1 mg (Bayne, 1976).

Een volwassen mossel kan per uur 2 tot 3 liter water filteren. De filtratiesnelheid[45] van een mossellarve is 0.1 tot 0.6 ml/dag (Bayne, 1976). Alle deeltjes die groter zijn dan 0,01 mm blijven als voedsel achter op de kieuwen en worden naar de mond getransporteerd. (Smaal, 1988). Mosselen produceren pseudofeces als de algenconcentratie verhoogd wordt van 50.000 naar 100.000 cellen/ml (Foster-Smith, 1975).

2.3.2 Voedselaanbod voor mossellarven in een mosselhatchery

In een mosselhatchery wordt er geen gebruik gemaakt van algen die al in het water zitten maar van algen die een hoge voedingswaarde hebben en gemakkelijk te kweken zijn. De algencultuur wordt gemaakt door zeewater of bronwater op te pompen en dit te filteren en te steriliseren[46]. Zo worden alle deeltje die er nog inzitten verwijderd (Petit 1990). Met dit water wordt een nieuwe algencultuur[47] gemaakt. De algen groeien alleen optimaal als er genoeg beweging is (lucht), genoeg licht, voldoende koolstof (C) en een goed medium[48] met nutriënten wordt toegevoegd. De algencultuur wordt in de volgende stappen opgebouwd:

- 20 ml
- 500 ml
- 5 l
- 20 l
- 250 l

De gemiddelde celconcentratie van een algencultuur is 1 tot 5 miljoen algen/ml (Gosling, 1992).

Tabel 2.1: Celvolume, AFDW (asvrijddrooggewicht) en energie van algen (Helm et al,. 2004).

Algensoort	**Cel volume (μm^3)**	**DW ($\mu g/10^6$ cellen)**	**AFDW ($\mu g/10^6$ cellen)**	**Vetten/Eiwitten (%)**
Isochrysis galbana	40-50	$30,5*10^3$	19-24	20-24
Pavlova lutheri	40-50	$102,3*10^3$	19-24	20-24
Chaetoceros calcitrans	35	$11,3*10^3$	7	17
Chaetoceros gracilis	80	$74,8*10^3$	30	19

Algensoorten

De algensoorten hebben invloed op de groei van de larven. De algen zonder celwand[49], flagellaten, zijn beter op te nemen door larven dan de algensoorten met celwand. De algensoorten die een positieve invloed hebben op de groei van larven zijn *Chaetoceros calcitrans, Isochrysis galbana, Pavlova lutheri, Tetraselmis suecica* en *Thalassiosira pseadonana*. De algensoort *Phaeodactylum* heeft geen invloed op de groei van larven. Een bepaalde combinatie van algensoorten zorgt voor een optimale groei, afhankelijk van de concentratie, kwaliteit en celgrootte van de algen. De algencellen moeten dusdanig klein, dat de larven ze op kunnen nemen. De optimale concentratie van algen voor de larven is 10-50 µg (DW)/ml (Bayne, 1983).

Optimale combinaties van algensoorten en algenconcentraties

Er zijn verschillende onderzoeken gedaan naar de optimale algencombinatie en algendichtheid die gevoerd kan worden aan mossellarven. Hieronder volgt een overzicht van resultaten deze onderzoeken:

- Uit onderzoek is gebleken dat bij een hoge algenconcentratie (>200 cellen/µl) de voedingsratio[50] bij mossellarven verlaagt wordt (Bayne, 1976).

- Een experiment met alleen de algensoort *Isochrysis* en een variatie van algenconcentratie 1,2,5,10,20,40 cellen/ µL (1.000 tot 40.000 cellen/ml) bij verschillende temperaturen (6,12,18 ^{0}C). Er werd een maximale groeisnelheid bereikt van 3.4, 8.1 en 11,8 µm/dag voor respectievelijk 6,12 en 18 ^{0}C (Sprung, 1984b)

- Het verschil in algenconcentratie heeft pas invloed op de groei van de larven bij 0,01 cellen/ µL (10 cellen/ml). De groeisnelheid bij de larven neemt dan af (Sprung 1984b).

- Bayne (1965) vond een optimale groei bij een algenconcentratie van 0,1 cellen/ µL (100 cellen/ml) en een larvendichtheid van 3-10 larven/ml voor mossellarven.

- Uit onderzoek van Jespersen & Olsen (1982) blijkt dat de optimale algenconcentratie voor mossellarven bestaat uit een mix van *Isochrysis* en *Pavlova* , 40-50 cellen/ µL (40.000-50.000 cellen/ml) bij een larvendichtheid van 0.1-0.2 larven/ml.

- Bayne (1976) heeft onderzoek gedaan naar de overleving van mossellarven wanneer deze geen voedsel krijgen. De larven overleven het 20-30 dagen bij een temperatuur van 15-16 ^{0}C.

- Bij onderzoek van Ponis & Probert (2005) naar de het optimale voedsel voor *Crassostrea gigas* larven werd voornamelijk gekeken naar de samenstelling en de algenconcentratie. Er werd gebruik gemaakt van 20% diatomeeën en 80% flagellaten. De larven werden om de dag gevoerd, de eerste 2 weken met 50.000 cellen/ml. De laatste 2 weken kregen de larven 100.000 cellen/ml gevoerd. Als blanco werd er gebruik gemaakt van een opstelling die geen voer kregen. Als referentie werd gebruik gemaakt van *C. calcitrans* samen met *Isochrysis*. De larvendichtheid was 5 larven/ml in volumes van 2 liter.

- Het onderzoek van Laing & Millican (1986) was ook gebaseerd op verschillende algendichtheden en samenstellingen. Bij dit onderzoek werd gebruik gemaakt van broed van *Ostrea edulis*. Tijdens het onderzoek werd er in het begin een algenconcentratie gevoerd van 100.000-200.000 cellen/ml. Aan het einde van het experiment, na 4 maanden, werd er een algenconcentratie van 600.000-700.000 cellen/ml gevoerd.

2.4 Factoren die de groei en overleving beïnvloeden van mossellarven

Er zijn verschillende omgevingsfactoren, fysische[51] factoren en andere omstandigheden die van invloed kunnen zijn op de groei en ontwikkeling van mossellarven.

2.4.1 Invloed ouderdieren op mossellarven

De ouderdieren hebben invloed op de ontwikkeling van de larven. Tijdens onderzoek van Bayne (1972) werden larven die van ouderdieren afkomstig waren onder normale omstandigheden vergeleken met ouderdieren die blootgesteld werden aan stress. De larven die afkomstig waren van ouderdieren, die onder stressvolle omstandigheden paaiden, ontwikkelden zich minder snel. Ook heeft de conditie van de ouderdieren invloed op de ontwikkeling van de larven. Hoe meer energie de ouderdieren hebben opgeslagen, hoe meer ze kunnen missen tijdens het paaien. De BMI[52] (Body Mass Index) is bepalend voor de hoeveelheid eicellen die het vrouwtje kan produceren. De BMI wordt beïnvloed door het voedselaanbod en de watertemperatuur (Beukema et al., 1998). De kwaliteit van het voedselaanbod wordt bepaald door vetzuren die voorkomen in de algen (EPA[53] en DHA[54]) (Lane, 1989). De PUFA's[55] (worden onder andere gevormd door EPA en DHA) zijn onverzadigde vetzuren[56]. De meeste bivalven kunnen deze moeilijk aanmaken (Ackman, 1983). Algen kunnen deze onverzadigde vetzuren wel aanmaken en zijn daarom van belang als leverancier van energie voor de ouderdieren. De energie wordt gebruikt om gonaden aan te maken. De vrouwelijke ouderdieren die voldoende onverzadigde vetzuren hebben binnen gekregen geven dit mee aan de eicellen. De energie wordt door de larve gebruikt tijdens de eerste 24 uur na bevruchting. Dit is het stadium waarin de larve nog niet eet maar gebruik maakt van zijn reserves (Helm et al., 1991; Utting & Millican, 1997).

2.4.2 Invloed van abiotische omgevingsfactoren op mossellarven

De mossellarven zijn in de eerste stadia gevoelig voor abiotische[57] factoren zoals licht, zwaartekracht en druk. Omdat larven gevoelig zijn voor licht zwemmen ze 's nachts in de bovenste kolom van het water. Overdag zijn ze in dieper water te vinden zodat ze kunnen vluchten voor de predatie. Samen met een tekort aan voedselaanbod, extreme temperaturen, saliniteit en chemische vervuiling kan er in het wild een mortaliteit van 99% optreden tijdens het larvale stadium (Thoson, 1946, 1950; Mileikovsky, 1971). De factoren die invloed hebben op de ontwikkeling zijn dezelfde die invloed hebben op de groei van volwassen mosselen (Gosling, 2003).

Larven hebben in het beginstadium last van wisselende omgevingsfactoren. Temperatuur is bepalend voor de snelheid waarmee de metamorfose wordt voltooid en de groeisnelheid (Gosling, 1992). Uit onderzoek van Bayne (1965) blijkt dat de trochophore larven goed ontwikkelen bij een saliniteit tussen 30-40 $^{0}/_{00}$ bij een temperatuur tussen 8 en 18 ^{0}C. De saliniteit tolerantie ligt voor de mossellarven bij 15 °C tussen 15 en 20 $^{0}/_{00}$ en bij 20 °C tussen 20 en 25 $^{0}/_{00}$ (Hrs-Brenco, 1973; Bayne, 1976). Voor de larven van *Mytilus edulis* ligt de optimale groeisnelheid bij een temperatuur bij 20 ^{0}C en bij een saliniteit tussen 25 en 30 $^{0}/_{00}$.(Hrs-Brenko & Calabrese, 1969).

Vertraging van de metamorfose kan optreden door het ontbreken van bepaalde stimuli van de omgeving (Thorson, 1950; Wilson, 1952). De larven van een mossel kunnen de metamorfose vertragen tot 40 dagen bij een temperatuur van 10 ^{0}C en 2 dagen bij een temperatuur van 20 ^{0}C. Het vertragen van de metamorfose is dus voor een deel afhankelijk van de temperatuur. De larven gaan op rantsoen en eten minder algen tijdens de metamorfose. De invloed van saliniteit wordt dan ook verminderd. Het velum past zich aan en het is bijna niet meer mogelijk om algen binnen te krijgen. Zwemmen wordt ook bemoeilijkt. De groei van de larve kan zelfs geheel stilgelegd worden (Bayne, 1976).

2.4.3 Invloed van biotische omgevingsfactoren op mossellarven

De biotische omgevingsfactoren die bijdragen aan een hoge mortaliteit zijn de predatoren. Vertebraten[58], zoals vissen (Lebour, 1933; Legaré & Maclellan, 1960), en evertebraten[59], zoals krabben (Thorson, 1946), voeden zich met zwemmende larven. Onder predatie wordt ook verstaan het weg filteren van de larven uit de waterkolom door filterfeeders. Filterfeeders, waaronder de oester, filteren de larven uit het water (Thorson, 1946, 1966; Bayne, 1964b; Hancock, 1973; Mileikovsky, 1974).

Volgens onderzoek van Bayne (1976) kunnen de larven tot 20-30 dagen bij een temperatuur van 15-16 °C zonder voer. De oudere larven kunnen nog langer zonder voer, volgens Spung (1982) namelijk 150 dagen bij een temperatuur van 12 °C. Ze maken dan gebruik van hun eigen eiwitten en vetten voor overleving.

2.4.4 Overleving van mossellarven

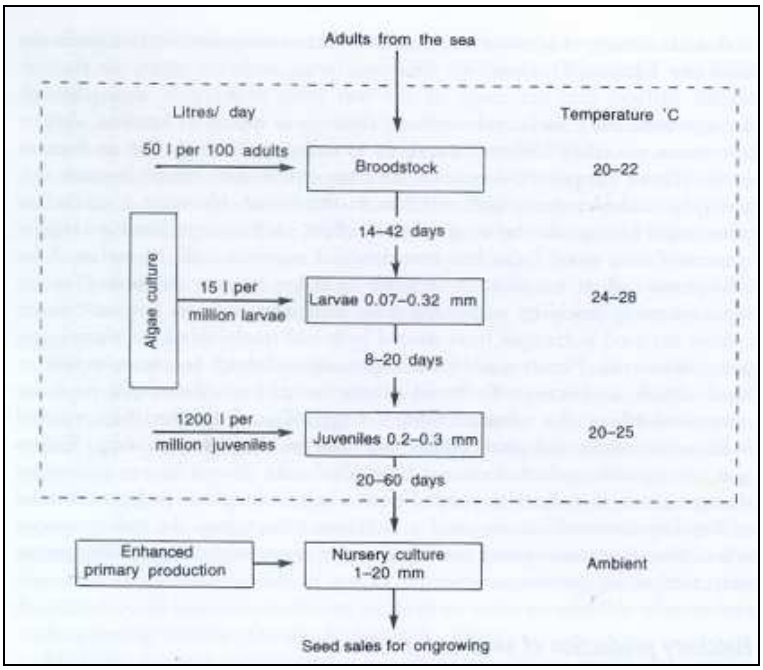
Larven doen er tussen de 15 en 35 dagen over om zich te gaan settelen. Dit is alleen mogelijk als de metamorfose en het settelen goed verlopen. De tijd die larven nodig hebben om te gaan settelen is afhankelijk van het voedselaanbod, de temperatuur, de saliniteit en andere variabelen zoals stroming. Saliniteit en temperatuur hebben de minste invloed op het proces van settelen omdat de larven binnen een grote range kunnen leven (Thorson, 1950). De larven settelen zich gemiddeld na 3 weken. De drie selecties die larven doormaken zijn: a) invloed van temperatuur en voedselaanbod, b) stratificatie[60] van het water in bijvoorbeeld estuaria en c) het substraat waarop de larven zich kunnen gaan settelen (Thorson, 1966).

2.5 Kunstmatig kweken van bivalven

De term aquacultuur is afkomstig van een Chinese politicus (500 voor Chr.). Die bedacht dat karpers gekweekt konden worden in vijvers. Ze waren daarna gemakkelijk te vangen en te verkopen. Hierna is de aquacultuur sterk doorontwikkeld. Het belangrijkste onderdeel van het kunstmatig kweken van bivalven is de aanvoer van broed of zaad. Dit kan worden verkregen uit het wild of van een broedstock (Gosling, 2003).

2.5.1 Hatchery/nursery mosselen (Mytilus edulis)

Om een goede hatchery te ontwikkelen is noodzakelijk om te kweken met soorten die relatief goedkoop voedsel consumeren en niet gevoelig zijn voor ziektes. De mossel heeft als voedselaanbod fytoplankton nodig. De kosten die hiervoor gemaakt worden zijn het oppompen van zoutwater, nutriënten, licht en arbeid. De mossel heeft een constante stroom algen nodig om optimaal te kunnen groeien. Deze deeltjes filtert de mossel uit het water. Mossellarven kunnen zich vrij bewegen in de waterkolom met de juiste samenstelling en temperatuur. Hierdoor kunnen ze in verschillende wateren settelen en gekweekt worden. Figuur 2.3 geeft een overzicht van de kweek van mossellarven. De ontwikkelingen van hatcheries hebben een positieve invloed op de ontwikkelingen binnen de mosselkweek. Het is economisch alleen haalbaar als er grote dichtheden mosselen bij elkaar gekweekt worden. Dit staat dichtbij de natuurlijke zaadval van de mosselen (Gosling, 1992).



Figuur 2.3: Het verloop van kunstmatig kweken van mosselen (*Mytilus edulis*) in een hatchery. Figuur is afkomstig uit Gosling, 2003.

Paaien in hatchery

De mosselen die gekweekt worden in een hatchery/nursery worden onder gecontroleerde omstandigheden gekweekt. De ouderdieren, ook wel broedstock[61] genoemd, worden bij een temperatuur van 17 ^{0}C geconditioneerd. Ze krijgen extra voedsel (d.w.z. geconditioneerd) zodat de rijpe gonaden van goede kwaliteit zijn. Door de broedstock in water van 26 ^{0}C te plaatsen worden ze gestimuleerd om eicellen en zaadcellen af te scheiden. Na 45 minuten wordt de broedstock in water van 10 ^{0}C geplaatst om nogmaals een stimulans te geven. Na weer 45 minuten wordt de broedstock opnieuw in water van 26 ^{0}C geplaatst. Tijdens het afscheiden van de eicellen en zaadcellen in het water worden de mannetje en vrouwtjes gescheiden bewaard. Bij het uitzoeken van de juiste mannetjes en vrouwtjes wordt er gekeken naar de hoeveelheid ei- en spermacellen. (protocol bijlage 2)

Larven dichtheid

De dichtheid van de larven heeft minder invloed op de groei dan de algenconcentratie. Er zijn pas verschillen waar te nemen bij minder dan 1 larve/ml (Bayne 1976).

Ziektes binnen een hatchery kunnen ontstaan door het hanteren van een te hoge larvendichtheid, door stress tijdens het verversen en door bacteriën die de kop op kunnen gaan steken (Gosling, 2003).

Kosten Hatchery

Bij een hatchery wordt 30% van de kosten bepaald door de algenkweek. Het is dus van belang om de juiste voedingsratio toe te passen. Ook instant algen zou een oplossing kunnen zijn voor de grote oppervlakte die nodig is voor de algenkweek. Er zijn onderzoeken gaande naar de verschillen tussen het voeren van 1 algensoort, verschillende algensoorten en instant algen. Een goedkope vorm van algen kweken zou het kweken op afvalwater kunnen zijn (Gosling, 2003).

2.5.2 Hatchery/nursery andere bivalven

Voor het kweken van oesters *(Ostrea edulis)* wordt gebruik gemaakt van zaad dat afkomstig is van een hatchery of van natuurlijke broedval op schelpensubstraat. Het andere deel is afkomstig van in het wild gevallen broed.

Bij de oesterhatchery (*Crassostrea gigas)* werd al langer gebruik gemaakt van de temperatuurshock. Door de oesters in water van 28 – 30 ^{0}C te plaatsen krijgen ze een stimulans om te paaien. Dit moet binnen 45 minuten plaatsvinden. Als er geen paaiing plaatsvindt, wordt de temperatuur verlaagd naar 24 ^{0}C voor een periode van 30 min. Dit wordt herhaald totdat de oesters wel gaan paaien. Ook wordt er gebruik gemaakt van elektrische schokken of het injecteren van zout (Gosling, 2003). Oesters kunnen tussen de 0,1 en de 1,5 miljoen eicellen produceren. Dit is afhankelijk van de leeftijden van de oester (Walne, 1974)

Tijdens het beginstadium van oesterlarven (180 µm) wordt er 20.000 alg/ml gevoerd. Tijdens het eindstadium van de oesterlarven (250 µm) wordt er 60.000 alg/ml gevoerd van de algensoort *Isochrysis* (Walne, 1974). Uit onderzoek is gebleken dat oesterlarven cellen binnen krijgen van 3 tot 10 µm (Bayne, 1976).

De larven van *Crassostrea virginica* krijgen de eerste 24 uur geen voer en worden pas na 2 dagen ververst. Daarna krijgen ze 3 keer per week voer. In het begin hebben ze een dichtheid van 60.000 larven/l. Als ze een schelp hebben gekregen hebben ze een dichtheid van 4.000-15.000 larven/l. De larven worden iedere dag gevoerd met een algenconcentratie van 30.000-100.000 cellen/ml (Gosling, 2003).

2.5.3 Voor- en nadelen kweek hatchery/nursery van mosselen

<u>Voordelen kunstmatig gekweekt mosselzaad</u>

Er zijn een aantal voordelen van hatchery gekweekte mosselzaad. Eén van de voordelen is dat men minder wild mosselzaad nodig heeft en dus minder hoeft op te vissen uit de Waddenzee. Hierdoor blijft er genoeg voedsel over voor de vogels. Verder zijn de mosselvissers minder afhankelijk van de natuurlijke broedval omdat het gekweekte mosselzaad op ieder gewenst moment geproduceerd kan worden. Het wilde mosselzaad kan slechts op bepaalde tijden per jaar opgevist worden en in een beperkte hoeveelheid.

Een ander voordeel is dat door een juiste selectie van de ouderdieren (broedstock) veredeld kan worden binnen de kweek. Er kunnen dan mosselen gekweekt worden die juist een stevige schelp hebben, resistent zijn voor ziektes, minder gevoelig zijn voor een slechte waterkwaliteit of juist een snelle groeier. Wel zal het nog een aantal jaar duren voordat de techniek zover ontwikkeld is. Op dit moment zijn er onderzoeken gaande naar het kweken van snelgroeiende mosselen (www.blueseedproject.com).

<u>Nadelen kunstmatig gekweekt mosselzaad</u>

Het voornaamste nadeel van kunstmatig gekweekt mosselzaad is dat het op dit moment nog in experimenteel stadium is en er nog niet commercieel gekweekt wordt. De oorzaak hiervoor is dat het zaad mogelijk duurder is dan het traditioneel gevangen mosselzaad. Er zal voorzichtig omgegaan moeten worden met het gekweekte mosselzaad en men kan zich dan ook geen grote verliezen permitteren door predatie en stroming. De kosten van kunstmatig gekweekt mosselzaad zijn mogelijk hoog omdat het een arbeidsintensief proces is en er veel oppervlakte nodig is voor de algenkweek. Verder is de schaal waarop nu gekweekt wordt te klein om aan de grote vraag naar mosselzaad te kunnen voldoen.

2.5.4 Mogelijkheden voor kweek van mosselen (Mytilus edulis)

Bodemcultuur

In 1825 is de hedendaagse (bodem)mosselcultuur ontstaan. De mosselen worden op de bodem van de Oosterschelde en de Waddenzee opgekweekt. Voor die tijd lagen de mosselen voor het oprapen aan de Zeeuwse kust en de Waddenzee (www.vriendenvandemossel.nl). De visserij bestond toen uit het opvissen van mosselen op vrije banken. Men viste dus wilde mosselen op die consumptierijp waren. Door een groeiende vraag vanuit de consument naar mosselen en om structuur aan te brengen binnen de mosselvisserij is men in 1825 begonnen met de gestructureerde mosselcultuur (www.mosseldagyerseke.nl). Sinds 1870 worden de mosselpercelen verpacht door de overheid (www.mosseldagyerseke.nl). De kwaliteit van het kweekperceel wordt bepaald door het voedselaanbod op het kweekperceel, de bodemgesteldheid en de stroming. Vroeger kon er onbeperkt mosselzaad opgevist en gezaaid worden. Om dit te voorkomen heeft iedere mosselzaadvisser vergunningen nodig van de Natuurbeschermingswet. Tegenwoordig zijn er 88 vergunningen en mag er slechts met één boot per vergunning gevist worden op bepaalde tijden. Zo kunnen de mosselvissers maar een beperkte hoeveelheid mosselzaad opvissen (www.vriendenvandemossel.nl).

Het wilde mosselzaad wordt gebruikt voor het kweken van consumptie mosselen. Men vist het zaad op uit de Waddenzee of uit de Zeeuwse wateren op. Dit wordt in het voor- en najaar gedaan nadat de larven zijn uitgegroeid tot mosselzaad. Het mosselzaad heeft dan een grootte van 1 á 2 cm. De mosselvissers vissen dan 3 tot 5 weken alleen op mosselzaad. Het zaad wordt opgevist met behulp van speciale mosselkotters die voorzien zijn van sleepnetten, per schip worden er 4 sleepnetten gebruikt. Het mosselzaad wordt voornamelijk in de Waddenzee opgevist en uitgezaaid op percelen in de Oosterschelde en in de Waddenzee. Het opgeviste mosselzaad wordt uitgezaaid op de percelen van de mosselvissers. Op deze percelen kunnen de mosselen verder groeien. Wanneer de predatie van krabben en zeesterren te groot is of de groei geremd wordt door andere factoren worden de mosselen weer opgevist en uitgezaaid op een ander perceel. Dit alles neemt minimaal 2 jaar in beslag voordat de mosselen zijn uitgegroeid tot consumptie mosselen (Mosselcultuur in de Nederlandse wateren, mosselkantoor Yerseke).

De mosselen die op bodempercelen worden opgekweekt tot consumptiemosselen bevatten vaak slib, klei en zand. Dit raken ze kwijt bij het verwateren van de mosselen. Het verwateren vindt hoofdzakelijk plaats in de Oosterschelde ten oosten van Yerseke (Mosselcultuur in de Nederlandse wateren, mosselkantoor Yerseke).

Hangcultuur

Tegenwoordig maakt men gebruik van de mogelijkheid dat mosselen steeds opnieuw byssusdraden kunnen aanmaken. Hierdoor kan de mossel zich steeds opnieuw hechten aan substraat. Zo is de hedendaagse hangcultuur aan touwen ontstaan (Gosling, 1992).

Hangcultuur is alternatieve vorm van het opkweken van mosselen. Het wilde mosselzaad uit de Waddenzee of Oosterschelde wordt door middel van een kous (sok) rond het touw gespannen. De mosselen hechten zich dan vast aan het touw. De sok, die meestal van natuurlijke materialen is gemaakt, verteert na een tijdje. Na ongeveer 1,5 jaar zijn de mosselen dan consumptierijp. De hangmosselen zijn minder gevoelig voor predatie, omdat ze boven de bodem hangen. De meeste predatoren (zeesterren, krabben) leven op de bodem. Wel zijn de concentraties mosselen waarin gekweekt wordt lager dan bij een bodemperceel. De mosselen in de hangcultuur groeien sneller omdat ze in de bovenste laag van de waterkolom hangen. Hier bevinden zich de meeste algen. De reden hiervoor is dat de lichtintensiteit in de bovenste waterkolom het hoogst is (Viskwekerij Neeltje Jans, firma Schot BV).

Mosselkweek op houten palen (bouchots)

Het kweken van mosselen op palen gebeurt al vanaf de dertiende eeuw. Door middel van kokosvezel-touwen tussen palen op te hangen kan het mosselzaad zich settelen. De palen worden dicht aan de laagwaterlijn, in beschermde baaien, geplaatst zodat de natuurlijke habitat wordt nagebootst. Wanneer het mosselzaad groot genoeg is wordt het verplaatst naar andere palen waar meer voedsel ter beschikking is. Het mosselzaad is 1 jaar oud als het de afmeting van 2 cm heeft. De kweker zoekt de grootste mosselen uit en verhangt deze op palen die hoger op het strand staan. Na 3 jaar zijn de mosselen consumptierijk. Deze techniek wordt voornamelijk in Frankrijk toegepast (www.natuurwetenschappen.be).

Mosselzaadinvang

Sinds 2000 zijn er nieuwe ontwikkelingen gaande voor wat betreft het opvangen/collecteren van mosselbroed tijdens de natuurlijke broedval. Door te experimenteren met invanginstallaties voor mosselzaad zou er natuurvriendelijk mosselzaad gevist kunnen worden. De mosselzaad-invanginstallatie, ook wel MZI genoemd, bestaat uit netten of ander substraat waarop de larven tijdens een natuurlijke broedval kunnen settelen. De MZI's worden op verschillende plaatsen in de Oosterschelde, de Waddenzee en de Noordzee uitgehangen. Na analyse van de invang kan er een beeld gevormd worden van de locatie waar het rendement van invang het hoogst is. De larven van wilde mosselen hechten zich net als bij de hangcultuur op het aangeboden substraat. Na een bepaalde tijd worden de MZI's uit het water gehaald en kan het mosselzaad als bodemcultuur opgekweekt worden tot consumptiemosselen. Het rendement van een MZI is afhankelijk van de locatie, de periode van invang en de natuurlijke hoeveelheid larven in de waterkolom (pers. comm. Kamermans).

Import

Er is binnen de mosselvisserij vraag ontstaan naar het importeren van Ierse mosselen omdat er te weinig mosselzaad gevangen mag worden op de Waddenzee. Door het mosselzaad van Ierse mosselen te importeren kan het te kort aan zaad aangevuld worden (pers. comm. Kamermans).

3. Methode & materialen

Dit hoofdstuk bestaat uit een uitgebreide methode voor experiment 1 en experiment 2. Bij ieder onderdeel is direct een materialenlijst toegevoegd.

3.1 Voorbereiding op de experimenten

3.1.1 Opzetten en onderhouden algenkweek:

Bij experiment 1 is er gebruik gemaakt van 4 verschillende algen, namelijk: *Isochrysis galbana, Pavlova lutheri, Chaetoceros calcitrans* en *Chaetoceros gracilis*. Bij experiment 2 is er gebruik gemaakt van *Pavlova lutheri* en *Chaetoceros gracilis*. De algenculturen werden gestart vanuit een stock cultuur. De algencultuur groeit daarna verder uit volgens de methode van FAO manual Hatchery culture of bivalves (Helm et al, 2004) tot een cultuur van 4 liter. Nadat de algen een hoge algenconcentratie bereikte van ongeveer $10*10^6$ cellen/ml werden ze overgeplaatst naar een plastic zak van 25 liter. De algen die gebruikt werden voor de experimenten waren afkomstig uit de glazen bollen van 4 liter of uit de plastic zakken, afhankelijk van de kwaliteit. De kwaliteit van de algen werd bepaald aan de hand van de concentratie. Een teruglopende algenconcentratie duidt op een verminderde kwaliteit. Verder is de kwaliteit ook op het zicht bepaald. Bij het helder worden van het algenwater werd er aangenomen dat de kwaliteit achteruit ging. In bijlage 7 staat het protocol vermeld voor het kweken van algen in plastic zakken.

Benodigdheden:

- Klimaatkamer, temperatuur 17 ^{0}C
- Algen stockcultuur
- Medium (Walne, Silicaat en vitaminen)
- Autoclaaf
- Glazen flessen 8 l
- Meet pipet 0,2 ml
- Meet pipet 2 ml
- Maatcilinder 25 ml
- Plastic zakken
- Glazen bol 5 l
- Luchtpomp
- Microscoop

3.1.2 Bepalen algendichtheden:

De larven krijgen tijdens het BLUE SEED project standaard een algenconcentratie van 25.000 cellen/ml per dag gevoerd voor een larvendichtheid van 10 larven/ml. De dichtheid van de algencultuur werd om de 2 dagen bepaald met behulp van een hematocytometer[62] (telkamer) onder de microscoop (zie bijlage 3). De mossellarven kregen 5 maal per week hun algendieet. De algenconcentratie is berekend aan de hand van formules (bijlage 3 en 4)

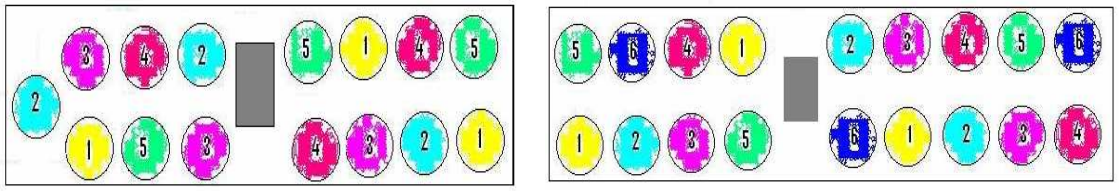
Benodigdheden:

- Microscoop
- Computer
- Computer programma Excel
- Lugol
- Meetpipet van min. 2 ml
- Maatcilinder 10 ml
- Hematocytometer/telkamer
- Methode algentelling in bijlage 3

3.1.3 Opstelling:

De opstelling van experiment 1 en 2 bestond uit glazen bollen met ieder een inhoud van 4 liter gefiltreerd zeewater. Het zeewater werd eerst gefilterd door een filter van 1 µm en daarna door een kaarsfilter van 0,2 µm. Het experiment is in triplo uitgevoerd voor de nauwkeurigheid. Figuur 3.1 geeft een overzicht van de gehele opstelling van experiment 1 en experiment 2. De kleuren en nummers die overeenkomen vormden de triplo uitvoering per opstelling. Figuur 3.2 is een weergave van de opstelling zoals deze random was neergezet in de klimaatkamer. Per bol werd er, door middel van een luchtpomp, zuurstof (O_2) toegevoegd.

De temperatuur van het water in de bollen moest gelijk zijn met de temperatuur van de klimaatkamer. Daarom is er gebruik gemaakt van het dubbele aantal bollen. Deze bollen werden 1-3 dagen voor de verversing klaargezet met gefiltreerd zeewater zodat het water 17 ^{0}C was voor de verversing.



Figuur 3.1: Schematisch overzicht opstelling experiment 1(links) en experiment 2 (rechts) voor bepaling optimaal algendieet voor mossellarven. Het grijze vierkantje is de luchtpomp. Voor uitleg van de nummers zie tabellen 3.1 en 3.3



A





B C

Figuur 3.2: Foto's van de opstelling experiment 2, bestaande uit 18 glazen bollen van 4 liter. Per glazen bol 40.000 mossellarven. A.)Vooraanzicht van de opstelling. B.) Zijaanzicht van de opstelling. C.) Glazen bollen en luchtpomp.

Experiment 1

Experiment 1 was gericht op de vraag of er verschillen waren tussen diatomeeën en flagellaten binnen het algendieet. De voorgaande experimenten binnen het BLUE SEED project zijn uitgevoerd met een verhouding 1:1 tussen flagellaten en diatomeeën. Deze verhouding werd bij experiment 1 ook aangehouden zodat er vergeleken kon worden met eerder gedane experimenten. Verder werden de mossellarven 5 maal per week gevoerd met 25.000 algen/ml. In tabel 3.1 staat vermeld welke combinaties algen er gebruikt zijn bij experiment 1. In tabel 3.2 staat vermeld welke concentraties algen er gebruikt zijn gedurende het experiment.

Tabel 3.1: Algensamenstellingen experiment 1 met de combinatie van flagellaten en diatomeeën.

Opstelling	**50 %**	**50 %**
1 Referentie	*Isochrysis*	*Chaetoceros gracilis*
2	*Pavlova*	*Chaetoceros gracilis*
3	*Isochrysis*	*Chaetoceros calcitrans*
4	*Pavlova*	*Chaetoceros calcitrans*
5 Blanco	Geen voer	

Tabel 3.2: Overzicht algenconcentratie (cellen /ml/dag) die gevoerd werden aan de mossellarven tijdens experiment 1 De verhouding flagellaten en diatomeeën was 1:1.

opstelling / **weken**	**1 referentie**	**2**	**3**	**4**	**5 blanco**
1 t/m 6	25.000	25.000	25.000	25.000	0
7 t/m 12	25.000	25.000	25.000	25.000	0
13 t/m 18	25.000	25.000	25.000	25.000	0
19 t/m25	25.000	25.000	25.000	25.000	0

Experiment 2:

Ook experiment 2 is een onderdeel van het BLUE SEED project. Als algendieet werd gebruik gemaakt van de beste combinatie uit experiment 1, namelijk *Pavlova lutheri* en *Chaetoceros calcitrans*. Van deze algencombinatie is een serie met verschillende algendichtheden opgesteld. Als referentie werd er gebruik gemaakt van een algenconcentratie 25.000 cellen/ml. De andere algenconcentraties zijn afkomstig uit het literatuuronderzoek (zie hoofdstuk 2). In tabel 3.3 staan de verschillende algenconcentraties *Pavlova lutheri* en *Chaetoceros calcitrans* vermeld die gevoerd zijn tijdens experiment 2.

Tabel 3.3: Overzicht totale algenconcentraties (cellen/ml/dag) die gevoerd werden aan de mossellarven tijdens experiment 2. De verhouding *Pavlova* en *Chaetoceros calcitrans* was 1:1.

opstelling / **dagen**	**1** *(alg/ml)*	**2** *(alg/ml)*	**3** *(alg/ml)*	**4** *(alg/ml)*	**5** *(alg/ml)*	**6** *(alg/ml)*
1 t/m 6	25.000	25.000	50.000	25.000	50.000	100.000
7 t/m 12	25.000	25.000	50.000	50.000	100.000	200.000
13 t/m 18	25.000	50.000	100.000	100.000	200.000	400.000
19 t/m24	25.000	50.000	100.000	200.000	400.000	800.000

Benodigdheden:

- Klimaatkamer, temperatuur 17 ^{0}C
- Luchtpomp
- 30 of 36 glazen bollen met een inhoud van 4 l
- 15 of 18 slangetjes voor transport O_2
- 15 of 18 plastic pipetten van 2 ml voor transport van O_2
- 72 l gefiltreerd zeewater (2 µm) voor larven
- 72 l gefiltreerd zeewater (2 µm) voor verversing
- Kaarsfilter (0,2 µm)
- Slang voor transport zeewater
- Slang voor transport kraanwater

3.1.4 Ouderdieren conditioneren:

De ouderdieren (broedstock) werden voor experiment 1 geconditioneerd zodat ze onder gecontroleerde omstandigheden konden paaien. Het conditioneren van de mosselen gebeurde in de hatchery, hierbij werd de broedstock op 17^{0}C gehouden en gevoerd met algen. De mosselen werden geconditioneerd omdat er dan waarschijnlijk een betere kwaliteit en een grotere hoeveelheid eicellen en zaadcellen geproduceerd wordt. Bij experiment 2 is er gebruikt gemaakt van ouderdieren die direct uit het veld kwamen. Het was toen tijd voor de mosselen om in het wild te gaan paaien dus zou het waarschijnlijk overbodig zijn om ze te conditioneren.

Benodigdheden:

- Klimaatkamer, temperatuur 17 ^{0}C
- Broedstock mosselen (25-100 ouderdieren)
- Algen als voer voor ouderdieren
- Luchtpomp
- Doorstoomsysteem met gefiltreerd zeewater (1 µm)
- Slang voor transport zeewater
- 1 plastic bak van min 10 l

3.1.5 Mosselen laten paaien en de bevruchting:

Nadat de mosselen voor een periode van 2 weken geconditioneerd werden konden ze blootgesteld worden aan wisselende watertemperaturen. Door de mosselen van warm (26 ^{0}C) naar koud (10 ^{0}C) en terug naar warm water (26 ^{0}C) te verplaatsen gingen ze paaien. De mosselen lieten eicellen en zaadcellen los in het water. De mannetjes en vrouwtjes konden op deze manier gescheiden worden en apart van elkaar worden bewaard. De vrouwtjes mosselen die de meeste eicellen produceerden werden gebruikt voor de bevruchting. Door de spermacellen en de eicellen bij elkaar te voegen in een maatbeker en het water in beweging te houden ontstond de bevruchting.

Benodigdheden:

- Klimaatkamer, temperatuur 17 ^{0}C
- Broedstock mosselen (25-50 ouderdieren)
- Totaal 40 liter gefiltreerd zeewater (1 µm)
- Slang voor transport zeewater
- Verwarmingselement
- Koud zeewater 5 ^{0}C
- 2 plastic bakken van min 10 l
- 50 kleine plastic bakjes
- Glazen bollen voor bevruchting
- 6 Maatbekers van 1 liter
- Zeef (48 µm)
- Fotobak
- Peroxide voor het schoonmaken van alle materialen
- 2 Monsterbakjes voor telling eicellen
- Microscoop
- Binoculair
- Lugol om de mossellarven te fixeren
- Meetpipet van min. 0,250 ml
- Meetpipet van min 10 ml
- Stokje met geperforeerde schijf

3.2 Uitvoering experimenten

3.2.1 Verdeling mossellarven:

Nadat de bevruchting had plaatsgevonden duurde het 48 uur voordat er een D-larve ontstond. Deze D-larven werden uit het water gefilterd met behulp van een zeef van 48 µm (figuur 3.3c). De larven werden in een maatbeker (figuur 3.3b) gedaan en aangevuld met gefiltreerd zeewater tot 3 liter. Het gefiltreerde zeewater met de larven is homogeen verdeeld door het gebruik van een stokje met geperforeerde schijf (figuur 3.3a). Hiervan is een monster genomen en een bekend volume geteld. Aan de hand van een berekening (voorbeeld formule in bijlage 4) was het totaal aantal larven bekend. Voor experiment 1 waren 600.000 larven nodig en voor experiment 2 waren dat 720.000 larven. Het berekende volume werd uit de 3 liter gehaald met behulp van een meetpipet.



A B C

Figuur 3.3: Foto's van de gebruikte materialen voor het verversen. A.) Stokje met geperforeerde schijf. Wordt gebruikt voor het mixen van de eicellen en zaadcellen voor bevruchting. Ook gebruikt voor het homogeniseren van de larven in de maatbeker. B.)De gebruikte maatbeker en het stokje met geperforeerde schijf. C.) De zeef van 48 µm. De zeef wordt in een fotobak gezet zodat de larven niet droogstaan tijdens het zeven.

<u>Benodigdheden:</u>

- Slang voor transport zeewater
- 6 Maatbekers van 1 liter
- Zeef (48 µm)
- Fotobak
- Peroxide voor het schoonmaken van alle materialen
- 2 Monsterbakjes voor telling van de larven
- Microscoop
- Binoculair
- Lugol om de mossellarven te fixeren
- Meetpipet van min. 0,250 ml
- Stokje met geperforeerde schijf
- Monsterbakje voor telling

3.2.2 Voeren van de larven

De algen werden 5 keer per week met de hand gevoerd (maatcilinder met het berekende volume) aan de mossellarven. Aan de hand van een telling met een telkamer werd de dichtheid van de algencultuur bepaald (zie bijlage 3). In de formule van bijlage 4 kon het gemiddelde van de telling ingevoerd worden om te bepalen welk volume van de algen aan de larven toegevoegd moest worden. De berekening werd gedaan met een rekenmachine en vervolgens in een Excel model ingevoerd.

Benodigdheden:

- Rekenmachine
- Algen (*Isochrysis galbana, Pavlova lutheri, Chaetoceros calcitrans* en *Chaetoceros gracilis*) in plastic zakken of glazen bollen/erlenmeyers
- 2 maatbekers van minimaal 500 ml
- Computer
- Computer programma Excel
- Meetpipet van min 2 ml
- Maatcilinder 10 ml
- Maatcilinder 50 ml
- Maatcilinder 100 ml

3.2.3 Verversen van de larven:

De mossellarven zijn 2 keer per week ververst. Als voorbereiding stonden er nieuwe glazen bollen gevuld met gefiltreerd zeewater klaar (zie figuur 3.4). De glazen bol met larven werd leeg gemaakt door het water over een filter (zeef) van 48 µm te laten stromen waar de larven op bleven liggen. De larven werden vanaf de zeef in een maatbeker gedaan in een volume van 200 tot 400 ml gefiltreerd zeewater. Het volume was afhankelijk van het aantal aanwezige larven. Uit de maatbeker werd een monster van 100 tot 400 µl gehaald voor analyse (telling en lengte meting). Na monstername uit de maatbeker werden de larven in de glazen bol gedaan die klaar stond. De glazen bollen en zeven werden na gebruik schoongemaakt met peroxide en nagespoeld met kraanwater.



Figuur 3.4: Foto van de glazen bollen gevuld met gefiltreerd zeewater die klaarstaan voor de verversing.

Benodigdheden:

- 15 of 18 glazen bollen met een inhoud van 4 liter (zijn al gevuld met zeewater)
- 72 l gefiltreerd zeewater (1 µm) om nieuwe bollen te vullen
- Kaarsfilter (0,2 µm)
- Slang voor transport zeewater
- Slang voor transport kraanwater
- 6 Maatbekers van 1 liter
- Zeef (48 µm)
- Fotobak
- Peroxide voor het schoonmaken van de materialen
- Stokje met geperforeerde schijf
- 20 Monsterbakjes voor lengte
- 3 Monsterbakjes voor telling
- Lugol om de larven te fixeren
- Meetpipet van min. 0,250 ml

3.2.4 Overleving en lengte mossellarven

De monitoring van de larven is gedaan aan de hand van tellingen (overleving) en het meten van de lengte van de larven. De monsters voor de monitoring zijn genomen op de dagen van verversing. Zoals hierboven vermeld staat werden de larven na het zeven per bol in een maatbeker gedaan van 200 tot 400 ml zeewater en worden er monsters genomen. Per maatbeker is er in triplo een monster genomen en geanalyseerd om de overleving/mortaliteit te bepalen. Er is lugol aan de monsters toegevoegd om de larven te fixeren. Naast de monsters voor de overleving werd er een extra monster genomen van 2 ml om de lengte van minimaal 20 larven te bepalen. De larven zijn gemonitord totdat de larven van één van de behandelingen overgingen tot metamorfose en een voet ontwikkelden. De larven wilden dan settelen en werden verplaatst naar de nursery.

Lengtebepaling

De lengte van de mossellarven is gemeten onder de binoculair met behulp van het computerprogramma Leica. Met dit computerprogramma kan een foto worden gemaakt. Op de foto kan met de muis aangegeven worden welke lengtes er gemeten moeten worden (zie figuur 3.5). De lengte van minimaal 20 mossellarven zijn per keer gemeten en in een spreadsheet geplaatst. Tijdens het begin en het eind van het experiment zijn er 50 larven gemeten zodat de resultaten nauwkeuriger waren.



Figuur 3.5: Bepaling van de lengte van mossellarven. De lengte van de larve werd gemeten door met de computermuis een lijn te trekken op een foto van een larve.

De larven zijn minimaal eens per week gemeten. Hieruit kan opgemaakt worden met welk algendieet de grootste groeisnelheid behaald wordt. Verder werd er ook eens per week gekeken naar de mortaliteit onder de larven.

Benodigdheden:

- 6 Maatbekers van 1 l
- Zeef (48 µm)
- Fotobak
- Peroxide voor het schoonmaken van alle materialen
- 20 Monsterbakjes voor lengte
- 3 Monsterbakjes voor telling
- Microscoop
- Binoculair
- Computer
- Computer programma Leica
- Computer programma Excel
- Computer programma Word
- Lugol om de larven te fixeren
- Meetpipet van min. 0,250 ml
- Lugol om de larven te fixeren

Bepaling overleving

De overleving van de mossellarven is bepaald door het aantal larven te tellen dat nog aanwezig is. Het verschil met de voorgaande tellingen is het aantal dode mossellarven en wat er overblijft is de overleving. Er is een telling in triplo per bol gedaan aan de hand van een bekend volume monster (0.1 of 0.2 ml). Door lugol toe te voegen aan het monster kleurden de levende larven geheel oranje. De dode larven waren doorzichtig of voor een klein deel oranje. Deze getallen zijn verwerkt in Excel zodat het percentage overleving bepaald kan worden.

Benodigdheden:

- 20 Monsterbakjes voor lengte
- 2 Monsterbakjes voor telling
- Binoculair
- Computer
- Computer programma Leica
- Computer programma Excel
- Computer programma Word
- Lugol om de larven te fixeren
- Meetpipet van min. 0,250 ml

3.2.5 Waarnemingen en statistische analyse:

De waarnemingen en metingen zijn schriftelijk bijgehouden en verwerkt in een spreadsheet in Excel. Er zijn tabellen gemaakt met gemiddelden van de behandelingen met standaarddeviatie. Aan de hand van deze gegevens is er een grafiek opgesteld en zijn er gegevens getransporteerd naar het programma SPSS. In Excel is de Fmax test (R.R. Sokal & F.J. Rohlf, 1995) uitgevoerd om te controleren of de gegevens homogeen zijn. Vervolgens is de Q-Q test (SPSS) uitgevoerd om te controleren dat de gegevens normaal verdeeld zijn. Na deze testen bleken de gegevens van beide experimenten juist om te testen met SPSS (Univariatie Analysis of Varaince). Hieruit bleekt of er significante verschillen zijn tussen de behandelingen.

Benodigdheden:

- Computer
- Computer programma Leica
- Computer programma Excel
- Computer programma SPSS
- Computer programma Word

4. Resultaten

In het hoofdstuk resultaten zijn alle waarnemingen weergegeven van de experimenten. De waarnemingen bestaan uit de groeisnelheid (toename van de schelplengte) en de overleving. Aan de hand van foto's en grafieken worden de waarnemingen per experiment beschreven. De foto's van de larven zijn bij dezelfde vergroting genomen en kunnen onderling vergeleken worden.

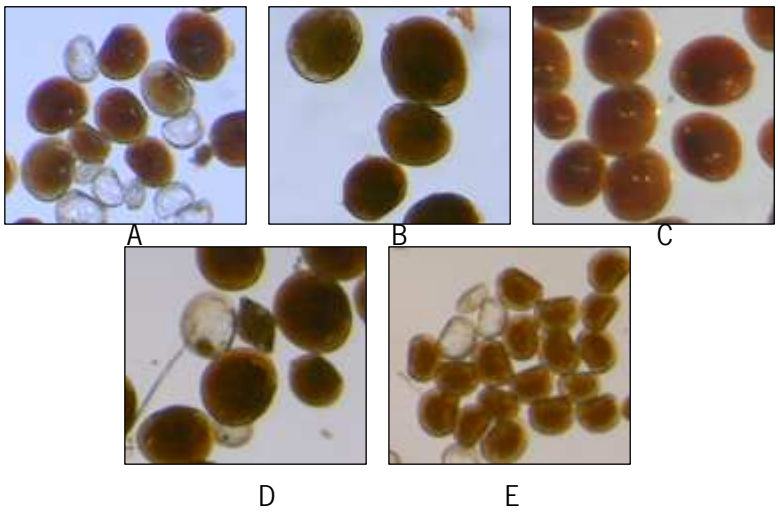
4.1 Experiment 1: Combinatie van algensoorten.

De larven waren tijdens de eerste 2 weken van experiment 1 niet met het blote oog waar te nemen in de waterkolom. Ze waren alleen zichtbaar op de zeef. Figuur 4.1 laat zien hoe groot de larven waren, 2 dagen na de bevruchting. De larven van alle behandelingen hadden bij de eerste meting een gemiddelde schelplengte van 106,5 ± 6,7 µm. De larven die in figuur 4.1 oranje gekleurd zijn, zijn de levende larven. De larven die leeg zijn en niet oranje gekleurd zijn dood.



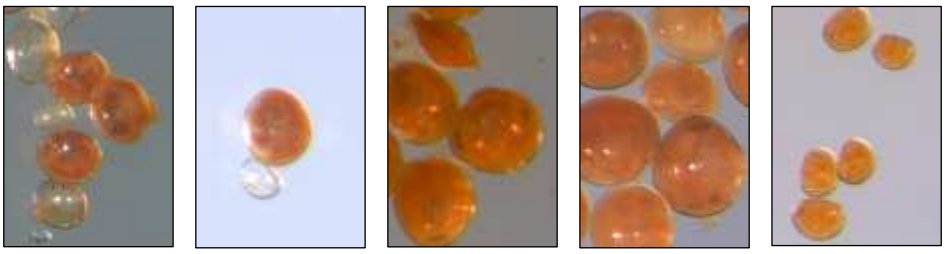
Figuur 4.1: Mossellarven 2 dagen na bevruchting, schelplengte ongeveer 100 µm

Bij meting 3 (14 dagen na bevruchting) waren er al duidelijke verschillen waar te nemen tussen de behandelingen met voer en de blanco. Figuur 4.2 laat de larven van de verschillende behandelingen zien. De larven van behandelingen 2,3, en 4 hadden de grootste schelplengte (figuur 4.2b, 4.2c en 4.2d). Deze mossellarven hadden 14 dagen na bevruchting al een gemiddelde schelplengte van 190,6 ± 6,6 µm. De grootste larven hadden een ovale vorm maar nog geen oogvlek. Dit waren dus veliger larven die zich net niet in het pediveliger stadium bevonden. De kleinere mossellarven hadden bij meting 3 nog maar een schelplengte tussen de 140 en 170 µm (figuur 4.2a en 4.2e). Dit waren duidelijk nog D-larven en nog niet zo ver ontwikkeld als de grotere larven. Verder laat figuur 4.2a zien dat de mortaliteit voornamelijk plaatsvindt bij de kleinere D-larven.



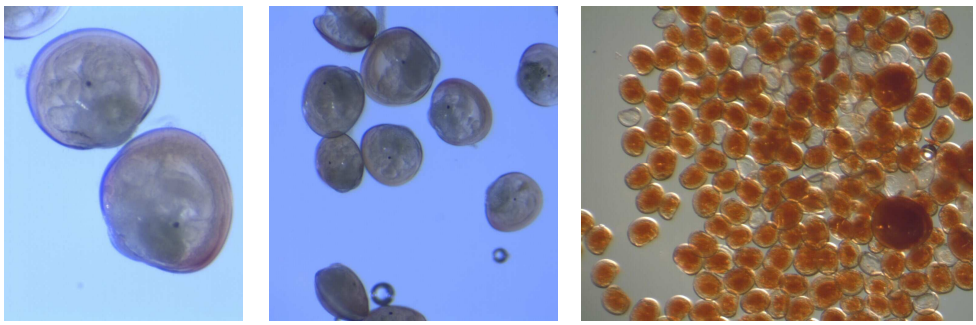
Figuur 4.2: Mossellarven 14 dagen na bevruchting. A) *Isochrysis + Chaetoceros gracilis* B) *Pavlova + Chaetoceros gracilis* C) *Isochrysis + Chaetoceros calcitrans* D) *Pavlova + Chaetoceros calcitrans* E) Blanco (geen voer.

Bij meting 4 (17 dagen na bevruchting) waren de verschillen tussen *Chaetoceros calcitrans* en *Chaetoceros gracilis* goed te zien (zie figuur 4.3). De larven van behandeling 3 (*Isochrysis + Chaetoceros calcitrans*) en 4 (*Pavlova + Chaetoceros calcitrans*), te zien op figuur 4.3c en 4.3d, waren groter dan de andere larven. Meer dan 50% van de larven had een oogvlek en waren op dat moment in het pediveliger stadium beland.



Figuur 4.3: Mossellarven 17 dagen na bevruchting. A) *Isochrysis + Chaetoceros gracilis* B) *Pavlova + Chaetoceros gracilis* C) *Isochrysis + Chaetoceros calcitrans* D) *Pavlova + Chaetoceros calcitrans* E) Blanco (geen voer.

Aan het einde van het experiment (24 dagen na bevruchting) begonnen de larven van behandeling 3 (*Isochrysis + Chaetoceros calcitrans*) en 4 (*Pavlova + Chaetoceros calcitrans*) al te settelen waardoor ze op de bodem lagen. Figuur 4.4 laat het verschil zien in schelplengte van behandeling 3 en 5 (blanco). De larven van figuur 4.4b waren bijna niet gegroeid en de ontwikkeling had stilgestaan omdat ze geen voedsel kregen. De larven hebben geen ovale vorm, geen oogvlek en hebben nog geen voet ontwikkeld.

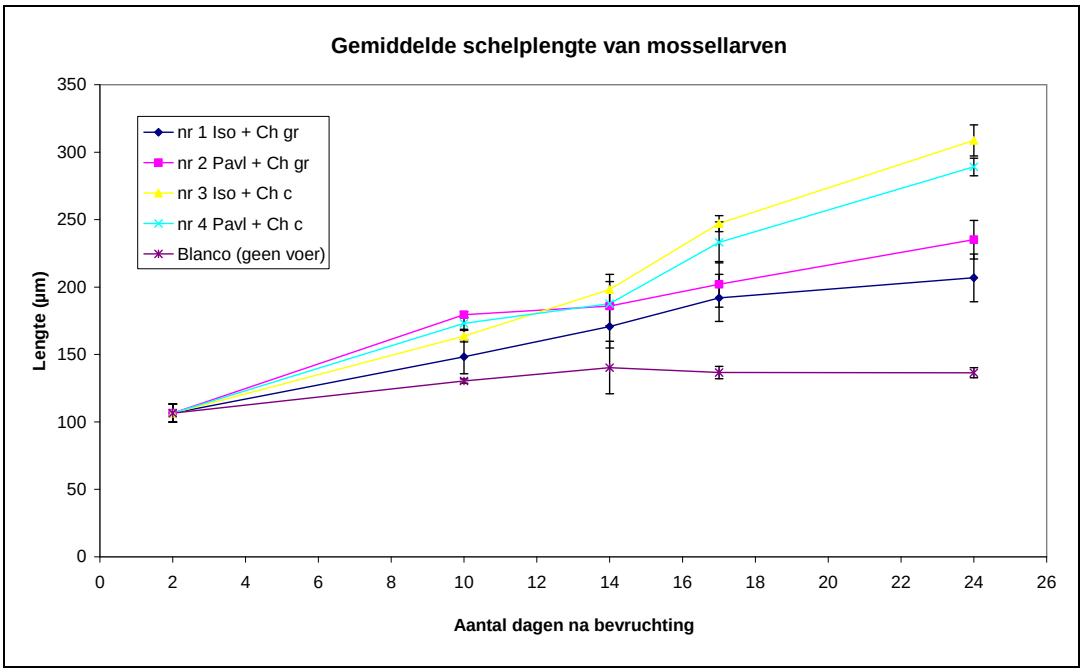


Figuur 4.4: Mossellarven 24 dagen na bevruchting. A) + B) behandeling 3 (Isochrysis + Chaetoceros calcitrans) Duidelijk de oogvlek waar te nemen. C) behandeling 5 (Blanco = geen voer)

4.1.1 Groeisnelheid

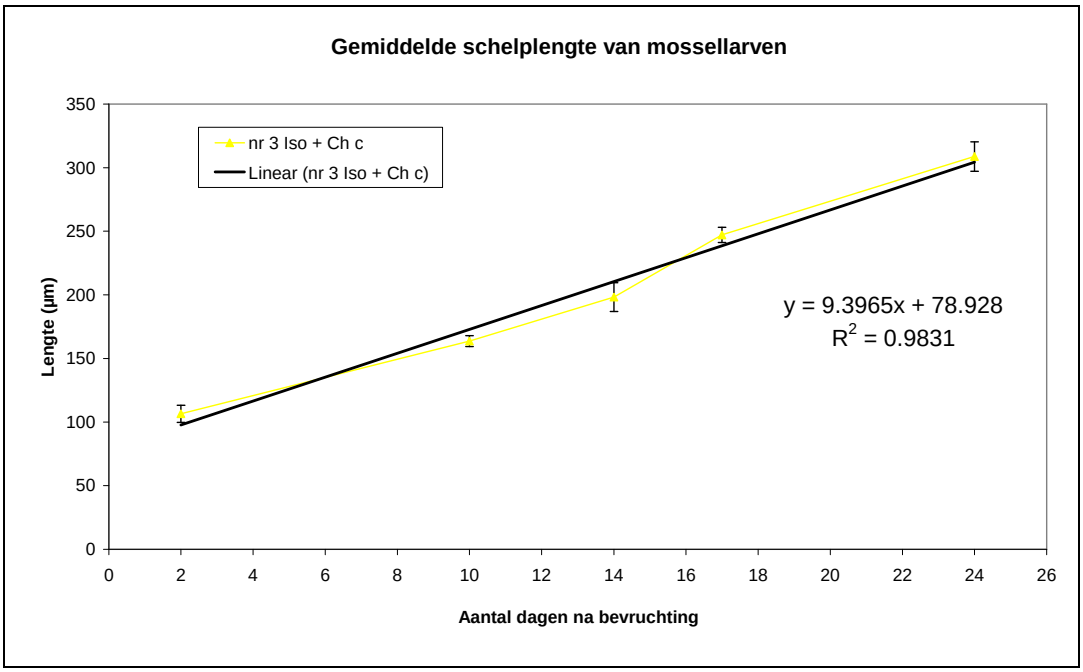
Figuur 4.5 laat de groeisnelheid van de mossellarven zien bij de behandelingen met verschillende algensoorten. Het experiment is in 24 dagen uitgevoerd. In deze tijd zijn de grootste mossellarven van behandeling 3 (*Isochrysis + Chaetoceros calcitrans*) gegroeid tot 308,76 ± 11,55 µm. De larven hadden op dat moment de metamorfose doorstaan en waren aan het settelen. Hiermee was het einde van het experiment bereikt.

De mossellarven zijn bij alle behandelingen gegroeid. De blanco opstelling met larven die geen voer kregen zijn alleen in het beginstadium gegroeid. Dit kwam waarschijnlijk door de energiereserves die aanwezig waren in de eicel. De larven hadden zich niet verder ontwikkeld dan een D-larve maar hadden het experiment wel overleefd.



Figuur 4.5: De gemiddelde schelplengte van hatchery mossellarven *(Mytilus edulis)*, opgekweekt met een algendieet bestaande uit 2 verschillende soorten en een algenconcentratie van 12.500 cellen/ml/dag per algensoort. Sd is aangegeven, n=3.

De statistische analyse wijst uit dat er een significant verschil bestaat tussen de behandelingen *Chaetoceros gracilis* en *Chaetoceros calcitrans* (p<0,01). Er is geen significant verschil tussen de behandelingen *Pavlova + Chaetoceros calcitrans* en *Isochrysis + Chaetoceros calcitrans* (p=0,841). Tussen de andere behandelingen is er onderling wel een significant verschil (p=0 en p=0,001). Er is tussen alle dagen een significant verschil (p=0) gemeten. Dit houdt in dat de larven bij iedere metingen voldoende in lengte zijn toegenomen om een significant verschil waar te nemen. In bijlage 5 zijn de resultaten van de statistische analyses te vinden.

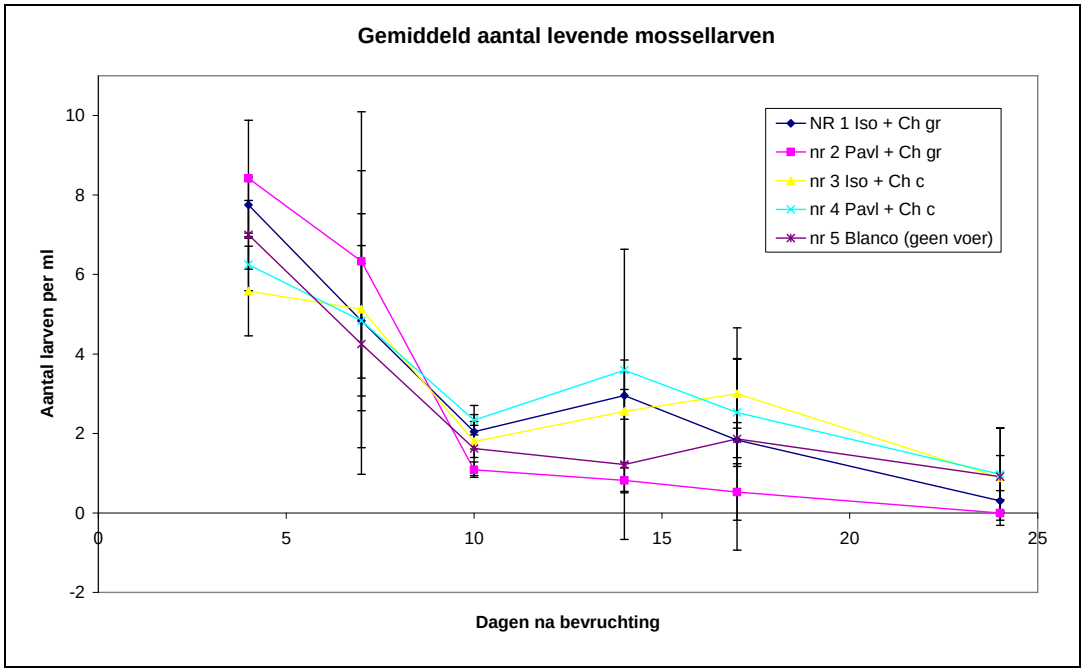


Figuur 4.6: De gemiddelde schelplengte van hatchery mossellarven *(Mytilus edulis)*, opgekweekt met een algendieet bestaande uit *Isochrysis + Chaetoceros calcitrans* en een algenconcentratie van 12.500 cellen/ml/dag per algensoort. Sd is aangegeven, n=3.

De larven van behandeling 3 (*Isochrysis+ Chaetoceros calcitrans*) hadden tijdens het experiment een groeisnelheid van 9,4 µm/dag (figuur 4.6). Dit was de hoogste groeisnelheid die bereikt is tijdens experiment 1.

4.1.2 Overleving

De overleving van de mossellarven staat vermeld in figuur 4.7. De grafiek laat zien dat de overleving afneemt wanneer de larven in lengte toenemen en ouder worden. Tijden het opstellen van de behandeling is de larvendichtheid bepaald. Deze zou ongeveer 10 larven/ml moeten zijn. Uit de meting van 4 dagen na bevruchting blijkt dat gemiddeld 7,1 ± 1,1 larven/ml aanwezig waren in het begin van het experiment. Bij de laatste meting zijn er nog gemiddeld 0,6 ± 0,4 larven/ml over. De grafiek (figuur 4.7) laat zien dat er mortaliteit optreedt tijdens alle stadia van de larven.

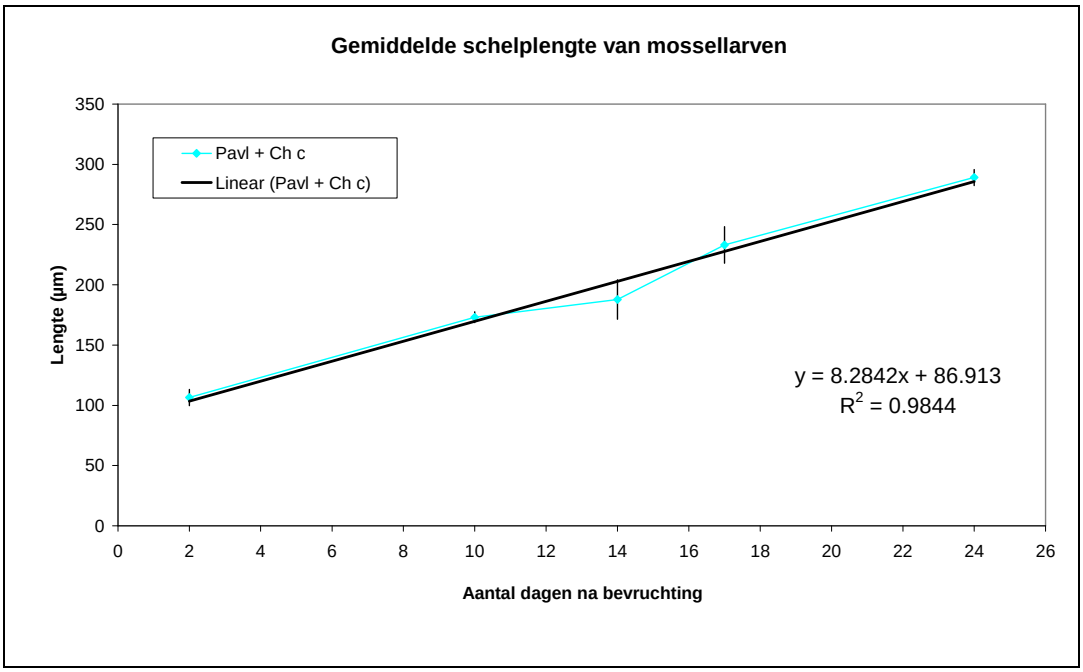


Figuur 4.7: De gemiddelde overleving van hatchery mossellarven (*Mytilus edulis*), gevoerd met een algendieet bestaande uit 2 verschillende soorten en een algenconcentratie van 12.500 cellen/ml/dag per algensoort. Sd is aangegeven, n=3.

Uit de statistische analyse blijkt dat er geen significant verschil bestaat tussen alle behandelingen (p=1). Er bestaat wel een significant verschil tussen bepaalde dagen waarop gemeten is. Meting 1 (4 dagen na bevruchting) verschilt significant van alle andere metingen (p<0,032). Dit houdt in dat het aantal larven dat dood gaat significant verschilt met de eerste meting. In bijlage 5 zijn de resultaten van de statistische analyses te vinden.

4.2 Experiment 2: Verschillende algenconcentraties

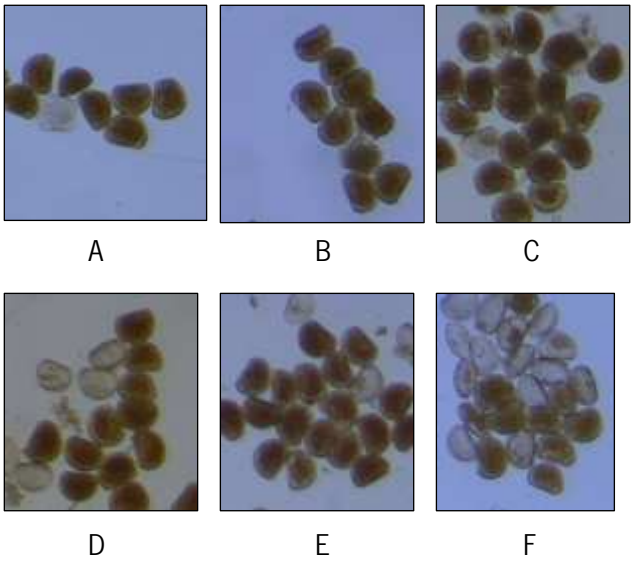
Experiment 2 was ingezet met de algencombinatie *Pavlova + Chaetoceros calcitrans*. Uit experiment 1 was gebleken dat de combinatie van *Pavlova* of *Isochrysis* met *Chaetoceros calcitrans* optimaal was voor de groei van mossellarven. De algencultuur van *Pavlova* was op het moment van experiment 2 van betere kwaliteit dan *Isochrysis*. Daarom was er gekozen om *Pavlova* als flagellaat te gebruiken. De groeisnelheid van behandeling 4 (*Pavlova + Chaetoceros calcitrans*) was tijdens het eerste experiment 8,3 µm/dag (figuur 4.8).



Figuur 4.8: De gemiddelde schelplengte van hatchery mossellarven *(Mytilus edulis)*, opgekweekt met een algendieet bestaande uit *Pavlova + Chaetoceros calcitrans* en een algenconcentratie van 12.500 cellen/ml/dag per algensoort. Sd is aangegeven, n=3.

Experiment 2 richtte zich op het behalen van de optimale groeisnelheid door verschillende algenconcentraties te testen. De larven van experiment 2 hadden bij de eerste meting (2 dagen na bevruchting) ongeveer eenzelfde afmeting als bij experiment 1, namelijk een gemiddelde lengte van 102,8 ± 5,0 µm. Bij meting 2 (4 dagen na de bevruchting) was er weinig toename in schelplengte. De mossellarven waren gemiddeld 108,6 ± 2,6 µm groot. Er was een minimale groei waar te nemen bij de larven tot en met meting 4 (10 dagen na bevruchting).

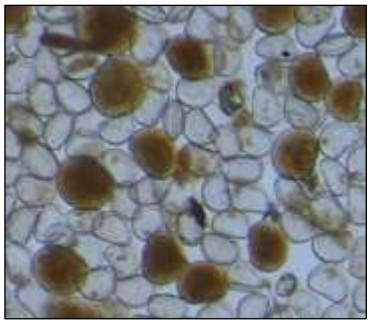
De mosselen van alle behandelingen hadden bij meting 4 (10 dagen na bevruchting) ongeveer dezelfde schelplengte. Figuur 4.10 laat de mossellarven zien die gemeten zijn 10 dagen na bevruchting. De larven zijn nog niet verder ontwikkeld, zijn nog steeds D-larven en zijn ongeveer 113 µm groot. De mortaliteit is bij meting 4 toegenomen. Figuur 4.8f laat een groot percentage dode larven zien.



Figuur 4.9: Mossellarven 10 dagen na bevruchting. A) Behandeling 1 (25.000-25.000 cellen/ml/dag) B) Behandeling 2 (25.000-50.000 cellen/ml/dag) C) Behandeling 3 (50.000-100.000 cellen/ml/dag) D) Behandeling 4 (25.000-200.000 cellen/ml/dag) E) Behandeling 5 (50.000-400.000 cellen/ml/dag) F) Behandeling 6 (100.000-800.000 cellen/ml/dag) .De larven zijn gevoerd met *Pavlova + Chaetoceros calcitrans* in een verhouding van 1:1.

De groeisnelheid van de larven werd groter bij meting 5 (18 dagen na bevruchting). De grootste larven, behandeling 1 (25.000 – 25.000 cellen/ml/dag), hadden toen een gemiddelde schellengte van 139,4 ± 7,9 µm. De kleinste larven, behandeling 6 (100.000 – 800.000 cellen/ml/dag), hadden op dat moment een gemiddelde schelplengte hadden van 114,0 ± 1,2 µm.

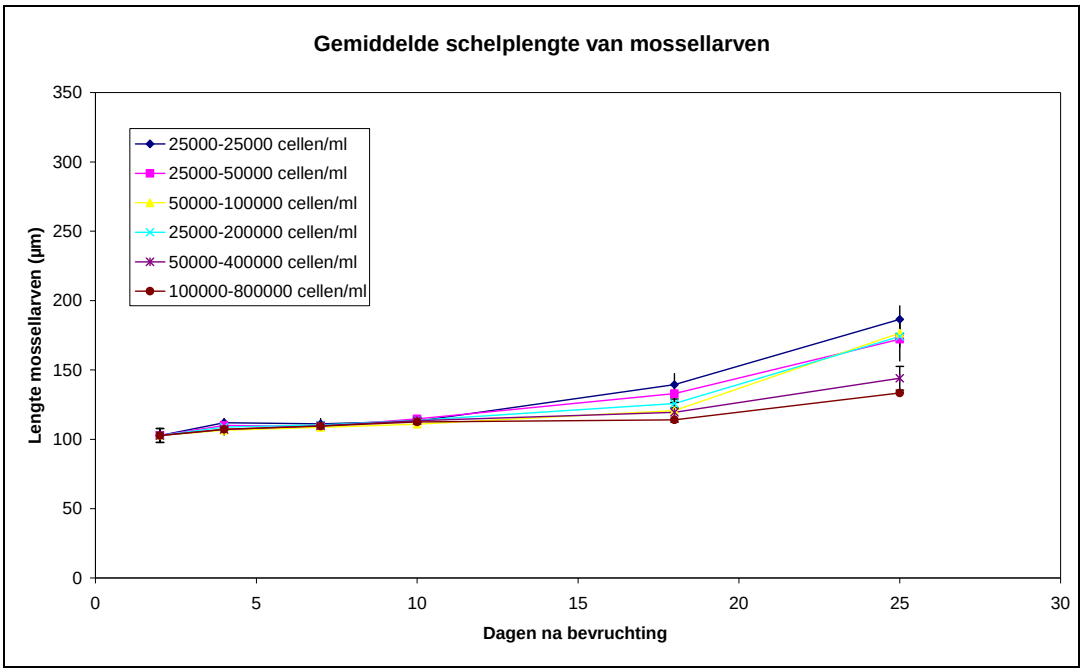
De mossellarven bleven erg klein en niet ontwikkeld vergeleken met experiment 1. Na 24 dagen waren er nog geen larven in het pediveliger stadium beland en steeg de mortaliteit (zie figuur 4.10). Aan de hand van tellingen bleek dat de kwaliteit van de algencultuur sterk achteruit ging. Het algenwater werd helder wat duidt op kwaliteitsvermindering en een teruglopende concentratie. Daarom was er besloten om het experiment voortijdig af te breken . Dit was eerder dan gepland omdat het experiment zou doorlopen totdat er larven zouden gaan settelen.



Figuur 4.10: Mossellarven 25 dagen na bevruchting van behandeling 3 (50.000-100.000 cellen/ml/dag)

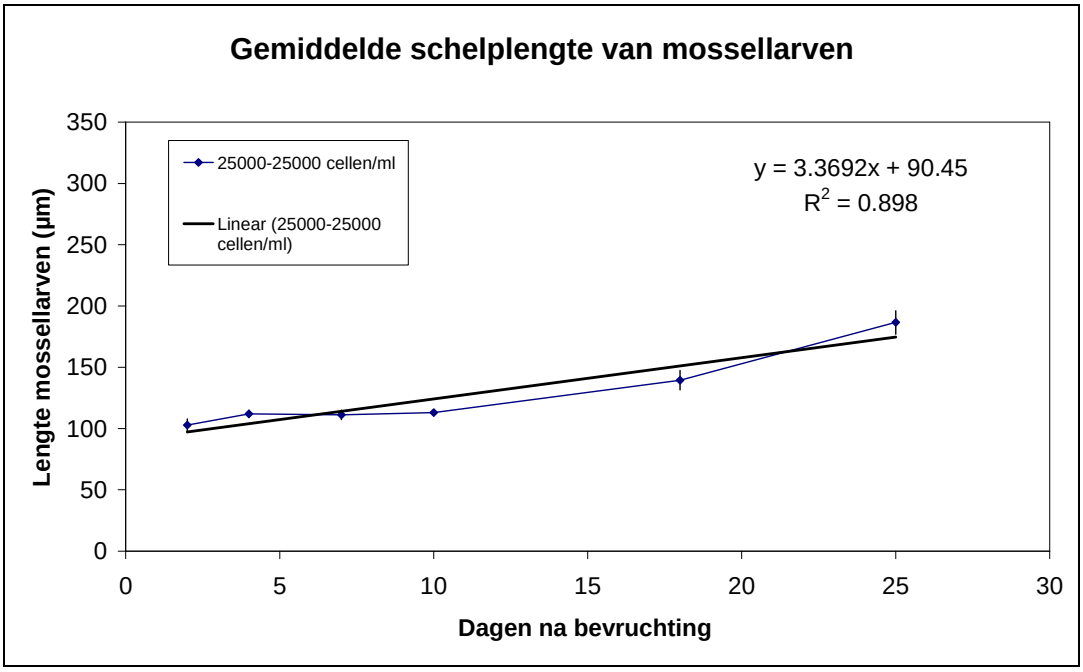
4.2.1 Groeisnelheid

Figuur 4.11 laat zien hoe de mossellarven zijn toegenomen in schelplengte tijdens experiment 2. Als referentie is gebruik gemaakt van een algenconcentratie van 25.000 cellen/ml/dag van de algencombinatie *Pavlova + Chaetoceros calcitrans*. Het experiment is uitgevoerd in 25 dagen. In deze tijd waren de grootste mossellarven, behandeling 1 (25.000-25.000 cellen/ml/dag), gemiddeld 186,6 ± 9,6 µm. De kleinste larven, behandeling 6 (100.000-800.000 cellen/ml/dag), waren gemiddeld 133,5 ± 1,1 µm. De groeisnelheid neemt 10 dagen na de bevruchting pas toe. Gedurende de tijd daarvoor bleef de schelplengte gemiddeld rond de 110 µm. De veliger larven hadden de vorm van een D-larve en hadden nog geen oogvlek of voet ontwikkeld.



Figuur 4.11: De gemiddelde schelplengte van hatchery mossellarven (*Mytilus edulis*), opgekweekt met een algendieet bestaande uit *Pavlova lutheri* en *Chaetoceros calcitrans* en verschillende algenconcentraties. Sd is aangegeven, n=3.

Uit de statistische analyse blijkt dat behandelingen 1,2,3 en 4 (begin 25.000 of 50.000 – eind 25.000 t/m 200.000) significant verschillen met behandeling 5 (begin 50.000- eind 400.000 cellen/ml) en behandeling 6 (begin 100.000- eind 800.000 cellen/ml) ($p<0,017$). Verder is er tussen de dagen geen significant verschil ($p>0,275$) gevonden tussen dagen 4 en7 en dagen 7 en 10 onderling na bevruchting. De andere dagen verschillen wel significant ($p<0,039$). In bijlage 6 zijn de resultaten van de statistische analyses te vinden.



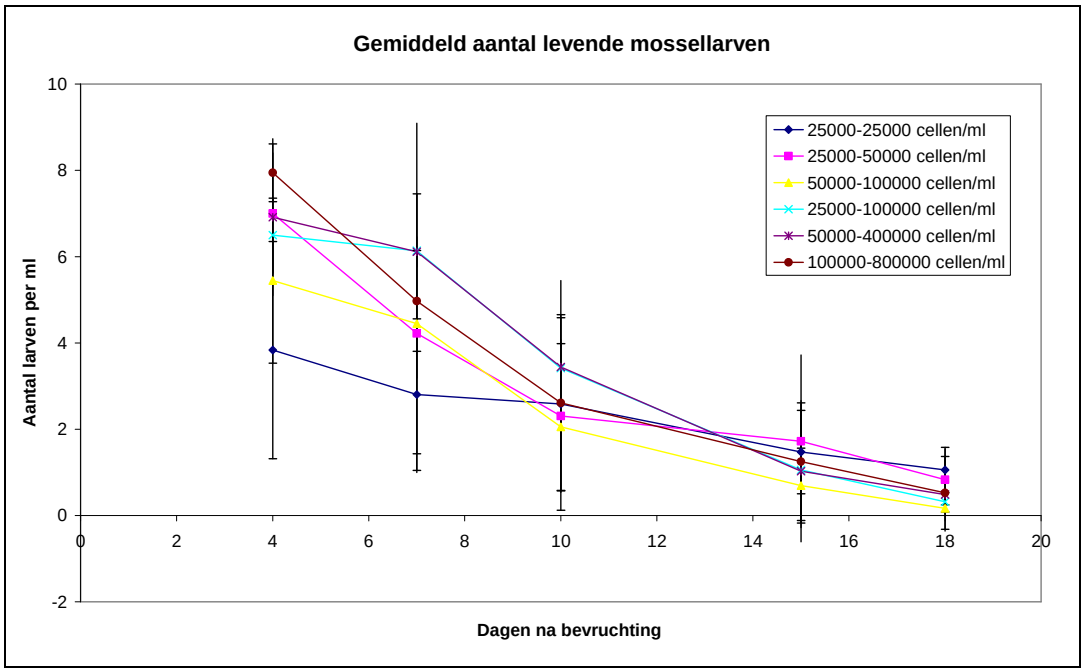
Figuur 4.12: De gemiddelde schelplengte van hatchery mossellarven *(Mytilus edulis)*, opgekweekt met een algendieet bestaande uit *Isochrysis + Chaetoceros calcitrans* en een algenconcentratie van 12.500 cellen/ml/dag per algensoort. Sd is aangegeven, n=3.

Figuur 4.12 laat de hoogste gemiddelde groeisnelheid zien die bereikt is, namelijk 3,36 µm/dag. De groeisnelheid neemt pas 10 dagen na bevruchting toe. Voor die tijd stagneert de groei, de lijn loopt dan bijna horizontaal.

4.2.2 Overleving

Ondanks de lage groeisnelheid bij de larven van experiment 2, vergeleken met experiment 1, is de overleving nagenoeg gelijk. De larvendichtheid tijdens het begin van het experiment was ongeveer 6,3 ± 1,4larven/ml (4 dagen na bevruchting). Deze zou ook bij experiment 2 ongeveer 10 larven /ml moeten zijn. De overleving aan het einde van experiment 2 was van alle behandelingen gemiddeld 0,5 ± 0,3 larven/ml.

Figuur 4.13 laat zien dat het verloop van overleving een zelfde beeld geeft als experiment 1. Behandeling 1 (25.000-25.000 cellen/ml) had de laagste larvenconcentratie aan het begin van het experiment, namelijk 3,8 ± 2,5 larven/ml. Aan het einde van het experiment was de overleving van behandeling 1 het hoogst. Er waren nog 1,0 ± 0,5 larven/ml over. Bij behandeling 3 (50.000-100.000 cellen/ml) en 4 (25.000-100.000 cellen/ml) waren de minste larven over, gemiddeld 0,2 larven/ml.



Figuur 4.13: De gemiddelde overleving van hatchery mossellarven (*Mytilus edulis*), gevoerd met een algendieet bestaande uit *Pavlova lutheri* en *Chaetoceros gracilis* en verschillende algenconcentraties. Sd is aangegeven, n=3.

Uit de statistische analyse blijkt dat er geen significant verschil bestaat tussen alle behandelingen (p>0,632). In bijlage 6 zijn de resultaten van de statistische analyses te vinden.

5. Discussie

De kwaliteit van de algencultuur was van groot belang tijdens de twee experimenten. De experimenten konden alleen plaatsvinden met goede kwaliteit algencultures. De kwaliteit van de algencultures werd bepaald aan de hand van tellingen en op het zicht. Uit de tellingen kon de concentratie cellen per ml bepaald worden. Door om de dag te tellen kon het verloop van de groei van de algen gevolgd worden. Op het moment dat de concentratie verminderde was de algencultuur aan het instorten. De algencultuur groeit in fases. De laatste fase voordat de cultuur instort is de stationaire fase. Deze duurt bij flagellaten lang en bij diatomeeën juist erg kort. Als de cultuur instort zou de volgende, nieuwe, algencultuur al klaar moeten staan voor gebruik. Dit was tijdens experiment 2 niet het geval. Verder is de kwaliteit van de algencultures op het zicht bepaald. Bij het teruglopen van kleur of het helder worden van het algenwater werd aangenomen dat de kwaliteit achteruit ging. Het is niet nauwkeurig om op deze manier de kwaliteit van de algencultures te bepalen. Er was nog een optie om het vetzuurgehalte te laten bepalen. Deze bepaling zou 3 maanden in beslag nemen en de uitslag zou er dan pas na de experimenten zijn.

De kwaliteit van de larven moet voor de experimenten ook optimaal zijn, net als de algen. Als het experiment met kwalitatief minder goede larven wordt ingezet is het niet mogelijk om een optimaal algendieet te bepalen. De kwaliteit van de larven kan worden bepaald aan de hand van verschillende factoren, zoals beschreven in paragraaf 2.4 (factoren die de groei beïnvloeden van mossellarven). Bij experiment 2 werd er gebruik gemaakt van ouderdieren die niet geconditioneerd waren. Waarschijnlijk waren ze door het veelvuldige transport en het niet optimaal voeren niet in de juiste conditie om te paaien. Door de temperatuursschok hebben ze wel gepaaid maar was het aantal ontstane larven minder dan bij geconditioneerd ouderdieren. Na het paaien zijn er een aantal ouderdieren opengemaakt om de conditie te bepalen. Het bleek dat de mosselen erg mager waren. Er zat weinig vis in. De larven van een experiment dat parallel liep met experiment 2, met dezelfde batch larven, hadden een overleving van 0%.

Om de overleving van de larven te bepalen tijdens de experimenten werd er gebruik gemaakt van een cilinder met een telraam op de bodem. Door de larven te tellen van een bekend volume kan het totaal aantal larven dat nog aanwezig is bepaald worden. Tijdens experiment 1 zijn verschillende volumes gebruikt om het juiste volume voor de telling te bepalen. Uiteindelijk bleek dit een monster van 200 µl te zijn uit een volume van 200 ml (waar alle larven in zaten). Na het homogeniseren van het water waar de larven in zaten zou het een nauwkeurig beeld moeten geven van de overleving. Helaas is gebleken dat het niet nauwkeurig is en dat er waarschijnlijk een groter volume nodig is voor de telling. Er zijn een aantal keren 0 larven geteld, terwijl er toch overleving bleek te zijn aan het einde van het experiment.

Bij het verversen van de larven werd er gebruik gemaakt van een zelfgemaakte zeef. Na het veelvuldig gebruiken van de zeef ontstonden er openingen waar de larven tussen konden gaan zitten. Hierdoor is er een kans dat niet alle larven weer terug in de glazenbol komen waardoor het aantal larven afneemt. Ook is het mogelijk dat, tijdens het overschenken van de larven vanaf de zeef in de maatbeker, larven achterblijven op de zeef.

Verder werden alle larven bij de verversing weer terug in een bol gedaan. Er werd hierbij geen onderscheid gemaakt tussen de dode en levende larven. Er is niet duidelijk of de dode larven invloed hebben op de overleving van de nog levende larven.

De algenconcentratie die gevoerd wordt aan de larven is afhankelijk van de larvendichtheid. Tijdens het BLUE SEED project is er afgesproken dat er een larvendichtheid van 10 larven/ml gehanteerd wordt en een algenconcentratie van 25.000 cellen/ml gevoerd wordt. Zoals hierboven beschreven staat gaan er een bepaald aantal larven verloren. Dit zou toenemen wanneer er voor de telling een groter monster genomen zou moeten worden. Dit alles draagt er aan bij dat de larvendichtheid niet meer klopt en er eigenlijk een andere algenconcentratie gevoerd zou moeten worden.

De mortaliteit onder larven kan door verschillende factoren veroorzaakt worden, zie paragraaf 2.4 (factoren die de groei beïnvloeden van mossellarven). Tijdens de experimenten kan er mogelijk een besmetting plaats hebben gevonden vanuit de nursery. Wegens ruimtegebrek stond de nursery in dezelfde klimaatkamer als de hatchery. Doordat de nursery gevoerd werd met algen die buiten gekweekt werden is er een grotere kans op besmetting. Door opspattend water en luchtcirculatie kunnen protozoa bij de larven terecht komen. De protozoa gebruiken de larven als voedsel waardoor de mortaliteit toeneemt.

De larven van experiment 2 groeiden niet goed. De larven waren na 24 dagen nog steeds in het veliger stadium en hadden duidelijk de vorm van een D-larve. Volgens Bayne (1976) zouden de veliger larven van 120 tot 250 µm moeten groeien. De larven van experiment 2 waren maximaal 186,6 ± 9,6 µm. Waarschijnlijk komt de verminderde groei door de slechte kwaliteit algen of larven.

Volgens Sprung (1984) vindt er een efficiënte groei van mossellarven plaats bij een opname van 60 – 70% van het eigengewicht per dag. De larve weegt in het begin 0,1 mg en tijdens het eindstadium 1 mg (Bayne, 1976). Onderstaand tabel geeft het aantal algen/ml weer aan de hand van berekening van het drooggewicht (DW). De algenconcentraties van de combinatie van de flagellaten en diatomeeën is minimaal 7.000 cellen/ml en maximaal 36.300 cellen/ml voor larven in het beginstadium. Tijdens experiment 1 is er gevoerd met een algenconcentratie van 25.000 cellen/ml. Dit komt gemiddeld ongeveer overeen met de onderstaande berekening. Tijdens experiment 2 is er gevoerd met verschillende concentraties, deze waren hoofdzakelijk hoger dan de concentraties berekend in tabel 5.1.

Tabel: 5.1 Berekeningen met DW van de verschillende algensoorten

Algensoort	**DW (µg/10^6 cellen)**	**Algen voor 10 larven/ml (cellen/ml)**	**50 % nodig**
Isochrysis galbana	$30,5*10^3$	19.672	9.836
Pavlova lutheri	$102,3*10^3$	5.865	2.933
Chaetoceros calcitrans	$11,3*10^3$	53.097	26.548
Chaetoceros gracilis	$74,8*10^3$	8.021	4.011

De voedingsratio wordt verlaagt bij een hogere celconcentratie dan 200.000 cellen/ml. Dit komt overeen met de gegevens van experiment 2. Uit de grafiek (figuur 4.11) is af te lezen dat de larven die minder dan 200.000 cellen/ml/dag gevoerd krijgen harder groeien dan de larven die meer gevoerd krijgen. Het blijkt uit de literatuur niet duidelijk of dit afhankelijk is van de soort algen en het drooggewicht van de algen.

Volgens experiment 2 zijn er de grootste larven bij de behandeling met de algenconcentratie 25.000 cellen/ml/dag bij een larvendichtheid van 1,0 ± 0,5 larven/ml. Dit spreekt de literatuur tegen. Bayne (1976) heeft geschreven dat er een optimale groei voor mossellarven is bij 100 cellen/ml/dag voor een larvendichtheid van 3-10 larven/ml. Jespersen & Olsen (1982) vonden een optimale groei bij een algenconcentratie van 40.000-50.000 cellen/ml/dag maar dan voor een larvendichtheid van 0,1-0,2 larven/ml. De groei en mortaliteit kan dus ook afhankelijk zijn van de larvendichtheid. Ook bestaat er een mogelijkheid dat er groeivertragende stoffen in de algencultures aanwezig waren.

De optimale groeisnelheid van de schelp van mossellarven is volgens Sprung (1984) 11,8 µm/dag bij een temperatuur van 18 ^{0}C. De optimale groeisnelheid die tijdens deze experimenten is behaald staat vermeld in figuur 4.6 en is 9,4 µm/dag bij een temperatuur van 17 ^{0}C.

Het verschil in voedingswaarde tussen *Chaetoceros calcitrans* en *Chaetoceros gracilis* bestaat uit het verschil in vetzuren. *Chaetoceros calcitrans* bevat meer van de juiste vetzuren EPA en DHA voor de groei van mossellarven. Dit is terug te vinden in de resultaten van experiment 2. De larven die gevoerd werden met *Chaetoceros calcitrans* hadden een hogere groeisnelheid.

6. Conclusie

De hoofdvraag van de experimenten was:

Wat is het optimale algendieet, d.w.z. welke combinatie van algensoorten en de algendichtheid, van de algensoorten *Isochrysis galbana, Pavlova lutheri, Chaetoceros calcitrans* en *Chaetoceros gracilis* voor een optimale groei en overleving van mossellarven (*Mytilus edulis*) van verschillende leeftijden binnen een hatchery?

Uit de experimenten is gebleken dat mossellarven (*Mytilus edulis*) een optimale groei kennen bij het algendieet *Isochrysis* of *Pavlova* in combinatie met *Chaetoceros calcitrans* en een algenconcentratie van 25.000 cellen/ml/dag.

Voor de optimale* algenconcentratie blijkt uit de statistische analyse van experiment 2 dat behandelingen 1,2,3 en 4 (begin 25.000 of 50.000 – eind 25.000 t/m 200.000) significant verschillen met behandeling 5 (begin 50.000- eind 400.000 cellen/ml) en behandeling 6 (begin 100.000- eind 800.000 cellen/ml) ($p<0,017$). Dit houdt in dat de mossellarven het beste gevoerd kunnen worden met een algenconcentratie van begin 25.000 of 50.000 cellen/ml en eind 25.000 t/m 200.000 cellen/ml van de algencombinatie *Pavlova + Chaetoceros calcitrans*. De behandelingen 1,2,3 en 4 verschilden onderling niet significant.

*de omstandigheden waren bij experiment 2 niet optimaal.

Mossellarven groeien goed bij een algendieet dat voor 50% bestaat uit diatomeeën en voor 50% uit flagellaten. Uit het experiment blijkt dat de diatomeeën binnen het dieet belangrijk zijn voor de groeisnelheid. Er bestond namelijk geen significant verschil tussen de flagellaten. De optimale groei bij experiment 1 is 9,4 µm/dag bij een temperatuur van 17 ^{0}C. Dit is dus afhankelijk van *Chaetoceros calcitrans*. De grootste larven waren na 24 dagen 308,76 ± 11,55 µm. De blanco behandeling (geen voer) is ook nog toegenomen in lengte, tot maximaal 136,5 ± 3,8 µm. De mortaliteit bij de blanco opstelling was gelijk aan die van de larven die wel gevoerd werden

Voor de overleving van de mossellarven is geen significant verschil gevonden. Dit houdt in dat bij alle behandelingen met verschillende combinaties van algen de sterfte ongeveer gelijk was. De sterfte was dus niet afhankelijk van de algencombinaties die gevoerd werden.

Experiment 2 was ingezet met de algencombinatie *Pavlova + Chaetoceros calcitrans*. Uit experiment 1 was gebleken dat de combinatie van *Pavlova* of *Isochrysis* met *Chaetoceros calcitrans* optimaal was voor de groei van mossellarven. De algencultuur van *Pavlova* was op het moment van experiment 2 van betere kwaliteit dan *Isochrysis*. Daarom was er gekozen om *Pavlova* als flagellaat te gebruiken. De groeisnelheid van behandeling 4 (*Pavlova + Chaetoceros calcitrans*) was tijdens het eerste experiment 8,3 µm/dag (figuur 4.8).

De conclusie van experiment 2 is gebaseerd op de metingen die gedaan zijn aan de hand van wisselende algenconcentraties. Het blijkt dat de behoefte aan algen van larven die groeien niet toe neemt (25.000 cellen/ml/dag) of toeneemt tot een maximum van 200.000 cellen/ml/dag. De hoogste groeisnelheid (3,4 µm/dag) van experiment 2 werd bereikt met 25.000 cellen/ml/dag. Dit was lager dan dezelfde algenconcentratie van *Pavlova + Chaetoceros* calcitrans bij experiment 1. De grootste larven van experiment 2 waren na 25 dagen 139,4 ± 7,9 µm. De 2 behandelingen met een te hoge algenconcentratie hadden een hoge mortaliteit en verschilden significant van de andere behandelingen.

7. Aanbevelingen

- Waarschijnlijk is het beter om de ouderdieren (broedstock) te conditioneren voordat ze gebruikt worden om te paaien. De larven, afkomstig van de geconditioneerde ouderdieren, hadden tijdens dit experiment een hogere groeisnelheid. Door het conditioneren zijn de ouderdieren in betere conditie.

- Er zouden experimenten uitgevoerd kunnen worden om te testen of de verhouding tussen diatomeeën en flagellaten ook invloed heeft op de groeisnelheid en de overleving van mossellarven. Verder zou er ook gekeken moeten worden of de vraag naar andere combinaties van algen tijdens de groei veranderd.

- Tijdens experimenten zou de drooggewichten en asgewichten van de algen gemonitord moeten worden op de dagen dat de algenconcentratie bepaald wordt. Zo is het mogelijk om op snelle wijze de kwaliteit van de algen te monitoren.

- Om besmetting van de larven te voorkomen zou de nursery in een andere ruimte uitgevoerd moeten worden zodat de besmetting van larven met protozoa zo klein mogelijk is.

- Er zouden protocollen geschreven kunnen worden voor de verversing van larven zodat er geen larven verloren gaan tijdens het verversen. Of eventueel nieuwe zeven gemaakt kunnen worden waarbij er geen larven verloren gaan.

- Een extra stock cultuur van de algen op voorraad hebben zodat er altijd algen aanwezig zijn als er wat mis gaat met de cultures. Door omstandigheden waren er tijdens experiment 2 geen juiste algen van goede kwaliteit aanwezig om nieuwe cultures te starten.

- Een vervolg onderzoek zou opgesteld kunnen worden om de optimale larvendichtheid te bepalen. De dichtheden die in de literatuur gevonden zijn komen niet allemaal overeen met de 10 larven/ml. Door verschillende larvendichtheden te hanteren met hetzelfde voedselaanbod per larve kan er gekeken worden of de dichtheid invloed heeft op de overleving.

- Proberen om de kweek van mossellarven op te schalen. Misschien hebben het volume en de omvang van het experiment invloed op de nauwkeurigheid van de experimenten. In het wild kan 99% mortaliteit optreden. Tijdens een experiment is dit erg veel, ervan uitgaande dat er slechts 40.000 larven per opstelling zijn.

- Een betere methode ontwerpen voor het tellen van de larven om de overleving te bepalen. Het blijkt dat de volumes die gebruikt zijn geen nauwkeurig beeld geven van de overleving. Het is misschien beter om een telling uit te voeren in het beginstadium en als laatste meting. Bij de laatste meting alle larven in en groter volume doen en een groter monster nemen. (Bijvoorbeeld een monster van 1 ml van 500 ml water met alle larven erin)

- Mogelijk een onderzoek doen naar een wisselend voedselaanbod voor larven van verschillende afmetingen. Het zou kunnen zijn dat het voedselaanbod toeneemt als de larven in lengte toenemen. Dit komt overeen met experiment 2 van dit rapport. Helaas waren toen de omstandigheden niet optimaal waardoor er geen nauwkeurige resultaten waren.

8. Verklarende woordenlijst

1 Mosselzaad: Kleine mosselen met een schelplengte tussen 3 en 25 mm, komen na het stadium mosselbroed. Het wordt gebruikt als grondstof voor de mosselkwekers door het uit te zaaien op bodempercelen.

2 Quota: Beschrijving van de hoeveelheid mosselzaad dat gevangen mag worden door de mosselkwakers in de Waddenzee.

3 Exoten: Een organisme dat direct of indirect door de mens ingevoerd. Het betreft een uitheemse soort die zich kan voortplanten in een nieuwe omgeving.

4 MZI: Een MosselZaad-Invanginstallatie bestaat uit verschillende soorten substraat. Het substraat wordt in het water gehangen zodat er larven via natuurlijke broedval kunnen settelen.

5 Substraat: Een materiaal dat zowel een voedingsbodem als onderliggent sediment kan zijn. Voor mosselen is substraat een materiaal waar ze zich aan kunnen hechten of op kunnen settelen. Vaak is bevat het materiaal reliëf waar de byssusdraden goed aan kunnen hechten. Voorbeelden van substraat zijn: stenen, palen, zeebodem en touw.

6 Broedval: Tijdens broedval hebben de mossellarven de metamorfose doorstaan en willen ze gaan settelen op substraat. De mosselen scheiden waarschijnlijk een bepaalde stof uit waardoor alle larven tegelijkertijd willen gaan settelen.

7 Settelen: De mosselen hebben na de metamorfose een voet en byssusdraden ontwikkeld. Met behulp van de voet kunnen ze zich voortbewegen naar het juiste substraat en zich met byssusdraden vasthouden. Het vastmaken aan substraat heet settelen.

8 Hatchery: Tijdens het kunstmatig kweken van mosselen worden de larven in een hatchery opgekweekt tot broed. Dit wordt dan ook wel een broedhuis genoemd.

9 Nursery: Nadat de mossellarven uitgegroeid zijn tot mosselbroed worden ze overgeplaatst naar de nursery, ook wel kinderkamer genoemd. Hier groeit het mosselbroed uit tot mosselzaad.

10 Mosselbroed: Het stadium na het larvale stadium waarbij de mossel een schelplengte heeft tussen 0,3 en 3 mm. Het mosselbroed ontstaat nadat de mossellarven de metamorfose hebben doorstaan en gaan settelen.

11 Fytoplankton: Het plantaardige deel van het plankton (alle kleine zwevende deeltjes in het water) heet fytoplankton. Door middel van fotosynthese worden anorganische deeltjes om in organische deeltjes.

12 Flagellaten: Deze algensoort komt voor in zoutwater, bezit zweepharen, zwemmen vrij rond in het water en zijn vaak kleiner dan diatomeeën.

13 Diatomeeën: Deze algensoort bezit een skeletje van kiezelzuur waardoor ze bezinken. Men noemt ze ook wel kiezelwieren.

14 Bivalven: 2-kleppige weekdieren.

15 Paaien: Het loslaten van eicellen en zaadcellen in het water zodat de bevruchting kan plaatsvinden door de beweging (stroming) van het water.

16 Saliniteit: Het zoutgehalte van zeewater wordt ook wel saliniteit genoemd en wordt uitgedrukt in mg/l ($^0/_{00}$) NaCl

17 Gonaden: Geslachtsklieren die geslachthormonen en geslachtsproducten aanmaken. Hiermee worden bij mosselen geslachtsproducten afgescheiden in het water.

18 Meiose: Het delingsproces van voortplantingsproducten. Hierdoor komen de homologe chromosomenparen niet meer samen voor.

19 Velum: Een orgaan waarmee de mossellarve voedsel kan opnemen en kan bewegen in de waterkolom tijdens het larvale stadium.

20 Trochophore larve: Ontstaat net na de bevruchting en heeft nog geen schelp maar begeeft zich al wel in de waterkolom. De larve heeft dan een afmeting van 70-100 µm.

21 Prodissoconch I: Het stadium waarin de mossellarven van geen schelp (trochophore) naar een eerste schelp ontwikkelen. Dit is het eerste stadium waarin de larven beginnen met het aanmaken van de uiteindelijke schelp.

22 D-larve: De Prodissoconch I is de eerste schlep van de larve en heft een D vorm, daarom wordt deze larve ookwel een D-larve genoemd. De larve heeft dan een schelplengte van 100-120 µm.

22 Prodissoconch II: Dit stadium volgt op prodissoconch I. Hierbij wordt de schelp van een veliger larve aangemaakt. Dit vormt de mantel met groeilijnen.

24 Mantel: Het deel van de schelp waarop de groeilijnen te vinden zijn.

25 Veliger stadium: Dit is het stadium waarin de larve een schelp heeft en zich in de waterkolom bevindt in de vorm van plankton. Tijdens dit stadia groeit de larve van 120 tot 250 µm.

26 Pediveliger: Een larve die in het postlarvale stadium ontwikkeld is. De larve heeft dan een oogvlek en een voet zodat de larve klaar is voor de metamorfose. De larve heeft dan een afmeting van 210 tot 300 µm. Dit stadium volgt op het veliger stadium.

27 Oogvlek: Een pigment vlek die de larve aanmaakt voordat het gaat settelen en tijdens het aanmaken van een voet.

28 Voet: Het orgaan van een mossel waarmee byssusdraden aangemaakt worden en waarmee de mossel zich kan voortbewegen over substraat. De voet wordt ontwikkeld bij een schelplengte vanaf 195 µm.

29 Byssusdraden: Draden die aangemaakt worden met de voet nadat de metamorfose voltooid is. Met de draden kan de mossel zich hechten aan substraat.

30 Postlarvale stadium: Dit is het stadium waarin de larve zich net voor het settelen bevindt. De metamorfose is voltooid en de larve kan zich gaan settelen. De larve in dan een Pediveliger.

31 Mondlappen: Organen waarmee de mossel eetbare deeltjes kan opnemen nadat de getransporteerd zijn door de trilhartjes en kieuwlamellen.

32 Kieuwlamellen: De lamellen van kieuwen filteren het water zodat de eetbare deeltjes opgenomen worden door de mondlappen.

33 Plantigrade: De larve bevindt zich in het stadium waarin de larve net gesetteld is op substraat en mosselbroed aan het worden is

34 Plankton: Alle kleine organismen (deeltjes) die zich vrijzwemmend of drijvend in de waterkolom begeven.

35 Zooplankton: Het plantaardige deel van het plankton zoals kleine diertjes en larven.

36 Anorganisch: Het niet organische deel dat bestaat uit chemische verbindingen die geen koolstof bevatten behalve de koolstofoxides CO en CO_2, het koolzuur H_2CO_3, blauwzuur HCN en de zouten van de twee zuren.

37 Organisch: Dit zijn chemische verbindingen die koolstof, waterstof, zuurstof en soms stikstof bevatten. Ze kunnen opgenomen worden door organismen die energie eruit kunnen halen.

38 Fotosynthese: Een biochemisch proces dat met licht anorganische verbindingen om kan zetten in organische verbindingen en zuurstof.

39 Nutriënten: Voedingsstoffen die opgenomen kunnen worden en tevens nuttig gebruikt kunnen worden.

40 Ultraplankton: Plankton dat in het wild voorkomt met een celgrootte kleiner dan 5-10 µm.

41 Estuaria: Dit is een monding waarbij zoet en zout water bij elkaar komen en de invloed van getij groot is.

42 Pseudofeces: De deeltjes die wel opgenomen worden door mosselen maar niet verteerd worden. Bijv. slib.

43 Feces: De uitwerpselen van de mossel van de restproducten van verteerd voedsel.

44 Trilhaartjes: Haartjes van een mossellarve die zich bevinden zich op het velum en zorgen voor het transport van voedsel.

45 Filtratiesnelheid: Dit is de snelheid waarmee filterfeeders alle deeltjes uit het water kunnen filtreren. De effectiviteit van filtreren is 100%, alle deeltjes worden dus uit het water gehaald.

46 Steriliseren van water: Het steriel maken van water wordt gedaan door het water te verhitten zodat alle organismen dood zijn.
47 Algencultuur: Het kweken van algen gebeurd in bepaalde volumes. Door een startcultuur in een groter volume met water te doen met nutriënten kunnen de algen vermenigvuldigen. Hierdoor ontstaat er een cultuur.
48 Medium: Het voedselaanbod voor algen bestaat uit een medium waarin stikstof en fosfaat is opgenomen. Voor de diatomeeën is er ook Silicaat in het medium opgenomen.
49 Celwand: De wand die rondom de alg zit. De celwand is bepalend voor de opname van algen voor mosselen.
50 Voedingsratio: Het gewicht van de mossel gedeeld door het gewicht van het voedsel is de voedingsratio.
51 Fysische factoren: Dit zijn de abiotische factoren.
52 BMI: (Body Mass Index) Conditie index op basis van lengte en gewicht.
53 EPA: Deze wordt gevormd door vetzuur 20:5n3 en belangrijk voor de groeisnelheid van mossellarven.
54 DHA: Deze wordt gevormd door vetzuur 22:6n3 en belangrijk voor de groeisnelheid van mossellarven.
55 PUFA: Alle onverzadigde vetzuren samen.
56 Onverzadigde vetzuren: Dit zijn vetzuren met een dubbele binding.
57 Abiotisch: Een externe milieufactor die geen biologische oorsprong kent zoals predatie.
58 Vertebraten: De gewervelde organismen.
59 Evertebraten: Ongewervelde organismen.
60 Stratificatie: De aanwezigheid van 2 verschillende waterlagen boven elkaar. Iedere waterlaag heeft een andere samenstelling zoals bijvoorbeeld saliniteit.
61 Broedstock: De ouderdieren die geconditioneerd worden en daarna onder gecontroleerde omstandigheden paaien.
62 Hematocytmeter: Een meetinstrument waarmee de algenconcentratie bepaald wordt. Ook wel telkamer genoemd.

9. Verwijzingen

Bayne, B. L. (1963) Responses of *Mytilus edulis* larvae to increase in hydrostatic pressure.
Bayne, B.L. (1964) Primary en secondary settlement in *Mytilus edulis* L. (Mollusca).
Bayne, B. L. (1965) Growth and delay of metamorphosis of the larvae of *Mytilus edulis*
Bayne, B. L. (1975) Reproduction in bivalve molluscs under environmental stress. Physiological Ecology of Estuarine Organisms. Columbia
Bayne, B. L. (1976) Marine Mussels, their ecology and physiology. International Biological Programme 10. Cambridge.
Bayne, B. L. (1983) Physiological ecology of marine molluscan larvae. The Mollusca, Vol III, Development. York
Barber, B. J., Blake, N. J. (1991) Reproductive physiology. Scallops: Biology, Ecology and Aquaculture
Cahalan, J. A., Siddall, S. E., Luckenbach, M. W. (1989) Effects on flow velocity, food concentration and particle flux on the growth rate of juvenile bas scallops, *Argopecten irradians.*
Carriker, M. R. (1961) Interrelation of functional morphology, behaviour and autecology in early stages of the bivalve *Mercenaria mercenaria.*
Foster-Smith, R. L. (1975) The effects of concentration of suspension on filtration rates and pseudofaecal production of *Mytilus edulis*, *Cerastoderma edule* and *Venerupis pullastra.*
Gosling, E. (1992) The mussel *Mytilus*: ecology, physiology, genetics and culture. Development in aquaculture and fisheries science, volume 25.
Gosling, E. (2003) Bivalve Molluscs. Biology, Ecology and Culture.
Hancock, D. A. (1973) The relationship between stock and recruitment in exploited invertebrates.
Helm, M. and Bourne, N. (2004) Hatchery culture of bivalves: A practical manual, FAO Fisheries Technical Paper.
Hendriks, I. E., Duren van, L. A., Herman, P. M. J. (2003) Effect of dietary polyunstaturated fatty acids on reproductive output and larval growth of bivalves
Hrs-Brenko, M., (1973) The study of mussel larvae and their settlement in Vela Dragba Bay.
Hrs-Brenko, M., (1974) Temperature and salinity requirements for embryonic development of *Mytilus galloprovincialis.*
Isham, L. B., Tierney, J. Q. (1953) Some aspects of the larval development and metamorphosis of *Teredo pedicellata.*
Jabber, A., Davies J.I. (1982) A simple and convenient biochemical method for sex indification in the marine mussel, *Mytilus edulis.*
Jablonski, D. J., Lutz, R. A., (1980) Molluscan larval shell morphology: ecological and paleobiogical applications. Skeletal Growth of Aquatic Organisms. New York
Jesperson, H., Olsen, K. (1982) Bioenergetics in veliger larvae of *Mytilus edulis*.
Kamermans, P., Blanco, A., Nevejan, N. (2006) Operationaliseren Schelpdierhatchery/nursery bij de Roem van Yerseke. Rivo Rapport CO21/06
Konstantinova, M. I. (1966) Characterics of the motion of pelagic larvae of marine invertebrates.
Kuenster, S. H. (1988) The effects of the Brown Tide algae on the feeding physiology of *Argopecten irradians* and *Mytilus edulis.*
Laing, I,. Millican, P. F. (1986) Relative growth ant growth efficiency of *Ostrea edulis* spat fed various algal diets.
La Barbera, M. (1924) Larval en postlarval development of five species of Miocene bivalves (Mollusca)
Lebour, M. V. (1933) The importance of larval mollusca in the plankton.
Legaré, J. E. H., Maclellan, D. C. (1960) A qualitative and quantitative study of the plankton of the Quoddy region in 1957 and 1958 with special reference to the food of herring.
Lutz, R. A., Chalermwat, K., Figueras, A., Gustafson, R. G., Newell, C. (1991) Mussel aquaculture in marine and estuarine environments throughout the world. Culture of Estuarine and Marine Bivalve Mollusks in Temperature and Tropical Regions. Florida

Mileikovsky, S. A. (1971) Types of larval development in marine bottom invertebrates, their distribution and ecological significance: a revolution.
Mileikovsky, S. A. (1974) On predation of pelagic larvae and early juveniles of marine bottom invertebrates by adult benthic invertebrates and their passing alive through their predators.
Millar, R. H. (1968) Growth lines in the larvae and adults of bivalve molluscs.
Ponis, E., Probert, I., Véron, B., Mathieu, M., Robert, R. (2005) New micro algae for the Pacific oyster *Crassostrea gigas* larvae.
Seed, R., Suchanek, T. H. (1992) Population and community ecology of *Mytilus edulis*. The mussel *Mytilu*s: Ecology, Physiology, Genetics and Culture.
Sastry, A. N. (1966) Temperature effects in reproduction of the bay scallop, *Aequipecten irradians.*
Sastry, A. N. (1968) The relationship among food, temperature and gonad development of the bay scallop, *Aequipecten irradians.*
Sastry, A. N. (1970) Reproductive physiological variation in latitudinally separated populations of the bay scallop, *Aequipecten irradians.*
Sastry, A. N., Blake, N. J. (1971) Regulation of gonad development in the bay scallop, *Aequipecten irradians.*
Scholten, drs. H. (1988) Voedsel in de Oosterschelde.
Smaal, A. C. (1988) De kering en de kweek. Het functioneren van de mosselpercelen in de Oosterschelde.
Sokal, R. R., Rohlf, F. J. (1995) Biometry. The principles and practice of statistics in biological research.
Sprung, M. (1984) Physiological energetics of mussel larvae (*Mytilus edulis*) . Shell growth and biomass.
Thorson, G. (1946) Reproduction development of Danish marine bottom invertebrates.
Thorson, G. (1950) Reproductive and larval ecology of marine bottom invertebrates.
Thorson, G. (1966) Some factors influencing the recruitment and establishment of marine benthic communities.
Thompson, R. J. (1979) Fecundity and reproductive effort of the blue mussel (*Mytilus edulis*), the sea urchin (*Strongylcentrotus doenachiensis*) and the snow crab (*Chionectes opilio*) from populations in Nova Scotia and Newfoundland.
Walne, P. R. (1974) Culture of bivalves Molluscs: 50 years of experience at Conwy.
Werner, B. (1939) Über die entwicklung und artunterscheidung von muschellarven des Nordseeplanktons, unter besonderer beruchsichtigung der schalenentwicklung.
Wilson, D. P. (1952) The influence of the nature of the substratum on the metamorphosis of the larvae of marine animals, especially the larvae of *Ophelia bicornis.*
Zwann,A., Mathieu, M. (1992) Cellular biochemistry and endocrinology. The mussel *Mytulis edulis*: Ecology, Physiology, Genetics and Culture.

Mosselcultuur in de Nederlandse wateren, uitgave van het Mosselkantoor te Yerseke.

Internet:
Internet zoekmachine: www.google.nl

Zoektermen:
mossel, mosselkweek, bodemcultuur, hatchery, nursery, larven, *Mytilus edulis*, algen

Resultaten:
www.aquacultuur.nl
www.natuurwetenschappen.be
www.vriendenvandemossel.nl
www.mosseldagyerseke.nl
www.picassoweb.nl
www.lnv.nl

Bijlage 1: Algemeen literatuuronderzoek

8.1 Mossel algemeen

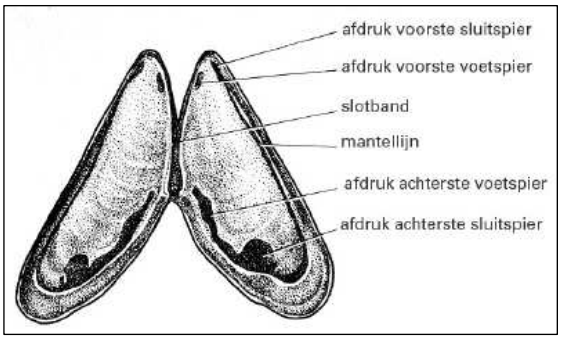
De mossel behoort tot het Rijk van de weekdieren, de wetenschappelijke naam van de mossel is Mytilus edulis, dit betekend eetbare mossel.(www.natuurwetenschappen.nl)

Rijk:	Mollusca (Weekdieren)
Klasse:	Bivalvia (Twee-kleppige)
Orde:	Mytiloida
Familie:	Mytilidae

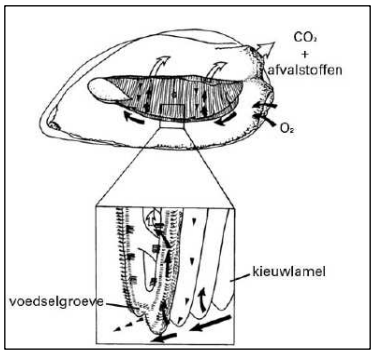
(www.aquacultuur.nl)

Bouw van de mossel

De mossel is een tweezijdig symmetrisch weekdier, het weke lichaam is verstevigd met een schelp en kan zich voortbewegen en hechten met behulp van een voet. De schelp wordt bij elkaar gehouden door 2 sluitspieren. De top van de schelp is het oudste gedeelte, de kringen op de schelp zijn groeilijnen waaraan de groei kan worden afgelezen, dit is hetzelfde als bij een boom (www.natuurwetenschappen.be).



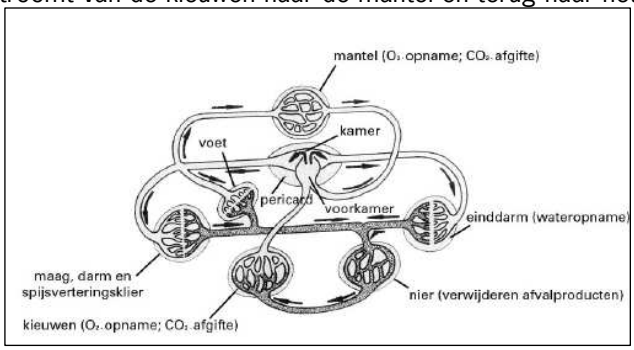
Figuur 8.1: Binnenkant mosselschelp



De ademhaling van de mossel vindt plaats door zuurstof-uitwisseling met water. Door het water langs de kieuwen te laten stromen kan de zuurstof opgenomen worden in het bloed van de mossel. Langs beide kanten van de voet bevinden zich de kieuwen, deze bestaan uit doorbloede lamellen. Als de mossel boven het water komt dan sluit de schelp zich en gaat de mossel over op anaërobe ademhaling. Bij deze soort van ademhaling ontstaan er veel afvalstoffen. (www.natuurwetenschappen.be).

Figuur 8.2: Ademhaling van de mossel

Het bloed van de mossel bestaat uit een mengsel van bloed en weefselvocht, ook wel hemolymfe genoemd. De hemolymfe stroomt van de kieuwen naar de mantel en terug naar het hart waarna het weer richting de kieuwen wordt gepompt. Dit systeem is een zogenaamd open bloedvat systeem (www.natuurwetenschappen.be).

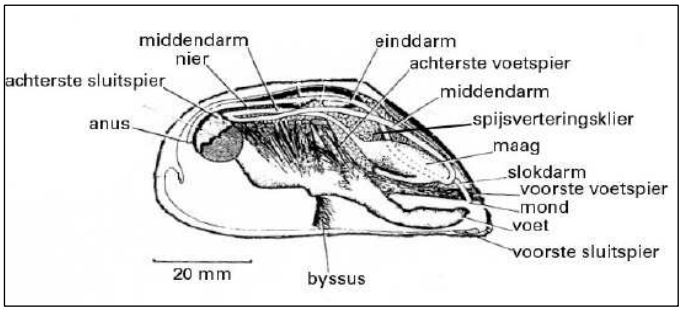


Figuur 8.3: Bloedcirculatie van de mossel

De nieren van de mossel zorgen voor de osmoregulatie en de excretie. De nieren zijn U-vormig en hebben een verbinding met het hartzakje en de kieuwen. De afvalstoffen komen via het hartzakje in de nieren terecht, de nieren verwijderen de afvalstoffen uit de hemolymfe (www.natuurwetenschappen.be).

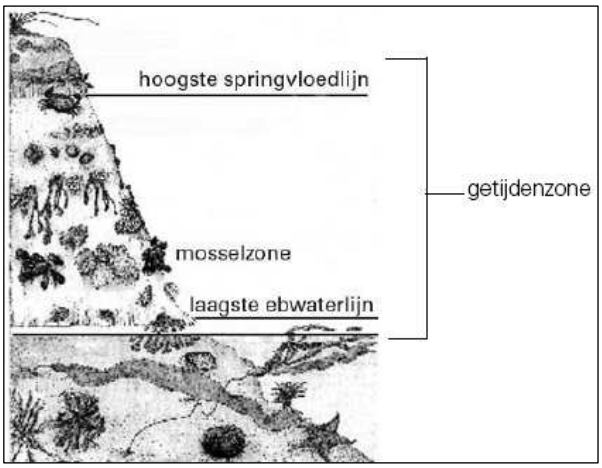
Het zenuwstelsel van de mossel bestaat uit 3 zenuwknopen, zenuwstrengen verbinden de 3 knopen met elkaar en met de organen. De zintuigcellen van de mantellob zijn het gevoeligst voor temperatuur, verandering van waterkwaliteit en licht. De zintuigcellen gebruikt de mossel om te kunnen reageren op zijn omgeving en veranderende biotische en abiotische factoren. Het zenuwstelsel van de mossel is eenvoudig waardoor de mossel geen pijn kan waarnemen (www.natuurwetenschappen.be).

De mossel is een filter feeder. Dit houdt in dat de kleine zwevende deeltjes, met behulp van een filter, uit het water worden gehaald. De zwevende deeltjes bestaan voornamelijk uit plankton en andere organische en anorganische producten. Door de schelp te openen komt het water de schelp binnen. De mossel steekt twee sipho's (adempijpen) naar buiten, één van die pijpen zuigt het water op. Het water komt dan langs een rij kieuwen, deze halen zuurstof uit het water. De andere pijp is voor de afvoer van het water en afvalstoffen. De deeltjes die zich in het water bevinden worden door ciliën (trilharen) vastgehouden. Deze trilharen verplaatsen het voedsel naar een slijmlaag en het voedsel wordt vervolgens in de maag opgenomen (www.natuurwetenschappen.be).



Figuur 8.4: Spijsvertering van de mossel

De mossel leeft aan de kust, en komt voornamelijk op rotsachtige hellingen en andere harde substraten voor. Doordat mosselen byssusdraden van eiwitten kunnen vormen is het mogelijk zich stevig te verankeren aan een voorwerp of aan elkaar. De byssusdraden, ook wel baarddraden genoemd, worden uitgescheiden door de voetklier. Na enige tijd verharden de draden, ze worden dan taai en elastisch (www.natuurwetenschappen.be).



Figuur 8.5: Habitat van de mossel

Predatie

In de natuur heeft de mossel vele vijanden. Om de mossel te kunnen kweken dient de predatie zo laag mogelijk te zijn om het verlies ook laag te houden. Wanneer de mosselen in een getijden gebied leven vallen ze ten prooi aan vogels. Voorbeelden zijn de scholekster, de eidereend, de zee-eend en de zeemeeuw. Een ander predator is de zeester. Deze is alleen actief wanneer de mosselen zich in het water bevinden. De zeester valt de mossel via de onderkant aan en opent de schelp met zijn armen. Andere predatoren onderwater zijn krabben en slakken. De grootste vijand van de mossel is een storm. Door de harde stroming van het water, die veroorzaakt wordt door de wind, kan de mossel losraken van zijn vestigingsplek. Meestal komen de mosselen dan in de diepere geulen terecht waar ze niet kunnen overleven. Ook de mens vormt een predator door de stijgende vraag naar consumptiemosselen. Door het intensief wegvangen van mosselzaad wordt de kans kleiner dat het mosselzaad kan volgroeien tot volwassen mosselen, waardoor de voortplanting wordt verminderd. Een nieuwe bedreiging voor de mossel is de exoot Japanse Oester. Deze oester gebruikt hetzelfde substraat als de mossel, gebruikt hetzelfde voedsel en filtert waarschijnlijk ook de mossellarven uit het water. De factoren die invloed hebben op de mortaliteit van de mossel zijn: temperatuur, uitdroging, storm, golfslag, verzilting, intra- en interspecifieke competitie en predatie (www.natuurwetenschappen.be).

8.2 Mosselzaadvisserij

Geschiedenis

In 1825 is de hedendaagse mosselcultuur ontstaan. De mosselen worden op de bodem van de Oosterschelde en de Waddenzee opgekweekt, deze vorm heet dan ook bodemcultuur. Voor die tijd lagen de mosselen voor het oprapen aan de Zeeuwse kust en de Waddenzee (www.vriendenvandemossel.nl). De visserij bestond toen uit het opvissen van mosselen op vrije banken, men viste dus wilde mosselen op die consumptierijk waren. Door een groeiende vraag vanuit de consument naar mosselen en om structuur aan te brengen binnen de mosselvisserij is men in 1825 begonnen met de gestructureerde mosselcultuur (www.mosseldagyerseke.nl). Verder was het verkrijgen van wild groeiende mosselen niet gemakkelijk, het proces was arbeidsintensief en had een lagere opbrengst dan de mosselkweek. Sinds 1870 worden de mosselpercelen verpacht door de overheid (www.mosseldagyerseke.nl). De percelen die verpacht worden door de overheid zijn verdeeld over ongeveer 80 bedrijven (www.picassoweb.nl). De kwaliteit van het kweekperceel wordt bepaald door het voedselaanbod op het kweekperceel, de bodemgesteldheid en de stromingen.

Het wilde zaad wordt gebruikt voor het kweken van consumptie mosselen. Men vist het zaad uit de Waddenzee op of uit de Zeeuwse wateren. Dit wordt in het voor- en najaar gedaan nadat de larven zijn uitgegroeid tot mosselzaad. Het mosselzaad heeft dan een grootte van 1 á 2 cm. De mosselvissers vissen dan 3 tot 5 weken alleen op mosselzaad. Het zaad wordt opgevist met behulp van speciale mosselkotters die voorzien zijn van sleepnetten. Deze sleepnetten schrapen de bodem af, per schip worden er 4 sleepnetten gebruikt. Het mosselzaad wordt voornamelijk in de Waddenzee opgevist en uitgezaaid op percelen in de Oosterschelde en in de Waddenzee (Mosselcultuur in de Nederlandse wateren, mosselkantoor Yerseke).

Het risico van uitspoeling voor mosselen op een bodemperceel ligt bij een gemiddelde stroomsnelheid van 60 cm/s, bij een gemiddeld tij (tussen springtij en doodtij). De uitspoeling kan ook veroorzaakt worden door de golfwerking. Doordat het water heen en weer beweegt, kunnen de mosselen losraken en wegspoelen. Als de stroomsnelheid op de bodem, veroorzaakt door golven groter is dan 40 cm/s is er een vergrote kans op uitspoeling. De golfwerking geld alleen voor de ondiepe percelen waar de mosselen gezaaid zijn, de invloed van de golven is minimaal als de waterkolom dieper is dan 4 meter onder het wateroppervlakte (A.C. Smaal, 1988).

Het opgeviste mosselzaad wordt uitgezaaid op de percelen van de mosselvissers. Op deze percelen kunnen de mosselen verder groeien. Wanneer de predatie van krabben en zeesterren te groot is of de groei geremd wordt door andere factoren worden de mosselen weer verhuisd naar een ander perceel. Dit alles neemt minimaal 2 jaar in beslag voordat de mossels zijn uitgegroeid tot consumptie mossels (Mosselcultuur in de Nederlandse wateren, mosselkantoor Yerseke).

De mosselen die op een bodemperceel gezaaid worden, filteren veel voedsel uit het water. Door een goede menging in de gehele waterkolom is er geen daling in voedselaanbod waar te nemen vlak boven de bodem van een mosselperceel (De kering en de kweek, Juli 1988, A.C. Smaal). De groei van de mosselen is afhankelijk van het voedselaanbod en de bodemsamenstelling van het perceel. De mosselen die gekweekt worden op de meer westelijke percelen van de Oosterschelde bevatten een hoger visgewicht. Het visgewicht wordt gevormd door de hoeveelheid vlees van de mossel binnen de schelp die wordt verkregen nadat de mossel is gekookt (A.C. Smaal, 1988).

Vroeger kon er onbeperkt mosselzaad opgevist worden. Uiteindelijk bracht dit te veel schade aan de natuur aan. Om dit te voorkomen heeft iedere mosselzaadvisser vergunningen nodig van de Natuurbeschermingswet. Tegenwoordig zijn er nog maar 88 vergunningen en mag er slechts met één boot per vergunning gevist worden. Zo kunnen de mosselvissers maar een beperkte hoeveelheid mosselzaad opvissen (www.vriendenvandemossel.nl).

De Oosterschelde

De karakteristiek van de Oosterschelde is door de invloed van de zee, natuur en menselijk ingrijpen veel veranderd. Na het plaatsen van de Oosterscheldekering in 1986 kon de natuur- en visserijfunctie van de Oosterschelde blijven bestaan. Dit was niet mogelijk geweest wanneer en een dichte dam zou worden geplaatst. De oppervlakte van de Oosterschelde is met 10120 ha afgenomen tot 35100 ha, na de aanleg van de Oosterscheldewerken (A.C. Smaal, 1988). Bij ieder getij stroomt er 1.100 miljoen m3 water in en uit de Oosterschelde (Mosselcultuur in de Nederlandse wateren, mosselkantoor Yerseke). Het water van de Oosterschelde is schoon doordat er geen uitwisseling plaatsvindt met de Westerschelde en er strenge regels zijn betreft lozingen van ongezuiverd afvalwater (Mosselcultuur in de Nederlandse wateren, mosselkantoor Yerseke). Wel zijn er bij Krammer-Volkerak mosselpercelen verloren gegaan, hiervoor is compensatie gezocht op de Waddenzee. De Oosterschelde bestaat uit diepe geulen, afgewisseld met platen, slikken en vertakkingen. Hierdoor zijn karakteristieke stromingen ontstaan. (drs. H. Scholten, 1988).

Het aanwezige sestongehalte in de Oosterschelde is afhankelijk van het weer en het jaargetijde. Er is een duidelijke jaarcyclus te zien in het sestongehalte die samenhangt met de weersomstandigheden per jaargetijde (A.C. Smaal, 1988).

De primaire producenten zijn de organismen die zorgen voor de primaire productie van energie, het omzetten van anorganisch in organisch. De belangrijkste primaire producenten in de Oosterschelde zijn de kleinere algensoorten (fytoplankton) en op de bodem de benthische micro-algen. De grotere algensoorten, eigenlijk planten, zijn de wieren en zeegrassen. De algen die voorkomen in de Oosterschelde worden verdeeld in diatomeeën en flagellaten. Limiterende stoffen voor de algen zijn stikstof, fosfaat en silicaat. Deze stoffen komen in de Oosterschelde terecht door regen, zoutwaterlozingen en vanuit de Noordzee. De stoffen komen opgelost in water de Oosterschelde binnen en worden gemengd door circulatiestromingen (drs. H. Scholten, 1988).

In de winter komen kleinere hoeveelheden algen in de Oosterschelde voor, licht is dan een limiterende factor voor hun groei. In de winter is de stromingssnelheid hoger, hierdoor komt er meer slib en detritus in het water waardoor het water troebel wordt. Deze deeltjes zorgen voor

absorptie van het licht, er blijft dan te weinig licht over voor de algen. Verder neemt de lichtintensiteit af in de winter (drs. H. Scholten, 1988).

De mosselen horen bij de groep consumenten die de grootste invloed hebben op het Oosterschelde systeem. Mosselen, oesters en kokkels zijn filter feeders, ook wel suspensie-eters genoemd. Het zijn bentische organismen die vanaf de bodem deeltjes uit het water zeven en opnemen. De totale mosselbiomassa binnen de Oosterschelde bestaat voor 95% uit mosselen voor menselijke consumptie. Er zijn 1000 ha productie percelen en 1000 ha voor het opkweken van mosselzaad tot halfwas mosselen. De veranderingen die optreden binnen de mosselbiomassa staan in relatie tot de mosseloogst die plaatsvindt. De 5% wilde mosselen die nog voorkomen in de Oosterschelde leven op de dijkglooiingen en oevers (drs. H. Scholten, 1988).

Quota

De mosselvissers vissen het mosselzaad op uit de Waddenzee. Er zijn quota ingesteld voor de hoeveelheid mosselzaad dat opgevist mag worden per schip. De quota zijn opgesteld door het Ministerie van LNV. Er is afgesproken dat 90% van het mosselzaad in de Waddenzee moet blijven, en niet naar de Oosterschelde getransporteerd mag worden. (Besluit Schelpdiervisserij 2005-2020). De vraag naar consumptie mosselen is nog zo hoog dat de mosselvissers 5 keer zoveel mosselzaad zouden moeten vangen dan de quota toelaten.

De regels die opgesteld zijn door het LNV zijn gemaakt op basis van de Vogel- en Habitat richtlijnen. Om de regels goed af te stemmen op de natuur worden er onderzoeken gedaan die gefinancierd worden door de mosselsector en de overheid. Deze onderzoeken kosten veel geld maar ook veel tijd. Daarom zijn er afspraken gemaakt tussen het LNV en de mosselsector dat er een overgangsperiode is van 15 jaar waarin gezocht wordt naar structurele oplossingen. De 15 jaar wordt gebruikt om oplossingen te vinden voor het verkrijgen van zaad uit meerdere bronnen dan alleen vanaf de bodem.

Tijdens deze onderzoeken blijven de mosselvissers wel op de traditionele manier op mosselzaad vissen. In de overgangsperiode wordt ieder jaar een vergunning aangevraagd en getoetst aan de Natuurbeschermingswet. Als er bezwaar aangetekend wordt leidt dit tot vertraging of zelfs het niet kunnen vissen op mosselzaad.

De traditionele manier van mosselkweek is niet onnatuurlijk. De natuur kan nog steeds als predator optreden. De kwekers houden rekening met een verlies van de oogst omdat het niet mogelijk is om het te beschermen tegen invloeden van buitenaf. Verder laten de mosselvissers altijd een deel van het mosselzaad achter, ze vissen niet de gehele Waddenzee leeg.
Of het nu beter voor de natuur zou zijn als het mosselzaad niet meer opgevist wordt blijft een raadsel. Doordat de mosselvissers het zaad op beschutte plekken uitzaaien is de overlevingskans van de mosselen hoger. Hiermee zorgen de mosselvissers ervoor dat er, de komende jaren, genoeg mosselen zijn voor de consumptie door mens en vogel.

Duurzame visserij

De mosselvissers zijn zich ervan bewust dat ze verantwoording dragen voor het wilde mosselzaad. Na het opvissen van het benodigde mosselzaad blijft er genoeg zaad achter voor de natuur. Helaas is de natuur onvoorspelbaar en is er niet ieder jaar evenveel zaad beschikbaar. De doelstellingen vanuit het LNV zijn:

- Kweekrendement in 2010 op 3:1 brengen (1 kg mosselzaad groeit uit tot 3 kg consumptiemossel) Dit is alleen mogelijk als de mosselvissers investeren in de percelen, namelijk:
    - Natuurlijke predatie verlagen
    - Goede kwaliteit mosselzaad met hoge overlevingskans

- Alleen goede kweekpercelen
- Wegvissen van de Japanse Oester

Bijlage 2: Protocol bevruchting

(Bron: Kamermans et al.,2006)

Benodigdheden:
- Mosselen (meer dan 100)
- Bakken
- Rol zwart plastic
- Water verwarmings elementen
- Plastic potjes (250 ml)
- Viltstift
- 3-5 liter van Isochrysis (T-ISO) en Chaetoceros gracilis culturen
- Gefiltreerd zeewater
- 30 µm zeef
- 90 µm zeef
- Plunger
- 1 liter maatcilinders
- 1 liter bekers
- Plastic pipet (3 ml)
- 100-1000 µl automatische pipetten
- Tel kamer
- Teller
- Binoculair
- Microscoop

Paaien

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Bevruchting

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

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

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

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

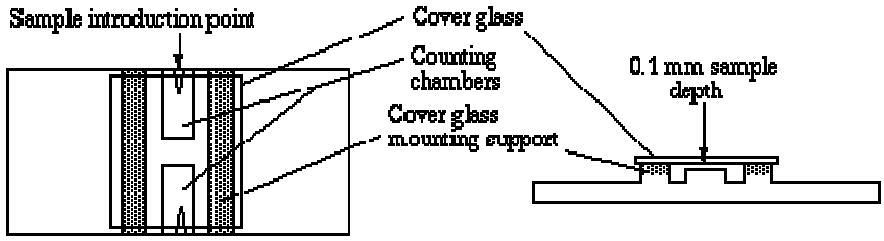
5. Embryo's worden hierna geplaatst in 1250 liter kegelvormige tanks of in 100 liter platte bodem tanks gevuld met gefiltreerd zeewater van 18oC. Ze moeten bewaard worden bij een dichtheid niet hoger dan 80 embryo's/ml en bij voorkeur een concentratie van 20-50 embryo's/ml.

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

Bijlage 3: Algentelling

(Bron: Kamermans et al.,2006)

Een hematocytometer (figuur 16) is een dik preparaat glaasje met twee tel kamers op de oppervlakte, iedere kamer is 1*1 mm. Een speciaal dekglas wordt over deze twee kamers geplaatst die een diepte van 0.1 mm geeft zodat het totale volume van elke kamer 0.1 mm3 wordt.



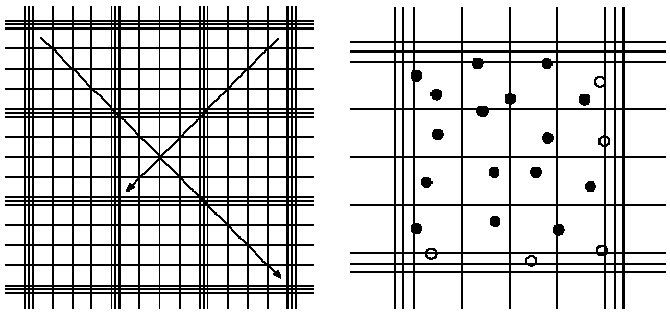
Figuur 10.1.: Hematocytometer.

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

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

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

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



Figuur 10.2a) Het diagonaal tellen van algencellen in de vierkantjes. b) Tellen van de algencellen in het centrum en twee randen van het vierkantje (de zwarte bolletjes).

Bijlage 4: Formules

Formule: Bepalen totaal aantal larven dat aanwezig is in de maatbeker van 3 liter.

$$Larven(totaal) = \frac{larven(meting) \times volume(totaal)_{(ml)}}{volume(meting)_{(ml)}}$$

$$Larven(totaal) = \frac{larven(meting) \times 3000_{(ml)}}{volume(meting)_{(ml)}}$$

Formule: Bepalen volume (per bol) dat uit de maatbeker van 3 liter nodig is voor 40.000 larven

$$Volume_{(ml)} = \frac{larven(nodig) \times volume(totaal)_{(ml)}}{larven(totaal)}$$

$$Volume_{(ml)} = \frac{40.000 \times 3000_{(ml)}}{larven(totaal)}$$

Experiment 1:

$$V_{(ml)} = \frac{alg\,en/ml \times volumeg(bol)_{(ml)}}{alg\,enconcentratie\left(\frac{alg\,en}{ml}\right)}$$

Formule

$$V_{(ml)} = \frac{12.500(alg\,en/ml) \times 4000(ml)}{xxx\left(\frac{alg\,en}{ml}\right)}$$

*xxx invullen met de algenconcentratie van de algencultuur

Experiment 2:

Formule

$$V_{(ml)} = \frac{alg\,en/ml \times volumeg(bol)_{(ml)}}{alg\,enconcentratie\left(\frac{alg\,en}{ml}\right)}$$

$$V_{(ml)} = \frac{x(alg\,en/ml) \times 4000(ml)}{xxx\left(\frac{alg\,en}{ml}\right)}$$

*x algen die nodig zijn
*xxx invullen met de algenconcentratie van de algencultuur

Bijlage 5: Statistische analyse experiment 1

Lengte

Univariatie Analysis of Varaince

Between-Subjects Factors

		N
Dagen	2.00	15
	10.00	15
	14.00	15
	17.00	15
	24.00	15
Behandeling	Blanco	15
	Iso+Chc	15
	Iso+Chg	15
	Pav+Chc	15
	Pav+Chg	15

Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable: Lengte

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	227693.647(a)	24	9487.235	80.290	.000
Intercept	2325372.348	1	2325372.348	19679.481	.000
Dagen	139489.996	4	34872.499	295.124	.000
Behandeling	51587.582	4	12896.895	109.146	.000
Dagen * Behandeling	36616.069	16	2288.504	19.367	.000
Error	5908.114	50	118.162		
Total	2558974.108	75			
Corrected Total	233601.761	74			

a R Squared = .975 (Adjusted R Squared = .963)

Post Hoc test → Behandeling

Multiple Comparisons

Dependent Variable: Lengte
Bonferroni

(I) Behandeling	(J) Behandeling	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
Blanco	Iso+Chc	-32.7927(*)	3.96925	.000	-44.4502	-21.1351
	Iso+Chg	-73.1880(*)	3.96925	.000	-84.8456	-61.5304
	Pav+Chc	-49.8207(*)	3.96925	.000	-61.4782	-38.1631
	Pav+Chg	-66.1933(*)	3.96925	.000	-77.8509	-54.5358
Iso+Chc	Blanco	32.7927(*)	3.96925	.000	21.1351	44.4502
	Iso+Chg	-40.3953(*)	3.96925	.000	-52.0529	-28.7378
	Pav+Chc	-17.0280(*)	3.96925	.001	-28.6856	-5.3704
	Pav+Chg	-33.4007(*)	3.96925	.000	-45.0582	-21.7431
Iso+Chg	Blanco	73.1880(*)	3.96925	.000	61.5304	84.8456
	Iso+Chc	40.3953(*)	3.96925	.000	28.7378	52.0529
	Pav+Chc	23.3673(*)	3.96925	.000	11.7098	35.0249
	Pav+Chg	6.9947	3.96925	.841	-4.6629	18.6522
Pav+Chc	Blanco	49.8207(*)	3.96925	.000	38.1631	61.4782
	Iso+Chc	17.0280(*)	3.96925	.001	5.3704	28.6856
	Iso+Chg	-23.3673(*)	3.96925	.000	-35.0249	-11.7098
	Pav+Chg	-16.3727(*)	3.96925	.001	-28.0302	-4.7151
Pav+Chg	Blanco	66.1933(*)	3.96925	.000	54.5358	77.8509
	Iso+Chc	33.4007(*)	3.96925	.000	21.7431	45.0582
	Iso+Chg	-6.9947	3.96925	.841	-18.6522	4.6629
	Pav+Chc	16.3727(*)	3.96925	.001	4.7151	28.0302

Based on observed means.
* The mean difference is significant at the .05 level.

Post Hoc test → Dagen

Multiple Comparisons

Dependent Variable: Lengte

Bonferroni

(I) Dagen	(J) Dagen	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
2.00	10.00	-52.4600(*)	3.96925	.000	-64.1176	-40.8024
	14.00	-71.2993(*)	3.96925	.000	-82.9569	-59.6418
	17.00	-95.3140(*)	3.96925	.000	-106.9716	-83.6564
	24.00	-128.7380(*)	3.96925	.000	-140.3956	-117.0804
10.00	2.00	52.4600(*)	3.96925	.000	40.8024	64.1176
	14.00	-18.8393(*)	3.96925	.000	-30.4969	-7.1818
	17.00	-42.8540(*)	3.96925	.000	-54.5116	-31.1964
	24.00	-76.2780(*)	3.96925	.000	-87.9356	-64.6204
14.00	2.00	71.2993(*)	3.96925	.000	59.6418	82.9569
	10.00	18.8393(*)	3.96925	.000	7.1818	30.4969
	17.00	-24.0147(*)	3.96925	.000	-35.6722	-12.3571
	24.00	-57.4387(*)	3.96925	.000	-69.0962	-45.7811
17.00	2.00	95.3140(*)	3.96925	.000	83.6564	106.9716
	10.00	42.8540(*)	3.96925	.000	31.1964	54.5116
	14.00	24.0147(*)	3.96925	.000	12.3571	35.6722
	24.00	-33.4240(*)	3.96925	.000	-45.0816	-21.7664
24.00	2.00	128.7380(*)	3.96925	.000	117.0804	140.3956
	10.00	76.2780(*)	3.96925	.000	64.6204	87.9356
	14.00	57.4387(*)	3.96925	.000	45.7811	69.0962
	17.00	33.4240(*)	3.96925	.000	21.7664	45.0816

Based on observed means.

* The mean difference is significant at the .05 level.

Overleving

Between-Subjects Factors

		N
Dagen	4.00	15
	7.00	15
	10.00	15
	14.00	15
	17.00	15
	24.00	15
Behandeling	Blanco	18
	Iso+Chc	18
	Iso+Chg	18
	Pav+Chc	18
	Pav+Chg	18

Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable: mortaliteit

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	486.384(a)	29	16.772	6.457	.000
Intercept	866.378	1	866.378	333.561	.000
Dagen	432.688	5	86.538	33.318	.000
Behandeling	4.828	4	1.207	.465	.761
Dagen * Behandeling	48.868	20	2.443	.941	.541
Error	155.842	60	2.597		
Total	1508.604	90			
Corrected Total	642.226	89			

a R Squared = .757 (Adjusted R Squared = .640)

Post Hoc Tests→ Behandeling

Multiple Comparisons

Dependent Variable: mortaliteit
Bonferroni

(I) Behandeling	(J) Behandeling	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
Blanco	Iso+Chc	-.4480	.53721	1.000	-2.0137	1.1178
	Iso+Chg	-.3477	.53721	1.000	-1.9134	1.2180
	Pav+Chc	-.0533	.53721	1.000	-1.6191	1.5124
	Pav+Chg	-.6059	.53721	1.000	-2.1717	.9598
Iso+Chc	Blanco	.4480	.53721	1.000	-1.1178	2.0137
	Iso+Chg	.1003	.53721	1.000	-1.4655	1.6660
	Pav+Chc	.3946	.53721	1.000	-1.1711	1.9604
	Pav+Chg	-.1580	.53721	1.000	-1.7237	1.4078
Iso+Chg	Blanco	.3477	.53721	1.000	-1.2180	1.9134
	Iso+Chc	-.1003	.53721	1.000	-1.6660	1.4655
	Pav+Chc	.2944	.53721	1.000	-1.2714	1.8601
	Pav+Chg	-.2582	.53721	1.000	-1.8240	1.3075
Pav+Chc	Blanco	.0533	.53721	1.000	-1.5124	1.6191
	Iso+Chc	-.3946	.53721	1.000	-1.9604	1.1711
	Iso+Chg	-.2944	.53721	1.000	-1.8601	1.2714
	Pav+Chg	-.5526	.53721	1.000	-2.1183	1.0131
Pav+Chg	Blanco	.6059	.53721	1.000	-.9598	2.1717
	Iso+Chc	.1580	.53721	1.000	-1.4078	1.7237
	Iso+Chg	.2582	.53721	1.000	-1.3075	1.8240
	Pav+Chc	.5526	.53721	1.000	-1.0131	2.1183

Based on observed means.

Post Hoc Tests → Dagen

Multiple Comparisons

Dependent Variable: mortaliteit
Bonferroni

(I) Dagen	(J) Dagen	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
4.00	7.00	1.8917(*)	.58849	.032	.0925	3.6908
	10.00	5.1880(*)	.58849	.000	3.3888	6.9872
	14.00	4.7378(*)	.58849	.000	2.9386	6.5369
	17.00	5.0167(*)	.58849	.000	3.2175	6.8158
	24.00	6.3500(*)	.58849	.000	4.5508	8.1492
7.00	4.00	-1.8917(*)	.58849	.032	-3.6908	-.0925
	10.00	3.2963(*)	.58849	.000	1.4972	5.0955
	14.00	2.8461(*)	.58849	.000	1.0470	4.6453
	17.00	3.1250(*)	.58849	.000	1.3258	4.9242
	24.00	4.4583(*)	.58849	.000	2.6592	6.2575
10.00	4.00	-5.1880(*)	.58849	.000	-6.9872	-3.3888
	7.00	-3.2963(*)	.58849	.000	-5.0955	-1.4972
	14.00	-.4502	.58849	1.000	-2.2494	1.3489
	17.00	-.1713	.58849	1.000	-1.9705	1.6278
	24.00	1.1620	.58849	.794	-.6372	2.9612
14.00	4.00	-4.7378(*)	.58849	.000	-6.5369	-2.9386
	7.00	-2.8461(*)	.58849	.000	-4.6453	-1.0470
	10.00	.4502	.58849	1.000	-1.3489	2.2494
	17.00	.2789	.58849	1.000	-1.5203	2.0780
	24.00	1.6122	.58849	.121	-.1869	3.4114
17.00	4.00	-5.0167(*)	.58849	.000	-6.8158	-3.2175
	7.00	-3.1250(*)	.58849	.000	-4.9242	-1.3258
	10.00	.1713	.58849	1.000	-1.6278	1.9705
	14.00	-.2789	.58849	1.000	-2.0780	1.5203
	24.00	1.3333	.58849	.406	-.4658	3.1325
24.00	4.00	-6.3500(*)	.58849	.000	-8.1492	-4.5508
	7.00	-4.4583(*)	.58849	.000	-6.2575	-2.6592
	10.00	-1.1620	.58849	.794	-2.9612	.6372
	14.00	-1.6122	.58849	.121	-3.4114	.1869
	17.00	-1.3333	.58849	.406	-3.1325	.4658

Based on observed means.
* The mean difference is significant at the .05 level.

Bijlage 6: Statistische analyse experiment 2

Univariatie Analysis of Varaince

Lengte

Between-Subjects Factors

Between-Subjects Factors

		N
Behandeling	1	15
	2	15
	3	15
	4	15
	5	15
	6	15
Dagen	2.00	18
	4.00	18
	7.00	18
	10.00	18
	25.00	18

Tests of Between-Subjects Effects

Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable: Lengte

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	52670.759(a)	29	1816.233	93.046	.000
Intercept	1290416.427	1	1290416.427	66107.963	.000
Behandeling	1540.922	5	308.184	15.788	.000
Dagen	46057.480	4	11514.370	589.881	.000
Behandeling * Dagen	5072.356	20	253.618	12.993	.000
Error	1171.190	60	19.520		
Total	1344258.376	90			
Corrected Total	53841.949	89			

a R Squared = .978 (Adjusted R Squared = .968)

Post Hoc Tests → Behandeling

Multiple Comparisons

Dependent Variable: Lengte
Bonferroni

(I) Behandeling	(J) Behandeling	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
1	2	3.2633	1.61327	.713	-1.6689	8.1955
	3	4.1967	1.61327	.175	-.7355	9.1289
	4	3.1527	1.61327	.830	-1.7795	8.0849
	5	9.7047(*)	1.61327	.000	4.7725	14.6369
	6	12.0313(*)	1.61327	.000	7.0991	16.9635
2	1	-3.2633	1.61327	.713	-8.1955	1.6689
	3	.9333	1.61327	1.000	-3.9989	5.8655
	4	-.1107	1.61327	1.000	-5.0429	4.8215
	5	6.4413(*)	1.61327	.003	1.5091	11.3735
	6	8.7680(*)	1.61327	.000	3.8358	13.7002
3	1	-4.1967	1.61327	.175	-9.1289	.7355
	2	-.9333	1.61327	1.000	-5.8655	3.9989
	4	-1.0440	1.61327	1.000	-5.9762	3.8882
	5	5.5080(*)	1.61327	.017	.5758	10.4402
	6	7.8347(*)	1.61327	.000	2.9025	12.7669
4	1	-3.1527	1.61327	.830	-8.0849	1.7795
	2	.1107	1.61327	1.000	-4.8215	5.0429
	3	1.0440	1.61327	1.000	-3.8882	5.9762
	5	6.5520(*)	1.61327	.002	1.6198	11.4842
	6	8.8787(*)	1.61327	.000	3.9465	13.8109
5	1	-9.7047(*)	1.61327	.000	-14.6369	-4.7725
	2	-6.4413(*)	1.61327	.003	-11.3735	-1.5091
	3	-5.5080(*)	1.61327	.017	-10.4402	-.5758
	4	-6.5520(*)	1.61327	.002	-11.4842	-1.6198
	6	2.3267	1.61327	1.000	-2.6055	7.2589
6	1	-12.0313(*)	1.61327	.000	-16.9635	-7.0991
	2	-8.7680(*)	1.61327	.000	-13.7002	-3.8358
	3	-7.8347(*)	1.61327	.000	-12.7669	-2.9025
	4	-8.8787(*)	1.61327	.000	-13.8109	-3.9465
	5	-2.3267	1.61327	1.000	-7.2589	2.6055

Based on observed means.
* The mean difference is significant at the .05 level.

Post Hoc Tests → Dagen

Multiple Comparisons

Dependent Variable: Lengte
Bonferroni

(I) Dagen	(J) Dagen	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
2.00	4.00	-5.8167(*)	1.47271	.002	-10.1090	-1.5244
	7.00	-6.9106(*)	1.47271	.000	-11.2028	-2.6183
	10.00	-10.2389(*)	1.47271	.000	-14.5312	-5.9466
	25.00	-61.6900(*)	1.47271	.000	-65.9823	-57.3977
4.00	2.00	5.8167(*)	1.47271	.002	1.5244	10.1090
	7.00	-1.0939	1.47271	1.000	-5.3862	3.1984
	10.00	-4.4222(*)	1.47271	.039	-8.7145	-.1299
	25.00	-55.8733(*)	1.47271	.000	-60.1656	-51.5810
7.00	2.00	6.9106(*)	1.47271	.000	2.6183	11.2028
	4.00	1.0939	1.47271	1.000	-3.1984	5.3862
	10.00	-3.3283	1.47271	.275	-7.6206	.9640
	25.00	-54.7794(*)	1.47271	.000	-59.0717	-50.4872
10.00	2.00	10.2389(*)	1.47271	.000	5.9466	14.5312
	4.00	4.4222(*)	1.47271	.039	.1299	8.7145
	7.00	3.3283	1.47271	.275	-.9640	7.6206
	25.00	-51.4511(*)	1.47271	.000	-55.7434	-47.1588
25.00	2.00	61.6900(*)	1.47271	.000	57.3977	65.9823
	4.00	55.8733(*)	1.47271	.000	51.5810	60.1656
	7.00	54.7794(*)	1.47271	.000	50.4872	59.0717
	10.00	51.4511(*)	1.47271	.000	47.1588	55.7434

Based on observed means.
* The mean difference is significant at the .05 level.

Overleving

Between-Subjects Factors

		N
Behandeling	1	15
	2	15
	3	15
	4	15
	5	15
	6	15
Dagen	4.00	18
	7.00	18
	10.00	18
	15.00	18
	18.00	18

Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable: Overleving

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	478.728(a)	29	16.508	6.102	.000
Intercept	871.630	1	871.630	322.173	.000
Behandeling	20.887	5	4.177	1.544	.190
Dagen	414.976	4	103.744	38.346	.000
Behandeling * Dagen	42.865	20	2.143	.792	.712
Error	162.328	60	2.705		
Total	1512.686	90			
Corrected Total	641.056	89			

a R Squared = .747 (Adjusted R Squared = .624)

Post Hoc Tests → Behandeling

Multiple Comparisons

Dependent Variable: Overleving
Bonferroni

(I) Behandeling	(J) Behandeling	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
1	2	-.8667	.60061	1.000	-2.7029	.9695
	3	-.2110	.60061	1.000	-2.0472	1.6252
	4	-1.1361	.60061	.951	-2.9723	.7001
	5	-1.2472	.60061	.632	-3.0834	.5890
	6	-1.1111	.60061	1.000	-2.9473	.7252
2	1	.8667	.60061	1.000	-.9695	2.7029
	3	.6557	.60061	1.000	-1.1805	2.4919
	4	-.2694	.60061	1.000	-2.1056	1.5668
	5	-.3805	.60061	1.000	-2.2168	1.4557
	6	-.2444	.60061	1.000	-2.0806	1.5918
3	1	.2110	.60061	1.000	-1.6252	2.0472
	2	-.6557	.60061	1.000	-2.4919	1.1805
	4	-.9251	.60061	1.000	-2.7613	.9111
	5	-1.0362	.60061	1.000	-2.8724	.8000
	6	-.9001	.60061	1.000	-2.7363	.9362
4	1	1.1361	.60061	.951	-.7001	2.9723
	2	.2694	.60061	1.000	-1.5668	2.1056
	3	.9251	.60061	1.000	-.9111	2.7613
	5	-.1111	.60061	1.000	-1.9473	1.7251
	6	.0250	.60061	1.000	-1.8112	1.8613
5	1	1.2472	.60061	.632	-.5890	3.0834
	2	.3805	.60061	1.000	-1.4557	2.2168
	3	1.0362	.60061	1.000	-.8000	2.8724
	4	.1111	.60061	1.000	-1.7251	1.9473
	6	.1362	.60061	1.000	-1.7001	1.9724
6	1	1.1111	.60061	1.000	-.7252	2.9473
	2	.2444	.60061	1.000	-1.5918	2.0806
	3	.9001	.60061	1.000	-.9362	2.7363
	4	-.0250	.60061	1.000	-1.8613	1.8112
	5	-.1362	.60061	1.000	-1.9724	1.7001

Based on observed means.

Post Hoc Tests → Dagen

Multiple Comparisons

Dependent Variable: Overleving
Bonferroni

(I) Dagen	(J) Dagen	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
4.00	7.00	1.4908	.54828	.085	-.1072	3.0888
	10.00	3.5371(*)	.54828	.000	1.9391	5.1350
	15.00	5.0695(*)	.54828	.000	3.4715	6.6674
	18.00	5.7084(*)	.54828	.000	4.1104	7.3063
7.00	4.00	-1.4908	.54828	.085	-3.0888	.1072
	10.00	2.0463(*)	.54828	.004	.4483	3.6443
	15.00	3.5787(*)	.54828	.000	1.9807	5.1767
	18.00	4.2176(*)	.54828	.000	2.6196	5.8156
10.00	4.00	-3.5371(*)	.54828	.000	-5.1350	-1.9391
	7.00	-2.0463(*)	.54828	.004	-3.6443	-.4483
	15.00	1.5324	.54828	.070	-.0656	3.1304
	18.00	2.1713(*)	.54828	.002	.5733	3.7693
15.00	4.00	-5.0695(*)	.54828	.000	-6.6674	-3.4715
	7.00	-3.5787(*)	.54828	.000	-5.1767	-1.9807
	10.00	-1.5324	.54828	.070	-3.1304	.0656
	18.00	.6389	.54828	1.000	-.9591	2.2369
18.00	4.00	-5.7084(*)	.54828	.000	-7.3063	-4.1104
	7.00	-4.2176(*)	.54828	.000	-5.8156	-2.6196
	10.00	-2.1713(*)	.54828	.002	-3.7693	-.5733
	15.00	-.6389	.54828	1.000	-2.2369	.9591

Based on observed means.
* The mean difference is significant at the .05 level.

Bijlage 7: Methode van algenkweek in plastic zakken

Benodigdheden

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Tabel 14.1. Hoeveelheid chemicaliën nodig voor 1 L oplossing Walne medium

Stof	**Hoeveelheid**
Na2EDTA	45 g
H3BO3	33.6 g
NaNO3(KNO3)	100 g (116 g)
NaH2PO4*2H2O	20 g
MnCl3*4H2O	0.36 g
FeCl3*6H2O	1.30 g
Oplossing 2	1 ml

Met deze oplossing kan 1000 liter medium gemaakt worden.
Oplossing 2
Schenk de volgende nutriënten in een schone geautoclaveerde fles met 100 ml demiwater. Voeg 1 ml HCl 36% toe om alles op te lossen. Bewaar de oplossing in de koelkast bij 4 oC.

Tabel 14.2. Hoeveelheid chemicaliën nodig voor 100 ml oplossing 2 Walne medium

Stof	**Hoeveelheid**
ZnCl2	2.1 g
CoCl2*6H2O	2.0 g
(NH4)6Mo7O24*4H2O	0.9 g
CuSO4*5H2O	2.0 g

Tabel 14.3. Hoeveelheid chemicaliën nodig voor 100 ml Vitamine oplossing Walne medium

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

Breng deze oplossing over in 10 ml buizen door de oplossing te filtreren door een 0.45 µm membraan filter. De vitamine oplossing moet bewaard blijven bij –18 ˚C.
Met elke 10 ml buis kan 100 L medium bereid worden.

Tabel 14.4. Hoeveelheden chemicaliën nodig voor extra diatomeeën oplossing

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

Met deze oplossing kan 250 L medium gemaakt worden.

Tabel 14.5. Volume van de chemicaliën oplossing nodig per liter gefiltreerde zeewater.

	Algen soorten	
	Flagellaten	**Diatomeeën**
Walne oplossing (ml oplossing/l gefiltreerd zeewater)	1	1
Vitamine oplossing (ml oplossing/l gefiltreerd zeewater)	0.1	0.1
Silicaat (ml oplossing/l gefiltreerd zeewater)	-	4

Verantwoording

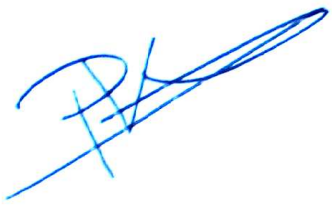
Dit rapport voor

Opdrachtgever: Wageningen IMARES
Afdeling Aquacultuur
Korringaweg 5
Postbus 77
4400 AB Yerseke

Projectnummer: 4394100701

is met grote zorgvuldigheid tot stand gekomen. De wetenschappelijke kwaliteit is intern getoetst door de stagebegeleider.

Akkoord: Dr. P. Kamermans
Senioronderzoeker Aquacultuur



Handtekening: _____

Datum: 4 juni 2007

Aantal exemplaren:	10
Aantal pagina's:	77
Aantal tabellen:	26
Aantal figuren:	29
Aantal bijlagen:	7