

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 Texel
Postbus 167
1790 AD Den Burg Texel
Tel.: 0222 369700
Fax: 0222 329235

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

Intern rapport

Nummer: 06.006

Inventariseren van de mogelijkheden voor, én testen van:

- een algen cultivatie systeem in een mossel hatchery
- een methode voor de bepaling van paairijpheid van de mossel (*Mytilus edulis*).

Arno Dekker

Dit rapport is gerealiseerd in samenwerking met:



Project nummer:

Blue Seed 3031220021

Aantal exemplaren:	9
Aantal pagina's:	45
Aantal tabellen:	7
Aantal figuren:	21
Aantal bijlagen:	2

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.

Dit (afstudeer)rapport is geschreven in het kader van het afronden van de HBO opleiding Aquatische Ecotechnologie, verbonden aan de Hogeschool Zeeland. Conform de richtlijnen voor het succesvol afsluiten van deze opleiding is onderzoek gedaan naar de mogelijkheden om een algen cultivatie systeem binnen een mossel hatchery/nursery te plaatsen, evenals een onderzoek naar een snellere methode voor de bepaling van paairijpheid van de mossel (*Mytilus edulis*).

Dit rapport is verbonden aan het project "Blue Seed" en is in de eerste plaats bedoeld als afstudeerscriptie voor de Hogeschool Zeeland. Daarnaast kan het een handig hulpmiddel zijn voor vervolg onderzoeken binnen IMARES Yerseke op dit vlak. Dit rapport was nooit tot stand gekomen als de Hogeschool Zeeland, IMARES Yerseke en Roem van Yerseke mij niet de mogelijkheid hadden gegeven om binnen deze organisaties het onderzoek uit te voeren.

Dit rapport werd mede mogelijk gemaakt door:



Inhoudsopgave

Inhoudsopgave	3
Voorwoord.....	5
Samenvatting	6
Abstract	7
1. Inleiding.....	8
1.1 Achtergrond.....	8
1.2 Probleemstelling.....	9
1.3 Doelstelling	9
2. Inventarisatie algenkweek systemen.	10
2.1 Werkwijze.....	10
2.2 Resultaten.	10
2.2.1 Voedselaanbod larven en mosselzaad.	10
2.2.2 Groei van een algencultuur.....	11
2.2.2.1 Optimale leefomstandigheden.	11
2.2.2.2 Ontwikkeling van een algencultuur.	13
2.2.3 Batch cultuur en continue cultuur.	14
2.2.3.1 Batch cultuur.	14
2.2.3.2 Continue cultuur.	14
2.2.4 Indoor cultivatie mogelijkheden.	15
2.2.4.1 Platte fotobioreactoren.	16
2.2.4.2 Buisvormige fotobioreactoren.	16
2.2.4.3 Verticale cilinders en zakken.....	18
2.2.5 Overzicht inventarisatie en kostenraming.....	19
2.2.5.1 BioFence tubular bioreactor.	19
2.2.5.2 Seacaps / Seasalter zakken systeem.	23
2.3 Conclusie.....	26
3. BioFence fotobioreactor.	27
3.1 Werkwijze.....	27
3.2 Resultaten.	27
3.3 Conclusie.....	29

4. Inventarisatie methoden voor bepaling paairijpheid.....	30
4.1 Werkwijze.....	30
4.2 Resultaten.....	30
4.3 Conclusie.....	31
5. Bepaling van paairijpheid van de mossel.....	32
5.1 Werkwijze.....	32
5.1.1 Monster locatie en bemonstering.....	32
5.1.2 Analyse van het paairijpheids stadium van de mossel.....	32
5.1.2.1 Afmetingen van de mantel.....	32
5.1.2.2 Weefsel preparatie.....	32
5.1.2.3 Weefsel inbedden.....	33
5.1.2.4 Weefsel snijden tot coupes.....	34
5.1.2.5 Weefsel kleuring.....	34
5.1.2.6 Analyseren onder de microscoop.....	35
5.1.2.7 Onderverdeling in het stadium van gonaden ontwikkeling.....	35
5.2 Resultaten.....	35
5.2.1 Verschil tussen Bouin en Davidson fixatief.....	35
5.2.2 Variatie in gewicht van de mantel.....	36
5.2.3 Aanwezigheid van ei- en zaadcellen t.o.v. het gewicht van de mantel.....	37
5.3 Conclusie.....	38
6. Conclusies en aanbevelingen.....	39
6.1 Algen cultivatie systemen.....	39
6.2 Aanbeveling met betrekking tot het BioFence systeem.....	40
6.3 Bepaling van de paairijpheid van de mossel.....	40
6.4 Aanbeveling met betrekking tot bepaling van de paairijpheid.....	40
7. Literatuurlijst.....	41
7.1 Broninformatie bij figuren.....	42
8. Verklarende woordenlijst.....	43
Bijlage 1; Bouin en Davidson fixatief.....	44
Samenstelling Bouin fixatief.....	44
Samenstelling Davidson fixatief.....	44
Bijlage 2; Kostenraming algen cultivatie systemen.....	45

Voorwoord

De laatste drie maanden, ook wel afstudeerstage genoemd, was net zo een succes als de stage hiervoor. Vanaf de eerste dag heb ik het werk erg leuk gevonden. Het Centrum voor Schelpdieronderzoek is een klein, maar daardoor efficiënt werkend instituut. Tevens maak je hierdoor makkelijker contact met de andere werknemers en zodoende krijg je ook een betere indruk van de lopende projecten.

De mensen waren allemaal bereid om te helpen als ik ergens niet uitkwam, of iets niet kon vinden, wat natuurlijk de vorderingen van mijn project ten goede kwam.

Mijn begeleidster bij IMARES, Pauline Kamermans, probeerde zo goed mogelijk op de hoogte te blijven van de vorderingen van mijn project. Elke week kwamen we even bij elkaar om door te spreken hoever ik was en of er knelpunten zaten. Als ik iets belangrijks te melden had of als er problemen zouden zijn kon ik ook op andere momenten bij haar terecht. Kortom, ik voelde me hier helemaal op mijn plaats en deze plaats is zeker een aanrader voor een volgende student.

Samenvatting

Het uitgangspunt van de Nederlandse mosselsector is het cultiveren van mosselzaad. De eicellen en spermacellen van duizenden mosselen worden tijdens de voortplantingsperiode (van de lente tot de zomer) bijna tegelijkertijd uitgestoten. De bevruchting vindt in het zeewater plaats. Tijdens de ontwikkeling kan men twee larvale stadia onderscheiden: de trochophora- en de veligerlarve. Als deze vrij in het water zwemmende larven zich als kleine schelpen aan de zeebodem vastzetten ontstaan er complete mosselzaadbanken. Deze banken zijn de basis voor het opkweken van de mossel *Mytilus edulis*. Het mosselzaad wordt 2 keer per jaar vrijgegeven voor de vangst. Mosselkwekers mogen dit mosselzaad opvissen en op eigen kweekpercelen uitzetten. De schelpdiersector heeft te maken met grote fluctuaties in het aanbod van (mossel)zaad, waardoor het moeilijk wordt om aan de nog steeds groeiende vraag van consumptie schelpdieren te kunnen voldoen. Tevens worden de toegestane vangsten gelimiteerd in verband met de voedselbeschikbaarheid voor vogels. Om toch aan de vraag van de klant te kunnen voldoen is men begonnen met het opzetten van een gecontroleerd kweekstelsel voor schelpdieren als aanvulling op het huidige aanbod van mosselzaad.

Algenkweek.

Schelpdieren voeden zich voornamelijk met verschillende soorten eencellige algen. Om deze dieren het hele jaar door te kweken is dus een aanvoer van algen nodig. Zodoende moet er behalve een goed systeem voor de hatchery/nursery¹ ook nog een efficiënt systeem voor algenkweek opgezet worden. Hier zijn verschillende bedrijven en instellingen de afgelopen jaren mee begonnen. Dit rapport is een inventarisatie van de mogelijkheden voor de algenkweek en beschrijft tevens de werking van bestaande algensystemen. Op basis van de in dit rapport gepubliceerde resultaten zijn de twee beste systemen uitgekozen en zover als mogelijk uitgewerkt, inclusief een kostenraming.

Uit deze inventarisatie is gebleken dat het Seacaps systeem van Seasalter Ltd. en het BioFence systeem van BioFence Ltd. het beste resultaat kunnen geven. Het Seacaps systeem bestaat uit recht opstaande zakken die aan elkaar gekoppeld zijn en zo een continue cultuur vormen. Het BioFence systeem is een zogeheten buizenreactor. De algen worden door, in rekken geplaatste, horizontale buizen geleid en kunnen als de concentratie hoog genoeg is aan het einde afgetapt worden. In de kostenraming van paragraaf 2.2.4 is af te lezen dat het BioFence systeem op de lange termijn efficiënter (kleinere afmetingen, minder manuren) en goedkoper algen kan produceren. Het Seacaps systeem vraagt meer onderhoud, en dus manuren, dan het BioFence systeem. Van het Seacaps systeem is al bekend dat het goed werkt, mede ook omdat het in vele hatchery's al gebruikt wordt. Het BioFence systeem is een relatief nieuw product, waardoor weinig ervaring met dit systeem beschikbaar is. Om deze redenen is besloten het BioFence systeem te gaan testen in de mossel hatchery van Roem van Yerseke. Tijdens de opbouw van het systeem kampten wij met een aantal tegenslagen, waardoor het operationeel maken van het systeem binnen deze periode niet mogelijk was. In hoofdstuk 3 wordt uitgelegd welke problemen wij tegenkwamen en hoe wij die geprobeerd hebben op te lossen.

Paairijpheid.

Op dit moment wordt de conditie van de ouderdieren visueel bepaald door mosselen open te steken en naar het vlees te kijken. Het komt echter te vaak voor dat de opengemaakte ouderdieren er wel goed uitzien, maar dat de rest van de groep toch niet paait. Er ontbreekt een efficiënte methode om de paairijpheid van ouderdieren te bepalen, met als gevolg dat er geen optimaal resultaat behaald kan worden. Op basis van mijn literatuuronderzoek, beschreven in paragraaf 4.2, is besloten om een snellere methode op te stellen voor de bepaling van de paairijpheid. In deze alternatieve methode wordt het gewicht van de mosselmantel uitgezet tegen het stadium van gonaden ontwikkeling in de mossel én de tijd. Uiteindelijk kan aan de hand van het gewicht van de mosselmantel, het paairijpheid stadium van de mossel *Mytilus edulis* bepaald worden.

De determinatie van het stadium van geslachtsontwikkeling is gebaseerd op een histologische evaluatie van de rijping stadia van mossel gonaden (Newell, 1989).

Abstract

The main point of the Dutch mussel sector is cultivating mussel seed. The oocytes and spermatozoa, of thousands of mussels, are expelled almost at the same time during the reproduction period (from spring up to summer). Fertilization takes place in a marine environment. During development, we can distinguish two larvae stages: the trochophora - and the veligerlarvae. If these, free swimming larvae, fix themselves as small shells to the sea floor a mussel seed bank will arise. These banks are the source for rearing the marine mussel *Mytilus edulis*. Two times a year, the mussel seed banks are released for capture. Mussel-farmers can fish out this mussel seed and drop them on their own culture plots. The shellfish farmers get larger problems with obtaining sufficient (mussel)seed to be able to satisfy the increasing demand of consumption mussels. The permitted captures are limited also, concerning the food availability for birds. To satisfy the demand of the customer, the shellfish factory started with setting up controlled indoor and outdoor cultivation systems in addition to the present supply of mussel seed.

Algae cultivation.

Shellfish mainly feed themselves with several types of phytoplankton. Cultivation of algae is necessary to deliver food for the mussels all year round. In that case, an efficient system for cultivation of algae must be set up for the hatchery/nursery. Several years before, companies and institutes already started with the development of different cultivation systems. This report is an inventory of the possibilities for the algae cultivation and describes the functioning of existing algae systems. Depending on the results published in this report the two best systems have been selected and explained in detail, including an estimation of the cost.

From this inventory it has become clear that the Seacaps system of Seasalter Ltd. and the BioFence system of BioFence Ltd. will give the best result. The Seacaps system exists of bags (placed vertically) which connect each other and form a continuous culture. The BioFence system is a tubular bioreactor system, working by recirculating algae, nutrients, water and carbon dioxide round transparent tubes, which are placed in manifolds. Algae are collected from the overflow. There is only little knowledge available about results of the BioFence system, because it is one of the most recent algae cultivation systems. We made the decision to start up an experiment using the BioFence system in the mussel hatchery of Roem van Yerseke. During advancement of research we contended with a number of negative developments. As a result of these developments it was not possible to use the algae cultivation system within this period of time. Chapter 3 explains which problems we encountered and how we have tried to solve the problems.

Spawning of mussels.

At this moment the condition of the parent animals is stipulated visually. Mussels are opened to take a look at the condition of mantle tissue. Too frequently it occurs that opened parent animals show a well developed gonad ready for spawning, but rest of the group does not start spawning. They still do not have an efficient method to stipulate the gonadal development of parent animals, so they can not achieve an optimum result. On the basis of the results of the literature research, described in paragraph 4.2, we decided to develop a faster essay for gonadal development. In this alternative method the weight of the mussel mantle is turned off against the stage of gonadal development in the mussel and the time. Finally, the reproduction stage of mussel *Mytilus edulis* is stipulated by means of the weight of the mussel mantle.

Determination of stage of gonadal development has been based on histological evaluation of the maturation stages of mussel *Mytilus edulis* (Newell, 1989).

1. Inleiding

1.1 Achtergrond

Het uitgangspunt van de Nederlandse mosselsector is het cultiveren van mosselzaad. De eicellen en spermacellen van duizenden mosselen worden tijdens de voortplantingsperiode (van de lente tot de zomer) bijna tegelijkertijd uitgestoten. De bevruchting vindt in het zeewater plaats. Tijdens de ontwikkeling kan men twee larvale stadia onderscheiden: de trochophora- en de veligerlarve. Als deze vrij in het water zwemmende larven zich als kleine schelpen aan de zeebodem vastzetten ontstaan er complete mosselzaadbanken. Deze banken zijn de basis voor het opkweken van (consumptie)mosselen. Het mosselzaad wordt 2 keer per jaar vrijgegeven voor de vangst. Mosselkwekers mogen dit mosselzaad opvissen en op eigen kweekpercelen uitzetten. De schelpdiersector heeft te maken met grote fluctuaties in het aanbod van (mossel)zaad, waardoor het moeilijk wordt om aan de nog steeds groeiende vraag van consumptie schelpdieren te kunnen voldoen. Tevens worden de toegestane vangsten gelimiteerd in verband met de voedselbeschikbaarheid voor vogels. Om toch aan de vraag van de klant te kunnen voldoen is men begonnen met het opzetten van een gecontroleerd kweekstelsel voor schelpdieren als aanvulling op het huidige aanbod van mosselzaad. Deze hatchery/nursery systemen zijn tot op heden volop in ontwikkeling.

Schelpdieren voeden zich voornamelijk met verschillende soorten fytoplankton², om deze dieren het hele jaar door te kweken is dus een aanvoer van algen nodig. Zodoende moet er behalve een goed systeem voor de hatchery/nursery ook nog een efficiënt systeem voor algenkweek opgezet worden. Hier zijn verschillende bedrijven en instellingen de afgelopen jaren mee begonnen. Aan mij de taak om een optimaal systeem voor algenkweek te vinden, te testen en te optimaliseren.

Een ander probleem is het bepalen van de paairijpheid³ van de ouderdieren. Op dit moment wordt de conditie van de ouderdieren visueel bepaald door mosselen open te steken en naar het vlees te kijken. Het komt echter te vaak voor dat de opengemaakte ouderdieren er wel goed uitzien, maar dat de rest van de groep toch niet paait. Er ontbreekt dus een efficiënte methode om de paairijpheid van ouderdieren te bepalen, met als gevolg dat er geen optimaal resultaat behaald kan worden. Aan mij de taak om een efficiënte methode voor het bepalen van de paairijpheid van ouderdieren op te stellen en te testen.

1.2 Probleemstelling

Algenkweek.

In een hatchery neemt de kweek van algen relatief veel tijd in beslag. Momenteel wordt in de hatchery van Roem van Yerseke gebruik gemaakt van kweek in een batch⁴ cultuur van 50 liter met toevoeging van CO₂ (Matthijs Koole, 2005), waar een maximale celdichtheid van 14.4 miljoen algen per ml in 11 dagen bereikt wordt. Er moet gezocht worden naar een nieuw of aanvullend systeem met een nog optimalere verhouding tussen de productiviteit, benodigde tijd, benodigde uren voor onderhoud en kosten. Zodoende kunnen de onderstaande vragen geformuleerd worden;

- Welke systemen zijn beschikbaar voor algenkweek met betrekking tot de schelpdiersector?
- Hoeveel algen kan het systeem per tijdseenheid produceren?
- Hoeveel tijd kost het onderhoud van dat systeem?
- Waar is het te krijgen en hoeveel kost het?

Bij het uitgekozen systeem kunnen de volgende vragen gesteld worden;

- Hoeveel tijd heeft het systeem nodig om een continue cultuur op te starten?
- Welke concentratie algen en welk debiet kan er met kunstlicht behaald worden?
- Is dit systeem nog verder te optimaliseren?
- Hoe is de verhouding tussen opbrengst en kosten voor onderhoud?

Paairijpheid.

In een hatchery is het beschikbaar hebben van voldoende paairijpe ouderdieren belangrijk. De conditie van de ouderdieren wordt momenteel visueel bepaald door mosselen open te steken en naar het vlees te kijken. Het komt echter vaak voor dat de opengemaakte dieren er wel goed uitzien, maar dat de rest van de groep toch niet paait. Er dient gezocht te worden naar een betere methode om de paairijpheid te bepalen. Zodoende kunnen de onderstaande vragen geformuleerd worden.

- Met welke methoden kan de paairijpheid van een groep mosselen bepaald worden?
- Welke kenmerken geven de paairijpheid van mosselen aan?
- Hoe ontwikkelen de gonaden⁵ van de mosselen zich onder natuurlijke omstandigheden (in het veld)?

Bij het uittesten van de gekozen methode kunnen de volgende vragen gesteld worden;

- Is er door het nemen van monsters in de tijd, verloop terug te vinden in de paairijpheid van de *Mytilus edulis*?
- Kan er een relatie tussen de gemeten parameters worden gelegd, zodat een snellere inschatting van de paairijpheid mogelijk is.

1.3 Doelstelling

Algenkweek.

Het vinden van een bestaand indoor kweekstelsel voor algen, dat bruikbaar is in de schelpdiersector (zout water geschikt). Tevens moet hier gezocht worden naar de juiste balans tussen kosten en baten.

Het bouwen, testen en/of optimaliseren van het gekozen stelsel voor algenkweek.

Paairijpheid.

Inventariseren van de op dit moment gebruikte methoden voor het bepalen van paairijpheid bij mosselen.

Het ontwikkelen en testen van een snellere methode om de paairijpheid van schelpdieren, te bepalen.

2. Inventarisatie algenkweek systemen.

2.1 Werkwijze.

Om een gedegen literatuuronderzoek te kunnen verrichten is het belangrijk om een systematische werkwijze aan te houden. Zeker in het geval van een vorm van aquacultuur die nog in de kinderschoenen staat, is er nog geen overzicht van de beschikbare artikelen waardoor veel bronnen geraadpleegd moeten worden om niets over het hoofd te zien. Een overzichtelijke werkwijze is dan ook de basis voor een goede inventarisatie van de mogelijkheden.

Er is begonnen met het verzamelen van namen, zowel bedrijven als onderzoekers, die met algenkweek en/of paairijpheid werken en gewerkt hebben. Door alle mensen te benaderen kan er al een eerste selectie gemaakt worden van bruikbare en onbruikbare bronnen. De bruikbare bedrijven en of contacten zijn benadert, om op deze manier zoveel mogelijk informatie over het desbetreffende onderwerp te verzamelen. De informatie die op deze manier verzameld is kan dan geordend worden op verschillende manieren. In dit geval is gekozen voor een ordening op basis van de verschillende basiswerkingen van de systemen (in het geval van algenkweek). De gebruikte bronnen zijn allemaal opgenomen in de literatuurlijst, zodat de informatie altijd terug te vinden is.

Na de beschrijving van alle systemen zijn de beste twee systeem uitgekozen op basis van de kostenraming, algenproductie en afmetingen. Vervolgens zijn deze systemen nog uitgebreider tegen elkaar uitgezet, inclusief een gedetailleerde kostenraming. Uiteindelijk is het beste systeem opgebouwd, getest en vergeleken met het huidige systeem. Als dit systeem beter presteert dan het huidige systeem, kan het in gebruik genomen worden voor de hatchery.

2.2 Resultaten.

2.2.1 Voedselaanbod larven en mosselzaad.

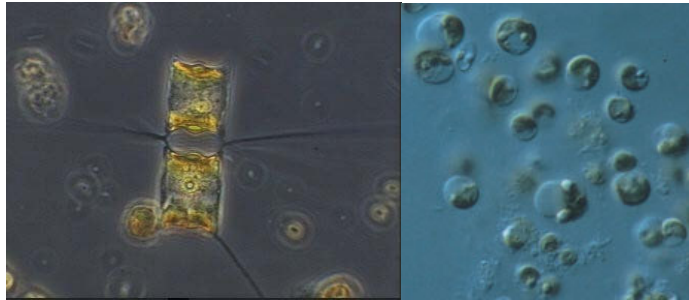
Mosselen filteren een grote verscheidenheid aan deeltjes en kleine organismen uit het zeewater (Helm et al. 2004). Dit kunnen bacteriën, fytoplankton, opgelost organisch materiaal en detritus⁶ zijn. Mossellarven voeden zich voornamelijk met de kleine soorten fytoplankton. In de hatchery zijn alleen zelf gekweekte algenculturen beschikbaar, zodoende is het erg belangrijk om de juiste culturen te kiezen. Op dit moment wordt er aan de larven zowel *Chaetoceros gracilis* als *Isochrysis galbana* gevoerd. Deze algensoorten worden snel door de larven opgenomen.

Chaetoceros gracilis.

Chaetoceros gracilis behoort tot de diatomeeën⁷, een eencellige alg. Door stekels van aangrenzende cellen onderling te verbinden wordt er een ketting gevormd. Individuele cellen zien er vierkant uit en variëren in lengte tussen de 6 en 9 µm. De gevormde kettingen bestaan uit 10 tot 20 cellen, waarmee een lengte tot 200 µm bereikt kan worden. *Chaetoceros gracilis* wordt veel als voer gebruikt voor radardiertjes, schelpdieren en garnalen.

Isochrysis galbana.

Isochrysis galbana behoort tot de flagellaten⁸. Kenmerkend zijn de twee flagella aan de uiteinden van de cel. Deze cellen bewegen snel door het water en roteren (door de bewegende flagella) als ze zwemmen. De cel is cirkelvormig en tussen de 4 en 8 µm groot. De chloroplast beslaat ongeveer eenderde van de cel. Ook *Isochrysis galbana* is een veel gebruikte soort voor het voeden van radardiertjes, watervlooien en filter feeders⁹ in het algemeen.



Figuur 1,2 *Chaetoceros gracilis* en *Isochrysis galbana*.

2.2.2 Groei van een algencultuur.

2.2.2.1 Optimale leefomstandigheden.

Onderstaande informatie is gebaseerd op het boek "Plankton culture manual" (Hoff en Snell, 1989). Ondanks het feit dat microalgen zeer sterke cellen zijn, moet hun milieu aan specifieke eisen voldoen om een optimale groei te kunnen bereiken. Zoals bij alle levende organismen hebben de fysische condities grote invloed op de groei en voortplanting. De optimale omstandigheden zijn voor elke algensoort verschillend. Elke soort wordt beïnvloed door de temperatuur en temperatuurschommelingen, licht intensiteit en lichtspectrum, de saliniteit en de verhouding tussen zuurstof en koolstofdioxide. De belangrijkste invloeden voor een algensoort zullen hieronder nader toegelicht worden.

Circulatie patronen.

De circulatie van het water speelt een belangrijke rol in de productie van algen. Fogg en Than-Tun (1960) bewezen al dat algen veel sneller groeien als het water in beweging wordt gehouden. Door de circulatie van het water wentelen de algen continue om, waardoor de gehele cel optimaal aan het licht bloot gesteld kan worden.

Licht intensiteit.

Een licht intensiteit van 2500-5000 lux is optimaal voor microalgen. Echter, de kwaliteit van het lichtspectrum, oftewel de golflengte van het licht, is in veel gevallen niet van voldoende kwaliteit. De meeste alge reageren op rood en blauw licht, zodoende zijn de standaard "cool white" lampen ongeschikt voor een algencultuur. De meeste kwekers van algen maken gebruik van speciale belichting, zoals lampen van het merk Mazdafluor.

Een veelvoorkomend probleem bij algenkweek is het "self shading", indien er hoge concentraties algen worden bereikt. De algen zitten dan zo dicht op elkaar dat het licht niet meer ver genoeg doordringt, waardoor alleen de algen aan de buitenkant belicht worden. Op deze manier treedt licht limitatie al snel op, zodoende houden de circulatie patronen van het water en de lichtintensiteit nauw verband met elkaar.

Temperatuur.

Algen stellen in verhouding tot andere organismen, weinig eisen aan de temperatuur. De beste groeitemperatuur wordt bereikt in de range van 16 tot 27 graden Celsius met een optimum van 24 graden Celsius. Kleine fluctuaties hebben niet direct invloed op de algencultuur, tevens overleven algen ook bij lagere temperaturen. De groeisnelheid neemt in dat geval drastisch af. Hoge temperaturen zijn nog het meest limiterend voor de algen. Komt de temperatuur boven de 35 graden Celsius, dan zal de cultuur dood gaan en instorten¹⁰.

Essentiële nutriënten.

De groei van een algencultuur is afhankelijk van de juiste balans tussen specifieke nutriënten¹¹. Zodra de balans verstoord is zal de algencultuur direct instorten. De belangrijkste anorganische elementen voor algen zijn stikstof, fosfaten, potassium, magnesium, calcium, sulfaat, ijzer, sodium, cobalt en joden. Micro nutriënten, bestaand uit vitaminen en metaalionen, zijn nodig voor een optimale groei. De meeste microalgen zijn auxotrofen¹², en kunnen niet alle noodzakelijke vitaminen omzetten. De noodzakelijke vitaminen moeten uit het omringende milieu opgenomen worden. Thiamine (vitamine B), cobalamine (B₁₂) en biotine zijn essentiële vitaminen voor de meeste microalgen. Er is bewezen dat meer dan 70% van alle planktonalgen vitamine B₁₂ nodig hebben (Spotte 1979).

Uiteraard zijn er nog veel meer elementen die door algen benut worden maar die worden slechts in beperkte mate door de algen opgenomen.

Zuurstof, koolstofdioxide en pH.

De mate van zuurstof en koolstofdioxide toevoeging aan een cultuur met hoge dichtheid kan een limiterende factor worden. Microalgen zetten koolstofdioxide gedurende fotosynthese om, waarbij zuurstof vrij komt. Het extra toevoegen van koolstofdioxide of sodiumcarbonaten kan een exponentiële groei op gang brengen.

Uitzonderlijk hoge of lage pH waarden belemmeren de werking van diverse cellulaire processen, met als gevolg dat de groei stagneert. Als stikstof wordt toegevoegd aan algenculturen, zoals ammonium zouten, zullen de meeste algen selectief een ammonium ion opnemen waardoor de pH verlaagt wordt. Omgekeerd, als nitraat ionen worden verwijderd door de algen zal de pH als intentie hebben om toe te nemen maar de koolstofdioxide die toegevoegd wordt buffert die variatie. Als koolstofdioxide dan limiterend wordt, kan de pH boven de 11 uitkomen, met het gevolg dat de cultuur niet overleeft. Een juiste balancerings van zowel pH als koolstofdioxide toevoeging is dan ook noodzakelijk.

Bij het CO₂ balanceren is het van belang dat dagelijks de pH wordt gemeten om te voorkomen dat de pH te laag wordt. Als de pH te laag wordt, wat een negatief effect heeft op de groei van de algen, moet de CO₂ toevoer zachter worden gezet. De optimale pH voor algen ligt tussen 7 en 8.5. Omdat het toevoegen van CO₂ er voor zorgt dat de pH omlaag gaat, is het belangrijk om niet te veel toe te voegen. De pH mag in geen geval onder de 7 zakken, bij hogere dichtheden kan er meer CO₂ worden toegevoegd. De algen nemen dan meer CO₂ op voor de fotosynthese waardoor de pH omhoog gaat (Koole,2005).

2.2.2.2 Ontwikkeling van een algencultuur.

In de ontwikkeling van een algencultuur zijn vijf verschillende groeifases (fig.3) te herkennen. Hieronder zullen alle fases afzonderlijk besproken worden.

1. "Lag" fase.

De introductie oftewel opstart fase van de cultuur. In deze periode vindt nauwelijks groei plaats. Deze fase is beter te omschrijven als een acclimatisatie fase. De algen hebben tijd nodig om zich aan te passen aan de omgeving. Toegediende mineralen en nutriënten kunnen deze fase enigszins inkorten, afhankelijk van de algensoort.

2. Eerste deel exponentiële groeifase.

Celdeling neemt hier snel toe (logaritmische groei). Cellen die aan het einde van deze periode geoogst worden zijn goed ontwikkeld. Nieuwe culturen kunnen op dat moment weer geïnoculeerd worden vanuit deze algencultuur. Hiermee kan de periode voor opschalen van de kweek verkort worden. De duur van de groeifase kan gecontroleerd worden door dagelijks eenderde van het cultuurvolume te oogsten, en hiervoor in de plaats weer verse nutriënten toe te voegen. Indien er sprake is van een continue cultuur wordt er altijd in deze periode geoogst.

3. Tweede deel exponentiële groeifase.

De duur van de exponentiële groei is afhankelijk van de beschikbare hoeveelheid nutriënten, licht, koolstofdioxide en andere fysische en chemische factoren die de groei kunnen limiteren. Aan het eind van de groeifase neemt de celdeling significant af. Cellen die op dat moment geoogst worden hebben de maximale nutriënten waarde en dichtheid bereikt. Indien sprake is van een batch cultuur wordt er altijd op dit moment geoogst.

4. Stationaire fase.

De celdeling is minimaal en de dichtheid van de cultuur verandert niet meer. In een batch cultuur worden de nutriënten wel geconsumeerd maar niet aangevuld. Hoe groter de dichtheid van de cultuur, des te korter is de stationaire fase. De cellen die in deze periode geoogst worden hebben al een groot deel van hun nutriënten waarde verloren.

5. "Crash" fase.

De dichtheid van de cultuur neemt sterk af (cultuur stort in). Oorzaken hiervan kunnen zijn; gebrek aan nutriënten, zuurstof tekort of verandering van de pH. Een ingestorte cultuur is onmogelijk opnieuw op te starten.

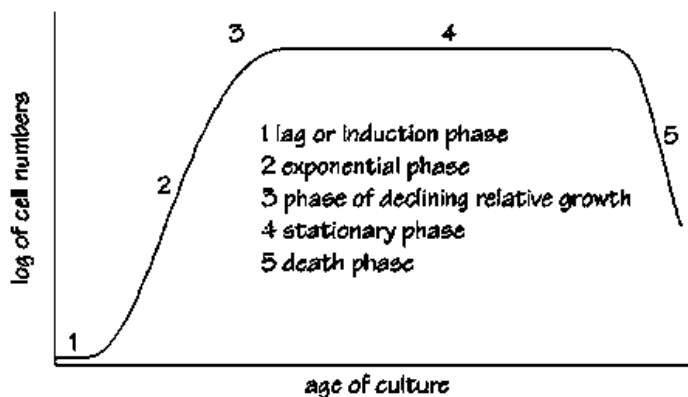


Fig. 3 De ontwikkeling van een algencultuur.

2.2.3 Batch cultuur en continue cultuur.

2.2.3.1 Batch cultuur.

Onderstaande informatie is gebaseerd op het boek "Handbook of Microalgal Culture" (Richmond, 2004).

De batch cultuur ontstaat door een eenmalige inoculatie van cellen in zakken en/of een erlenmeyer met nutriënten verrijkt zeewater, gevolgd door een groeiperiode van meerdere dagen. Uiteindelijk worden de algen geoogst net voordat ze de stationaire fase bereikt hebben. De algen die over zijn (meestal 10 % van het totale volume) kan gebruikt worden om een nieuwe zak te inoculeren. De grootte van de culturen kan variëren van 2 liter startcultures tot bassins van 25.000 liter, afhankelijk van de benodigde hoeveelheid algen.

Batch culturen worden vanwege de eenvoudige constructie en flexibiliteit van de systemen wereldwijd gebruikt voor een breed scala aan doeleinden. Ondanks dat dit systeem het eenvoudigst realiseerbaar is, werkt het inefficiënt in vergelijking met de continue cultuur. Het oogsten van de batch cultuur is helemaal afhankelijk van wanneer de stationaire fase bereikt wordt. Tevens heeft de algencultuur minimaal een week nodig om tot een dichtheid te komen waarvan geoogst kan worden. Er is een grote variatie in de kwaliteit van de algen omdat de groei van culturen zelden precies gelijk aan elkaar lopen. De kwaliteit van de algen wordt bepaald door het moment van oogsten (wanneer op de dag, exacte groeifase).

Een ander nadeel van de batch cultuur is de mogelijke besmetting van de algencultuur, waardoor deze onbruikbaar wordt, tijdens de inoculatie. De hoge beginconcentratie nutriënten en de lage concentratie algen kan er voor zorgen dat bacteriën zich sneller ontwikkelen dan de algencultuur, met als gevolg dat de cultuur overgroeit wordt door de bacteriën. Als laatste is het van belang om te vermelden dat de batch cultuur veel manuren vraagt vanwege het met de hand oogsten, schoon maken, steriliseren, hervullen en inoculeren van de zakken.

2.2.3.2 Continue cultuur.

De continue cultuur is een systeem waarbij voortdurend nieuwe nutriënten aan het zeewater toegevoegd worden en tegelijkertijd algen geoogst worden. De regelbare verblijftijd (doorstroomsnelheid) zorgt ervoor dat de cultuur constant rond de maximum celdichtheid gehouden kan worden.

Er kunnen twee categorieën culturen worden onderscheiden:

- turbidostat culture ; De algenconcentratie wordt op een vooraf ingesteld niveau gehouden door een regulatie van de nutriënten toevoer.
- chemostat culture ; Een flow van vers medium wordt in een gelijkmatig tempo aan de cultuur toegevoegd. Op deze manier wordt de groeisnelheid en niet de celdichtheid gereguleerd.

De nadelen van de continue cultuur zijn de relatief hoge kosten en de complexe constructie van het systeem. De benodigde omstandigheden voor een constante lichtbron en stabiele temperatuur beperken de meeste systeem tot indoor gebruik. Daarentegen biedt een continue cultuur de mogelijkheid om constant kwalitatief goede algen te produceren. Tevens is het systeem geautomatiseerd waardoor er minder manuren nodig zijn voor onderhoud van het systeem.

2.2.4 Indoor cultivatie mogelijkheden.

Algen kunnen zowel binnen als buiten gekweekt worden, gezien het relatief koude klimaat van Nederland en het feit dat de hatchery binnen is, richt ik mij alleen op de systemen die binnen bruikbaar zijn.

Alle algensystemen die van een lichtbron gebruik maken vallen onder de naam fotobioreactoren. Een fotobioreactor is te omschrijven als een reactor waarin fototrofen organismen (in dit geval algen) gekweekt worden, of een reactor die gebruikt wordt om een fotobiologische reactie op gang te brengen.

Fotobioreactoren kunnen onderverdeeld worden op basis van het ontwerp, operationele kenmerken en constructie materialen. Het schema hieronder geeft een overzicht van de mogelijkheden.

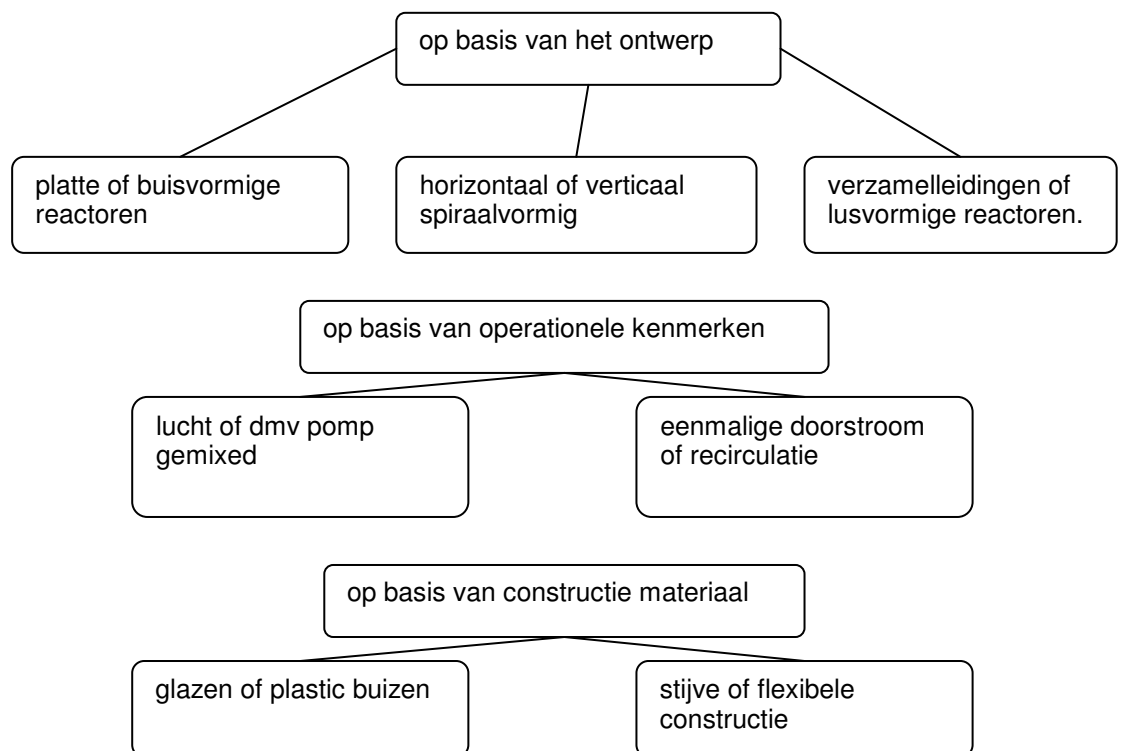


Fig. 4 Rangschikking van algen cultivatie systemen.

In dit rapport worden de algen cultivatie systemen gerangschikt op basis van het ontwerp en de bijbehorende subcategorieën die in figuur 4 genoemd zijn.

2.2.4.1 Platte fotobioreactoren.

Platte fotobioreactoren (fig.5) worden vaak gebruikt om fototrofe organismen op laboratoriumschaal te kweken, vanwege de geringe afmetingen en de mogelijkheid om respiratie¹³ te meten. In de loop van de tijd zijn er verschillende typen platte bioreactoren op de markt gekomen. Het meest gebruikte model is een dun plat paneel ontwikkeld in 2000 door Subitec GmbH.

Dit paneel is opgebouwd uit transparante pvc platen die het beste te vergelijken zijn met de radiator van de verwarming. De platen liggen plat op de grond en het water wordt door de 'radiator' gepompt. Na een aantal jaren is dit ontwerp doorontwikkeld tot een systeem van glasplaten. Dit systeem heeft minder weerstand en is eenvoudiger schoon te maken, nadeel is natuurlijk wel de kwetsbaarheid van het systeem. De laatste serie systemen kan in willekeurige hoeken gekanteld worden. Indien het systeem in een kas staat is het mogelijk om de baan van de zon te volgen en zo optimaal gebruik te maken van het zonlicht. In de winter is een hoek van 60 graden optimaal, terwijl in de zomer een hoek van 30 graden het beste resultaat geeft.

Nadeel aan dit ontwerp is de geringe inhoud van de radiatoren, voor een commercieel aantrekkelijke productie zijn enorm veel panelen nodig om voldoende algen te kweken. Veel ruimte, kost veel geld en ook de materialen zijn erg kostbaar. Zodoende is dit systeem niet het meest geschikt voor commerciële doeleinden of massa productie.



Fig. 5 Platte fotobioreactor (Subitec)

2.2.4.2 Buisvormige fotobioreactoren.

Fotobioreactoren die bestaan uit buizen zijn op te splitsen in lusvormige systemen of systemen die bestaan uit een verzameling buizen. Beide ontwerpen zullen hieronder kort besproken worden.

1. Bioreactoren met lussen (oud).

Meerdere rechte buizen liggen naast elkaar en zijn door middel van u-vormige uiteinden met elkaar verbonden. Het oorspronkelijke ontwerp komt van Tamiya (1957) maar in de loop der tijd zijn er verschillende geoptimaliseerde modellen op de markt gekomen. Tegenwoordig is er nog een model bruikbaar, de reactor geleverd door Inalco S.p.A. (Italië). Nadeel van dit systeem is de afmeting, waardoor de temperatuur moeilijk te regelen is en dat het systeem een groot oppervlak in beslag neemt.

2. Bioreactoren met verzamelleiding (huidig).

Deze bioreactoren zijn gebaseerd op het oude ontwerp wat hierboven beschreven is. Het grote verschil is dat de serie naast elkaar gelegen buizen aan het einde met elkaar verbonden zijn door twee verzamelleidingen. Een verzamelpunt voor recirculatie en een verzamelpunt voor het aftappen van de algen suspensie. De lusvorm was niet efficiënt, meer dan 15% van de energie ging verloren door de bochten. In het nieuwe ontwerp wordt dat door de verzamelleidingen voorkomen. Tegenwoordig bestaan ze in vele vormen en maten, variërend van 6 tot 85 m in lengte en geplaatst in alle mogelijke hoeken. De twee bekendste ontwikkelaars van dit systeem zijn Tredici en Zittelli. In 1998 optimaliseerden ze dit ontwerp tot de 'near-horizontal manifold-type reactor', afgekort NHTR. De buizen van dit systeem zijn een klein beetje schuin gelegd waardoor zowel de O₂ als CO₂ injectie eenvoudiger te mengen zijn met het medium. Het grootste systeem kon wel 1200 liter algen per dag leveren. De nieuwste ontwikkelingen zijn gaande bij Technogrow (fig.6) en BioFence Ltd. (fig.7), zij hebben een geoptimaliseerd systeem ontworpen waardoor de opbrengst bijzonder hoog kan zijn. Het nadeel van Technogrow is de grote oppervlakte van het systeem. BioFence is door de relatief eenvoudige opbouw en de veel gebruikte materialen, een goedkoop systeem in zowel aanschaf als onderhoud. Het meest recente systeem van Biofence Ltd. wordt gebruikt door de Universiteit van Florence.



Fig. 6 Buisvormige fotobioreactor (Technogrow).



Fig. 7 BioFence Ltd. fotobioreactor.

3. Spiraalvormige fotobioreactoren.

Een bioreactor die bestaat uit een lange flexibele slang of buis die rond een staande structuur is gewikkeld. Biotechna Ltd. (fig.8) heeft patent op dit ontwerp aangevraagd, onder de naam 'biocoil' PBR. De buizen worden iets schuin gerold waardoor er een omhoog gerichte spiraalvorm ontstaat. O₂ en CO₂ injectie kan dan eenvoudig aan de onderzijde plaatsvinden. Een voordeel van dit systeem is dat het eenvoudig werkt en in diameter minder plaats inneemt dan een liggend systeem. Nadeel is in dit geval de hoogte en de geringe dikte (3-7 cm) van de buis, hierdoor is een enorm systeem nodig om het commercieel interessant te maken.



Fig. 8 Helixvormige fotobioreactor.

2.2.4.3 Verticale cilinders en zakken.

Verticale buisreactoren, hierna genoemd kolom reactoren, zijn simpele systemen waarbij het mixen wordt bevorderd door injectie van lucht. Verschillende kolom reactoren zijn ontwikkeld naar aanleiding van Cook's eerste ontwerp op de Stanford Universiteit in Californië. Deze eerste proto types bestonden uit glazen kolommen van 1.8 m hoog en 10 cm breed. Gezien de geringe afmetingen was de opbrengst nog minimaal. Dit systeem is door vele wetenschappers aangepast, opgeschaald en geoptimaliseerd. De meest recente leverancier is Seasalter Shellfish Ltd. (fig.9). Dit bedrijf levert kolommen in de vorm van plastic zakken (soms ook kunststof cilinders) over de hele wereld. Het systeem wordt wereldwijd gebruikt in hatcheries om algen te produceren ten behoeve van het voeden van larven voor zowel schelpdieren, als vissen. Het grootste nadeel van dit systeem is de 'selfshading' (algen komen in eigen schaduw bij grote diameter) en de aangroei van algen aan de wand. De nieuwste innovatie (momenteel alleen op laboratoriumschaal) is een model met twee in elkaar geschoven cilinders (fig.10,11,12). Zowel aan de buitenkant (fig.10) als in de binnenste cilinder (fig.12) kunnen lichtbronnen geplaatst worden zodat de laag algen tussen de twee cilinders optimaal belicht kan worden. Momenteel wordt dit systeem operationeel gemaakt door onder andere ECN (Nederland) en Maricoltura di Rosignano Solvay (Italië) (fig.11 en 12).



Fig. 9 Seacaps systeem (Seasalter Ltd.)

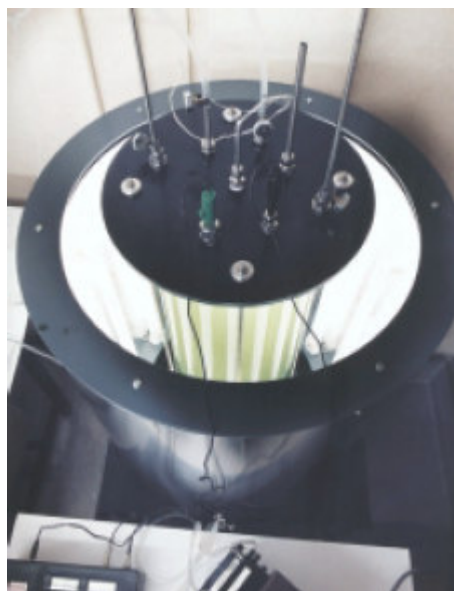


Fig. 10 Bioreactor van ECN.



Fig. 11 en 12 Bioreactor van de Universiteit van Florence.

2.2.5 Overzicht inventarisatie en kostenraming.

Naar aanleiding van de hierboven besproken bestaande systemen heb ik een selectie gemaakt van de voor ons meest geschikte modellen. De twee factoren waarmee ik rekening moest houden waren; het moet binnen plaatsbaar zijn en er moet een minimale productie van 400 tot 500 l algen per dag zijn (in geval van 5 miljoen cellen/ml). Ik heb in de afgelopen periode vier interessante systemen gevonden; Subitec GmbH (Duitsland), Biofence Ltd. (Groot-Brittannië), Seasalter Ltd. (Groot-Brittannië) en ECN (Nederland) maar bij navraag bleek dat alleen de systemen van Biofence Ltd. en Seasalter Ltd. aan de bovenstaande twee eisen konden voldoen. Zowel het systeem van Subitec GmbH als de bioreactor van ECN zijn nog schaalmodellen en op dit moment onvoldoende getest om het commercieel bruikbaar te maken. Zodoende is een inventarisatie en kostenraming opgesteld voor het Biofence systeem en het Seasalter/Seacaps systeem (zie ook bijlage 2). Uitgaande van een hatchery met een productie van 42 miljoen broedjes per maand, hebben we 500 l algen/dag nodig bij de huidige concentratie algen van 5000 cellen/ul (Kamermans et al. 2006).

2.2.5.1 BioFence tubular bioreactor.

De biofence reactor is een standaard buizenreactor met aanpassingen op een aantal punten. Door deze aanpassingen is dit systeem uitermate geschikt om binnen te plaatsen en tevens kan er een veel hogere productie mee gehaald worden dan met andere systemen. In tabel 1 is terug te vinden welke concentraties bereikt kunnen worden bij verschillende soorten algen.

Tabel 1. Overzicht haalbare algenconcentraties met BioFence systeem.

Species	Concentration reached (cellen x 10 ⁶ / ml)
<i>Nannochloropsis oculata</i>	150
<i>Chlorella vulgaris</i>	200
<i>Isochrysis galbana</i>	20
<i>Tetraselmis sp.</i>	2,5
<i>Chaetoceros gracillis</i>	8

De grootte van het systeem is afhankelijk van het benodigde aantal liters algen per dag. Een standaard rek bestaat uit 16 buizen van 5 m lang, en een hoogte tussen de 1,80 m en 2,60 m. Dit systeem kan in verschillende maten compleet geleverd worden, waardoor het volume van het systeem kan oplopen tot een algenproductie van 400 l/dag. De afmetingen van het systeem zijn in tabel 2 weergegeven.

Tabel 2. Overzicht afmetingen BioFence systeem.

TOTAL SYSTEM VOLUME	No of 5 metre tubes	TUBE ARRAY DIMENSIONS	
Litres		Height (m)	Length (m)
400	64	1.8	10
600	96	2.6(1.8)	10 (15)
600 dual light stage**	96	2.6	5
800	144	2.6	15
800 dual light stage	128	1.8	10
1200 dual light stage	192	2.6 (1.8)	10 (15)

**Dual light stage:
Afmeting van het
systeem gehalveerd
en licht-donker
cyclus gecreëerd
door twee panelen
naast elkaar te
zetten.

Biofence kan in het geval van *Chaetoceros gracillis* een concentratie van 8000 cellen/ul bereiken (tabel 1), wat gelijk staat aan een productie van 250 l algen/dag. De grootte van het systeem kan gevonden worden door de productie te vermenigvuldigen met drie (eenderde van het systeem volume kan per dag geoogst worden).

Het systeem van Biofence met een totaal volume van 800 l zou dan toereikend zijn voor deze hatchery.

Het buizensysteem moet uiteraard gekoppeld worden aan een pomp om circulatie mogelijk te maken. Belangrijk is om na te gaan of de algensoort die gekweekt wordt niet beschadigd raakt door de pomp. *Isochrysis galbana* heeft bijvoorbeeld een speciale pomp nodig.

Kort samengevat komt het voor deze hatchery op het volgende neer:

Inhoud Biofence systeem:	800 l.
Productie:	250 l/dag
Concentratie:	8000 cellen/ul (<i>Chaetoceros</i>)
Afmetingen:	144 buizen in een rek van 15 m lang x 2,6 m hoog
Manuren:	In de opstartfase moet elke dag een keer geteld worden, als het systeem operationeel is een keer in de twee dagen. Opstarten: 5 manuren (1 uur per dag voor een week) Operationeel: 2 manuur in de week
Kosten:	compleet: 20.000 euro
	compleet incl. pomp: 26.000 euro

Kostenraming BioFence 800 l systeem .

Tabel 3 Ruimtelijke afmetingen van het systeem.

Lengte	15 m
Breedte	0.8 m
Hoogte	2.6 m
Oppervlakte reservoir	1.2 m ² (400 l)

Het totale volume van dit systeem is 800 liter, waarbij 50% zich in de buizen bevindt en de andere 50 % in het circulatie reservoir.

Onder de slechtst mogelijke omstandigheden wordt een concentratie van 15 miljoen cellen per ml gegarandeerd (*Isochrysis galbana*), onder optimale omstandigheden kan de productie oplopen tot 20 miljoen cellen per ml.

Energieverbruik:

Het dagelijkse energieverbruik kan als volgt worden uitgesplitst:

-pomp	48 kWh
-belichting	58 kWh (afhankelijk van bron)
-proces	1 kWh

Totaal **107 kWh x 0,08 euro (kWh) = 8,56 euro/dag**

Nutriënten en CO2:

Het systeem verbruikt 2,16 liter per dag aan voedingsstoffen. Deze kunnen in grote hoeveelheden besteld worden. Uitgaande van de situatie waarbij het door BioFence geleverd wordt ligt de prijs op 0,92 euro/liter.

Totaal **2,16 liter x 0,92 euro (per liter) = 2,00 euro/dag**

In het geval van CO2 is 768 gram CO2/dag nodig om het systeem optimaal te voorzien. De prijs van CO2 is 0,6 euro per dag.

Totaal **0,6 euro/dag CO2**

Personeelskosten:

Er zullen elke dag een aantal korte onderhoudswerkzaamheden aan het systeem moeten plaatsvinden. Deze duren hooguit 15-30 minuten per dag. De werkzaamheden kunnen uiteenlopen van het wisselen van nutriënt voorraden, periodiek schoonmaken tot calibratie van de pH elektrode en celmonitoring. De werkgever moet ongeveer 15 euro per uur betalen (persoonlijke communicatie J.W. Harinck).

Totaal **0,5 uur x 15 euro = 7,5 euro/dag**

Kosten aanschaf / jaarlijkse afschrijving:

Het 800 liter systeem kost inclusief installatie en instructies 30.000 euro. BioFence gaat uit van een jaarlijkse afschrijving van 20 % per jaar. Zodoende zou het systeem 16,4 euro per dag kosten.

Totaal **16,4 euro/dag**

Onderhoudskosten:

De onderhoudskosten bestaan uit het jaarlijks vervangen van pH elektroden, het reviseren van de pomp en het vervangen van rubbers. De kosten zullen oplopen tot 255,5 euro/jaar.

Totale kosten: **0,7 euro/dag**

Post onvoorziene kosten.

Standaard wordt uitgegaan van een post onvoorziene kosten die kan oplopen tot 10 % van de totale kosten. Dit bedrag dekt onvoorziene reparaties en incidenten. Er wordt doorgerekend met de slechtste omstandigheden, hierdoor zullen de kosten in de praktijk lager uitvallen.

Totaal: **3,52 euro/dag**

Overzicht dagelijkse kosten:

<i>Onderdeel</i>	<i>Euro/dag</i>
Energieverbruik	8.56
Nutriënten	2.00
personeelskosten	7.50
Afschrijving	16.40
Onderhoudskosten	0.7
post onvoorziene kosten	3.52

Totale kosten/dag:***38,68 euro*****Kosten per jaar:** $38,68 \times 365 = 14.118 \text{ euro}$

Anderzijds kan de prijs per gram algenproductie berekend worden:

8000 cellen/ μ l (*Chaetoceros*) = 8.000.000.000 cellen/l

Productie: 250 l/dag

 $250 \text{ l/dag} \times 8.000.000.000 \text{ cellen/l} = 2 \times 10^{12} \text{ cellen/dag}$ *Chaetoceros*: 0,03 mg/miljoen cellen $0,03 \times (2 \times 10^6) = 60.000 \text{ mg/dag} = 60 \text{ g biomassa/dag}$ $38,68 \text{ euro/dag} : 60 \text{ gram biomassa/dag} = 0,65 \text{ euro/gram algen}$

De totale kosten voor het BioFence systeem zijn dus 0,65 euro/gram algen.

2.2.5.2 Seacaps / Seasalter zakken systeem.

De Seacaps cultuur is een continue cultuur die bestaat uit plastic zakken, vergelijkbaar met die van de batch cultuur. Dit systeem is zo aangepast dat het bruikbaar is als continue cultuur, zowel binnen als buiten.

Het speciaal gepasteuriseerde water dat gebruikt wordt geeft zekerheid dat de algen-cultuur van hoge kwaliteit is. Op deze wijze wordt, afhankelijk van de lichtintensiteit en uitstroomsnelheden, een concentratie van 4000 cellen/ul bereikt.

Standaard bestaat het systeem uit 40 zakken van 500 l. Elke zak levert een productie van 80-120 l algen/dag. Het systeem is voor alle algensoorten geschikt.

Een systeem kan 4 maanden aaneengesloten operationeel blijven, daarna moeten de zakken vervangen worden.

Een standaard systeem van 40 zakken vraagt 2 man dagen per week. Elke week moet het leidingwerk gesteriliseerd worden, maar een keer in de twee weken kan eventueel ook. Tevens kan er in deze tijd ook nog zorg besteedt worden aan de stock en starter culturen.

Gezien het feit dat wij op dit moment slechts 500 l/dag nodig hebben, zou dit standaard systeem veel te groot zijn ($40 \times 80 = 3200$ l/dag in het slechtste geval). Ik heb daarom contact opgenomen met de vertegenwoordiger, uit dit gesprek bleek dat het ook mogelijk is om het systeem aan te passen of te verkleinen. De kosten blijven dan wel hoog omdat de basisapparatuur toch aangeschaft moet worden. De kosten voor een systeem liggen op 15.000 euro.

Kort samengevat komt het voor deze hatchery op het volgende neer:

Seacaps systeem:	min. 8 x 500 l zakken
Productie:	80-120 l algen/dag per zak
Concentratie:	4000 cellen/ul
Afmetingen:	onbekend, aanpasbaar.
Manuren:	2 man dagen per week
Installatie:	Kost 2-3 weken.
Kosten:	15.000 euro

Kostenraming Seasalter 8 componenten systeem.

Tabel 4 Ruimtelijke afmetingen van het Seacaps systeem.

Lengte	5 m
Breedte	5 m
Hoogte	2 m
Afmetingen	8 x 0,60 m doorsnede (4000 l inhoud)

Het totale volume van dit systeem is 4000 liter, waarbij het water zich alleen in de zakken bevindt (inhoud leidingen is verwaarloosbaar).

Onder de slechtst mogelijke omstandigheden wordt een concentratie van 4 miljoen cellen per ml gegarandeerd (*Chaetoceros gracillis*), onder optimale omstandigheden kan de productie oplopen tot 10 miljoen cellen per ml.

Energieverbruik:

Het dagelijkse energieverbruik kan als volgt worden uitgesplitst:

-pomp	7,2 kWh
-belichting	168 kWh (afhankelijk van bron)
-proces	1 kWh

Totaal **176,2 kWh x 0,08 euro (kWh) = 14,10 euro/dag**

Nutriënten:

Het systeem verbruikt 4 liter per dag aan voedingsstoffen. Deze kunnen in grote hoeveelheden besteld worden. Uitgaande van de situatie waarbij het door BioFence geleverd wordt (Seasalter zegt alleen dat de kosten verwaarloosbaar zijn) ligt de prijs op 0,92 euro/liter.

Totaal **4 liter x 0,92 euro (per liter) = 3,68 euro/dag**

De benodigde hoeveelheid CO2 is onbekend, ook hier wordt gezegd dat het verwaarloosbaar is.

Personeelskosten:

Inclusief het benodigde personeel voor stomen is 1 dag per week voldoende. De werkzaamheden kunnen uiteenlopen van het wisselen van nutriënt voorraden, periodiek schoonmaken tot stomen en celmonitoring. De werkgever moet ongeveer 15 euro per uur betalen (persoonlijke communicatie J.W. Harinck).

Totaal **1,6 uur x 15 euro = 24,00 euro/dag**

Kosten aanschaf / jaarlijkse afschrijving:

Het 4000 liter systeem kost inclusief installatie en instructies 20.000 euro. Als we uitgaan van een jaarlijkse afschrijving van 20 % per jaar, zou het systeem 10,95 euro per dag kosten.

Totaal **10,95 euro/dag**

Onderhoudskosten:

De onderhoudskosten bestaan uit het jaarlijks vervangen van pH elektroden, het reviseren van de pomp en het vervangen van de plastic zakken (3 keer per jaar). De kosten zullen oplopen tot 328,5 euro/jaar.

Totale kosten: **0,9 euro/dag**

Post onvoorziene kosten:

Standaard wordt uitgegaan van een post onvoorziene kosten die kan oplopen tot 10 % van de totale kosten. Dit bedrag dekt onvoorziene reparaties en incidenten. Er wordt doorgerekend met de slechtste omstandigheden, hierdoor zullen de kosten in de praktijk lager uitvallen.

Totaal: **3,71 euro/dag**

Overzicht dagelijkse kosten:

<i>Onderdeel</i>	<i>Euro/dag</i>
Energieverbruik	14.10
Nutriënten	3.68
personeelskosten	24.00
Afschrijving	10.95
Onderhoudskosten	0.9
post onvoorziene kosten	3.71

Totale kosten/dag: **57,34 euro**

Kosten per jaar: $57,34 \times 365 = 20.929$ **euro**

Anderzijds kan de prijs per gram algenproductie berekend worden:

4000 cellen/ μ l (Chaetoceros) = 4.000.000.000 cellen/l
Productie: 500 l/dag

500 l/dag $\times$ 4.000.000.000 cellen/l = 2×10^{12} cellen/dag
Chaetoceros: 0,03 mg/miljoen cellen

$0,03 \times (2 \times 10^6) = 60.000$ mg/dag = 60 g biomassa/dag

57,34 euro/dag : 60 g biomassa/dag = **0.96 euro/gram algen**

De totale kosten voor het Seasalter/Seacaps systeem zijn dus 0,96 euro/gram algen.

2.3 Conclusie.

Ondanks de diverse systemen die in de loop der jaren op de markt zijn verschenen, zijn er slechts twee modellen die commercieel aantrekkelijk zijn.

De platte fotobioreactoren zijn niet geschikt omdat ze door het geringe volume te groot zouden moeten zijn om aan de levering van 500 l/dag (in geval van 5×10^6 cellen/ml) te kunnen voldoen. Tevens zijn deze systemen op dit moment nog niet goed uitgetest, geoptimaliseerd en voldoende opgeschaald om ze in een mosselhatchery te gebruiken.

De eerste serie buisvormige fotobioreactoren is niet bruikbaar omdat de u-vormen teveel energie kosten en het ontwerp te kwetsbaar is (glazen buis in een vloer). De nieuwe serie buisvormige fotobioreactoren is, in tegenstelling tot de eerder ontwikkelde serie, eenvoudig en goedkoop in opbouw, en tevens behalen ze een grote opbrengst. Aan de eis van 500 l/dag kan met deze systemen zonder problemen worden voldaan (BioFence Ltd.). Het BioFence systeem is gebouwd met wat kostbaardere materialen, maar de onderhoudskosten zijn veel lager en de opbrengst hoger dan vergelijkbare systemen.

De spiraalvormige bioreactoren zijn niet geschikt om binnen te plaatsen omdat de afmetingen erg groot zijn (tot 20 m hoog en 20 m breed). Tevens is de gewikkelde slang/buis maar van geringe doorsnede, waardoor aan de opbrengst voor een indoorsysteem bij lange na niet voldaan kan worden.

De groep “verticale cilinders en zakken” zijn een veelbelovende groep bioreactoren voor de toekomst. Het systeem Seacaps, (Seasalter Ltd.) wordt al op grote schaal gebruikt in hatchery's wereldwijd. De opbouw is eenvoudig en de gebruikte materialen goedkoop, echter vraagt dit systeem wel veel onderhoud. De dubbelwandige fotobioreactor van ECN kan een doorbraak in de toekomst worden, maar is op dit moment nog niet voldoende doorontwikkeld om in de praktijk te gebruiken. Hierdoor valt deze bioreactor op dit moment buiten de mogelijkheden.

Kortom, het BioFence systeem en het Seacaps systeem zijn momenteel de enige twee geschikte fotobioreactoren voor de hatchery. Na het uitwerken van beide systemen en het voltooien van de kostenraming is te zien dat het BioFence systeem in aanschaf duurder is (20.000 euro) dan het Seacaps systeem (15.000 euro). De productieprijs van de algen is bij het BioFence systeem wel lager (0,65 euro/g algen) dan bij het Seacaps systeem (0,96 euro/g algen), daardoor staan beide systemen uiteindelijk op een lijn (uitgaande van de gegevens van de fabrikanten). Gezien het feit dat het Seacaps systeem veel onderhoud en dus manuren vraagt, is er voor gekozen om het BioFence systeem als testopstelling te gaan gebruiken. Tevens is van Seasalter al bekend dat het systeem goed werkt, mede ook omdat het in vele hatchery's al gebruikt wordt. BioFence is een vrij nieuw systeem, daardoor is hier minder praktijkervaring van beschikbaar. Zodoende willen we tegelijkertijd meer praktijkervaring op doen met het BioFence systeem, waardoor de systemen nog beter te vergelijken zijn.

3. BioFence fotobioreactor.

3.1 Werkwijze.

Op basis van het literatuuronderzoek is besloten om het BioFence systeem te gaan opbouwen, te testen en/of te optimaliseren bij Roem van Yerseke. Een prototype van dit systeem is in bruikleen van TopsyBaits. Dit systeem was echter niet compleet, zodoende moesten de ontbrekende delen besteld worden. Gezien de lange levertijd van de materialen (5 weken) is besloten om alvast te oriënteren op de samenstelling van nutriënten en waterloop, evenals praktische zaken met betrekking tot plaatsing en de watervoorziening. Om het systeem als continue cultuur te kunnen laten functioneren moest meer kennis verzameld worden over de groei van algen gerelateerd aan de tijd (stationaire fase etc.). De gevonden informatie is verwerkt in paragraaf 2.2.

Na opbouw van het systeem wordt het eerst een dag met alleen water gespoeld als controle op lekken en eventueel gebreken. De tweede dag wordt het gespoeld met een peroxide-oplossing om het systeem zo schoon mogelijk te houden. Op het moment dat het systeem gebruiksklaar is en met een algencultuur is opgestart, wordt tegelijkertijd een batchcultuur ingezet. De groei van de algen kan in beide systeem gevolgd worden en de prestaties van de systemen kunnen dan uiteindelijk met elkaar vergeleken worden.

Volgens de fabrikant van het BioFence systeem is het mogelijk om algen in zowel over 1mu gefiltreerd zeewater, als in gepasteuriseerd zeewater te kweken. Er is besloten om dit vooraf uit te proberen met kleine startcultures van 2 liter. Voor deze proef zijn de algensoorten *Chaetoceros gracilis* en *Isochrysis galbana* gebruikt. Vier erlenmeyers zijn gevuld met 1mu gefiltreerd zeewater, waarvan er twee zijn geënt met *Chaetoceros gracilis*, en twee met *Isochrysis galbana*. Daarnaast zijn er nog vier erlenmeyers geënt met gepasteuriseerd zeewater en dezelfde algensoorten, om zo het groeiverloop van de algen met elkaar te kunnen vergelijken.

3.2 Resultaten.

De opbouw van het BioFence systeem verliep niet zoals gepland. Gedurende de periode van opbouw ondervonden wij veel tegenslagen, waardoor het systeem niet als zo danig kon draaien dat het bruikbaar was als testopstelling binnen deze periode. Om de planning niet nog verder in het gedrang te laten komen is besloten om het systeem buiten werking te stellen. Hieronder wordt beschreven welke problemen ontstonden, hoe die geprobeerd zijn op te lossen en als afsluiting een advies voor iemand die met dit systeem verder wil.

Materialen.

Het door ons gebruikte systeem was in bruikleen gegeven door TopsyBaits. Dit bedrijf had het systeem al enkele jaren in bezit en gebruikte het de afgelopen jaren niet meer. Het systeem is een zogeheten prototype van minimaal 6 jaar oud, waardoor dit systeem anders geconstrueerd is dan het huidige systeem van BioFence Ltd. De basis wordt gevormd door kolommen van PVC die 1.80 m hoog zijn en een diameter van 30 cm hebben. Aan de zijkant van de buizen zitten gaten waarin de plexiglas buizen bevestigd worden. Het gehele systeem is 4 meter lang. De ruimte tussen de plexiglas buizen en het PVC wordt afgedicht met rubberen ringen die precies passen. De aan- en afvoer van het systeem leiden naar een tank waar het huidige proceswater en de verse toevoer van zowel nutriënten als water verzameld wordt (zie ook fig.7). De plexiglas buizen waren in de loop der jaren dusdanig fragiel en dof geworden dat deze vervangen moesten worden door nieuwe exemplaren.

Problemen gedurende opbouw.

Bij de start van het project was niet duidelijk afgesproken wie de buizen zou gaan bestellen, waardoor de bestelling niet doorgegeven werd. Daar opeenvolgend had de fabrikant een levertijd van drie weken nodig. Zodoende vormden de plexiglas buizen het eerste probleem. Gezien de beschikbare tijd (10 weken) kwam de planning al direct in gevaar. Er is besloten om het systeem zover als mogelijk op te bouwen, zodat in later stadium alleen de buizen ingezet hoeven te worden.

De rubberen ringen die de ruimte tussen de PVC buizen en de plexiglas buizen moesten opvullen leken in eerste instantie, na reiniging, nog bruikbaar. Tijdens het bouwen werd echter duidelijk dat de ringen poreus waren geworden door jarenlang niet gebruikt te zijn. Het gevolg was dat het systeem begon te lekken. De eerste actie die ondernomen werd was het insmeren van de ringen met siliconenvet. Echter na een aantal uren begon er weer water te lekken.

De lekkages leken goed te lokaliseren, waardoor met kit de gaten gedicht werden. De realiteit was anders. Door het afsluiten van die lekkages werd de druk in de waterkolom weer groter en begon het op andere plekken te lekken. Het systeem is toen in hoogte gehalveerd (bovenste helft eraf gehaald) om zo de waterkolom te halveren en de druk op de ringen te verminderen. Dit gaf echter niet het verwachte resultaat. Zodoende zijn alle ringen in zijn geheel gekit om een laatste poging te wagen het systeem lekkage vrij te krijgen. De siliconenkit hield twee dagen stand waarna het los begon te laten en het systeem weer buiten werking gezet moest worden. Er is toen besloten om dit onderdeel, vanwege de tijdsplanning van het onderzoek stop te zetten en verder te gaan met de andere delen van het onderzoek.

De korte proef naar aanleiding van de keus tussen het gebruik van gepasteuriseerd zeewater en 1mu gefiltreerd zeewater gaf onderstaande resultaten (fig.13). Opvallend was dat de algencultuur in gepasteuriseerd zeewater gelijk op gang kwam en dit bij het gefiltreerde zeewater 3 dagen duurde. Vervolgens bleef de ontwikkeling van de algen in het gefiltreerde zeewater (1000 cellen/ul *Chaetoceros gracilis* en 900 cellen/ul *Isochrysis galbana*) ver achter op de algen in het gepasteuriseerde zeewater (3000 cellen/ul *Chaetoceros gracilis* en 3500 cellen/ul *Isochrysis galbana*). De ANOVA-test (tabel 5) bevestigt het resultaat van fig. 13. Er is een significante interactie tussen de soort algen en de behandeling van het water (gepasteuriseerd of gefiltreerd).

Tabel 5. ANOVA-test behorende bij fig. 13, waarbij $n=8$ en $R^2=1$. Significant wanneer $P<0.05$.

	df	Mean square	P
Behandeling	1	1.07416E+07	0.000
Soort	1	91592.000	0.000
Behandeling x soort	1	197820.500	0.000
Error	4	772.250	0.000

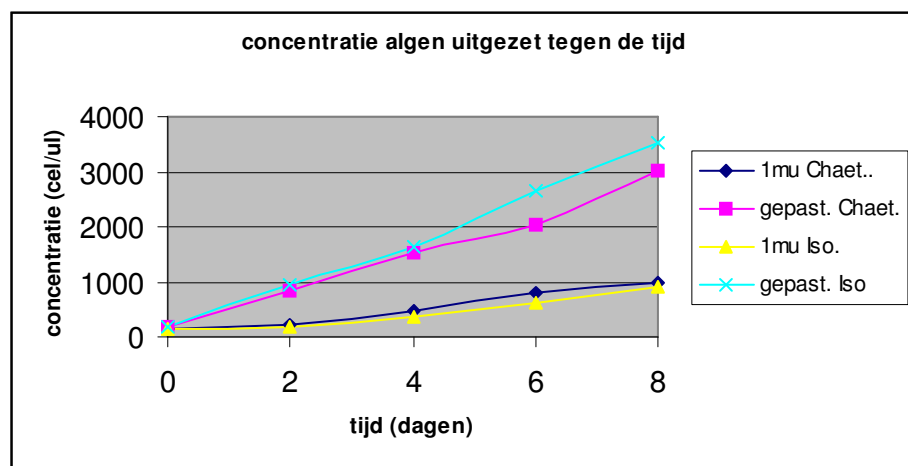


Fig. 13 Verschil in groei tussen algen gekweekt in 1mu gefiltreerd zeewater en in gepasteuriseerd zeewater.

Advies voor vervolgproject.

Ondanks de vele tegenslagen, zie ik dit systeem nog steeds als het beste algencultivatiesysteem. Het product dat de officiële leverancier van BioFence Ltd. verkoopt is anders geconstrueerd en al op vele punten verbeterd. Ik raad dan ook aan om het huidige officiële systeem van BioFence Ltd. als test te gebruiken. Indien men toch verder wilt met het prototype dat aanwezig is, adviseer ik om nieuwe rubberen ringen aan te schaffen. Tevens adviseer ik om contact te leggen met de leverancier, omdat deze kenbaar gemaakt heeft bereid te zijn om te helpen.

3.3 Conclusie.

Door slechte communicatie tussen de betrokkenen ging er veel kostbare tijd verloren. Het project liep helaas zoveel vertraging op dat er geen marge meer was om grote problemen te omzeilen. Het systeem is stop gezet om het andere deel van het onderzoek wel op tijd af te kunnen ronden.

Bouwkundig gezien werkte dit systeem wel, maar de lekkages waren zo groot (ongeveer 20% waterverlies per dag) dat het niet mogelijk was om in deze toestand een algencultuur op te starten. Een oplossing voor het probleem had het bestellen van nieuwe rubbers kunnen zijn, maar daar was geen tijd voor. Het is verstandiger om met goed materiaal te beginnen (direct nieuwe rubbers gebruiken), dan 'gaatjes vullen'.

Het systeem heeft zeker wel de potentie om in de toekomst als algen cultivatie systeem gebruikt te worden. De fabrikant heeft in het nieuwe model ook al vele verbeteringen aangebracht en nieuwe inzichten gebruikt. Een tweede poging om dit systeem op te starten en te testen juich ik zeker toe.

Indien het systeem opnieuw opgebouwd wordt adviseer ik, gezien bovenstaande resultaten, om gepasteuriseerd zeewater te gebruiken. De ontwikkeling van de algen in 1 mu gefiltreerd zeewater, bleef te ver achter op de algen in het gepasteuriseerde zeewater, om het commercieel haalbaar te maken.

4. Inventarisatie methoden voor bepaling paairijpheid.

4.1 Werkwijze.

Er werd gestart met het doornemen van verschillende boeken en publicaties over de reproductie in mosselen. De voor dit onderzoek relevante informatie werd verzameld en geordend op jaar van publicatie. Door alle literatuur door te nemen kan er een methode opgesteld worden voor de bepaling van paairijpheid in mosselen. In het geval van gonaden analyse, bouw ik zowel op de kennis die ik opgedaan heb in Japan, als op andere methoden die ik in wetenschappelijke artikelen tegenkom. Tevens is gezocht naar publicaties die de aan mij geleerde manier van analyseren onderbouwen en ook gebruiken.

Na het opstellen van de methode kunnen de mosselen uit het veld dan gefixeerd en geanalyseerd worden ten behoeve van het histologische onderzoek, beschreven in paragraaf 5.1.2.

4.2 Resultaten.

Om de paairijpheid van een mossel te kunnen bepalen, is het noodzakelijk om onderzoek aan de gonaden te verrichten. Bij mosselen is het zo dat de gonaden geen apart orgaan zijn, maar verspreid zitten door de mantel¹⁴. Zodoende kunnen de mantel en gonaden niet gescheiden worden. Er zijn al vele rapporten geschreven over de levenscyclus van de *Mytilus edulis*, maar er is nauwelijks literatuur beschikbaar over de ontwikkeling van de gonaden.

De reproductiecyclus van de *Mytilus edulis* in relatie tot de seizoenen, wordt gevolgd door het weergeven van de variatie in de massa van het weefsel in de mantel (Hickman & Illingworth, 1980 ; Hickman et al. 1991).

Bij de meeste mosselsoorten start de gametogenese in de winter, op gang gebracht door de reserves van proteïne, lipiden en carbonhydraten die in de voorafgaande zomer en herfst opgeslagen zijn. Opvallend is dat de rijpheid een piek bereikt in de late winter, gevolgd door het paaïen in het voorjaar en het begin van de zomer. Gedurende de hogere watertemperaturen in de zomer, en hoge concentraties voedingsstoffen in het water, rijpen de gonaden nogmaals voor de tweede paaï periode in de late zomer en herfst. Dit paaïen wordt weer gevolgd door het verzamelen en opslaan van voedingsstoffen voor de winter. Daarna start de cyclus weer opnieuw (Wilson & Seed 1974 ; Sprung 1983; Rodhouse et al. 1984; King et al. 1989).

De meest gebruikte methode voor het volgen van de ontwikkeling van de gonaden is histologische analyse (Seed & Suchanek 1992). Over het algemeen worden de monsters geclassificeerd aan de hand van het reproductiestadium (ontwikkelen, rijpen, paaïen). Ondanks het feit dat deze methode wereldwijd wordt gebruikt is het op sommige punten subjectief. Niet alle mosselen (ook binnen een soort) ontwikkelen zich op hetzelfde moment en met dezelfde snelheid. Een kwantitatieve methode om de veranderingen in de morfologie van gonaden, aan de hand van de aanwezigheid van ei en/of zaad cellen, te beschrijven is als alternatief opgesteld (Bayne et al. 1978; Newell et al. 1982; Rodhouse et al. 1984; Hawkins et al. 1985; Villalba 1995).

Er moeten coupes¹⁵ van de gehele mantel worden gemaakt in verschillende periodes, om zo met behulp van de concentratie zaad- en eicellen iets over de mate van paairijpheid te kunnen zeggen (Kim et al. 2002).

Behalve de histologische analyse werd als sneller alternatieve methode, de lengte en breedte van de mosselschelp gemeten, evenals het drooggewicht (DW) van de mantel. Deze gegevens koppel ik aan de resultaten van het gonaden onderzoek om te onderzoeken of er een verband bestaat tussen deze gegevens.

Omdat elke mossel andere afmetingen heeft is besloten om de verhouding tussen lengte, breedte en gewicht van de mosselmantel uit te zetten tegen de tijd. Onderstaande formule kan opgesteld worden om zo een gewicht per mm² te krijgen.

$$\text{gewicht/mm}^2 = \frac{\text{gewicht}(g) * 1000}{\text{lengte}(mm) * \text{breedte}(mm)}$$

Het uiteindelijke doel is om naar aanleiding van de opgedane kennis, het stadium van paairijpheid te bepalen. Indien er een relatie gelegd kan worden tussen de hierboven beschreven parameters kan er een protocol opgesteld worden, zodat het voor iedereen in de praktijk bruikbaar is.

Er zijn verschillende methodes om coupes van schelpdieren te fixeren en te prepareren. In dit geval is gekozen voor het fixeren van de mantel in zowel Bouin (Buchanan 2001) als Davidson fixatief (Kim et al. 2002). Mijn voorkeur ging uit naar Bouin, maar diverse bronnen vertelden mij dat Davidson prettiger werken was. De mantel schijnt dan makkelijker te snijden zijn dan in het geval van Bouin. Zodoende gebruik ik beide fixatieven om ook gelijk te kijken of er inderdaad verschil is.

4.3 Conclusie.

Er zijn vele rapporten te vinden over het fixeren van gonaden van mosselen, maar er is een zeer beperkt aanbod in rapporten over de bepaling van paairijpheid. De basis van elke huidige methode voor de bepaling van de paairijpheid is gebaseerd op twee artikelen. Het wetenschappelijke artikel van Newell (1982) en de histologische analyse van Seed & Suchanek (1992). In 1995 hebben Kim en Powell in opdracht van het NOAA een methode opgesteld waarin zowel het artikel van Newell, als de analyse van Seed en Suchanek verwerkt is. In de snellere alternatieve methode voor bepaling van de paairijpheid zal de histologische analyse van Kim en Powell, gekoppeld worden aan de door mij gevonden relatie tussen het gewicht van de mantel en de aanwezigheid van ei- en zaadcellen.

5. Bepaling van paairijpheid van de mossel.

5.1 Werkwijze.

5.1.1 Monster locatie en bemonstering.

De eerste partij monsters is bij het perceel Hammen 182 genomen op 4 januari door het schip de "Kokhaan". Deze partij mosselen is in de verswaterput achter Imares Yerseke gezet. Elke woensdag van de maand januari zijn er willekeurig acht mosselen uit de put gehaald en in het laboratorium voorbereid voor analyse (zie ook paragraaf 5.1.2). Door een tekort aan voedingsstoffen in de put bleef de ontwikkeling van de mosselen achter ten opzichte van de natuurlijke situatie. Zodoende is besloten om in de maanden februari, maart en april de mosselen direct na de bemonstering te verwerken.

5.1.2 Analyse van het paairijpheids stadium van de mossel.

Op basis van het literatuuronderzoek, beschreven in paragraaf 4.2, is besloten om een snellere methode op te stellen voor de bepaling van de paairijpheid. In deze nieuwe methode zit een deel van mijn ervaringen uit Japan (Nakamura and Dekker 2005) verweven met de werkwijze van het protocol "Gonadal Analysis" (Kim and Powell 2001). Het protocol van Kim en Powell wordt momenteel door het NOAA gebruikt als standaard-procedure om de geslachtsontwikkelingen van oesters en verschillen soorten mosselen te volgen.

De determinatie van het stadium van geslachtsontwikkeling is gebaseerd op een histologische evaluatie van de rijping stadia van mossel gonaden (Newell, 1989).

5.1.2.1 Afmetingen van de mantel.

Gezien het feit dat de mantel van de mossel over de hele oppervlakte van de schelp gespannen zit, wordt met een schuifmaat de lengte en breedte van de binnenkant van de schelp bepaald (gelijk aan de mantel), om later het gewicht uit te kunnen zetten tegen de oppervlakte van de mossel. Eventuele bijzondere kenmerken, waaronder kleur en structuur worden indien van toepassing genoteerd.

5.1.2.2 Weefsel preparatie.

De punt van een scherp mesje wordt voorzichtig tussen de schelphelften gebracht, waarna alle sluitspieren doorgesneden worden. Belangrijk is dat alleen de spieren doorgesneden worden omdat anders de mosselmantel kan beschadigen.

De schelp wordt opengelegd, waarna de linker mantel met een mesje wordt uitgesneden om vervolgens 48 uur bij 70 graden in de droogstoof te verblijven. De rechter mantel wordt ook verwijderd en in zijn geheel gewogen. Uit deze mantel wordt een monster van 1 cm² gesneden, welke ook gewogen wordt, en in Bouin of Davidson (Bijlage 1) gefixeerd wordt. Na 24 uur is het monster door het Bouin of Davidson fixatief gedehydrateerd, zodat het tot moment van analyse in 70% ethanol geconserveerd kan worden.

5.1.2.3 Weefsel inbedden.

De individuele monsters worden aan de hand van het dehydratie protocol (tabel 6) geprepareerd voor het inbedden in paraffine. De oplossingen, gebruikt voor dehydratie, infiltratie en neutralisatie, worden regelmatig vervangen om de zuiverheid van de oplossingen te kunnen garanderen. Na preparatie worden de monsters in cassettes overgebracht die in een carrousel geplaatst worden. De carrousel (figuur 14) doorloopt in 18 uur tijd het complete proces van het dehydratie protocol, met uiteindelijk inbedding in paraffine bij een temperatuur van 60 graden Celsius.

Na de carrousel gaan de monsters naar de Tissue-Tek (figuur 15), waar de monsters afzonderlijk in malletjes met paraffine geplaatst worden. Deze malletjes worden daarna voor minimaal 15 min. in de koelkast geplaatst om de paraffine te laten afkoelen. De monsters zijn nu gereed voor verwerking in de microtoom (figuur 16).



Fig. 14. Carrousel.



Fig. 15. Tissue-Tek.



Fig. 16. Microtoom.



Fig. 17. Hot plate.

Tabel 6. Dehydratie proces.

Oplossing	Duur (uren)
70 % ethanol	1
90 % ethanol	1
100 % ethanol	1.5
100 % ethanol	1.5
100 % ethanol	1.5
100 % ethanol	1.5
Xylene	1.75
Xylene	1.75
Xylene	1.5
paraffine (60 graden Celsius)	2.5
paraffine (65 graden Celsius)	2.5

5.1.2.4 Weefsel snijden tot coupes.

De paraffine blokjes worden eerst met 20 µm versneden om het midden (en dus de meest optimale doorsnede) van het monster te bereiken. Vervolgens worden met behulp van de microtoom coupes gesneden van 5 µm dik. De secties worden in een waterbad met een temperatuur van 50 graden Celsius gelegd zodat de paraffine kan uitzetten en zo de coupes mooi strak trekt. Als de maximale grootte bereikt is worden de coupes overgezet op objectglaasjes en worden de complete monsters in rekjes geplaatst waarna ze gereed zijn voor kleuring.

5.1.2.5 Weefsel kleuring.

De kleuring van de preparaten zorgt ervoor dat verschillende weefseltypen een andere kleur krijgen waardoor het analyseren van de monsters een stuk gemakkelijker wordt.

De preparaten worden eerst ontdaan van de paraffine door gebruik van de xylene-ethanol series. Hierna volgt de hydratatie (tabel 7) van de preparaten door te kleuren met de series pentachrome, acetic acid en acetone. Aan het einde van het traject worden de preparaten nogmaals afgespoeld met xylene en op de hot-plate (fig. 17) gedroogd.

Tabel 7. Weefsel kleur proces.

Oplossing	Duur (minuten)
Deparaffinization	
Xylene	5
Xylene	5
Xylene	5
100 % ethanol	3
100 % ethanol	2
Hydratie	
95 % ethanol	2
10 % ethanol	2
gedestilleerd water	2
Kleuring	
Ferric Alum mordant	10
Kraanwater	0.5
Haematoxylin	30-45
Kraanwater	5
Acid Fuchsin	1.5
Kraanwater	5
Phosphotungstic acid	2
Chromotrope	1.5
Kraanwater	5
Phosphomolybdic acid	2
Aniline blauw	3
Dehydratie	
1% acetic acid	10
1 % acid acetone	10
Spoelproces	
Xylene I	5
Xylene II	5
Drogen op hot-plate.	24 uur

5.1.2.6 Analyseren onder de microscoop.

Nadat de preparaten gedroogd zijn op de hot-plate kan er een dekglasje op vastgezet worden en zijn ze geschikt voor analyse met de microscoop. De resultaten van deze analyse zijn terug te vinden in paragraaf 5.2.

Aan de hand van de gevonden resultaten wordt er een relatie gelegd met oppervlakte, bijzondere kenmerken en het gewicht van de mantel.

5.1.2.7 Onderverdeling in het stadium van gonaden ontwikkeling.

Aan de hand van de aanwezigheid van ei- en zaadcellen kunnen de verschillende ontwikkelingsstadia van de gonaden opgesplitst worden in groepen (tabel 8), om zo te kunnen bepalen in welk stadium een groep mosselen zich bevindt. Onderstaande indeling is overgenomen uit het rapport "Gonadal analysis" (Kim en Powell, 2002).

Tabel 8. Kenmerken van de mantel per ontwikkelingsstadium.

Ontwikkelingsstadium	Kenmerken
<i>Rust fase</i>	
stadium 0	niet actief / geen ontwikkeling
<i>Ontwikkelings fase</i>	
stadium 1	gametogenesis gestart, rijpe gameten nog niet zichtbaar.
stadium 2	eenderde van de mantel gebruikt voor gonadenontwikkeling
stadium 3	follikels duidelijk zichtbaar
<i>Rijpings fase</i>	
stadium 4	mantel geheel vol met ei- en zaadcellen
<i>Paai fase</i>	
stadium 5	clusters zaadcellen worden gelegeerd eicellen worden losgelaten

5.2 Resultaten.

5.2.1 Verschil tussen Bouin en Davidson fixatief.

Het verschil tussen Bouin en Davidson fixatief zit in de inwerking van de chemicaliën op de mossel mantel. Van Bouin is bekend dat het weefsel beter geconserveerd wordt (en daardoor de structuur van de mantel) omdat het behalve dehydratie, ook het weefsel laat verharderen. Het behoud van de structuur van de mantel is handig omdat de monsters dan makkelijker geprepareerd kunnen worden. Nadeel is echter wel dat de mantel verhard waardoor sommige apparatuur moeite krijgt met het snijden van de coupes. In het geval van Davidson fixatief, wordt de structuur van de mantel veel minder goed behouden waardoor de preparaten van mindere kwaliteit zullen zijn (meer beschadigd). Voordeel is wel dat het weefsel niet verhard en daardoor eenvoudig tot coupes te versnijden is. De door ons gebruikte apparatuur kon zowel het weefsel geconserveerd in Bouin fixatief als in Davidson fixatief tot coupes versnijden. Het verschil in kwaliteit van de preparaten is in onze serie niet terug te vinden. Beide fixatieven kunnen dus zonder problemen voor deze proef gebruikt worden.

5.2.2 Variatie in gewicht van de mantel.

De mosselen in de put (maand januari) vertoonden een achterblijvende ontwikkeling ten opzichte van de mosselen uit het veld. Elke week zag de mantel 'glaziger' en nam het gewicht steeds sneller af (fig.18,19). In de gehele periode veranderde lengte en breedte maten van de mosselschelpen zo goed als niet. De mosselen bleven deze vier maanden van gelijke grote.

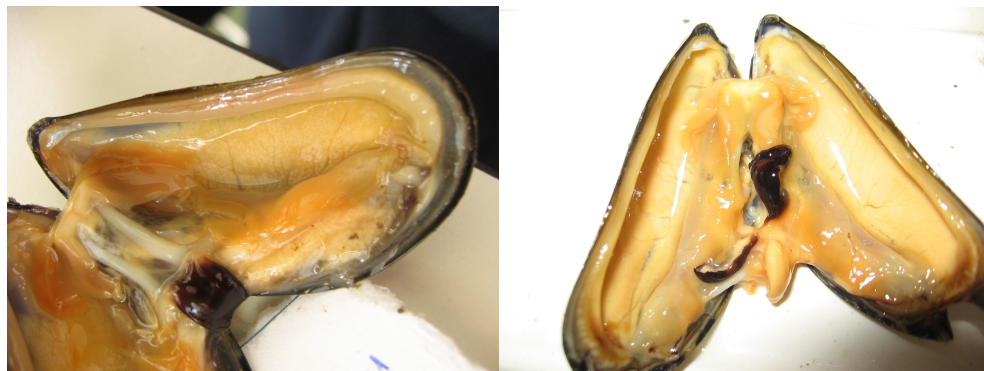


Fig. 18. 'Glazige' mantel uit maand januari (links) t.o.v. 'volle' mantel uit maand maart (rechts).

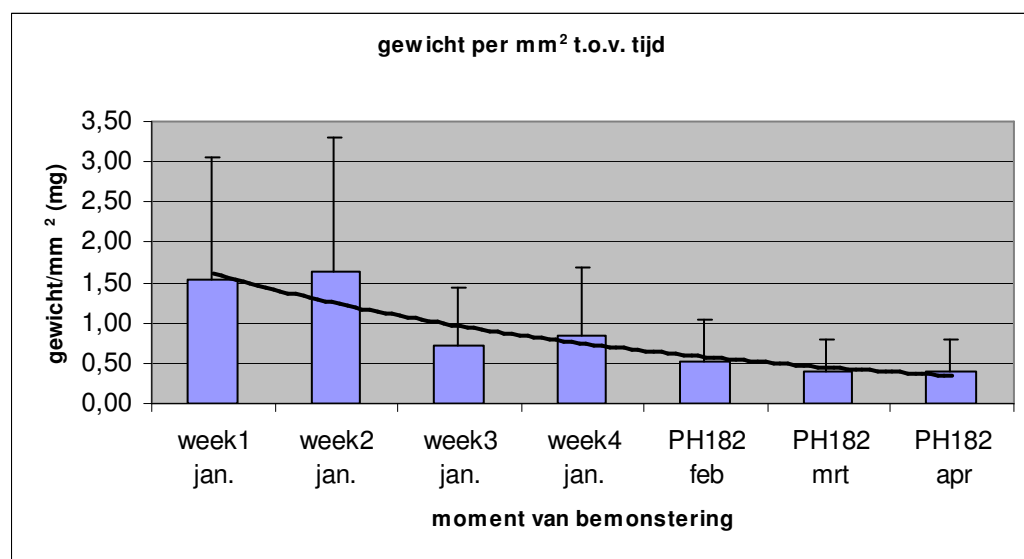


Fig. 19. Verloop van het gewicht per vierkante mm van de mossel mantel t.o.v. de tijd.
Voor de foutbalken geldt: $n=8 +SD$, behalve voor de maand februari waar $n=7 +SD$.

Uit fig.19 kan afgelezen worden dat het gewicht per mm^2 van de mantel in de 4 maanden van bemonstering sterk afneemt. Het verschil in gewicht tussen de eerste twee weken van januari en de maand maart is opvallend groot. In de maanden maart en april blijft het gewicht zo goed als gelijk. De resultaten van de regressie analyse van fig. 19 (tabel 9) bevestigen deze waarnemingen. Het gewicht van de mantel neemt significant af t.o.v. de tijd, waarbij $n=7$ en $R^2=0,639$ en $P=0,031$ (en blijft dus onder de grens van $P<0,05$).

Tabel 9. Regressie analyse van fig. 19 (gewicht van de mantel uitgezet tegen de tijd).

	df	Mean square	P
Regressie	1	1,036	0,031
Residual	5	0,117	

5.2.3 Aanwezigheid van ei- en zaadcellen t.o.v. het gewicht van de mantel.

De foto's van figuur 20 en 21 zijn beide gefotografeerd met een vergroting van 2x onder de Leica microscoop om vergelijking mogelijk te maken.

Fig. 20 en 21 laten zien dat er bij een relatief hoog gewicht (in de maand januari), nauwelijks gonaden ontwikkeling waarneembaar is. Bij een laag gewicht (in de maand maart) is de mantel geheel gevuld met ei- en of zaadcellen.

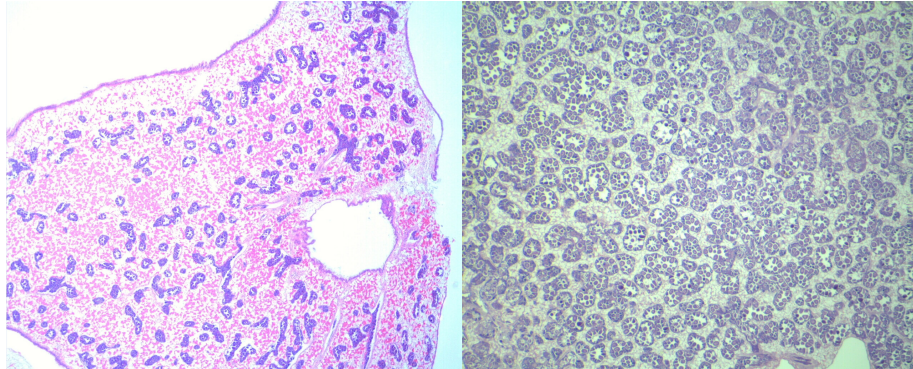


Fig. 20. Eicellen in de mantel van de mossel in de maand januari (links) en de maand maart (rechts).

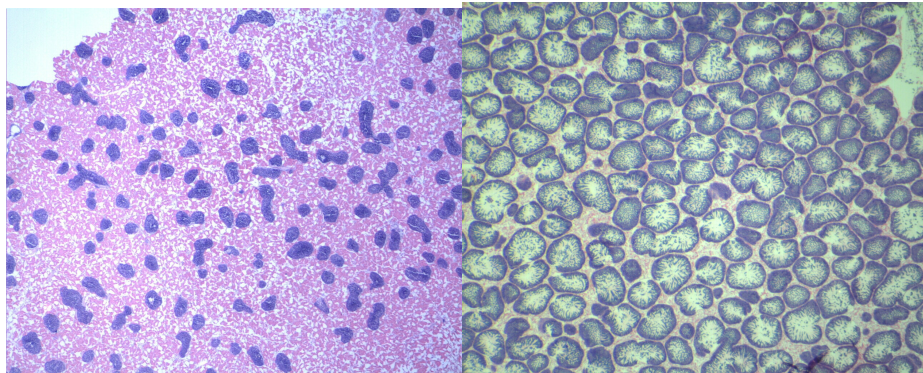


Fig. 21. Zaadcellen in de mantel van de mossel in maand januari (links) en de maand maart (rechts).

Aan de hand van de aanwezigheid van ei- en zaadcellen kunnen de verschillende ontwikkelingsstadia van de gonaden opgesplitst worden in groepen, om zo te kunnen bepalen in welk stadium een groep mosselen zich bevindt. Onderstaande indeling is overgenomen uit het rapport "Gonadal analysis" (Kim en Powell, 2002). Niet alle stadia zijn in mijn gegevens terug te vinden omdat er maar een keer per maand bemonsterd is.

Tabel 10. Kenmerken van verschillende ontwikkelingsstadia van de mossel *Mytilus edulis*.

Ontwikkelingsstadium	ontwikkeling monsters
<i>Rust fase</i>	
stadium 0	-
<i>Ontwikkelings fase</i>	
stadium 1	week 1 januari
stadium 2	week 2 januari
stadium 3	week 3 en 4 januari
<i>Rijpings fase</i>	
stadium 4	maand februari
<i>Paai fase</i>	
stadium 5	maand februari en maart

Tijdens analyse van de gonaden zijn foto's gemaakt van de mantel. Deze foto's worden gebruikt om het stadium van ontwikkeling te bepalen. In figuur 22 zijn de verschillende stadia (van tabel 10) uitgezet tegen het gewicht van de mantel, waardoor een relatie gelegd kan worden tussen deze twee parameters.

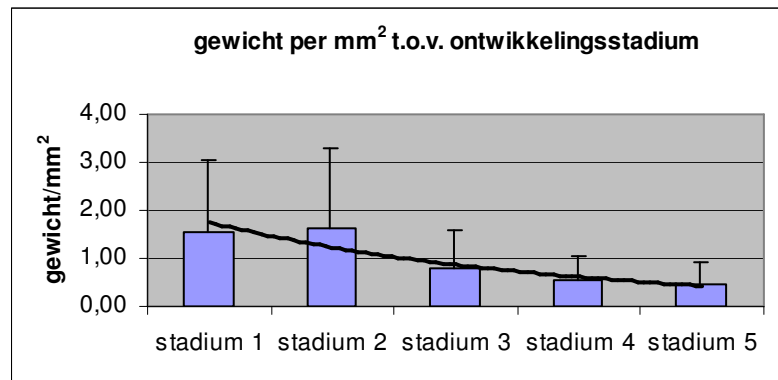


Fig. 22 Gewicht per vierkante mm uitgezet tegen het ontwikkelingsstadium.
Voor de foutbalken geldt; $n=4$ +SD behalve voor januari waar $n=2$ +SD.

Tabel 11. Regressie analyse van fig. 22, waarbij $n=5$ en $R^2=0,841$

	df	Mean square	P
Regressie	1	1,056	0,028
Residual	3	0,066	

Aan de hand van fig. 22 en de regressie analyse (tabel 11) kan geconcludeerd worden dat er een relatie bestaat tussen het gewicht van de mossel mantel en het stadium van gonaden ontwikkeling. Er kan gezegd worden; het gewicht van de mantel neemt significant af ten opzichte van het ontwikkelingsstadium, omdat $P=0,028$ en daarmee onder de gestelde grens blijft van $P<0,05$.

5.3 Conclusie.

De mosselen in de put kregen niet voldoende voedsel, waardoor de energie die normaal gebruikt wordt om meer vleesgewicht te produceren, in dit geval gebruikt werd om te overleven. Het gevolg is een dunne 'glazige' mossel mantel (fig.18).

Het gewicht per mm^2 van de mantel neemt in de periode van de eerste twee weken van januari tot en met de maand maart af (fig.19).

Na vergelijking van de foto's (fig.20/21) met de gewichten per mm^2 (fig.19) kan er geconcludeerd worden dat hoe meer ei- en/of zaadcellen er ontwikkeld zijn, des te lager het gewicht van de mantel is (fig. 22).

Dit kan verklaard worden aan de hand van het gebruik van de verzamelde voedingsstoffen en dus energie. De ontwikkeling van de gonaden heeft in deze periode een hogere prioriteit dan het ontwikkelen van vleesgewicht, waardoor de geproduceerde energie voor de ontwikkeling van de ei- en zaadcellen gebruikt wordt. Er blijft geen energie meer over voor de productie van vlees waardoor de mosselen in massa afnemen (vlees weegt meer dan ei- of zaadcellen, Hickmann 1980). Tevens wordt tijdens de ontwikkeling van gonaden het opgeslagen weefsel vervangen voor de gameten (Gabbot and Peek, 1991). Dit is uiteraard ook weer terug te zien in het dalende gewicht van de mossel mantel.

Aan de hand van bovenstaande resultaten kan geconcludeerd worden dat er wel degelijk op basis van het gewicht/ mm^2 een uitspraak gedaan kan worden over de mate van ontwikkeling van de gonaden. Er kan gezegd worden dat hoe lager het gewicht van de mosselmantel is, des te verder is de ontwikkeling van de gonaden.

6. Conclusies en aanbevelingen.

6.1 Algen cultivatie systemen.

De literatuurstudie naar algen cultivatie systemen heeft laten zien dat er in de loop der jaren verschillende systemen op de markt zijn verschenen. Hieruit is ook gebleken dat er momenteel maar twee systemen, commercieel gezien, bruikbaar zijn voor de mossel hatchery; het Seacaps systeem en het BioFence systeem.

Na het uitwerken van beide systemen en het in kaart brengen van de kosten was duidelijk te zien dat BioFence in aanschaf duurder is (20.000 euro tegenover 15.000 euro van het Seacaps systeem) dan Seasalter, maar door de efficiëntie en het minimale onderhoud van het BioFence systeem is de algenproductie wel goedkoper. De algen kosten in het geval van BioFence 0,65 euro per gram algen en in het geval van Seasalter 0,96 euro per gram algen. Op jaarbasis is dat een verschil van 6800 euro.

Gezien het feit dat het Seacaps systeem veel onderhoud en dus manuren vraagt, is er voor gekozen om het BioFence systeem als testopstelling te gaan gebruiken. Tevens is van Seasalter al bekend dat het systeem goed werkt, mede ook omdat het in vele hatchery's al gebruikt wordt. BioFence is een vrij nieuw systeem, daardoor is hier minder praktijkervaring van beschikbaar. Zodoende wilden we tegelijkertijd meer praktijkervaring op doen met het BioFence systeem, waardoor de systemen nog beter te vergelijken zijn.

De opbouw van het BioFence systeem verliep niet zoals gepland. Gedurende de periode van opbouw ondervonden wij veel tegenslagen, waardoor het systeem niet als zo danig kon draaien dat het bruikbaar was als testopstelling binnen deze periode. Door slechte communicatie tussen de betrokkenen ging veel kostbare tijd verloren. Bouwkundig gezien werkte dit systeem wel, maar de lekkages waren zo groot (20% waterverlies per dag) dat het niet mogelijk was om in deze toestand een algencultuur op te starten. De bedachte oplossingen, beschreven in paragraaf 3.2, werkten helaas niet goed, waardoor het systeem in verband met de planning van het onderzoek stop gezet moest worden.

De algen cultivatie systemen die gedurende het literatuuronderzoek gevonden zijn, blijven tijdsgebonden. De ontwikkelingen op dit vlak gaan erg snel, waardoor er volgend jaar al een nieuw (en misschien beter) systeem op de markt kan komen. Tijdens het lezen van dit verslag moet de lezer er rekening mee houden dat het een momentopname van 2006 is. Over een aantal jaren ziet een inventarisatie er misschien weer anders uit en zijn er weer andere inzichten.

Discussie.

Zoals bij elk project werden er ook tijdens dit onderzoek fouten gemaakt. De grootste fout gedurende mijn onderzoek was de slechte communicatie over het bestellen van plexiglas buizen met betrekking tot het BioFence systeem. Als er goed gecommuniceerd was had dat deel van het project anders kunnen lopen en was het systeem misschien wel operationeel geweest. Ik beschouw deze situatie vooral als een leermoment.

6.2 Aanbeveling met betrekking tot het BioFence systeem.

Ondanks de vele tegenslagen, zie ik dit systeem nog steeds als het beste algencultivatiesysteem dat momenteel op de markt is. Het systeem dat BioFence Ltd. vandaag de dag levert is al vele malen verder ontwikkeld dan het prototype waar wij mee werkten. Het probleem van lekkage is in het nieuwe systeem ook opgelost en de nieuwste inzichten en technologie zijn toegevoegd. Minstens zo belangrijk om te vermelden is dat de eigenaar van BioFence Ltd. na e-mail contact, telefonisch contact met mij zocht en bereid was te helpen met het oplossen van de problemen. Helaas was dit voor mij in een te laat stadium, maar ik kan iedereen aanbevelen om bij een tweede testopstelling direct contact met het bedrijf te zoeken.

Indien met het prototype opnieuw gestart wordt, adviseer ik om alle ringen te vervangen voor nieuwe exemplaren.

6.3 Bepaling van de paairijpheid van de mossel.

Er zijn vele rapporten te vinden over het fixeren van gonaden van mosselen, maar er is een zeer beperkt aanbod in rapporten over de bepaling van de paairijpheid. Alle moderne methodes die ik vond werden gebaseerd op twee artikelen. Het wetenschappelijke artikel van Newell (1982) en de histologische analyse van Seed en Suchanek (1992). Na een selectie van de bruikbare artikelen besloot ik om het artikel "Gonadal Analysis" van Kim en Powell (1995) als basis voor mijn methode te gebruiken. In de methode zitten zowel het artikel van Newell als de analyse van Seed en Suchanek verwerkt.

Door de resultaten van de histologische analyse te koppelen aan het gewicht van de mossel mantel, kan geconcludeerd worden dat hoe meer ei- en/of zaadcellen er ontwikkeld zijn, des te lager het gewicht van de mantel is. Dit verband kan uitgelegd worden aan de hand van het gebruik van de verzamelde voedingsstoffen en dus energie. De ontwikkeling van de gonaden had in deze 4 maanden van bemonstering een hogere prioriteit (voortplanting) dan de ontwikkeling van het vleesgewicht. De geproduceerde energie werd niet gebruikt om weefsel aan te maken, maar om de ei- en zaadcellen te ontwikkelen. Het opgeslagen weefsel wordt vervangen door gameten (Gabbot en Peek, 1991). Dit is terug te zien in het gewicht van de mantel. Eicellen en zaadcellen wegen immers minder dan weefsel.

6.4 Aanbeveling met betrekking tot bepaling van de paairijpheid.

Indien men aan de hand van de door mij beschreven methode de paairijpheid van de mosselen wil bepalen, doet men er verstandig aan om eerst een jaar het verloop van het gewicht en de ontwikkeling van de gonaden in kaart te brengen. De verhouding gewicht en ontwikkeling van gonaden is gebiedsafhankelijk en kan dus variëren tussen percelen in bijvoorbeeld de Oosterschelde, de Waddenzee en de Ierse zee (Newell, 1982).

Zodra men eenzelfde grafiek als in figuur 19 heeft verkregen kan eenvoudig het gemiddelde gewicht van een paarijpe mossel voor dat gebied bepaald worden.

7. Literatuurlijst.

- Bayne, B.L.; Holland, D.L.; Moore, M.N.; Lowe, D.M.; Widdows, J. 1978: Further studies on the effects of stress in the adult on the eggs of *Mytilus edulis*. Journal of the Marine Biological Association UK 58: 825-841.
- Buchanan, S. 2001: Measuring reproductive condition in the greenshell mussel *Perna canaliculus*. Journal of Marine and Freshwater Research, 2001, Vol. 35: 859-870.
- Fogg, G.E.; Than-tun 1960. Interrelations of photosynthesis and assimilation of elementary Nitrogen in a blue-green algae. Proc. R. Soc. B., 153;111.
- Gauthier-Clerc, S., Pellerin, J., Blaise, C., Gagne, F. 2002: Delayed gametogenesis of *Mya arenaria* in the Saguenay fjord (Canada): a consequence of endocrine disruptors? Comp. Biochem. Physiol. 131C, 457– 467.
- Hawkins, A.J.S.; Salkeld, P.N.; Bayne, B.L.; Gnaiger, E.; Lowe, D.M. 1985: Feeding and resource allocation in the mussel *Mytilus edulis* : evidence for time-averaged optimization. Marine Ecology Progress Series 20: 273-287.
- Helm, M.M.; Bourne, N.; Lovatelli, A. 2004: Hatchery culture of bivalves, a practical manual. FAO Fisheries Technical Paper 471, Rome 2004.
- Hickman, R.W.; Illingworth, J. 1980: Condition cycle of the green-lipped mussel in New Zealand. Marine Biology 60: 27-38.
- Hickman, R.W.; Waite, R.P.; Illingworth, J.; Meredyth-Young, J.L.; Payne, G. 1991: The relationship between farmed mussels and available food in Pelorus-Kenepuru Sound, New Zealand, 1983-1985. Aquaculture 99: 49-68.
- Hoff, F.; Snell, T.W. 1989: Plankton culture manual. 5th edition.
- Kamermans, P; Blanco, A; Nevejan, N; Geijssen, P. 2006: Operationaliseren Schelpdier-hatchery/nursery bij de Roem van Yerseke.
- Kim, Y; Ashton-Alcox, K.A.; Powell, E.N. 2002: Gonadal analysis, Haskin Shellfish Research Laboratory, Rutgers University.
- King, P.A.; McGrath, D.; Gosling, E.M. 1989: Reproduction and settlement of *Mytilus edulis* on a exposed rocky shore in Galway Bay, west coast of Ireland. Journal of the Marine Biological Association, UK 69: 355-365.
- Koole, M. 2005: Optimalisatie algenweek ten behoeve van een mosselhatchery. Ned. Instituut Visserij Onderzoek, Intern rapport 05.007.
- Mituya, A.; Nyunoya, T.; Tamiya, H. 1953: Pre-pilot plant experiments on algal mass culture.
- Newell, R.I.E.; Hilbish, T.J.; Koehn, R.K.; Newell, C.J. 1982: Temporal variation in the reproductive cycle of *Mytilus edulis* from localities on the east coast of the U.S.A. Biological Bulletin 162.
- Spotte, S H, 1979. Fish and Invertebrate Culture: Water Management in Closed Systems. New York: John Wiley & Sons, 179 pp.

- Richmond, A. 2004: Handbook of Microalgal Culture: Biotechnology and Applied Phycology. Blackwell Science Ltd, Oxford, U.K. ISBN: 0-63205953-2
- Rodhouse, P.G.; Roden, C.M.; Burnell, G.M.; Hensey, M.P.; McMahon, T.; Ottway, B.; Ryan, T.H. 1984: Food resource, gametogenesis and growth of *Mytilus edulis* on the shore and in suspended culture: Killary Harbour, Ireland. Journal of the Marine Biological Association, UK 64:513-529.
- Seed, R.; Suchanek, T.H. 1992: Population and community ecology of *Mytilus*. In: Gosling, E. ed. The mussel *Mytilus*: ecology, physiology, genetics and culture. Amsterdam, Elsevier. Pp. 87-169.
- Sprung, M. 1983: Reproduction and fecundity of the mussel *Mytilus edulis* at Helgoland (North Sea). Helgolander Meeres 36: 243-255.
- Tamiya, H. 1957: The mass culture of algae. Ann. Rev. Plant Physiol. 8: 309-334.
- Villalba, A. 1995: Gametogenic cycle of cultured mussel, *Mytilus galloprovincialis*, in the bays of Galicia (NW Spain). Aquaculture 130: 269-277.
- Wilson, J.H.; Seed, R. 1974: Reproduction in *Mytilus edulis* in Carlingford Lough, Northern Ireland. Irish Fisheries Investigations 15(B): 1-30.

7.1 Broninformatie bij figuren.

Fig.1	www.reedmariculture.com
Fig.2	www.reedmariculture.com
Fig.3	Hoff, F.; Snell, T.W. 1989
Fig.5	Subitec GmbH / www.subitec.com
Fig.6	Kamermans, Pauline
Fig.7	BioFence Ltd. / www.variconaquaculture.com
Fig.8	Biotecna Ltd.
Fig.9	Seasalter Ltd. / www.seacaps.com
Fig.10	ECN / www.ecn.nl
Fig.11	Kamermans, Pauline
Fig.12	Kamermans, Pauline
Fig.13	Dekker, Arno
Fig.14	Dekker, Arno
Fig.15	Dekker, Arno
Fig.16	University of Bristol
Fig.18	Dekker, Arno
Fig.20	Dekker, Arno
Fig.21	Dekker, Arno

8. Verklarende woordenlijst.

1.hatchery:	Systeem voor het opkweken van (mossel)larven d.m.v. stimuleren van de voortplanting bij ouderdieren, in een gecontroleerde omgeving.
nursery:	Vervolg op hatchery systeem. Larven worden opgekweekt tot (mossel)zaad.
2.fytoplankton:	Chlorofyl- α bevattende cellen, die energie uit (zon)licht halen m.b.v. fotosynthese. Vormt de basis van de voedselketen in zee. De twee belangrijkste typen zijn diatomeeën en flagellaten.
3.paarijphheid:	Moment waarop ouderdieren (mosselen) in staat zijn om te gaan paaien (voortplanten).
4.batch:	Deze cultuur wordt gevormd door eenmalige inbreng van een algensuspensie in een container met verrijkt zeewater (veel voedingsstoffen), gevolgd door een bepaalde groeiperiode en uiteindelijk oogsten van de algen wanneer de maximale concentratie algen is bereikt.
5.gonaden:	geslachtsorganen.
6.detritus:	Organisch materiaal, afkomstig van dode planten en dieren.
7.diatomeeën:	Algen die een belangrijke plaats innemen binnen het fytoplankton in zee. Ze hebben om hun cellen een pantser van kiezel, zodoende worden ze ook wel kiezelwieren genoemd. Er zijn ongeveer 5500 soorten bekend.
8.flagellaten:	Flagellaten zijn algen, voorzien van zweeopharen waarmee ze zichzelf kunnen voortbewegen. Er zijn flagellaten met een uitwendig skelet (dino-, kalk- en kiezelflagellaten) en flagellaten zonder skelet.
9.filterfeeders:	Organismen die hun voedsel (en dus voedingsstoffen) uit het water filteren. Onder andere schelpdieren behoren tot deze groep.
10.instorten:	Algencultuur die te lang in de stationaire fase blijft. Door een tekort aan voedingsstoffen gaan de algen dood.
11.nutriënten:	Voedingsstoffen die een algencultuur nodig heeft om zich te kunnen ontwikkelen. Denk bijvoorbeeld aan fosfaten.
12.auxotrofen:	Organismen die zeer gevoelig zijn voor een bepaalde groeifactor.
13.respiratie:	gasuitwisseling, bij organismen vaak 'ademhaling' genoemd.
14.mantel:	De buitenste weefsellaag van de mossel. Deze laag bevat tevens de gonaden van het organisme.
15.coupes:	slides, plakjes. In dit onderzoek een doorsnede van de mantel van ongeveer 5 μm dik. Kan gebruikt worden om onderzoek te verrichten aan ei- en zaadcellen in de mantel.

Bijlage 1; Bouin en Davidson fixatief.

Samenstelling Bouin fixatief.

De onderstaande chemicaliën moeten in de juiste verhoudingen samengevoegd worden in de zuurkast. Draag handschoenen en zet de afzuiging aan in verband met bijtende stoffen en schadelijke dampen.

Picric acid (met water verzadigde oplossing)	75 ml
Formalin (40% formaldehyde oplossing)	25 ml
Glacial Acetic Acid	5 ml

Na samenstelling heeft de oplossing een gele kleur en doordringende geur.

24 uur na het behandelen van het monster met Bouin fixatief **moet** het monster overgebracht worden in een monsterpotje met 70% alcohol.
Vanaf dat moment kan het in ieder geval 3 maanden bewaard worden.

Samenstelling Davidson fixatief.

Het Davidson fixatief is ook wel bekend onder de naam Hartmann fixatief. Er zit dus geen verschil tussen deze fixatieven.

Ook hier geldt weer draag handschoenen en werk in een zuurkast met de afzuiging aan. Onderstaande chemicaliën kunnen weer in de genoemde verhouding samengevoegd worden.

Formalin (37%)	50 ml
Alcohol	75 ml
Glacial Acetic Acid	25 ml
Kraanwater	75 ml

Na samenstelling is de oplossing transparant en een doordringende geur.

24 uur na het behandelen van het monster met Davidson fixatief **moet** het monster overgebracht worden in een monsterpotje met 70% alcohol.
Vanaf dat moment kan het in ieder geval 3 maanden bewaard worden.

Bijlage 2; Kostenraming algen cultivatie systemen.

Kostenraming continue systemen.

	BioFence 800 liter systeem	Seasalter/Seacaps zakken systeem
Model	Buizensysteem in rekken, geheel afgesloten	Grote zakken in een continue cultuur
Capaciteit (minimaal)		
Chaetoceros (x10 ⁶ / ml)	8	4
Nannochloropsis (x10 ⁶ /ml)	150	x
Productie (l/dag)	250	400
Afmetingen	15x0.8x2.6	8 x 500 liter zakken
	Euro/dag	Euro/dag
Kosten aanschaf / jaarlijkse afschrijving	16.4	10.95
Personeelskosten	7.5	24.0
Energieverbruik	8.56	14.1
Nutrienten en CO2	2	3.68
		(zonder CO2)
Onderhoudskosten	0.7	0.9

Reparaties / onvoorz. kosten
10% van totale kosten

3.516

3.713

Totale kosten/dag

38.676**57.343**

Totale kosten/jaar

14118.74**20930.20**

Kosten per gram algen.
0.6 g biomassa/dag

0.65

0.96

Eenmalige aanschaf

30000

20000

Opstartkosten jaar 1

44118.74**40930.20**

Wageningen IMARES is een
samenwerkingsverband tussen
Wageningen UR en TNO. Wij zijn
geregistreerd in het

Handelsregister Amsterdam nr.
34135929 BTW nr. NL
811383690B04

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

Wageningen IMARES is een
samenwerkingsverband tussen
Wageningen UR en TNO. Wij zijn
gevestigd in Wageningen.
Handelsregister Amsterdam nr.
34135090. 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.



Wageningen IMARES is een
samenwerkingsverband tussen
Wageningen UR en HVO. Wij zijn
gevestigd in Wageningen.
Handelsregister Amsterdam nr.
34135090. 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.

