

BEHEERSING VAN *CHAETOMORPHA LINUM* IN EEN MICROALGENVIJVER

Onderzoek naar de ongewenste groei van een macrowier

P.M.H. Biekart

Onderzoeksgroep Aquacultuur, Delta Academy

HZ University of Applied Sciences

2011 Vlissingen

Afstudeerscriptie

Beheersing van *Chaetomorpha linum* in een microalgvijver

Onderzoek naar de ongewenste groei van een macrowier

P.M.H. Biekart

Onderzoeksgroep Aquacultuur, Delta Academy

HZ University of Applied Sciences

2011 Vlissingen

Afstudeerscriptie

Begeleid door:

J. Heringa - Bedrijfsmentor

J. van Houcke - Bedrijfsmentor

P.N.C. Vader - Stagedocent

In samenwerking met :

AE3 consultancy

Koninklijke Maatschap Wilhelminapolder



UNIVERSITY
OF APPLIED SCIENCES



VOORWOORD

Na drie en een half jaar studie aan de opleiding Aquatische Ecotechnologie was het tijd om af te gaan studeren, mijn keuze viel daarbij op de onderzoeksgroep Aquacultuur. De onderzoeksgroep had een mooi probleem beschikbaar dat goed in het verlengde lag van mijn interesse in hoe ecosystemen in elkaar steken. In de lente van 2011 ben ik begonnen met dit onderzoek. In het begin leek het een simpel probleem maar hoe meer literatuur ik vond hoe ingewikkelder het wierprobleem bleek te zijn. Na een aantal praktijkonderzoeken en grote hoeveelheden literatuur is daar dit rapport uit gekomen. Speciaal wil ik daarvoor bedanken Jan Rijstenbil van AE3 consultancy die geduldig en grondig alle vorige versies van dit rapport doorgespit heeft en met zijn kritische blik en advies de kwaliteit van dit rapport erg verhoogd heeft. Daarnaast hebben Jasper en Jouke van de onderzoeksgroep met veel geduld de begeleiding op zich genomen. Dit onderzoek werd mede mogelijk gemaakt door een financiële bijdrage van de Stichting Innovatie Alliantie, waarvoor dank

Summary: Controlling *Chaetomorpha linum* in an Algae Pond

INTRODUCTION

In 2009 an attempt was made to improve the microalgal production of an open pond by adding extra nitrogen. Despite initial success the algal pond was quickly taken over by the multicellular seaweed *Chaetomorpha linum*. This posed a problem as the microalgae grown in the pond were intended to feed mussels and the microalgal production of a seaweed dominated ecosystem is too low. Literature research indicates that *Chaetomorpha* has high tolerance for different environmental factors so research, both literature and practical was needed.

MATERIALS AND METHODS

Five studies were performed, each separate in method and result.

- The nutrient experiment focused on the competition between microalgae and seaweed at different concentrations and ratios of nitrogen and phosphate. Growth was measured in biomass accumulation over two weeks.
- The second experiment measured the impact of the polychaete worm *Nereis virens* on the seaweed.
- The effect of the physiological condition of the seaweed (age) was determined through an experiment that measured the difference in biomass accumulation between young and old seaweed measured over two weeks.
- The effect of salinity in the environment was measured through the impact it had on oxygen production.
- The last experiment measured the impact of a number of hours of desiccation on oxygen production.

RESULTS

The results from the studies indicated that ecological parameters have very little effect on *C. linum*, both salinity and nutrient concentrations had very little effect on the seaweed. The physiological condition of the seaweed did not have a measurable influence either.

Desiccation did have a large influence on the seaweed. It was clear that only 24 hours of being out of water inhibits most of the netto oxygen production.

Nereis virens also had a noticeable impact on seaweed. The worms removed 0,07 g/worm/day on average over a period of two weeks.

DISCUSSION

- The nutrient experiment has left a lot of room for inaccuracies
- The *N. virens* experiment is supported by literature into the feeding habits of *N. diversicolor*
- There is a dichotomy between the long term experiment into the physiological condition of the seaweed and the desiccation experiment. The desiccation experiment showed a large difference between young and old seaweed in oxygen production over the short term where the long term experiment did not show significant differences in biomass growth.
- Although salinity did not seem to have an effect the results were so ambiguous that it is a serious possibility that salinity does have an effect if more tests are performed

CONCLUSION

Chaetomorpha linum is an incredibly tough seaweed that is not easy to remove through ecological means. Direct human intervention will be needed to properly remove meaningful amounts of seaweed.

RECOMMENDATIONS

PRACTICAL

As the nutrient experiment indicated trying to control *C. linum* through steering the amounts of nutrients will not work as the weed has a much wider ecological range than most microalgae. A more effective option is to introduce a population of polychaete worms as these seem to consume the seaweed. A second option is allowing the seaweed to dry, desiccation will kill it.

An opportunity lies in the use of *C. linum*. This study has shown that it is a versatile and hardy seaweed which could be perfect as a fish or cattle feed or as basis for fertilizer. However before this can be accurately done more research is needed.

RESEARCH

More research is needed into the direct effect of osmotic shocks. The study on salinity has yielded ambiguous results which could be due to osmotic shock, this extended study could also focus on the effect of desiccation as the rising salinity in a drying seaweed is strongly linked to the effect a osmotic shock would have.

Apart from the competition for resources between the seaweed and microalgae there is also a personal competition between the two. This is supposed to work through the excretion of inhibitory chemicals. Not much is known about the exact mechanism so more research will be useful in the understanding of the balance between the macro- and microalgae.

Samenvatting

INTRODUCTIE

In 2009 werd een poging gedaan om de productie van microalgen een open vijver te verbeteren door het toevoegen van extra stikstof. Ondanks aanvankelijk succes werd de algen vijver snel overgenomen door het meercellige zeewier *Chaetomorpha linum*. Dit vormde een probleem omdat de microalgen geteeld in de vijver bedoeld zijn om mosselen voeden en de productie van algen in de huidige situatie te laag is door de invloed van het zeewier. Uit literatuur onderzoek blijkt dat *Chaetomorpha* hoge tolerantie voor verschillende omgevingsfactoren heeft dus onderzoek, zowel in de literatuur en de praktijk nodig was nodig.

MATERIALEN EN METHODEN

Vijf studies werden uitgevoerd, elk afzonderlijk in methode en resultaat.

- Het nutriënten experiment richt zich op de concurrentie tussen microalgen en zeewier bij verschillende concentraties en verhoudingen van stikstof en fosfaat. De groei werd gemeten in biomassa accumulatie gedurende twee weken.
- In het tweede experiment werd de impact gemeten van de polychaete worm *Nereis virens* op het zeewier.
- Het effect van de fysiologische conditie van het zeewier (leeftijd) werd bepaald met een experiment dat het verschil in biomassa accumulatie tussen jong en oud wiermat over twee weken.
- Het effect van zoutgehalte in het milieu werd gemeten door de impact die het had op de productie van zuurstof.
- Het laatste experiment mat de impact van een aantal uren van uitdroging op de productie van zuurstof.

RESULTATEN

Uit de resultaten van de studies bleek dat ecologische parameters zeer weinig effect op *C. Linum* hebben, zowel zoutgehalte en nutriënten concentraties had weinig effect op het zeewier. De fysiologische conditie van het zeewier had ook geen meetbare invloed. Verdroging had wel een grote invloed op het zeewier. Het was duidelijk dat slechts 24 uur uit het water het grootste deel van de netto productie van zuurstof remt. *Nereis virens* had ook een merkbare impact op de zeewier. Het was duidelijk dat slechts 0,07 g/worm/dag gemiddeld over een periode van twee weken.

DISCUSSIE

- het voedingsstof experiment heeft veel ruimte voor onjuistheden opengelaten.
- het *N.virens* experiment wordt ondersteund door de literatuur in de voedingsgewoonten van *N.diversicolor*
- Er is een verschil tussen de lange termijn experiment in de fysiologische toestand van het zeewier. De verdroging experiment toonde een groot verschil aan tussen jong en oud zeewier in zuurstof productie op de korte termijn, waar op de lange termijn zijn geen significante verschillen in biomassa groei aangetoond.
- Hoewel het zoutgehalte geen effect lijkt te hebben waren de resultaten waren zo dubbelzinnig dat is een serieuze mogelijkheid dat zoutgehalte heeft een effect kan hebben als er meer tests worden uitgevoerd.

CONCLUSIE

Chaetomorpha linum is een erg taai zeewier dat niet eenvoudig te verwijderen is door middel van ecologische middelen. Rechtstreekse menselijke tussenkomst zal nodig zijn om zinvolle hoeveelheden zeewier goed te verwijderen.

AANBEVELINGEN

PRAKTISCH

Het nutriënten experiment gaf aan dat *C.linum* controle door middel van het sturen van de hoeveelheden voedingsstoffen niet zal werken. Het wier heeft een veel bredere ecologische range dan de meeste microalgen. Een effectievere mogelijkheid is de invoering van een populatie van zagers, deze lijken het zeewier te consumeren. Een tweede optie is het drogen van het zeewier, uitdroging zal het wier snel doden. Een kans ligt in het gebruik van *C. linum*. Deze studie heeft aangetoond dat het een veelzijdig en taai zeewier dat zouden kunnen worden gebruikt als vee- of visvoer. Voordat dit nauwkeurig kan worden gedaan is meer onderzoek nodig.

VERVOLGONDERZOEK

Meer onderzoek is nodig naar de rechtstreekse werking van osmotische schokken. Het onderzoek naar zoutgehalte heeft onduidelijke resultaten opgeleverd die beter verklaard kunnen worden door osmotische shock Het onderzoek naar de osmotische schokken kan gecombineerd worden met effect van verdroging want de stijgende zoutgehalten tijdens het drogen van zeewier zijn sterk verbonden met het effect dat osmotische schok zou hebben. Apart van de concurrentie over de bronnen tussen het zeewier en microalgen is er ook een persoonlijke concurrentie tussen de twee. Dit wordt verwacht te werken door middel van de uitscheiding van remmende stoffen. Niet veel is bekend over de exacte mechanisme, meer onderzoek zal nuttig zijn in het begrijpen van het evenwicht tussen de macro-en microalgen.

INHOUDSOPGAVE

1. INLEIDING	1
1.1 DE PROBLEMBESCHRIJVING	2
1.2 ONDERZOEKSOPZET.....	3
1.3 LEESWIJZER.....	4
2. ACHTERGRONDEN.....	5
2.1 VERSPREIDING.....	5
2.2 TAXONOMIE	6
2.3 ECOLOGISCHE NICHE	7
2.3.1 Zoutgehalte.....	7
2.3.2 Voedingstoffen.....	7
2.3.3 Interactie en concurrentie.....	8
2.4 VOORTPLANTING	10
3. NUTRIËNTEN EXPERIMENT.....	11
3.1 INLEIDING EN ACHTERGRONDEN	11
3.2 METHODE	12
3.2.1 Opzet.....	12
3.2.2 Monitoring.....	12
3.2.3 Berekeningen	13
3.3 RESULTATEN	15
3.4 DISCUSSIE	17
3.5 CONCLUSIE	18
4. ZAGER-WIER BEGRAZINGS EXPERIMENT	19
4.1 INLEIDING EN ACHTERGRONDEN.....	19
4.2 METHODE	19
4.2.1 Opzet.....	19
4.2.2 Monitoring.....	20
4.2.3 Berekeningen	20
4.3 RESULTATEN	21
4.4 DISCUSSIE	21
4.5 CONCLUSIE.....	22
5. FYSIOLOGISCHE CONDITIE EXPERIMENT.....	23
5.1 INLEIDING EN ACHTERGRONDEN	23
5.2 METHODE	24
5.2.1 Opzet.....	24
5.2.2 Monitoring.....	25
5.3 RESULTATEN	26
5.4 DISCUSSIE	27
5.5 CONCLUSIE.....	27
6. ZOUTGEHALTE EXPERIMENT	28
6.1 INLEIDING EN ACHTERGRONDEN	28
6.2 METHODE	29
6.2.1 Opzet.....	29
6.2.2 Berekening.....	29
6.3 RESULTATEN	30
6.4 DISCUSSIE	30
6.5 CONCLUSIE.....	31
7. UITDROGINGS EXPERIMENT.....	32
7.1 INLEIDING EN ACHTERGRONDEN	32

7.2	METHODE	32
7.2.1	<i>Opzet</i>	32
7.2.2	<i>Berekeningen</i>	33
7.3	RESULTATEN	33
7.4	DISCUSSIE	34
7.5	CONCLUSIE	34
8.	SYNTHESE	35
9.	EINDCONCLUSIE	36
10.	AANBEVELINGEN	37
10.1	AANBEVELINGEN VOOR MICROALGENKWEKERS	37
10.2	AANBEVELINGEN VOOR VERVOLGONDERZOEK.....	37
	BRONNEN	39
	BIJLAGE 1: PROCEDURE WIERWEGING	41
	BIJLAGE 2: METHODE VOOREXPERIMENT ZAGERS	42
	<i>Methode</i>	42
	<i>Resultaat</i>	42
	BIJLAGE 3: PROTOCOL NO₃⁻ BEPALING IN ZOUT MET SPECTOFOTOMETER	43
	ACHTERGROND	43
	BENODIGDE CHEMICALIËN/ APPARATUUR	43
	PROCEDURE METINGEN:.....	44
	BIJLAGE 4: ABSOLUTE CONCENTRATIES N EN P IN DE VIJVER VAN DE KMWP	45
	BIJLAGE 5: WAARDEN TIJDENS DE NUTRIENTENEXPERIMENT	46

1. INLEIDING

Wereldwijd komt er steeds meer vraag naar vis en andere zeeproducten en het begint helder te worden dat een groot gedeelte van de bestaande wildvang-methoden niet duurzaam is (FAO, 2005). Daarnaast worden steeds meer landgebouwgebieden ongeschikt voor traditionele landbouw door verzilting of gebrek aan zoet water. Derde factor in dit probleem is de snel groeiende wereldbevolking. Door de combinatie van toenemende vraag naar zeeproducten en terugloop van traditionele landbouwactiviteiten stappen steeds meer boeren over op kweek van zeeproducten op land. Wereldwijd worden steeds meer initiatieven ontplooid in de duurzamere en op land uitgevoerde varianten van aquacultuur. Ook in Zeeland zijn in het afgelopen decennium veel projecten van start gegaan zoals bijvoorbeeld de Zeeuwse Tong .

Een van de onderzoeksgebieden van veel van deze initiatieven is de zogenaamde Integrated Multitrophic Aquaculture (IMTA), het samenvoegen van verschillende productieketens binnen de aquacultuur zodat bijproducten van de ene keten een andere kunnen voeden.

Een van de projecten die de IMTA richt is het RAAK project Het Zoute Goud. Het Zoute Goud is het overkoepelende onderzoek dat uitgevoerd wordt door de Hogeschool Zeeland (HZ) met als doelstelling om de kennisbasis over landbased aquacultuur te vergroten en de samenwerking aan te gaan met internationale partners om hiermee de zich in Zeeland ontwikkelende aquacultuur te versterken. Hierbij wordt samengewerkt met 20 nationale en internationale partners.

Een van het onderzoeken in het kader van Het Zoute Goud is de kweek van microalgen als voedselvoorziening voor mosselen, dat uitgevoerd wordt door de Koninklijke Maatschap de Wilhelminapolder (KMWP), een partner in het Zoute Goud project.

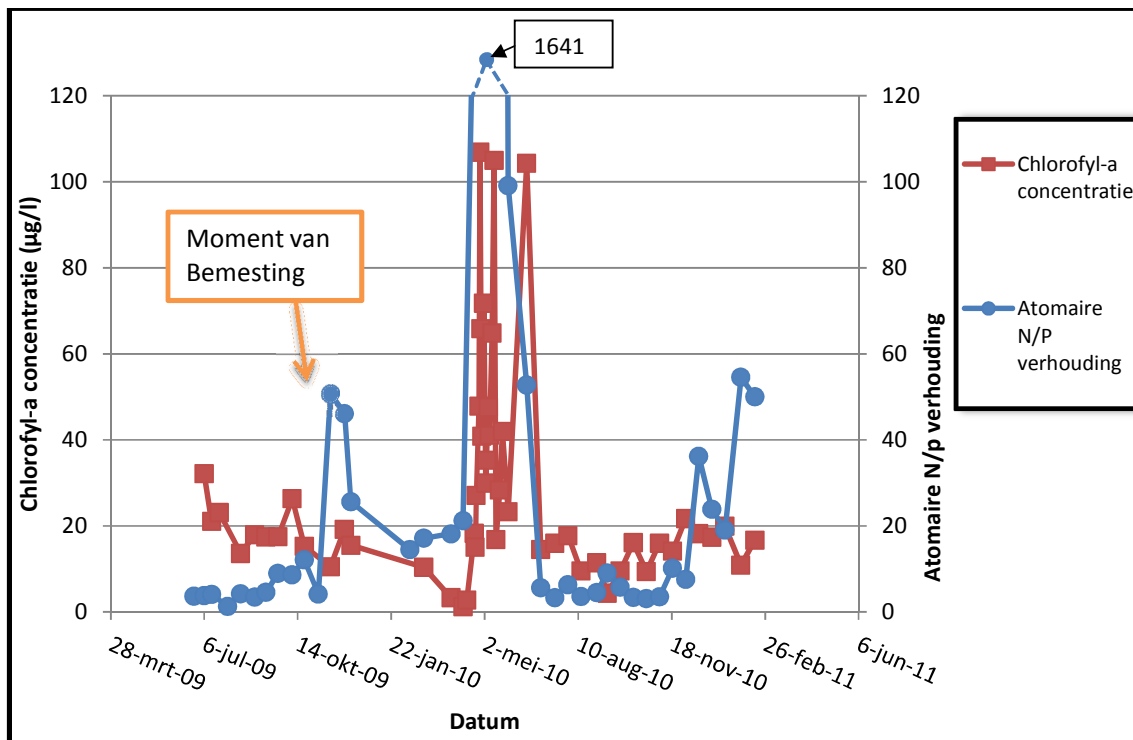
De KMWP is een akkerbedrijf dat ten noorden van Goes 1700 hectare grond beheert. Naast traditionele akkerbouw van bijvoorbeeld uien en aardappelen is de Maatschap actief op het gebied van duurzaamheid en innovatie in moderne technieken. Een van deze innovaties is de binnendijkse kweek van mosselen. In een met het grondwater in contact staande vijver met een oppervlakte van 4000 vierkante meter worden op een extensieve manier microalgen gekweekt. Deze microalgen worden gebruikt om de mosselen te voeren van twee kleine hangculturen. In deze vijver is sinds de zomer van 2010 een marcrowier (*Chaetomorpha linum*, Kützing 1845) verschenen, in het Nederlands "recht borstelwier" genoemd. In de Zeeuwse volksmond wordt *C. linum* ook wel Apenhaar genoemd, dit omdat het een structuur heeft die het best te vergelijken is met dik, warrig haar of een kluwen visdraad.

Vanuit de samenwerking tussen de onderzoeksgroep Aquacultuur van de Hogeschool Zeeland en de KMWP is de vraag om de wieroverlast te onderzoeken en zo bij te dragen aan een oplossing van het wierprobleem bij de Onderzoeksgroep terecht gekomen.

1.1 DE PROBLEEMBESCHRIJVING

De microalgenkweek van de KMWP verliep goed vanaf de start van het project, met een adequate microalgenproductie voor een extensief systeem. Maar om een hogere productie te bereiken is in 2009 besloten om de toen nog relatief lage microalgenconcentratie in de microalgenvijver te verhogen door het toevoegen van extra stikstof in de vorm van ammoniumnitraat (NH_4NO_3). Deze stikstofbemesting is uitgevoerd omdat gedacht werd dat de verhouding tussen stikstof (Dissolved Inorganic Nitrogen, DIN) en fosfaat in het water niet optimaal was. Uit de literatuur was gebleken dat voor microalgen een atomaire N:P verhouding van hoger dan 16:1 optimaal is. Vóór 2009 was de verhouding in de vijver lager, rond de 4 tot 8:1.

De toevoeging van ammoniumnitraat heeft inderdaad de N:P verhouding omhoog gebracht tot ruim 1600 in juni 2010 (zie fig. 1). De verhoging is veroorzaakt door een combinatie van een verhoging in de concentratie stikstof en het nagenoeg opraken van de hoeveelheid fosfaat, te zien in figuur 30 en 31 in bijlage 4.



Figuur 1: Overzicht van de Chlorofyl-a concentratie en N/P verhouding in de microalgenvijver van de KMWP. De Y as voor de atomaire N:P verhouding is gelimiteerd op 120 hoewel waarden tot 1641 zijn gevonden.

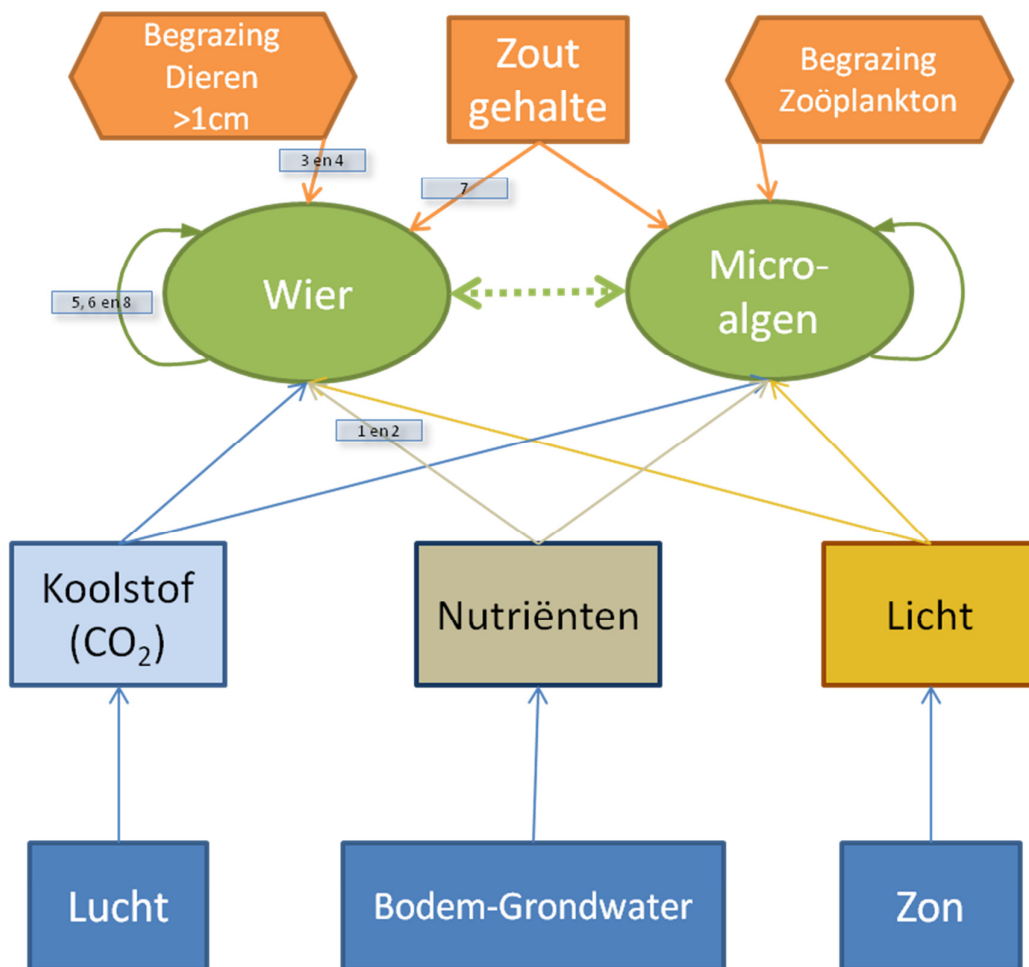
Ook de concentratie chlorofyl (en dus de microalgenconcentratie) in het water is ver omhoog geschoten tot ongeveer vijf maal de concentratie voor de nutriëntengift. De chlorofylconcentratie is vervolgens nadat de N/P-verhouding was gezakt mee omlaag gegaan tot uiteindelijk 5 µg/l, wat in de kweekvijver een vergelijkbare waarde is met de concentratie voor de zomer. Op het moment van deze inzakking (augustus 2010) is het wierprobleem ontstaan.

De sterke aanwezigheid van het wier is een probleem omdat dit wier in zo grote hoeveelheden aanwezig is dat het ecosysteem van de vijver verstoord wordt en zo de microalgenkweek tegenwerkt. Uit studie van zoetwatersystemen is bekend dat er over het algemeen twee mogelijke stabiele situaties zijn. De ene situatie is een troebel meer waarin microalgen domineren door het verstikken en beschaduen van alle waterplanten. De andere situatie is een heldere situatie waarin de waterplanten de boventoon voeren. (Scheffer et al. 1993) Ook op momenten dat de dominantie van een systeem niet duidelijk bij de waterplanten of de microalgen ligt, is er nog steeds directe concurrentie tussen microalgen en plant omdat zij nagenoeg dezelfde bronnen aanspreken: opgelost stikstof, fosfaat en zonlicht.

Het lijkt erop dat zich in de microalgvijver het wier een situatie heeft gecreëerd die lijkt op de situatie in de heldere meren. Dit is waarschijnlijk gebeurd doordat de plotselinge verlaging in microalgendichtheid licht bij de bodem heeft gelaten wat de fotosynthese en dus groei van het wier heeft versneld. Ook de concentraties stikstof en fosfaat zijn aan het eind van de zomer van 2010 erg omhoog gegaan (zie bijlage 4) maar het is niet duidelijk of dit een oorzaak of gevolg van de wiergroei is. Het wier is vanaf de herfst van 2010 de grootste primaire producent in de vijver. De helderheid van de microalgvijver is een probleem omdat de vijver bedoeld is voor de kweek van vrij-drijvende microalgen en deze nauwelijks voorkomen in een door macrowier gedomineerd systeem.

1.2 ONDERZOEKSOPZET

Om de overmatige groei van het wier goed en volledig te onderzoeken zal een groot aantal invloeden op borstelwier onderzocht moeten worden. Om structuur aan te brengen is het volgende denkschema gecreëerd (figuur 2) waarin een aantal van de mogelijke factoren die de balans tussen microalgen en macrowieren kunnen beïnvloeden is weergegeven.



Figuur 2: De hoofdinvoeden op wier en microalgen in een systeem als de microalgvijver van de KMWP. De donkerblauwe blokken zijn de bronnen, de oranje zijn externe omgevingsfactoren. In de kleine tekstvakken is aangegeven waarbij deelvragen (zie pagina 4) zijn gesteld.

Zowel het wier en de microalgen maken gebruik van dezelfde bronnen: koolstof in de vorm van CO₂, stikstof en fosfor als nutriënten en licht als basis voor de fotosynthese. Aan de andere kant staan de externe invloeden die een negatief effect hebben op de groei of voortplanting van het wier of de microalgen. De balans tussen microalgen en wieren kan zo veranderd worden door het beïnvloeden van de bronnen of het verhogen van de

druk op het wier. Er zijn nog vele andere invloeden en ook is er binnen het schema nog uitwisseling van effecten, bijvoorbeeld re-mineralisatie van wier en extinctie van de zon door de microalgen. Er is gekozen voor deze versimpelde versie van de realiteit om de focus in het onderzoek te behouden.

Om de ondanks de versimpeling toch complexe geheel van factoren goed te kunnen onderzoeken, zullen de volgende vragen beantwoord worden in een aantal losse onderzoeken.

Hoofdvraag:

Welke factoren hebben de grootste invloed op groei van *Chaetomorpha linum* de microalgenvijver van de KNWP en welke zijn bruikbaar in de beheersing van *C.linum*?

Deelvragen:

1. Hoeveel invloed heeft de N/P verhouding in het water op de competitie tussen microalgen en *C. linum*?
2. Hebben de absolute concentraties DIN (dissolved inorganic nitrogen) en fosfaat in het water invloed op de competitie tussen microalgen en borstelwier?
3. Hoeveel invloed heeft de begrazing door zagers (*Nereis virens*, Sars 1835) op de groei van *C. linum*?
4. Zijn zagers bruikbaar als beheersmiddel van borstelwier?
5. Is er verschil in groei van *C. linum* na fysieke stress (mechanische schade), dehydratie stress of bij verschillende cel leeftijden (oud of jong)
6. Is fysieke stress bruikbaar als beheersinstrument?
7. Wat is de invloed van het zoutgehalte van de omgeving op de korte termijn productie van *C. linum*?
8. Wat is de invloed van uitdroging op de korte termijn productie van *C. linum*?

1.3 LEESWIJZER

De deelvragen zullen deels beantwoord worden aan de hand van een literatuuronderzoek in hoofdstuk 2. In dit hoofdstuk zal de verspreiding, taxonomie en de ecologische niche van het wier worden toegelicht.

Naast het literatuuronderzoek zijn in totaal vijf experimenten uitgevoerd om in het literatuuronderzoek gevonden data verder duidelijk te krijgen en om specifieke parameters te onderzoeken. In hoofdstuk 3 worden de resultaten van het onderzoek naar de invloed van stikstof en fosfaat gepresenteerd. In hoofdstuk 4 zal de begrazing van *C. linum* door zagers worden besproken. In Hoofdstuk 5 is het onderzoek besproken naar of de fysiologische condities van het wier genoeg effect heeft om als beheersmiddel te dienen. Het optimale zoutgehalte van de omgeving van het wier is besproken in hoofdstuk 6. De resistentie tegen uitdroging is onderzocht met het experiment bescheven in hoofdstuk 7. De samenhang van deze deelonderzoeken en hun relevantie voor de praktijk wordt besproken in hoofdstuk 8, Synthese.

2. ACHTERGRONDEN

Wieren zijn een hele brede groep organismen die overal voorkomen waar licht en water aanwezig is, van sneeuwvelden tot tropische lagunes. Omdat wieren in al deze omstandigheden voor kunnen komen is een literatuuronderzoek een belangrijk instrument om een goed idee te krijgen van de potentiële ecologische bandbreedte

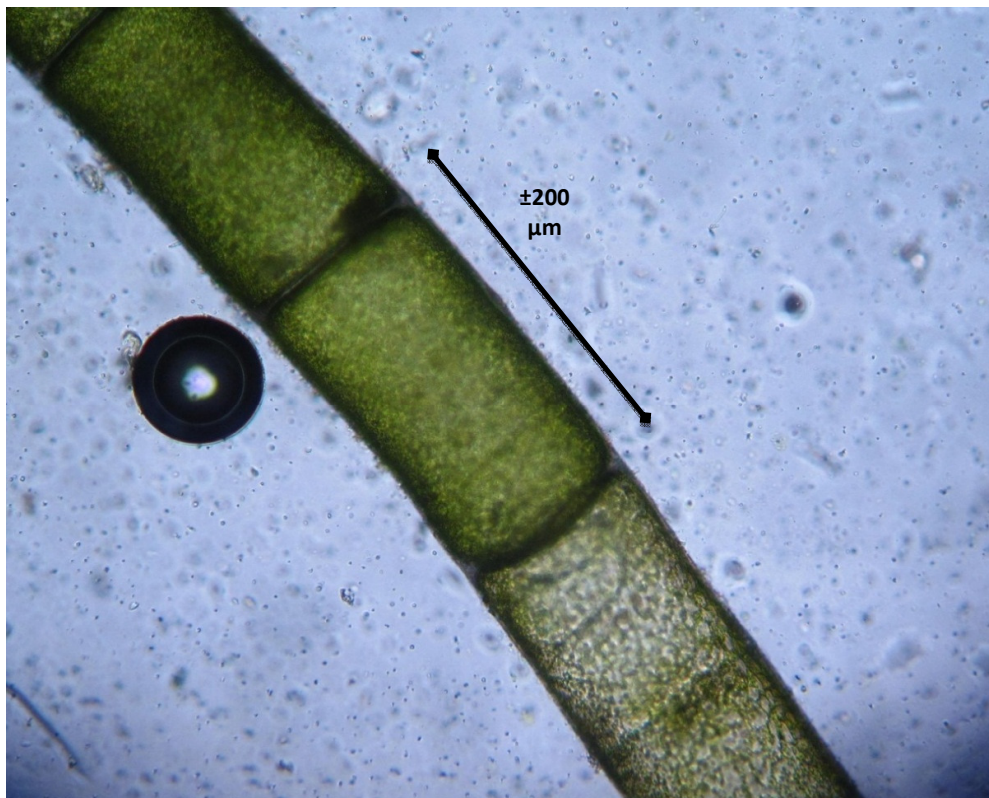
In dit rapport worden wieren gedefinieerd als meercellige agglomeraten van fotoautotrofe eukaryoten. Met “algen” worden microalgen bedoeld die als individuele cellen bestaan.

Wieren variëren in complexiteit van erg simpel en mosachtig tot een systeem dat er nagenoeg net zo complex als landplanten uitziet. Een groot verschil tussen planten en wieren is wel dat planten meestal duidelijk gedifferentieerde cellen hebben waar in wieren nagenoeg alle cellen dezelfde functies vervullen. Bij een wier is de technische term voor een enkele “plant” een thallus, bij de complexere wieren kan er ook nog onderscheid gemaakt worden tussen de diverse weefseltypen: de stengel, de lamina (bladachtige structuren) en het houvast. Sommige wieren hebben daarnaast ook nog met gas gevulde blaasvormige structuren om rechtop te blijven onder water.

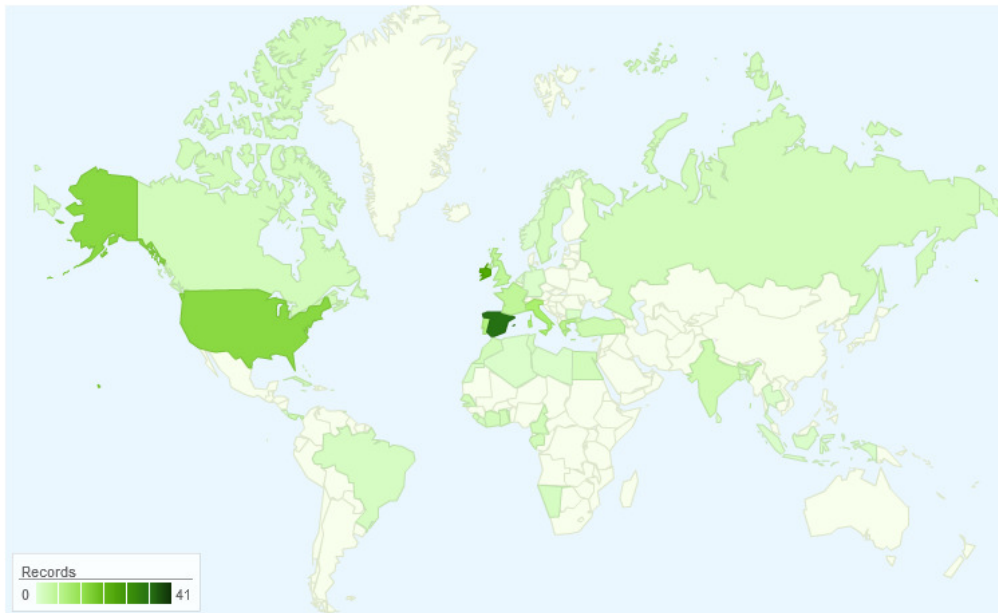
Chaetomorpha is een genus met daarin vooral simpele wieren. Een aantal soorten hecht zich vast aan de bodem, maar soorten met vrij drijvende thalli waarin nauwelijks differentiatie is tussen verschillende delen komen het meeste voor.

2.1 VERSPREIDING

Chaetomorpha is een geslacht van meercellig draadvormig wier met grote cellen ($\pm 200\text{-}300\ \mu\text{m}$ lengterichting) en dikke celwanden (observatie, zie figuur 3). waarop vaak epifytische diatomeeën groeien (niet te zien bij de getoonde vergroting)



Figuur 3: Foto van enkele typische levende *Chaetomorpha linum* cellen onder een lichtmicroscop bij 100 maal vergroting.

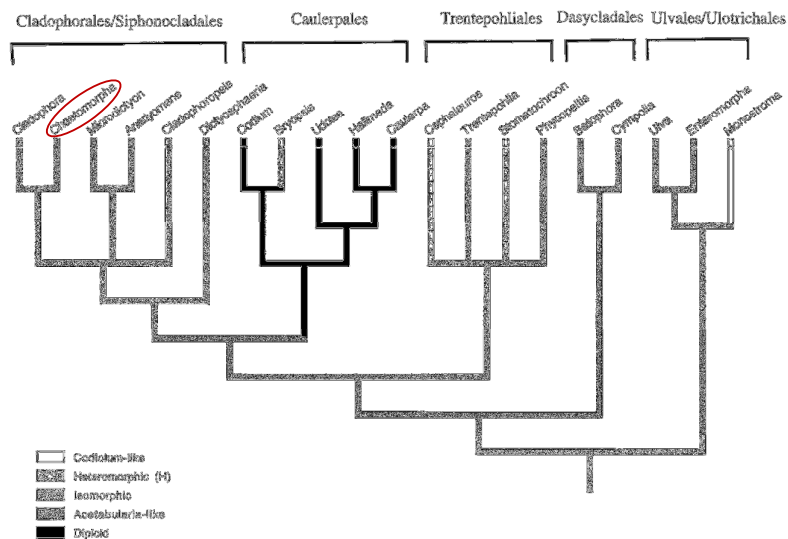


Figuur 4: Verspreidingsgebied van *Chaetomorpha linum*. In de donkere landen zijn gebieden waar *Chaetomorpha linum* gesignaleerd is volgens de wetenschappelijke literatuur, hoe donkerder de kleur van het land hoe meer wetenschappelijke publicaties uit dit land gaan over het wier. (Algaebase 2011).

Chaetomorpha linum is een wier groeiend in de sub littorale zone van estuaria in alle continenten behalve Antarctica. Het komt voor in alle gebieden tussen de tropen en de poolzones zoals te zien is in Figuur 4.

2.2 TAXONOMIE

Chaetomorpha is een groenwier uit een phylum waartoe de meerderheid van de zeevieren behoren: de Chlorophyta. Belangrijke verwante familie in de orde van de Ulvophyceae is het genus *Cladophora* met daarin soorten als *Cladophora rivularis*, een bekende zoetwateraquariumplant. Iets verder verwijderde familie is het genus *Ulva*.



Figuur 5: de stamboom met de taxonomische indeling van de orde *Ulvophyceae*, deze geeft aan hoe het genus *Chaetomorpha* verwant is aan andere geslachten. De kleur van de takken van de stamboom geeft aan welke voortplantingsmethode de verschillende geslachten gebruiken. Dit wordt verder besproken in paragraaf 2.4

2.3 ECOLOGISCHE NICHE

Zoals in paragraaf 2.1 is aangegeven komt het geslacht *Chaetomorpha* en ook specifiek *C. linum* in veel ecosystemen voor. Om in al deze omstandigheden te overleven heeft de plant de mogelijkheid om fysiologische systemen aan te passen, hoewel de mogelijke ecologische bandbreedte van het wier uiteraard zijn grenzen heeft. In deze paragraaf zal aangegeven worden binnen welke parameters het wier gedijt en dus ook onder welke omstandigheden borstelwier zich volgens de literatuur niet zal kunnen handhaven.

2.3.1 ZOUTGEHALTE

Het zoutgehalte van een aquatisch ecosysteem is belangrijk omdat de osmotische waarde van de omgeving grote kracht kan uitoefenen op cellen van organismen. Mocht een organisme niet aangepast zijn aan de lokale waarde kan grote schade ontstaan doordat osmose grote druk kan uitoefenen op de celmembranen. Ook zal het actief compenseren van een suboptimale osmotische druk de cel veel energie kosten.

Ook voor borstelwier is onderzocht welke zoutgehaltes het wier kan tolereren in zijn ecosysteem. Alleen Caputo et al. 2010 rapporteren hierover in de gangbare literatuur. In een laboratoriumexperiment met *Chaetomorpha linum* dat verzameld was uit gebieden met een saliniteit tussen zoet en 30 g/l is de fotosynthetische activiteit onderzocht. Er was geen correlatie tussen de saliniteit en activiteit. Uit verder onderzoek door hetzelfde team bleek dat *C. linum*, behalve de waarden waar het wier in de natuur voorkomt, ranges tussen zoetwater (<0,5 g/l) en pekel van 75 g/l kan tolereren zonder significante inhibitie van de fotosynthese te ondervinden. Hierna is het wier afkomstig uit zoete omstandigheden geplaatst in verschillende bassins met oplopende saliniteiten tot 75 g/l. Ook hier was de fotosynthese-activiteit niet significant verschillend van de zoete beginsituatie. Deze aanpasbaarheid komt door het enzym ascorbaatoxidase op een manier die nog niet goed begrepen is door de wetenschappers die het experiment uitvoerden.

Het lijkt er wel op dat borstelwier een tijd nodig heeft om zich aan te passen en om te schakelen van zout naar zoet water maar dit lijkt van de lokale variëteit af te hangen. Dat borstelwier ondanks het aanpassingsvermogen toch nauwelijks voorkomt in zoete ecosystemen geeft aan dat deze niet het optimale leefgebied zijn voor het wier en dat andere omgevingsfactoren het voorkomen waarschijnlijk beperken.

2.3.2 VOEDINGSTOFFEN

Alle foto-autotrofe organismen hebben voor de groei door assimilatie vrij koolstof nodig. Landplanten halen dit direct uit de lucht in de vorm van CO₂. Wieren en microalgen gebruiken opgelost koolstof, ook DIC (dissolved inorganic carbon) genoemd, meestal in de vorm van CO₂ en HCO₃⁻. *Chaetomorpha linum* produceert ook goed bij hoge concentraties DIC. In een laboratoriumexperiment is de vergelijking gemaakt tussen de fotosynthese bij atmosferische omstandigheden (±3,5 mM CO₂) en verhoogde condities (10 mM CO₂) met tot 50% hogere fotosynthetische ratio in de verrijkte omstandigheden ten opzichte van de normale omgeving. (Menéndez, 2000). Het is bekend dat andere soorten minder goed tegen hoge DIC kunnen door dalende alkaliniteit en stijgende pH. *C. linum* wordt wel in de groei geremd van stijgende pH maar niet meer dan vergelijkbare, opportunistische, wieren zoals *Ulva* en *Gracilaria*. Tot een pH van 8,5 tot 9 is er geen duidelijke verandering, daarna gaat de fotosynthetische ratio snel achteruit tot nagenoeg 0 bij pH 10. (Menéndez, 2000) hetgeen ook het geval is bij vele microalgen (Humphrey, 1975).

Daarnaast hebben wieren ook nog andere macronutriënten nodig zoals stikstof en fosfaat. Borstelwier kan goed leven bij zowel hoge als minimale concentraties van deze nutriënten (Menéndez, 2005) In een laboratoriumexperiment werd na 1,5 uur al gezien dat de cellen extra stikstof opnamen en opsloegen bij hogere concentraties nitraat of ammonium. In hetzelfde experiment werd opgemerkt dat het wier een hogere affiniteit heeft voor N in de vorm van ammonium dan in de vorm van nitraat. Na negen dagen onder N en P verrijkte omstandigheden was de stikstof- en ook de fosfaat-concentratie binnen het wier ver gestegen boven de initiële concentraties. Dit geeft aan dat het wier stikstof en fosfaat op kan slaan binnen de cel al is het niet duidelijk in welke vorm *C. linum* dit doet.

De plant kan de effectiviteit van zijn fotosynthetische licht- en donkerreacties reguleren naar de hoeveelheid beschikbare voedingsstoffen en de hoeveelheid licht. Deze regulatie zorgt ervoor dat het wier in donkere omstandigheden optimale koolstoffixatie heeft en in intens zonlicht schade door fotorespiratie wordt

voorkomen (Menéndez, 2005; McGlathery, 1999). Deze manier van regulatie is optimaal voor omstandigheden zoals vaak voorkomen in de ondiepe, zonbeschenen, estuaria waar *C. linum* leeft.

2.3.3 INTERACTIE EN CONCURRENTIE

In alle systemen waar het geslacht borstelwier voorkomt moeten de soorten concurreren met andere autotrofen, variërend van microalgen tot macroalgen met een complexe bouw.

Chaetomorpha sp. heeft het voordeel over microalgen omdat ze veel voedingsstoffen kan opslaan (Menendez, 2005; Pedersen 1996). Door de mogelijkheid om stikstof op te slaan binnen de cel heeft het borstelwier nog een concurrentievoordeel op microalgen: ze kan bij fluctuerende concentraties het luxe overschot opslaan en in tijden van schaarste doorgroeien door deze voorraad aan te spreken. (Menendez 2005).

Grote hoeveelheden drijvend wier of microalgen in een waterkolom werpen een schaduw op de daar onderliggende wieren of microalgen, het fenomeen van een schaduw werpen op individuen van de eigen soort (self-shading) is een groot probleem voor het bodemwier omdat het in tegenstelling tot de eencellige microalgen niet kan mengen in de waterkolom. Waar microalgen door waterstroming vaak naar de oppervlakte (en het licht) gebracht worden sterven de onderste lagen wier snel af (Krausse-Jensen 1996). Daarnaast is het zo dat zolang er genoeg microalgen in de waterkolom zitten het licht maar een korte afstand het water indringt. Deze extinctie kan ervoor zorgen dat bentische wieren niet de kans krijgen zich goed te ontwikkelen uit sporen. Tijdens een experiment met wier uit een lagune in de Ebro (Spanje) rivierdelta werd geobserveerd dat bij slechts 10% extinctie de productie binnen een wiermat al 75% lager was dan bij volledige belichting (Krausse-Jensen 1996). In een intensieve cultuur worden microalgen al geremd door self shading op een diepte van 5 tot 10 centimeter (eigen observatie) dus wier zal ook al in ondiep water in groei worden beperkt als het water troebel genoeg is.

Mocht het systeem doorslaan naar een wier-gedomineerd systeem, dan zullen deze wieren omstandigheden kunnen creëren die hun eigen groei bevorderen zonder de microalgen in het voordeel te stellen. Een van deze mechanismen is dat de afbraak van de onderste laag wier (gestorven door gebrek aan licht, zie paragraaf hierboven) een reducerend micromilieu creëert waardoor fosfaten en ammonium uit de bodem en uit het in afbraak zijnde wierweefsel diffunderen en lokaal hoge N en P (zoals geïllustreerd in figuur 6) concentraties veroorzaken (Lavery en McComb, 1991). Deze worden vervolgens snel opgenomen door de productievare hogere lagen van het wier. Direct boven de wiermat is de nutriënten concentratie alweer nagenoeg gelijk aan de natuurlijke omstandigheden (Krausse-Jenssen, 1996)



Figuur 6: Illustratie van het mechanisme waardoor *Chaetomorpha linum* nutriënten kan opnemen uit afstervend wier zonder microalgen te voeden.

Qua begrazing is er veel verschil tussen wier en microalgen. Vrij zwevende microalgen worden vooral begraaasd door het zoöplankton en filter feeders terwijl wier, dat mechanisch bewerkt (gekauwd of afgescheurd) moet worden voor het kan worden verteerd, veel meer wordt begraaasd door iets grotere ongewervelden zoals slakken, amphipoda en polychaete wormen maar wordt ook gegeten door grote gewervelden zoals de Amerikaanse Zwarte Eend (*Anas rubripes*, Brewster 1902) (Lynch, 1939)

Het hoofdverdedigingsmechanisme van het wier tegen begrazing is een combinatie van hoge groeisnelheid en relatieve taaigheid (Wilemsen en Reise, 1994). Maar zoals veel andere wieren bevat borstelwier daarnaast ook tanninen en fenolen (Premalatha, 2011) wat duidt op chemische verdediging tegen begrazing.

De gameten die borstelwier loslaat tijdens de voortplanting (zie paragraaf 2.4 voor meer details) zijn in tegenstelling tot het volwassen wier van de juiste omvang en samenstelling om als voedsel te dienen voor filter feeders. Mossellarven en volwassen mossels voeden zich actief met de gameten van *Chaetomorpha linum* en andere zeewieren. De gameten zijn een stuk kleiner dan de diatomeeën die het hoofddeel van het plankton vormen en daardoor zijn zij beter te eten voor de kleine larven. Voor de volwassen mosselen is het vooral voedingsgemak van een in de periode van voortplanting veelvoorkomende voedselbron (Otto en Marks, 1996).

Een onderzoek van B. Santelices en R. Ugarte uit 1987 toont aan dat fragmenten van *Chaetomorpha firma* die zijn verorberd door vier verschillende soorten slakken het verteringskanaal overleven en uit kunnen groeien tot gezonde individuen. Dit geeft aan dat de voortplantingcellen van het wier van vergelijkbare taatheid zullen zijn.

Alikruikken (*Litorina litorea*) grazen ook direct op volgroeide zeewieren, in een onderzoek naar hun begrazing op de soort *Codium fragile* is duidelijk geworden dat zij een voorkeur hebben voor jonge of beschadigde thalli maar dat volgroeide wieren niet begraasd worden omdat de thalli te groot zijn voor een dier dat normaal graast op epilithische microalgen (Scheibling et al 2008).

Jonge *Nereis virens* kunnen goed overleven op de zachtere soorten zeewier, met een opname van 89% van *Ulva intestinales*. Echter de veel taaiere vasculaire planten als Zeekraal of Slijkgras (*Spartina*) geven een veel lager opname van tussen de 60 en 30% en dit lijkt vooral aan het lignine- en cellulosegehalte van de plant te liggen (Ollivier et al, 1997). *Chaetomorpha linum* lijkt een voor wier relatief laag cellulosegehalte te hebben ($\pm 7,5\%$ droog, Siddhanta et al. 2009). Dit zijn gehalten vergelijkbaar met bijvoorbeeld *Spartina* (6,9% droog, Hemminga en Buth, 1992) dus de verwachting is dat de zagers die leven op een dieet van borstelwier een veel lagere voedselconversie-ratio hebben in vergelijking met dieren die een meer omnivoor (of cellulose-arter) dieet hebben.

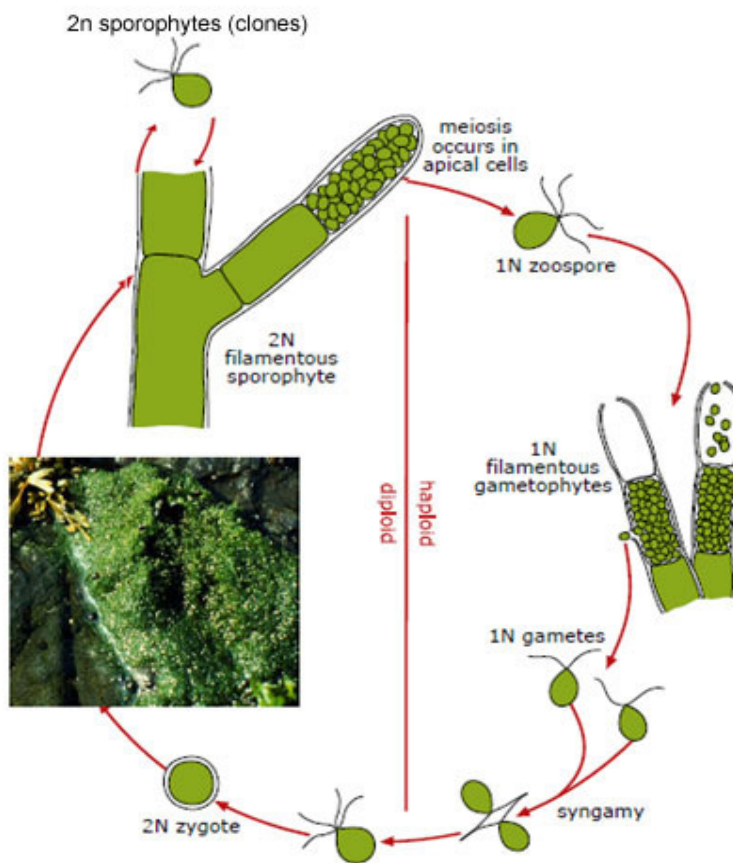
Uit literatuur blijkt dat het genus *Idotea* (zeepissebedden) een breed dieet heeft met daarin onder andere zeewier (Orav-Kotta en Kotta, 1994). Een observatie tijdens het praktijk onderzoek die de gevonden literatuur ondersteunt is dat er grote aantallen zeepissebedden (*Idotea balthica*) verschenen in het voorraadbassin van het wier. Deze zijn er waarschijnlijk met de originele wier ent in terecht gekomen en hebben zich vermenigvuldigd.

Het is mogelijk dat door de beperkte vraagstelling van de verschillende gevonden artikelen de totale graasdruk niet kan worden bepaald. Waar individuele soorten misschien geen duidelijke invloed hebben kan het zo zijn dat alle kleine effecten bij elkaar opgeteld toch een significante stress geven aan het wier.

2.4 VOORTPLANTING

De voortplanting van groene macrowieren kan plaatsvinden op verschillende manieren, het geslacht *Chaetompha* maakt gebruik van isomorfe gameten (1n en 2n individuen en de gameten daarvan zijn niet te onderscheiden) als van asexuele voortplanting in de vorm van sporofyten (Kornmann 1976, Otto en Marks 1996).

In figuur 7 wordt schematisch weergegeven wat de voortplantingscyclus van *C.linum* is. Een volgroeide diploïde thallus zal gelijkvormige zaad- en eicellen produceren. De gameten zullen individueel settelen en uitgroeien tot normale wieren. Deze haploïde volgroeide wieren zullen vervolgens weer haploïde gameten vrij laten welke versmelten tot een diploïd individu wat settelt en de cyclus overnieuw begint. Het is niet duidelijk of er een zwakke schakel is in de cyclus. De varianten van de gameten, de zygoten en asexuele sporofyten hebben allemaal een vergelijkbare ecologische robuustheid.



Figuur 7: Schema van de voortplantingscyclus van de Cladophales, de familie waar borstelwier toe behoort.

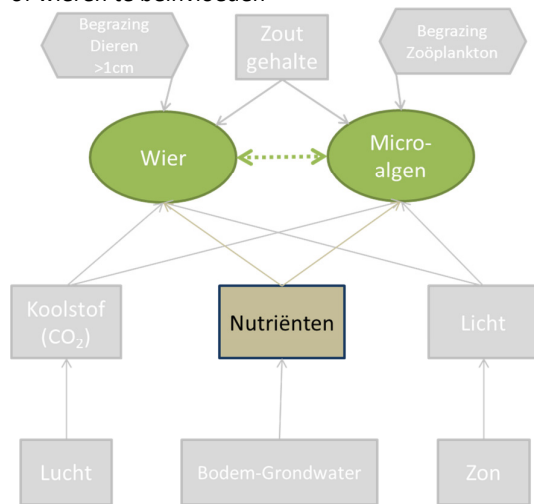
Er zijn twee types volgroeide individuen, haploïde en diploïde, die allebei autonoom kunnen bestaan en elkaar afwisselen per generatie. Kolonies bestaan meestal uit een mix van de twee types.

De orde waar borstelwier toe behoort gebruikt veel verschillende soorten voortplanting (zie figuur 5, pagina 6) elk met voordelen en nadelen. Het voordeel van de isomorfe variant die borstelwier gebruikt is dat zij een goede balans biedt tussen de snelle vegetatieve groei en verspreiding die ongeslachtelijke voortplanting biedt met variatie in genen die geboden wordt door alle vormen van seksuele voortplanting. Het feit dat de haploïde en diploïde groeivormen gelijk zijn geeft een voordeel tegenover asymmetrische gameten bij stabiele seizoenen, grote mortaliteit en hoge groei onder volgroeide thalli (Bessho en Iwasa, 2010).

3. NUTRIËNTEN EXPERIMENT

3.1 INLEIDING EN ACHTERGRONDEN

Minerale nutriënten zijn belangrijk voor de groei van alle levende organismen. In de vijver van de KMWP zijn twee mogelijke bronnen voor nutriënten: de bodem en het opgepompte grondwater. Het verband tussen de groei van microalgen en wieren en de concentraties N en P is onderzocht omdat deze aan de basis staan van de groei van zowel microalgen en wieren. Mochten de microalgen en de wieren anders reageren op de verhoudingen of concentraties, dan kan dit een belangrijk beheersinstrument zijn om de groei van microalgen of wieren te beïnvloeden



Figuur 8: Schema voor het onderzoek naar nutriënten. In dit onderzoek is de invloed van stikstof en fosfaat in het water onderzocht. Wier én microalgen zijn tegelijkertijd onderzocht.

Een belangrijk kenmerk van een ecosysteem is de trofische graad van een systeem; de hoeveelheid stikstof en fosfaat. De meest voorkomende klassen zijn oligotroof (weinig nutriënten) en eutroof (veel nutriënten). Deze hoeveelheden hebben een duidelijk effect op het lokale ecosysteem. In eutrofe omstandigheden is de hoeveelheid biomassa vaak hoger zijn en vaak is dit in de vorm van microalgen.

Naast absolute hoeveelheden is ook de verhouding tussen stikstof en fosfaat belangrijk. De theoretische optimale atomaire N:P verhouding is 16:1, de Redfield ratio. Deze waarde is genoemd naar de eerste beschrijver hiervan, Alfred Redfield. Deze waarde wordt gezien bij het plankton en in het water van de open oceaan (Redfield, 1934) maar veel soorten in andere ecosystemen hebben een iets andere verhouding.

Als de hoeveelheden beschikbaar stikstof en fosfaat in een systeem niet overeenkomen met de potentiële productie en potentiële biomassa van het systeem zal het systeem gelimiteerd worden. In de optimale situatie is deze limitatie bij zowel stikstof als fosfaat. In veel systemen is dit echter niet het geval, stikstof of fosfaat zal als eerste opraken en zo de limiterende factor in het systeem zijn. Welk nutriënt (als er al limitatie is) de limiterende factor is hangt af van de verhouding tussen stikstof en fosfaat in het systeem.

De te beantwoorden deelvragen:

1. Heeft de N/P verhouding in het water invloed op de competitie tussen microalgen en borstelwier?
2. Hebben de absolute concentraties DIN en fosfaat in het water invloed op de competitie tussen microalgen en borstelwier?

3.2 METHODE

3.2.1 OPZET

Van zes ondoorzichtige plastic bassins van 300 liter is in drie bassins Oosterscheldewater (gefilterd door een 5 µm filter om zoöplankton te verwijderen) gedaan en in drie bassins grondwater van het SEALab (zie figuur 9). Er is gekozen voor Oosterscheldewater en zout grondwater opgepompt bij het SEALab omdat de Oosterscheldewater oligotroof is en het grondwater eutroof. Vóór het nutriënten experiment is een inschatting gemaakt van de concentraties en aan de hand van het gemiddelde van Waterbase.nl (Monsterpunt Wissekerke, gemiddelde over 2010) en de in 2009 uitgevoerde analyse van de grondwaterbron in het SEALab. Aan de hand van deze inschatting is toen eenmalig een berekende hoeveelheid Natriumnitraat of Natriumdihydrogenfosfaat toegevoegd om de N:P ratio op 1:64, 1:16 en 1:2 te krijgen. Bij latere metingen is gebleken dat de geschatte beginconcentraties niet klopten. De uiteindelijke, werkelijke beginconcentraties en beginverhouding in het water staat in tabel 1. De aanduiding van de “±” bakken is omdat de samenstelling hier op ongeveer de Redfield ratio (1:16) uit had moeten komen.

Tabel 1: de originele concentraties DIN en fosfaat (kolom 2 en 3 van links), wat en hoeveel hieraan is toegevoegd (kolom 4 en 5) en wat de uiteindelijke concentraties en verhoudingen waren tijdens het begin van het experiment (rechter 3 kolommen). De namen van de bakken geven aan of er Oosterscheldewater of grondwater van het SEALab is gebruikt en of er grote hoeveelheden stikstof of fosfaat zijn toegevoegd.

	DIN Concentratie (NO ₃ +NH ₄) als mg N/l	P-totaal concentratie (mg/l)	N of PO ₄ toegevoegd	Hoeveel N of PO ₄ toegevoegd (mg/L)	Uiteindelijke concentratie N (mg/l)	Uiteindelijke concentratie PO ₄ (mg/l)	Atomaire N/P verhouding
Oosterschelde water +N	0,03	0,09	N	1,95	1,98	0,09	47,91
Oosterschelde water ±	0,03	0,09	PO ₄	0,05	0,03	0,14	0,47
Oosterschelde water +P	0,03	0,09	PO ₄	0,51	0,03	0,52	0,13
Grondwater +N	1,92	0,33	N	2,80	4,71	0,33	31,67
Grondwater ±	1,92	0,33	PO ₄	0,79	1,92	1,12	3,78
Grondwater +P	1,92	0,33	PO ₄	9,83	1,92	10,15	0,42

De microalgen (een kweek van *Phaeodactylum tricornutum*) zijn geënt met een concentratie van $3,0 \cdot 10^4$ per ml. Het wier is geënt met een enkele kluiten van ongeveer 50 gram (natgewicht) per bassin.

3.2.2 MONITORING

De groei van de microalgen en wieren is gedurende twee weken gevolgd met drie tellingen per week voor de microalgen en twee wegingen per week van het wier. De microalgen zijn geteld door middel van een Bürkner-Turk telkamer en het natgewicht van het wier is bepaald volgens de methode beschreven in bijlage 1.

Ook de stikstof (in de vormen van ammonium en nitraat) en fosfaatconcentraties zijn in deze twee weken gevolgd met metingen om de dag. De fosfaat- en ammoniumconcentraties zijn gemeten door middel van een Hachkit (methodes 8038 voor ammonia en 8084 voor fosfaat) en de nitraatconcentraties met de Perkin-Elmer Lambda 40 spectrofotometer (methode in bijlage 3). Alle chemische bepalingen zijn uitgevoerd in duplo.

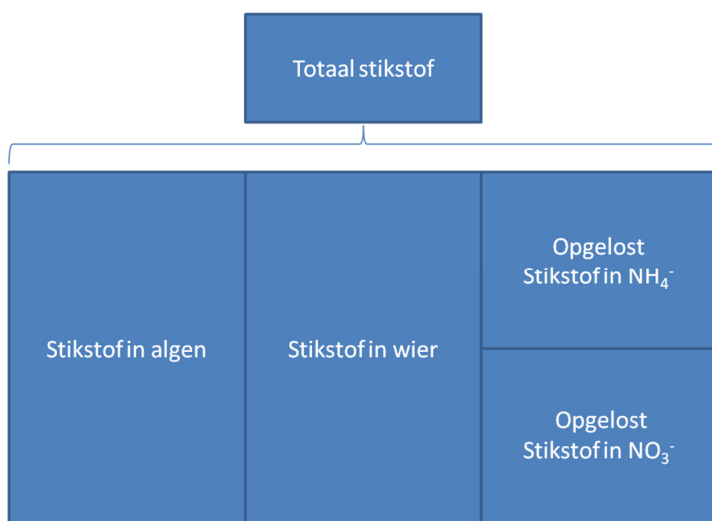


Figuur 9: foto van de gebruikte onderzoeksopzet van het nutriëntenexperiment: zes open, beluchte bakken.

3.2.3 BEREKENINGEN

Als maatstaf voor groei is de specifieke groei gebruikt, berekend met de formule $\frac{\ln\left(\frac{\text{biomassa op } t_2}{\text{biomassa op } t_1}\right)}{t_2-t_1}$. Dit is berekend voor ieder interval tussen twee meetmomenten.

Om de totale hoeveelheid stikstof of fosfaat in de bassins te berekenen is de volgende methode gebruikt.



Figuur 10: schematische weergave van de berekening voor de totale hoeveelheid stikstof in een bassin uit de verschillende componenten..

Het wier is gemeten als natgewicht, een voor-experiment in triplo heeft aangetoond dat het wier 14% droge massa heeft. Voor de berekening van de stikstof- en fosforgehaltes van drooggewicht is een atomaire C:H:O:N:P ratio van 106:263:110:16:1 in het wier gebruikt, rekening houdend met de massa's van die elementen is dit 1272:263:1760:224:31, totaal 3550 gram/mol

De massa N in het wier is dan $(droge\ massa\ wier) * \frac{224}{3550}$ of voor fosfor $(droge\ massa\ wier) * \frac{31}{3550}$

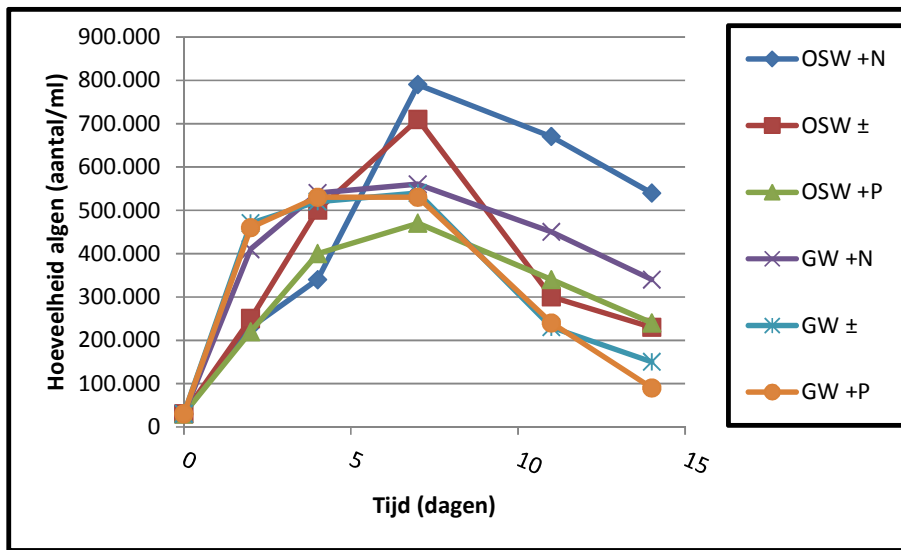
De microalgen zijn geteld. De massa van een gemiddelde droge *Pheodactylum tricornuttum* is 51,14 pg (Kamermaans et al. 2009), de berekening voor de massa van de microalgen in 300 liter water is: (aantal microalgen per ml)* 51,14 * 10⁻¹² * 300000

Vervolgens is de massa van de N:P verhouding in de algen te berekenen met een andere formule. Diatomeeën bestaan voor een substantieel deel uit silicaat en dit moet meegenomen worden in de berekening. De atomaire C:Si:H:O:N:P ratio van *Pheodactylum* is 106:15:263:110:16:1 in de alg (Brzezinski, 1985), rekening houdend met de massa's van die elementen wordt dat 1272:420:263:1760:224:31 dus totaal 3970. Voor de massa van fosfor in de algen is de formule: $(droge\ massa\ wier) * \frac{31}{3970}$ en voor stikstof

$(droge\ massa\ wier) * \frac{224}{3970}$

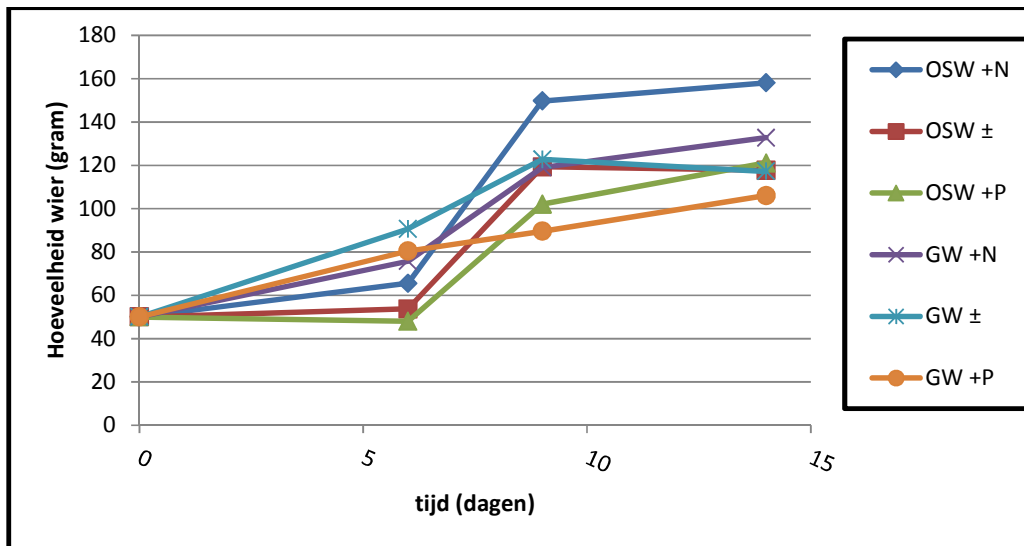
Om totaal stikstof per bassin te berekenen is de formule (N in wier in g)+(N in microalgen in g)+(NO₃⁻-N in mg/l*300+NH₄⁺-N in mg/l*300) gebruikt. Voor fosfor was dit (P in wier in g)+(P in microalgen in g)+(PO₄³⁻-P in mg/l*300)

3.3 RESULTATEN



Figuur 11: de hoeveelheid microalgen in de zes bassins per milliliter gedurende de twee weken van het nutriëntenonderzoek. OSW is Oosterschelde water, GW is grondwater, +N is toegevoegd stikstof, +P is toegevoegd fosfaat en de bassins gemarkeerd met ± is waar geprobeerd is om een gebalanceerde N/P verhouding te creëren.

De groei van de microalgen in nagenoeg alle bassins (zie figuur 11) is typisch voor een microalgencultuur: na exponentiële groei volgt een fase van stabiliteit waarna een crashfase in de cultuur optreedt en een meerderheid van de microalgen afsterven. Dit patroon is ook te zien in de berekende specifieke groei van de microalgen. (zie bijlage 5)



Figuur 12: Hoeveelheid wier in de zes bassins gedurende de twee weken van het nutriëntenonderzoek. OSW is Oosterschelde water, GW is grondwater, +N is toegevoegd stikstof, +P is toegevoegd fosfaat en de bassins gemarkeerd met ± is waar geprobeerd is om een gebalanceerde N/P verhouding te creëren.

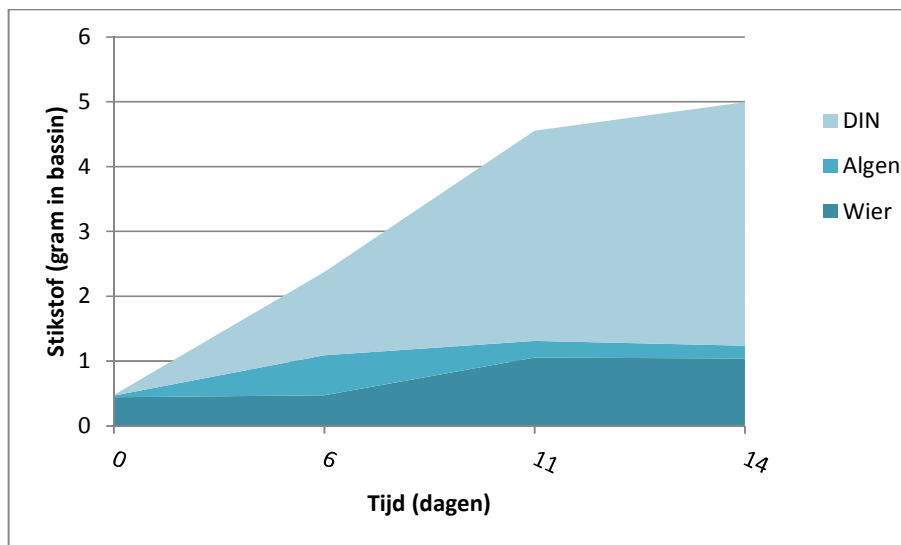
Het patroon in de wiergroei (zie figuur 12) was veel stabielier dan bij de algen hoewel er grote verschillen tussen de bassins zijn. Het wier in het Oosterschelde water is in het eerste deel van het experiment nauwelijks gegroeid maar later juist harder zodat zij gemiddeld een iets hogere groeisnelheid bereiken als het gemiddelde in grondwater. (0,07 tegen 0,05 g/g/dag)

In beide stikstof verrijkte bassins is bij zowel het wier als de microalgen gemeten dat zij harder groeiden dan de bassins waaraan fosfaat is toegevoegd, zie tabel 2.

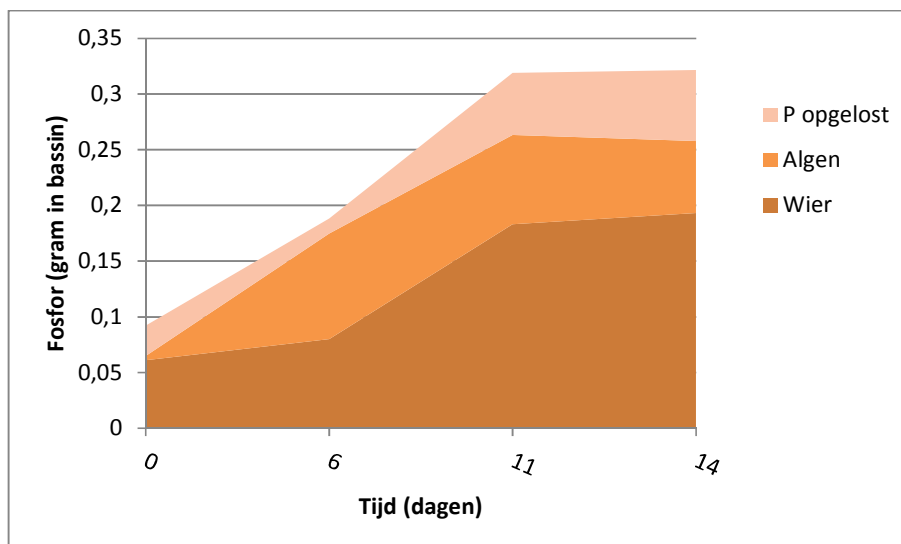
Tabel 2: De gemiddelde specifieke groei van microalgen en wieren in de zes bakken gedurende het experiment. Deze getallen zijn berekend door het wiskundig gemiddelde te nemen van de specifieke groei tijdens iedere meetinterval. Alle getallen zijn in gram ww/gram ww/dag en n=1.

	OSW +N	OSW ±	OSW +P	GW +N	GW ±	GW +P
Algen	2,66	2,64	2,58	2,54	2,41	1,78
Wier	0,07	0,06	0,05	0,05	0,05	0,03

Met de gemeten concentraties stikstof en fosfaat in het water en de berekende hoeveelheden in de algen en het wier zijn de totale hoeveelheden stikstof en fosfaat per bassin berekend. Wat hier opvalt is dat de totale hoeveelheid stikstof en fosfor in nagenoeg alle bassins oploopt met tot een factor tien tijdens de twee weken die het experiment duurde, geïllustreerd in figuur 12 en 13 met een voorbeeld van de totale hoeveelheid stikstof en fosfor in één bak.

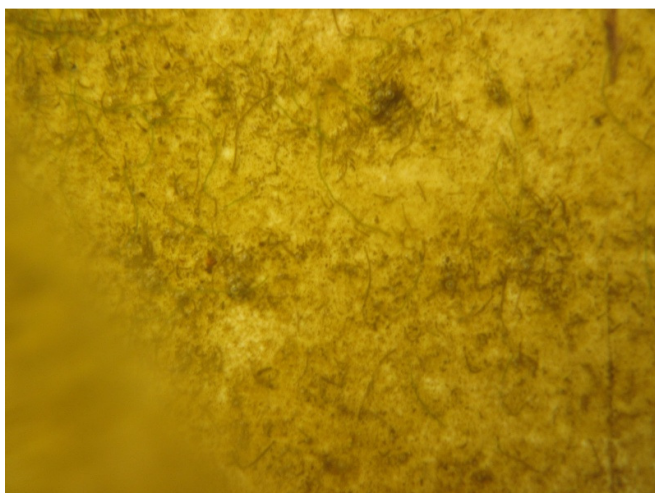


Figuur 13: Totale hoeveelheid stikstof in het Oosterscheldewater bassin "OSW±" waarin De totale hoeveelheid is uitgesplitst in de drie onderdelen waar het uit bestaat: opgelost stikstof (DIN) en het in microalgen en wier vastgelegd stikstof.



Figuur 14: Totale hoeveelheid fosfor in het Oosterscheldewater bassin 'OSW±' De totale hoeveelheid is uitgesplitst in de drie onderdelen waar het uit bestaat: opgelost fosfaat en het in microalgen en wier vastgelegd fosfaat.

En ander onverwachte maar relevante waarneming was de groei van biofilm op de wanden van de bassins en het wier zelf in alle bassins met grondwater, geïllustreerd in figuur 14. In de Oosterscheldewaterbassins was deze groei veel minder duidelijk. Aan het biofilm zijn verder geen metingen gedaan en het is ook niet meegenomen in de massabalansen. Echter allocatie van N of P in de biofilm zou de totale hoeveelheid N en P in de bassins alleen maar verhogen.



Figuur 15: Foto van de biofilm op de bodem van bassin "GW ±". Het water is erg helder maar de laag op de bodem is zo dik dat de originele kleur van het bassin niet te zien is.

3.4 DISCUSSIE

De resultaten van dit onderzoek zijn deels te vertalen naar de praktijksituatie omdat een groot gedeelte van de omstandigheden gelijk is aan die in de microalgenvijver: natuurlijk zonlicht, een open bassin en de aanwezigheid van zowel microalgen als wieren. Deze vertaalbaarheid heeft wel een nadeel gehad: een aantal factoren zijn niet beheerst, zoals het weer en de hoeveelheid licht. Dit kan ervoor gezorgd hebben dat het resultaat anders uitvalt bij een herhaal-experiment door invloeden die tot nu toe niet meegerekend zijn

De groei van de combinatie *Pheodactylum-Chaetomorpha* lijkt nog nooit onderzocht te zijn maar er is wel een aantal onderzoeken gedaan naar de groei van *Phaeodactylum*. Fabregas et al. rapporteren in 1996 dat de optimale stikstofconcentratie redelijk breed is en, afhankelijk van de gekozen meetmethode van groei, tussen de 4 en 16 mMol/l ligt, oftewel 56 tot 224 mg/l. Dit geeft aan dat de microalgen het beste zouden moeten groeien in de eutrofe omstandigheden zolang er geen wier interfereert. In het onderzoek is van de verschillende nutriëntenconcentraties geen significante invloed van gevonden, waarschijnlijk omdat de concentraties nutriënten veel lager waren dan die gemeten in het onderzoek van Fabregas. De hoogste concentraties microalgen én de hoogste gemiddelde groeisnelheden zijn zelfs gevonden in de relatief nutriënt-arme bassins met Oosterscheldewater.

De veranderende totaalhoeveelheden stikstof en fosfaat zijn niet te verklaren. Alle componenten waarin N en P voorkomen zijn direct of indirect bepaald. De systematische toename van N en P kan niet worden verklaard uit bijvoorbeeld een verkeerde schatting van het gehalte N of P in wier of algen. Ook als er rekening wordt gehouden met een meetafwijking van 50%. Nitriet zou een verklaring kunnen zijn voor een deel van de toename maar om een gedegen verklaring te zijn zou hier een toxische concentratie van aanwezig moeten zijn. In ieder bassin zijn er nog te grote verschillen in de hoogste en laagste datapunten van een bak. Voor stikstof is het mogelijk dat er door middel van stikstoffixatie de totale hoeveelheid stikstof in het systeem iets hoger is geworden, maar de gevonden verschillen zijn zo groot (een factor 10) dat dit geen goede verklaring is. Voor de verschillen in de totale hoeveelheid fosfaat is in het geheel geen verklaring.

Het neerslaan en biofilm is negatief voor de microalgen het wier werkt als een sedimentfilter. Het kan zijn dat deze biofilm-vorming de nutriënten uit het water heeft verwijderd die normaal gesproken door de microalgen gebruikt zouden worden.

Een aanbeveling voor vervolgonderzoeken kan zijn om beter te letten op de beginhoeveelheden microalgen en wier. In dit onderzoek zijn de beginbiomassa's erg ongelijk geweest (0,49 gram aan microalgen, 50 gram wier) dit kan een invloed op de uitkomsten van het experiment gehad hebben.

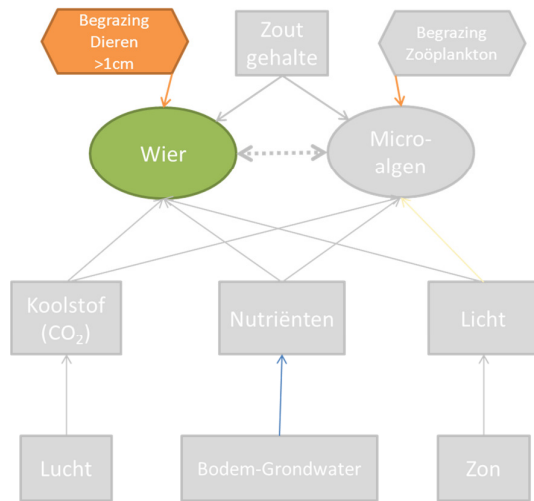
3.5 CONCLUSIE

De resultaten van dit experiment wijzen erop dat de nutriëntenconcentratie niet duidelijk uit maakt voor de groei van de wieren. Er is geen duidelijk patroon waarneembaar in zowel de groei van de microalgen als de groei van het wier hoewel bij alle bakken goede groei is waargenomen. De microalgen hebben een grotere gemiddelde specifieke groei maar de totale toename in biomassa (in gram) was groter bij het borstelwier.

1. Heeft de N/P verhouding in het water invloed op de competitie tussen microalgen en borstelwier?
Er zijn geen aanwijzingen gevonden dat de competitie tussen algen en wieren beïnvloed wordt door de verhouding tussen N en P,
2. Hebben de absolute concentraties DIN en fosfaat in het water invloed op de competitie tussen microalgen en borstelwier?
Er zijn geen aanwijzingen gevonden dat absolute concentraties stikstof of fosfaat de competitie tussen microalgen en wieren beïnvloeden. Wel is geconstateerd dat wieren een betere groei vertonen bij verhoogde concentraties stikstof.

4. ZAGER-WIER BEGRAZINGS EXPERIMENT

4.1 INLEIDING EN ACHTERGRONDEN



Figuur 16: Het schema voor de in het zager onderzoek onderzochte invloeden op wier.

Veel zachte wiersoorten over de hele wereld worden begraasd (Valiela et al 1997). Tot de soorten die wier als hoofdbestanddeel van hun dieet hebben vallen vissen, slakken, kreeftachtigen, vogels en ook zoogdieren inclusief de mens. De verdediging van wieren tegen herbivoren kan bestaan uit taatheid, chemische afweerstoffen en ook een lage voedingswaarde speelt mee in de afkeur van grazers. *Chaetomorpha linum* wordt niet veel begraasd door de taaie structuur. Een van de soorten waarvan is waargenomen dat zij *C. linum* eten is de zager, *Nereis virens*. In een voorexperiment (zie bijlage 2) is al gezien dat de zagers het wier versnipperden en meesleepten naar hun holen maar het leek er ook op dat zij het wier niet goed konden verteren. Doel van het onderzoek was dus om de invloed van graas door zagers op het wier te kwantificeren.

De te beantwoorden deelvragen:

1. Hoeveel invloed heeft de begrazing door zagers op de groei van *C. linum*?
2. Zijn zagers bruikbaar als top-down beheersmiddel van borstelwier?

4.2 METHODE

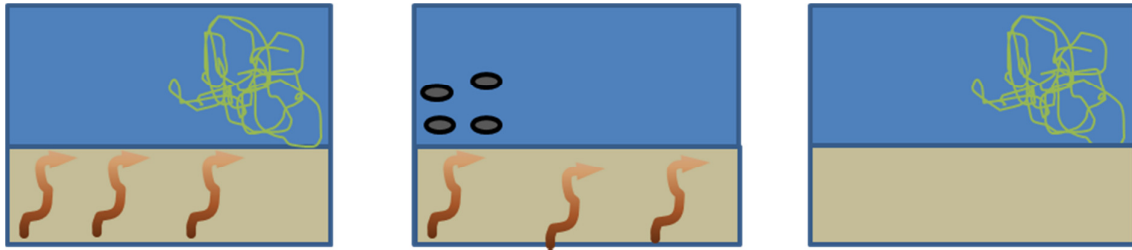
4.2.1 OPZET

In aquaria van 60x30x40cm is een laag van 10 cm zand aangebracht als substraat voor de zagers. De aquaria zijn verder gevuld met grondwater van het SEALab. Er zijn drie verschillende aquaria ingericht: een met zagers, een met zagers gevoerd met commercieel zagervoer en een derde met alleen wier. Ieder bassin is belucht. De twee aquaria die of wier of zagers bevatten zijn ingericht om als blanco te fungeren voor zowel het wier als de zagers.

De zagers zijn afkomstig uit een hengelsportwinkel. De wormen hebben 24 uur doorgebracht in een beluchte emmer om te acclimatiseren aan het grondwater en temperatuur terwijl de bassins tot rust kwamen. Daarna zijn 27 wormen per aquarium geplaatst om tot een in de natuur voorkomende dichtheid van 150 wormen/m² te komen (Zipperle en Reise, 2005).

Gedurende twee weken is er per dag 0,6% van natte zager biomassa aan droog voer gevoerd (naar: J.Schlamlich, 2011) In het geval van het wier is uitgegaan van een drooggewicht van 14% van versgewicht, afgeleid uit voorexperimenten. Tijdens het tweede experiment is 1,1% aan droog voer van natgewicht van de zagers per dag gevoerd om te zien of de zagers ook een maximum voedselopname van *C. linum* hadden.

Het experiment is binnen uitgevoerd met TL verlichting bij een 16/8 licht/donker regime.



Figuur 17: Schematische weerave van de zagerexperiment. Van links naar rechts: zagers met wier, zagers met voer en alleen wier.

4.2.2 MONITORING

Tijdens de twee weken die elk experiment duurde is bijgehouden hoeveel wier of voer er gevoerd is tijdens het experiment en er is beschreven indien er dode wormen gezien werden op de voermomenten. De zagers zijn geteld en gewogen voor en na het experiment. Ook het wier en de losse detritus is na het experiment terug gewogen volgens de methode in bijlage 1 om eventuele groei en het overgebleven detritus (versnipperd maar niet verteerd wier) te bepalen.

4.2.3 BEREKENINGEN

Om de wierconsumptie per zager per dag te berekenen is de volgende formule gebruikt:

$$\frac{(W_c - D_c) - (W_z - D_z)}{Z} / t = C$$

Met:

C = Wierconsumptie in g/zager/dag

W=Wier gevoerd, in controle of met zagers in gram

D = Organisch detritus of wier teruggevonden aan het eind van het experiment in gram

Z = Aantal zagers aan het begin van het experiment

t = Tijd in dagen

4.3 RESULTATEN

De zagers zijn met gelijke aantallen en nagenoeg gelijk gewicht begonnen. Gedurende het experiment is in het aquarium met wier gevoerd mortaliteit opgetreden, twee zagers zijn dood gegaan.

Tabel 3: Het gewicht van de zagers voor en na de eerste experiment en hoeveel zij gevoerd hebben gekregen.

	begin totaal gewicht zagers (g natgewicht)	eind totaal gewicht zagers (g natgewicht) in g	Gevoerd droog (g):
Zagers gevoerd met wier	94,42 (n=27)	83,24 (n=25)	9,21
Zagers gevoerd met zagervoer	94,63 (n=27)	94,28 (n=27)	8,06

Tijdens de eerste zagerexperiment is bij het controle-experiment (wier zonder zagers) aan het eind van het experiment 21,58 gram wier verdwenen. In het aquarium mét zagers was 49,18 gram wier verdwenen, een verschil van 27,60 gram, de zagers hebben dus 0,07 g/zager/dag verwijderd. In vergelijking met het aquarium zonder zagers is de hoeveelheid verwijderd wier ruim verdubbeld.

Tabel 4: Het gewicht van de zagers voor en na het tweede experiment en hoeveel zij gevoerd hebben gekregen. n=2 voor alle aquaria.

	begin totaal gewicht zagers (nat)	eind totaal gewicht zagers (nat) in g	Gevoerd droog (g):
Zagers gevoerd met wier	96,02 (n=2*27)	95,11 (n=2*27)	16,14
Zagers gevoerd met zagervoer	87,15 (n=2*27)	97,19 (n=2*27)	12,19

In het tweede experiment is significant meer gevoerd dan in het eerste experiment, zoals te zien in tabel 4, daarnaast is er ook veel minder wier verdwenen in het controle experiment, namelijk 6,18 (sd=5,18) gram. In het aquarium met zagers en wier is ook minder wier verdwenen, 30,98 (sd=1,73) gram, waardoor de gemiddelde wierconsumptie nogmaals uitkwam op 0,07 g/zager/dag (sd=0,02). In verhoudingen is er wel een verschil met het eerste experiment, in het aquarium mét zagers is vijf maal zoveel wier verwijderd als in het blanco aquarium.

4.4 DISCUSSIE

Het is mogelijk dat ondanks dat de zagers twee weken kunnen overleven alleen borstelwier geen volledig dieet voor hen is, omdat er bijvoorbeeld essentiële aminozuren ontbreken. Ook is het mogelijk dat de vertering van het wier zo onvolledig is dat de calorische waarde van het wier niet hoog genoeg is om een permanente voedingsbron van de zagers te vormen.

Daarnaast is dit experiment uitgevoerd in een situatie waarin de zagers nagenoeg geen andere keuze hebben dan het eten van het wier. In een natuurlijkere situatie zullen de dieren eerder de zachtere wiersoorten of dieren als voedselbronnen gebruiken hoewel Fidalgo e Costa et al. in 2006 hebben gevonden dat in het darmsysteem van *Nereis diversicolor* ruim 10% van de darminhoud uit plantdelen bestond. Als zand en slijm niet worden meegerekend bestond ongeveer de helft van de voedselpartikels uit plantaardig materiaal. Het kan dus zijn dat in een werkelijke toepassing de hoeveelheid gegeten wier tot de helft lager uit kan vallen om dat de zagers hun dieet aanvullen met andere voedselbronnen die voorkomen in microalgenvijvers.

Desalniettemin kunnen de resultaten wel gebruikt worden als uitgangspunt bij het beheer omdat het wel duidelijk was dat de zagers een impact op het wier hebben.

4.5 CONCLUSIE

1. Hoeveel invloed heeft de begrazing door zagers op de groei van *C. linum*?

Zagers verwijderen *Chaetomorpha linum* in een korte termijn aquariumschaal opzet met 0,07 gram wier per zager per dag. Over langere termijn is nog niets bekend maar het lijkt er wel op dat wieren en planten een belangrijk deel van het dieet van het geslacht *Nereis* zijn.

2. Zijn zagers bruikbaar als top-down beheermiddel van borstelwier?

De hoeveelheid verwijderd wier is niet veel (minder als een tiende gram per zager per dag) maar zou een goed te gebruiken methode zijn om de groei van het wier te beperken zodat de balans van een systeem weer doorslaat naar het microalgen-gedomineerde systeem. Hier dient een differentiatie gemaakt te worden tussen beheer en bestrijding. Het is waarschijnlijk niet mogelijk om rendabel zagers in te zetten om een dik pakket *Chaetomorpha* te verwijderen, hiervoor eten zij niet genoeg per individu. De aanwezigheid van een populatie Zagers in de vijver zou wel kunnen helpen met het beheersen van *Chaetomorpha* en andere wieren door het geven van graasdruk. Als beheersmaatregel zijn zij dus waarschijnlijk beter bruikbaar.

Hoewel deze eerste experimenten positief uitvielen is er wel verder onderzoek noodzakelijk. Er moet nog onderzocht worden: het effect van de leeftijd van de zagers, de biomassadichtheden aan zagers die nodig en mogelijk zijn, de voedselconversie (verteerbaarheid) en eventuele effecten van het wier op de voortplanting van de wormen. Soms komen toxische stoffen in wieren vrij bij de ingestie van het voedsel en deze kunnen de levenscyclus verstoren (J. Rijstenbil, pers. comm.). Over geen van deze dingen is veel bekend en extra onderzoek zal dus nodig zijn voordat de zagers ingezet kunnen worden

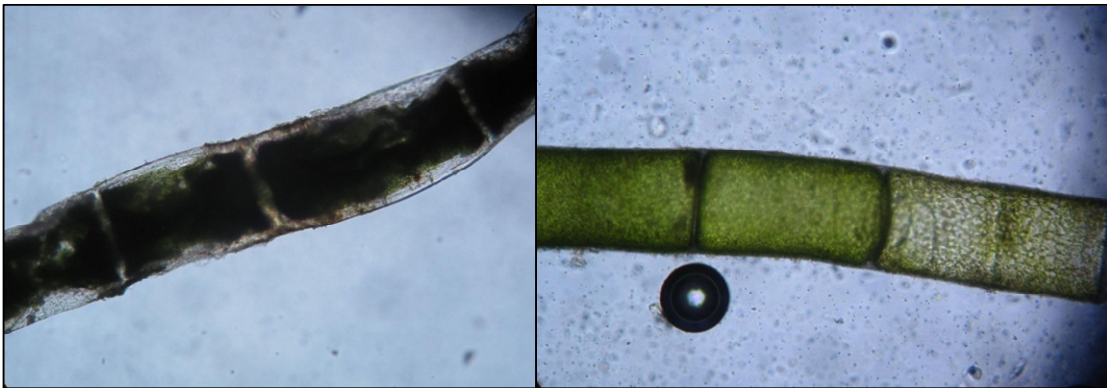
5. FYSIOLOGISCHE CONDITIE EXPERIMENT

5.1 INLEIDING EN ACHTERGRONDEN

Het is bekend van wieren zoals *Ulva* dat zij een punt in hun fysieke structuur hebben waar vanaf ze groeien, het groeipunt. Door onderzoek te doen naar waar dit groeipunt ligt en of er verschillen zijn tussen verschillende verschijningsvormen van het wier kan beter begrepen worden hoe beheersmaatregelen invloed hebben op de groei van het wier.

Hoewel er over *Chaetomorpha* in de literatuur niets is gevonden over groeipunten heeft borstelwier een aantal duidelijk van elkaar te onderscheiden groeistadia. Het grootste en duidelijkste verschil is dat tussen oud en jong wier. Het verschil tussen deze twee stadia is duidelijk te zien onder de microscoop (zoals te zien is in figuur 18) maar ook met het blote oog is het verschil zichtbaar. De jonge plukken zijn helder groen waar de oudere plukken wier veel donkerder zijn (zie figuur 19). Uitgangspunt is dat de felgroene cellen, rechts in figuur 18, de groeipunten zijn van het wier, de plaatsen waar de hoogste productie plaatsvindt. Onder de microscoop zijn in de felgroene cellen meer chloroplasten zichtbaar.

Daarnaast is onderzocht of versnippering een verschil uit zou maken in de groeisnelheid van wier door de isolatie van actieve cellen. De hypothese hier was dat de versnippering de "groeipunten" in het wier isoleert en activeert wat een hogere groei oplevert.



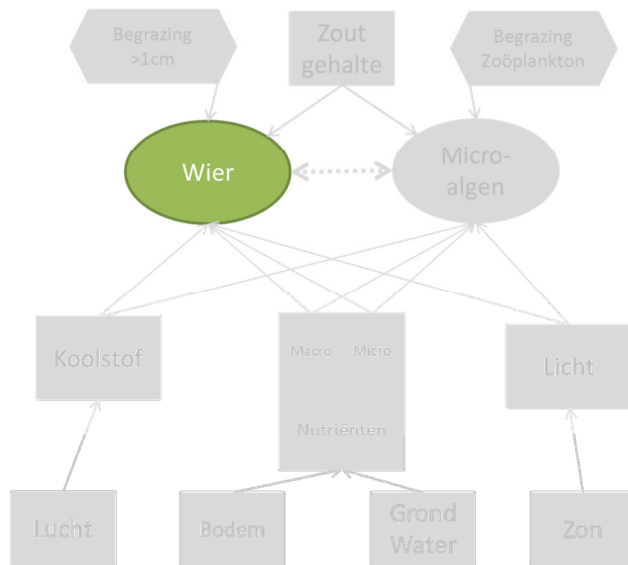
Figuur 18: foto's van oud (links) en jong (rechts) *C.linum* onder een lichtmicroscoop bij 100 maal vergroting



Figuur 19: foto van de met het blote oog ook zichtbare verschillen tussen de groeivormen. De drie linker plukken zijn helder groen en voelen soepel aan, de drie plukken aan de rechterkant zijn veel donkerder groen en/of voelen erg bros aan.

De te beantwoorden deelvragen:

- Is er verschil in groei van *C. linum* na fysieke stress (mechanische schade), dehydratie stress of bij verschillende cel leeftijden (oud of jong)
- is de fysieke conditie van het wier bruikbaar als beheersinstrument?



Figuur 20: Schema voor het onderzoek naar de fysiologische conditie. In dit experiment is alleen naar de interne processen van het wier gekeken.

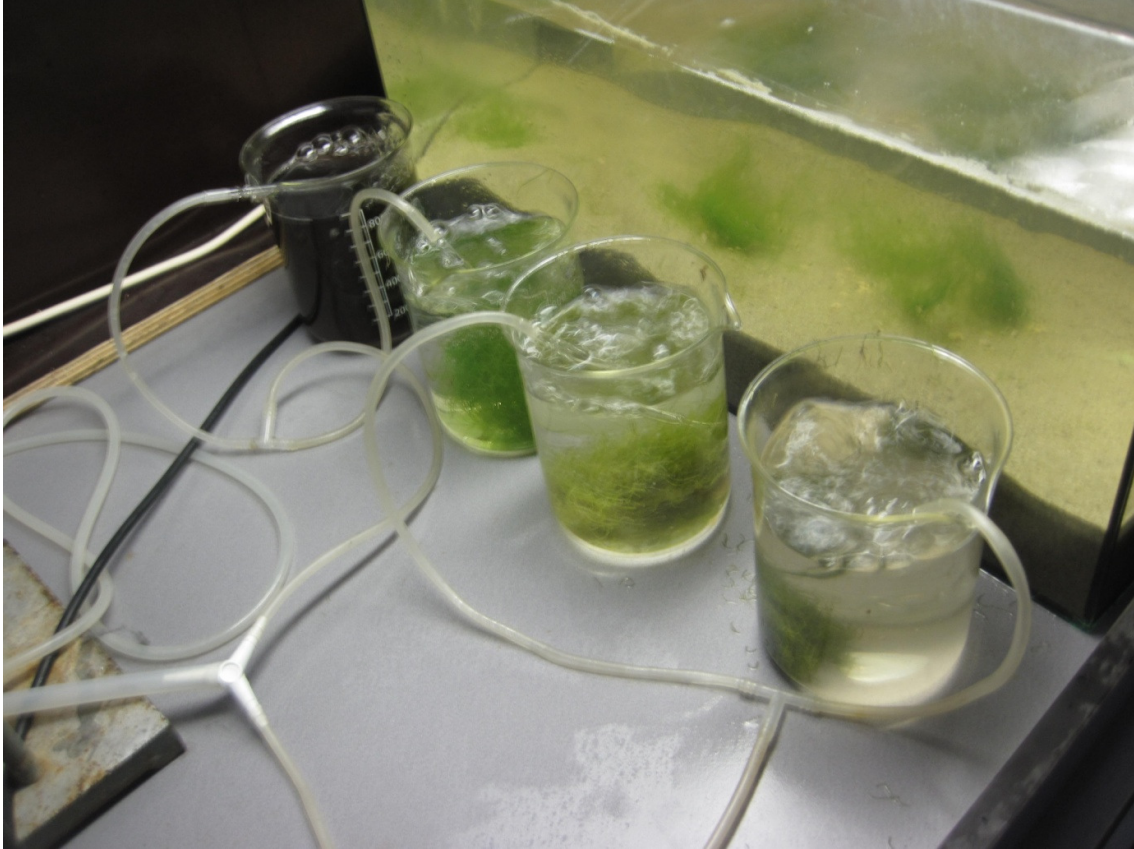
5.2 METHODE

Het experiment is twee maal uitgevoerd. Beide keren met dezelfde algemene opzet maar er waren kleine verschillen.

5.2.1 OPZET

Chaetomorpha linum uit het voorraadbassin is verdeeld over de drie groepen:

1. Jong wier: Ingedeeld op basis van kleur (felgroen) en textuur (zacht)
2. Oud wier: Ingedeeld op basis van kleur (donker groengeel) en textuur (broos, taai)
3. Versnipperd wier: Een pluk gemengd jong en oud wier dat in stukjes van ongeveer een halve centimeter breed is geknipt



Figuur 21: de opstelling voor het eerste experiment met vier bekgelzen met van rechts naar links: versnipperd, oud en jong wier. In de achtergrond staat een voorexperiment naar de uitdroging van het wier en een aquarium van het eerste zagerexperiment.

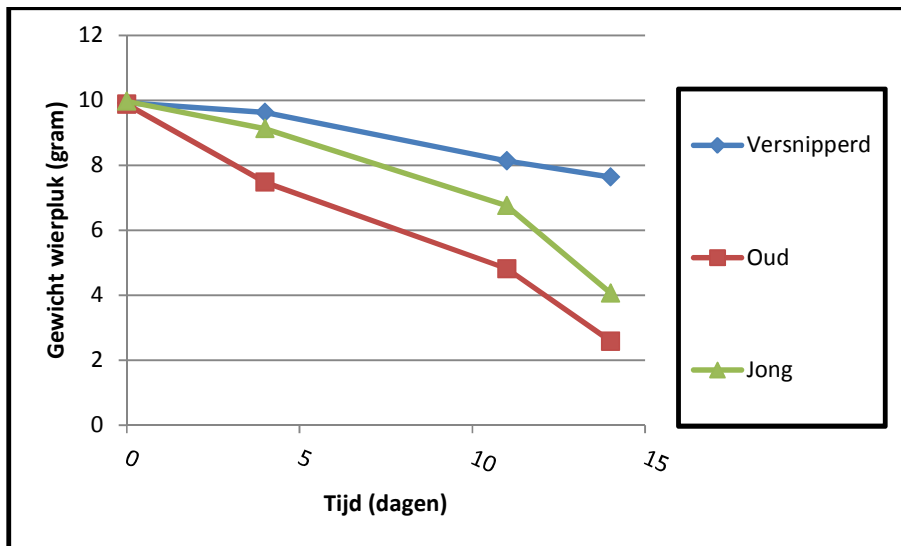
In bekgelzen van een liter gevuld met grondwater van het SEAlab is ongeveer 10 gram wier geplaatst, één beker per groeivorm. Er waren verder wel verschillen tussen de twee experimenten: Het eerste experiment is binnen uitgevoerd bij TL licht in een 16/8 licht/donker regime, de tweede bij zonlicht. Het eerste experiment duurde twee weken, het tweede had ook een geplande looptijd van twee weken maar moest door omstandigheden worden afgebroken na 10 dagen.

5.2.2 MONITORING

De biomassa van het wier is op gelijke intervallen drie maal gemeten door een wierweging zoals beschreven in bijlage 1, waarbij ook het water ververs is. Ook zijn er dagelijks foto's genomen om een beter inzicht te krijgen in bijvoorbeeld kleurverandering.

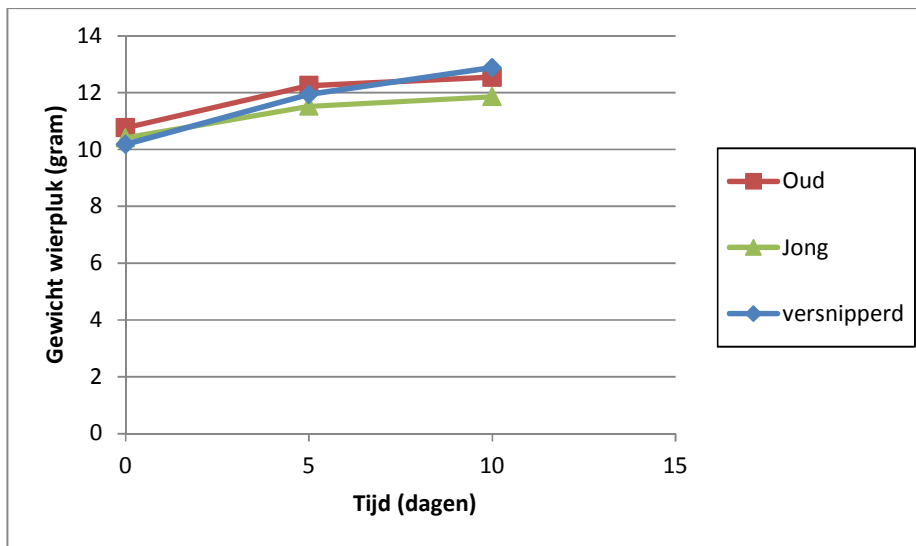
5.3 RESULTATEN

Tijdens het eerste experiment is een duidelijke afname gezien in alle groeivormen. De drie groeivormen zijn met 21 tot 67% afgenomen over twee weken.



Figuur 22: de groei van de hoeveelheid wier in de varianten versnipperd, oud, jong en gedroogd tijdens de twee weken van de eerste groeivormenexperiment. N=1 voor ieder datapunt.

In het tweede experiment is een heel ander patroon te zien dan in het eerste. Oud, jong en versnipperd wier zijn hier gegroeid tot nagenoeg gelijke hoeveelheden.



Figuur 23: Gewicht van het de drie groeivormen van het wier tijdens de tweede groeivormenexperiment. N=1 voor ieder datapunt.

De fotos die zijn genomen tijdens het onderzoek geven aan dat twee weken niet lang genoeg is om duidelijke veranderingen in kleur waar te nemen.

5.4 DISCUSSIE

De identificatie van de oud/jong groeivorm kan accurater met bijvoorbeeld microscopische identificatie. Andere experimenten (zoutgehalte en uitdroging, hoofdstuk 6 en 7) hebben grote verschillen tussen deze groeivormen laten zien waar het fysiologische conditie-experiment geen significante verschillen aantoonde. Het kan dus zijn dat er binnen de visueel duidelijk verschillende categorieën of stadia nog grote verschillen zijn.

In het eerste experiment is de biomassa afgenomen in alle groeivormen. De meest waarschijnlijke verklaring hiervoor is een gebrek aan licht, het eerste experiment is binnen uitgevoerd en de tweede buiten in het zonlicht.

Experiment 2 is niet volledig afgemaakt. Tussen dag 12 en 14 (24-26 juni 2011) was het zo uitzonderlijk heet in Vlissingen dat in de kas temperaturen van ca. 40 °C zijn bereikt. Een dag later was alle wier gestorven, te zien aan pigmentverlies in alle draden.

De hitte die het wier doodde lijkt wel een effectieve manier om wier te verwijderen. Verder onderzoek zou hier verder nodig zijn naar haalbaarheid en vertaalbaarheid van deze beheersmethode.

5.5 CONCLUSIE

Onderzoeksvragen:

1. Is er verschil in groei van *C. linum* na fysieke stress (mechanische schade) of bij verschillende cel leeftijden (oud of jong)?
 - Er lijkt geen groot verschil te zijn tussen jong, oud of versnipperd wier.
2. Is fysieke stress bruikbaar als beheersinstrument?
 - Nee, mechanische schade lijkt de groei van het wier niet te versnellen of vertragen. Daarnaast is er geen duidelijk verschil tussen oud of jong wier dus hierin valt ook niet te sturen.

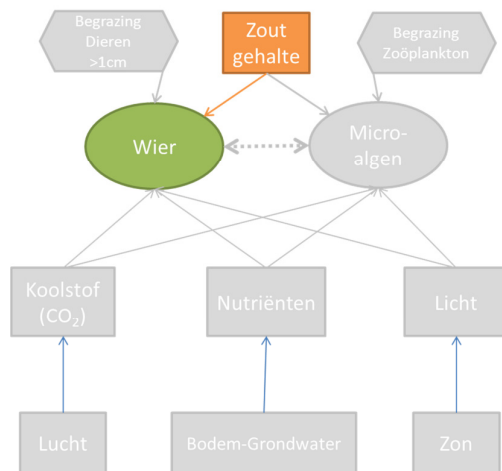
6. ZOUTGEHALTE EXPERIMENT

6.1 INLEIDING EN ACHTERGRONDEN

Als wier dat veel voorkomt in estuaria moet borstelwier aangepast zijn aan wisselende zoutgehaltes in zijn omgeving onder invloed van rivieren, de zee of verdamping. Het zoutgehalte van de omgeving kan de cellen dwingen tot osmotische regulatie. Waarden die te snel wisselen of te hoog of laag zijn om te compenseren door middel van regulatie kunnen de integriteit en productie van cellen ernstige schade opleveren.

Zoals eerder in de literatuur is gevonden (zie paragraaf 2.3.1) kan *C. linum* een brede range aan zoutgehaltes tolereren (van <0,5 g/l tot 75 g/l). Verschillende variëteiten van het wier kunnen echter verschillende toleranties hebben (Caputoa et al 2007). Omdat het onderzoek van Caputoa is uitgevoerd in Italië moet er rekening mee worden gehouden dat het lokale Zeeuwse borstelwier een andere variëteit kan zijn dan het Italiaanse en dat de zouttolerantie dus anders is.

De breedte van de zouttolerantie is belangrijk voor het beheer van de vijver omdat het zoutgehalte van de vijver beïnvloed kan worden door meer of minder water binnen te pompen tijdens regenbuien of droge perioden. Ook is de tolerantie van het zoutgehalte belangrijk voor de uitdroging. Als wier deels is uitgedroogd is het nog onduidelijk of bijvoorbeeld een regenbui een negatief effect heeft op de overleving en groei.



Figuur 24: het schema voor de onderzochte effecten in het onderzoek naar zoutgehaltes.

Deelvraag:

- Wat is de invloed van het zoutgehalte van de omgeving op de korte termijn zuurstofproductie van *C. linum*?

6.2 METHODE

Voor dit experiment is een methode ontwikkeld gebaseerd op de gebruikte methode van Menendez et al, 2005.

6.2.1 OPZET

Een verdunningsreeks van het SEALab grondwater en kraanwater is aangemaakt. De reeks bestond uit zeven zoutgehalten: 0, 5, 10, 15, 20, 25 en 30 g/l. Van ieder zoutgehalte is een liter water aangemaakt.



Figuur 25: Schematische weergave van de verschillende behandelingen in de methode van het zoutgehalte experiment.

In de zeven verschillende zoutgehalten is een pluk wier voor 24 uur (stap 1). Na deze 24 uur is de helft van iedere pluk wier teruggeplaatst in aparte aquaria met grondwater met een zoutgehalte van 30 g/l waar zij gedurende een uur weer terug naar het hogere zoutgehalte konden acclimatiseren (stap 2). Deze terugplaatsing is gedaan om het scenario te simuleren waarin de blootstelling aan lage zoutgehalten slechts kort duurt. Alle plukjes wier zijn in flessen geplaatst waarvan het zuurstofgehalte bepaald was (stap 3). De flessen zijn afgesloten en zijn gedurende twee uur in de zon geplaatst. Aan het eind van deze periode is het zuurstofgehalte nogmaals gemeten (stap 4). De plukjes wier zijn 48 uur gedroogd bij 80 °C en op basis van dit eindgewicht en de eerder gemeten hoeveelheden zuurstof is de netto productie in mg zuurstof per gram drooggewicht per uur berekend.

De zuurstofmetingen dit zijn concentraties in mg/l. Dit is omgerekend naar mg/flesje.

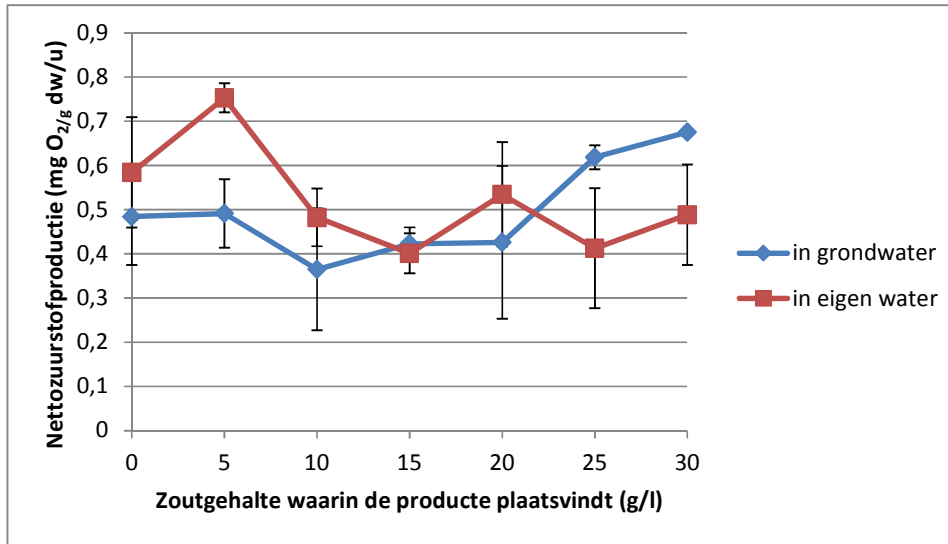
6.2.2 BEREKENING

De berekening voor de productie is $P = (O_2\text{begin} - O_2\text{eind})/dw/t$

- P: De netto zuurstofproductie van het wier in mg/g/uur
- O_2 begin: de hoeveelheid O_2 in miligram aanwezig in het flesje aan het begin van het experiment

- O₂ begin: de hoeveelheid O₂ in miligram aanwezig in het flesje aan het eind van het experiment.
- Dw: het drooggewicht van het wier in gram
- T: tijd in uren

6.3 RESULTATEN



Figuur 26: Zuurstofproductie van *C. linum* gemeten gedurende twee uur na 24 uur in water van verschillende saliniteiten. Eenmaal in het water waarin het wier de 24uur had doorgebracht (punten "in eigen water") en eenmaal teruggeplaatst in 30 g/l grondwater (punten "in grondwater") n=2 voor alle datapunten met de standaarddeviatie aangegeven.

Uit de gevonden waarden is geen conclusie te trekken, de resultaten geven dus geen eenduidig beeld. Er lijkt geen verschil te zijn door de grote spreiding in duplowaarden.

6.4 DISCUSSIE

Bij een zoutgehalte van 30g/l zijn bij de twee gebruikte methoden (in grondwater en eigen water) zijn bij 30 g/l verschillende waarden gevonden. Op dit punt zijn de twee methoden gelijk aan elkaar en dus de resultaten zouden gelijk moeten zijn. Er zijn over de meetseries wel grote duploverschillen geobserveerd van tot 30% dus het is mogelijk dat hier het gevonden verschil uit verklaard kan worden. De gevonden waarden komen wel overeen met de door Caputo et al. gemaakte waarnemingen in dat er geen significante verschillen zitten tussen de productie van borstelwier in zoet of zout water.

6.5 CONCLUSIE

Onderzoeksvraag: Wat is de invloed van het zoutgehalte van de omgeving op de korte termijn productie van *C. linum*?

Deze vraag is moeilijk te beantwoorden omdat het resultaat van de twee experimenten niet overeenkwam. Hoe dan ook, de onzekerheid door de duploverschillen is zo groot er geen concrete conclusies getrokken kunnen worden. Zelfs als de onzekerheid genegeerd wordt is het zo dat er niet veel effect is van veranderende zoutgehaltes. Het is mogelijk dat extreme (>75 g/l of een lager zoutgehalte als kraanwater) zoutconcentraties wel effect hebben maar dit is niet praktisch voor de KMWP. Verder onderzoek naar de invloed van osmotische schokken kan wel bruikbare beheersmethodes opleveren.

Het doel van het onderzoek was om te bepalen of de verrandering van zoutgehaltes een bruikbaar beheersinstrument zou zijn. Dit is niet het geval.

7. UITDROGINGS EXPERIMENT

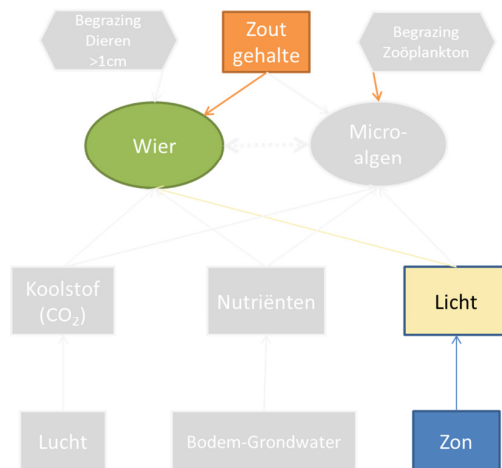
7.1 INLEIDING EN ACHTERGRONDEN

Uitdroging is een omstandigheid waar veel wieren tweemaal daags mee te maken krijgen in de intergetijdzone. Borstelwier komt zover bekend alleen maar als volledig ondergedoken wier voor en in de literatuur is de uitdrogingsresistentie nog niet goed onderzocht.

Daarnaast kan uitdroging waarschijnlijk de belangrijkste beheersmaatregel worden voor de KMWP omdat dit de enige praktische en goedkope manier is om de grote hoeveelheid wier die zich in de vijver kan ontwikkelen te doden zonder dat de beheersmaatregel invloed heeft op de levensvatbaarheid van de microalgencultuur die zich na het beheer in de vijver moet ontwikkelen. Het verlagen van de waterstand door middel van een pomp legt een groot deel van de vijver droog wat een negatief effect heeft op de wieren.

Het doel van dit onderzoek is om uit te zoeken hoe snel en hoe sterk het wier negatieve effecten ondervindt van uitdroging.

De te beantwoorden deelvraag: Wat is de invloed van uitdroging op de korte termijn productie van *C. linum*?



Figuur 27: schema van de onderzochte waarden in het uitdrogingsexperiment. Hoe langer een pluk wier is uitgedroogd hoe meer zon de cel direct heeft ontvangen en hoger het zoutgehalte rond de cel is.

7.2 METHODE

7.2.1 OPZET

Gedurende één week is iedere dag een pluk van ongeveer 5-10 gram wier van zowel het jonge als het oude type (zie hoofdstuk Fysiologische conditie, pagina 24 voor details over identificatie van de types) uit het water gehaald en in de kas op een kartonnen raster geplaatst om te drogen. Aan het eind van de week was er dus een reeks van 7 tot 0 dagen(vers) gedroogd wier met een interval van 24 uur

Na de periode van drooglegging zijn alle plakken wier een uur lang geweekt in zout grondwater in een TL verlichte ruimte. Voorexperimenten hebben aangetoond dat na deze tijd nagenoeg de maximale hoeveelheid water weer terug is opgenomen in het wier.

Hierna is het wier in tweeën geknipt om een duplo te creëren en in glazen flesjes van 125ml geplaatst waarvan het zuurstofgehalte was bepaald. De flesjes zijn afgesloten en twee uur in de zon (gemiddeld 945 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$) Photosynthetically active radiation PAR, data M. Michels) geplaatst. Na deze groeiperiode is nogmaals het zuurstofgehalte van het water in de flesjes bepaald om de netto productie te kunnen berekenen. De plakjes

wier zijn 64 uur gedroogd bij 80 °C en op basis van dit eindgewicht en de eerder gemeten hoeveelheden zuurstof is de netto productie in mg zuurstof per gram drooggewicht per uur berekend.



Figuur 28: foto van alle afgesloten flesjes met wier tijdens de uitdrogings experiment. Achterin staan de langst gedroogde plukken, voorin het wier dat niet gedroogd is. Duidelijk te zien is hoe het gedroogde wier een theekleur afgeeft aan het water waarin het zich bevindt.

7.2.2 BEREKENINGEN

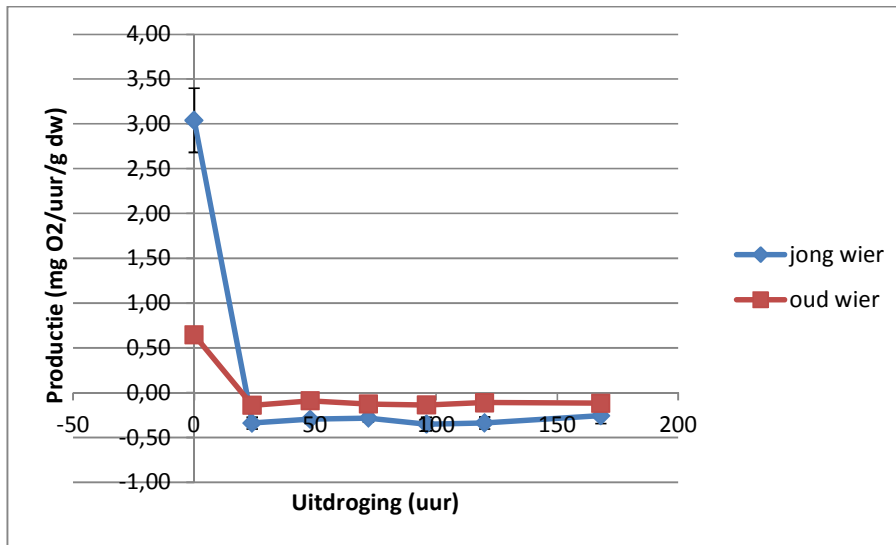
De berekening voor de productie is hetzelfde als beschreven in paragraaf 6.2.2 dus: $P = (O_2\text{begin} - O_2\text{eind})/dw/t$

- P: De netto zuurstofproductie van het wier in mg/g/uur
- O_2 begin: de hoeveelheid O_2 in miligram aan het begin van het experiment
- O_2 eind: de hoeveelheid O_2 in miligram aan het eind van het experiment
- Dw: het drooggewicht van het wier in gram
- T: tijd in uren

Om het verschil tussen oud en jong wier na uitdroging te kwantificeren is een t-test uitgevoerd. Er is hier gekozen voor de tweezijdige onafhankelijke t-toets.

7.3 RESULTATEN

De verwachting was dat het “breekpunt” in de productie na een paar dagen uitdroging zou liggen. Zoals figuur 28 laat zien is er een vrijwel onmiddellijke (<24 uur uitdroging) verlaging van de productie. Als aangenomen wordt dat de brutoproductie bij een negatieve nettoproductie nul benadert, blijft de respiratie dan vervolgens nagenoeg gelijk. De respiratiehoeveelheden voor gedroogd jong wier ($M=-0,31$ $SD=0,06$) zijn significant lager dan die voor gedroogd oud wier ($M=-0,12$ $SD=0,03$) ($t(12)=-9,36$, $p<0,001$) terwijl de productie van het verse jonge wier ruim vier maal zo hoog was als het oude wier.



Figuur 29: de nettozuurstofproductie van jong en oud wier na een drogingsperiode. Error bars geven aan wat de standaarddeviatie van de duplos is maar deze zijn zo klein dat ze niet te zien zijn.

7.4 DISCUSSIE

De gebruikte plukken wier zijn van beperkt formaat (enkele grammen natgewicht), kunnen de conclusies voornamelijk gemaakt worden over vergelijkbare hoeveelheden wier. Bij plukken van groter formaat of de diepere lagen van een wiermat zal de uitdroging veel minder zijn omdat zij geïsoleerd worden door het omringende wier. Eerder onderzoek naar uitdroging op de schorren in Panama (Hay, 1981) gaf aan dat pakketvorming een grote invloed heeft op de resistentie tegen uitdroging. Individuen van *Laurencia papillosa*, *Halimeda opuntia* en verschillende soorten *Dictyota* in een pakket hadden na een uitdroging van twee uur een >30% hogere fotosynthetische productie dan losse individuen. Uit de gevonden data kan wel afgeleid worden dat de bovenste laag nagenoeg dood is na al een korte tijd in de zon en open lucht.

Het is niet duidelijk wat de invloed van warmte en droogte apart is, het is onduidelijk of de warmte van de kas of de osmotische schok van de uitdroging die het wier fataal was.

7.5 CONCLUSIE

- Wat is de invloed van uitdroging op de korte termijn productie van *C. linum*?

De productie van *Chaetomorpha linum* neemt na slechts 24 uur uitdroging aan de open lucht al af tot 0. De conclusie geldt alleen voor kleine plukken wier. De hoeveelheid uitdroging hoeft minder groot te zijn dan werd verwacht aan het begin van het experimenten, borstelwier sterft onder de onderzochte condities al snel.

8. SYNTHESE

In dit onderzoek is door middel van literatuur en experimenteel onderzoek een analyse gedaan van de groei van *Chaetomorpha linum* in open microalgenvijvers. Macrowier en de microalgen concurreren om nagenoeg dezelfde bronnen, voornamelijk opgelost stikstof, opgelost fosfaat en licht.

Uit de literatuur (Fabergaz 1996, Lavery 1991, Menendez 2005) is gebleken dat *Chaetomorpha linum* beter dan microalgen in staat is in het omgaan met schommelingen in nutriëntenconcentraties. Waar microalgen de hoeveelheid nutriënten die beschikbaar is alleen heel direct kunnen volgen kan het wier een nutriëntenpuls opslaan en dus de effecten uitspreiden over een langere periode. Op de korte termijn zullen de microalgen een exponentiële groei laten zien maar over de lange termijn is de hoeveelheid biomassa-groei van het wier net zo groot als die van de microalgen per hoeveelheid nutriënten. Omdat het wier door deze uitspreiding een voorraad stikstof en fosfaat heeft op het moment dat de microalgenpopulatie afneemt kan het wier op dat moment het ecosysteem overnemen.

In het experiment is gezien dat er geen duidelijke verschillen waren tussen hoge of lage concentraties nutriënten. Overall is wel nagenoeg hetzelfde patroon te zien: de wieren groeiden gestaag gedurende het gehele experiment terwijl de microalgen na 7-10 dagen begonnen met afnemen.

In het zagerexperiment is gezien dat zagers een duidelijk merkbare hoeveelheid wier opaten: 0,07 gram/worm/dag gemeten over twee weken. Het is nog niet duidelijk of zagers over de langere tijd een compleet dieet hebben aan slechts een soort wier. De hoeveelheid gegeten wier is niet heel groot en bij normale dichtheden wormen kunnen zij waarschijnlijk niet het volledige wierpakket verwijderen.

De totale biomassa aan *Chaetomorpha* is op 22,5 ton (vers gewicht) geschat tijdens het hoogtepunt van de wierbloei. (0,5 hectare aan 4,5 kg versgewicht/m² (Krause-Jensen et al. 1996) Indien er rekening wordt gehouden met een groei van 0,05 g/g/dag (zoals tijdens het nutriëntenexperiment, hoofdstuk 1, pagina 16) geeft dit inclusief een foutmarge van 20% een biomassaproductie van tussen de 900 en 1350 kilo per dag. De graas door zagers (gegevens uit hoofdstuk 4 pagina 20) bedraagt 0,07 g/zager/dag. Dit betekent dat er tussen de $1,28 \cdot 10^7$ en $1,92 \cdot 10^7$ zagers (*Nereis virens*) nodig zijn om de totale bijgroei weg te grazen. Hierdoor zal de totale biomassa aan *Chaetomorpha* in het systeem 'slechts' stabiel blijven. De dichtheid aan zagers zal dan rond de 3400 tot 5100 individuen/m² zijn, uitgaande van een totaal oppervlak van 0.5 ha. Ter vergelijking; in natuurlijke omstandigheden komen zagerdichtheden van rond de 150 tot 1700 individuen/m² voor (Zipperle en Reise 2005).

Een andere mogelijkheid is het inzetten van zagers in een 'geschoonde' vijver, waarbij de totale biomassa aan *Chaetomorpha* beduidend lager ligt. Hoewel de algenvijver niet precies overeenkomt met de in het door Zipperle en Reise beschreven optimale ecosysteem voor zagers moeten zagerdichtheden van enkele honderden per vierkante meter bereikbaar zijn. Bij een dichtheid van 250/m² kunnen de zagers de groei van 350 gram vers wier per dag verwijderen. Dit komt overeen met een egale laag van 2 cm wier of een enkele pluk ter grootte van een voetbal (± 25 cm diameter) In dit geval wordt er echter wel van uit gegaan dat de zagers enkel *Chaetomorpha* eten als voedingsbron.

De fysieke conditie van het wier lijkt niet uit te maken voor de groei van het wier over de periode van twee weken, in twee experimenten is daar geen verschil in gezien. Over de korte termijn (2 uur) is wel in de uitdrogingsexperiment gezien dat jong wier een bijna vijf maal grotere zuurstofproductie had dan het oude wier. Het is niet duidelijk waarom er een zo groot verschil zit tussen de meting op korte of de lange termijn. De meest voor de hand liggende verklaring is dat het verschil zit in de meetmethode: het fysiologische conditie experiment mat biomassa, het uitdrogingsexperiment de zuurstofproductie. Het meest voor de hand liggende is dat de hoge zuurstofproductie het resultaat is van hogere assimilatie maar dat deze productie niet gebruikt wordt voor groei. Het is ook mogelijk dat het gevonden verschil in productie tussen de korte en lange termijn komt omdat het verschil tussen jong en oud wier nog niet goed begrepen is. Het is mogelijk dat naast het gebruikte visuele verschil ook nog andere fases in de activiteit van het wier zijn.

Het effect van het zoutgehalte is nog niet goed begrepen maar kan een verklaring geven voor de uitdroging van het wier. De uitdroging van het wier heeft al heel snel een effect. Na slechts 24 uur was het wier al dood, waarschijnlijk door de extreem hoge zoutconcentraties die ontstaan als het water rondom de cel verdampt.

9. EINDCONCLUSIE

Uit alle onderzoeken is naar voren gekomen dat zolang er voldoende nutriënten, vocht en licht aanwezig is het wier zal kunnen groeien, het stelt niet veel eisen aan zijn leefomgeving. Dit betekent dat het erg moeilijk zal zijn om met alleen ecologische ingrepen het wier te verwijderen zonder de microalgencultuur ook grote schade toe te brengen.

Deelvragen:

1. Heeft de N/P verhouding in het water invloed op de competitie tussen microalgen en borstelwier?
 - Er zijn geen aanwijzingen gevonden dat de competitie tussen algen en wieren beïnvloed wordt door de verhouding tussen N en P.
2. Hebben de absolute concentraties DIN en fosfaat in het water invloed op de competitie tussen microalgen en borstelwier?
 - Ook deze vraag heeft geen duidelijk antwoord wieren bleken wel beter te groeien op verhoogde concentraties stikstof.
3. Hoeveel invloed heeft de begrazing door zagers op de groei van *C. linum*?
 - Zagers verwijderen *Chaetomorpha linum* in een korte termijn aquariumschaal opzet met 0,07 gram wier per zager per dag. Over langere termijn is nog niets bekend maar het lijkt er wel op dat wieren en planten een belangrijk deel van het dieet van het geslacht Nereis zijn.
4. Zijn zagers bruikbaar als top-down beheermiddel van borstelwier?
 - De hoeveelheid verwijderd wier is niet veel (minder als een tiende gram per zager per dag) maar zou een goed te gebruiken methode zijn om de groei van het wier te beperken zodat de balans van een systeem weer doorslaat naar het microalgen-gedomineerde systeem.
5. Is er verschil in groei van *C. linum* na fysieke stress (mechanische schade) of bij verschillende cel leeftijden (oud of jong)?
 - Er lijkt geen groot verschil te zijn tussen jong, oud of versnipperd wier.
6. Is fysieke stress bruikbaar als beheersinstrument?
 - Nee, mechanische schade lijkt de groei van het wier niet te versnellen of vertragen. Daarnaast is er geen duidelijk verschil tussen oud of jong wier dus hierin valt ook niet te sturen.
7. Wat is de invloed van het zoutgehalte van de omgeving op de korte termijn productie van *C. linum*?
 - Deze vraag is moeilijk te beantwoorden omdat het resultaat van de twee experimenten zo tegenstrijdig is met resultaten van één experiment die aangeven dat de groei beter is bij hoge saliniteit en de ander die aangeeft dat dit juist niet is. Hoe dan ook, de onzekerheid is zo groot er absoluut geen concrete conclusies getrokken kunnen worden.
8. Wat is de invloed van uitdroging op de korte termijn productie van *C. linum*?
 - De productie van *Chaetomorpha linum* neemt na slechts 24 uur uitdroging aan de open lucht al af tot 0. In het donker of diep in een wiermat geldt deze conclusie niet. De hoeveelheid uitdroging hoeft minder groot te zijn dan werd verwacht aan het begin van het experimenten, borstelwier sterft onder de onderzochte condities al snel.

Hoofdvraag:

Welke factoren hebben de grootste invloed op groei van *Chaetomorpha linum* in de microalgenvijver van de KNWP en welke zijn bruikbaar in de beheersing van *C. linum*?

- Uitdroging en begrazing hebben de grootste invloed op het wier en zijn beide bruikbaar als beheersmaatregel. Zoutgehaltes, nutriëntenconcentraties en fysieke stress hebben te weinig invloed om een bruikbare beheersmaatregel te vormen.

10. AANBEVELINGEN

In dit hoofdstuk zullen aan de hand van de in hoofdstuk 9 getrokken conclusies aanbevelingen worden gedaan. Deze aanbevelingen zijn opgesplitst in twee categorieën. De aanbevelingen voor de microalgenkwekers zijn bedoeld als richtlijn voor wat er gedaan kan worden als een bloei van *Chaetomorpha linum* geconstateerd wordt. Verder worden ook aanbevelingen gedaan voor vervolgonderzoek.

10.1 AANBEVELINGEN VOOR MICROALGENKWEKERS

Het nutriëntenonderzoek geeft aan dat sturing met nutriëntenhoeveelheden of -verhoudingen geen goede methode is. Het borstelwier kan door zijn opslagcapaciteit optimaal gebruik maken van grote schommelingen. Mocht de microalgencultuur instorten terwijl er al wier aanwezig is, kan de plotselinge toename in licht ervoor zorgen dat het wier zich explosief zal vermenigvuldigen. De aanbeveling is dus om erg voorzichtig te zijn in het verstoren van de nutriëntenbalans omdat het wier in vergelijking met de microalgen veel beter in staat is om te profiteren van overschotten in stikstof (zie §2.3.2 en hoofdstuk 8). Op de korte termijn zal de hoge groeisnelheid van de microalgen de algen het voordeel geven maar over de lange termijn 'wint' het wier qua dominantie van een ecosysteem.

Het inzetten van een populatie zagers of andere wormen zoals wadpieren (*Arenicola marina*) voor de beheersing van wiergroei is iets dat verder onderzoek verdient naar de commerciële inzet, maar de eerste resultaten van het onderzoek zijn veelbelovend. Zagers op zich zullen niet in staat zijn om een volledig wierpakket te verwijderen, maar zij zullen waarschijnlijk wel in staat zijn om een bloei af te remmen dan wel te voorkomen.

Uitdroging heeft wel duidelijk effect en is een goede potentiële beheersmaatregel. Bij de KMWP is deze methode al uitgeprobeerd en het gedeeltelijk leegpompen van de vijver zorgde voor sterfte onder het wier. Uit het uitdrogingsonderzoek is naar voren gekomen dat de bovenste lagen wier al na minder dan een etmaal dood zijn. De diepere lagen van een wierpakket kunnen langer overleven maar ook hier zal al vrij snel sterfte optreden. Het uitdrogen van het wier lijkt de beste bestrijdingsmethode om snel van grote hoeveelheden wier af te komen omdat het effectiviteit combineert met een minimale impact op de toekomstige productie van microalgen.

In een rustige waterkolom zullen diatomeen snel bezinken. Op een open bodem zullen zij zodra het water meer gemengd wordt, weer opgewerveld worden, maar bodemwieren zoals *Chaetomorpha* beperken de waterbeweging dicht bij de bodem waardoor de microalgen sterven. Een systeem zoals in de intensievere vijvers met schoepenraden of bubbelsystemen om de waterkolom in beweging te houden, kan ervoor zorgen dat de microalgen niet bezinken. Dit heeft als bijkomend effect dat de drijvende microalgen het onderliggende wier zullen beschaduen.

Naast overlast biedt *Chaetomorpha linum* ook mogelijkheden. In delen van de Zeeuwse aquacultuur wordt gekweekt wier gebruikt voor verschillende toepassingen, een mogelijke energiebesparing is om in deze gevallen het wier uit de microalgen vijvers waar het ongewenst is te oogsten en het te gebruiken als vee- of visvoer of basis voor compost. In gevallen waar het wier nu alleen verwijderd wordt, kan het dan worden hergebruikt. Als snelgroeiend en ecologisch taai wier is *Chaetomorpha* hier bijzonder voor geschikt. Deze mogelijkheden moeten nog verder worden onderzocht.

10.2 AANBEVELINGEN VOOR VERVOLGONDERZOEK

Ondanks het aantal onderzoeken dat is uitgevoerd en het literatuuronderzoek wat een groot aantal punten heeft aangesneden zijn er nog veel meer onderzoeken nodig voordat het probleem van de wiergroei volledig is doorgrond. Er zijn ondanks alle onderzoeken nog grote leemtes in de kennis over hoe sommige invloeden effect hebben op andere en hoe dit de groei van het wier beïnvloedt.

Uit het onderzoek naar het zoutgehalte zijn vreemde, tegenstrijdige resultaten naar voren gekomen. De invloed van osmotische schokken op het wier kan blijkbaar erg groot zijn. Er moet wel duidelijk worden hoe en hoeveel het wier zich kan aanpassen aan veranderende zoutgehaltes.

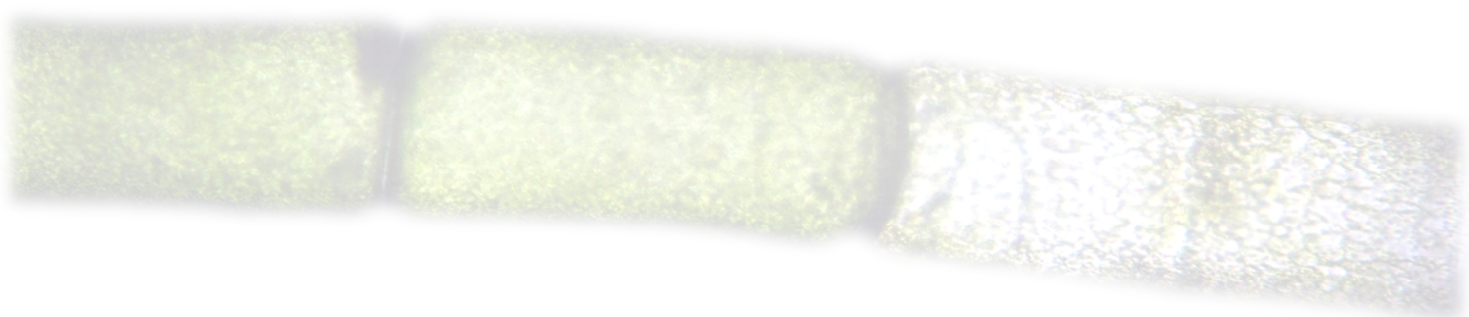
Meting van het effect van zoutgehaltes is ook belangrijk voor het verdere onderzoek naar de uitdroging van het wier. Er is uit het uitgevoerde onderzoek naar voren gekomen dat een kleine pluk wier al snel dood is maar de vraag is nu nog: wat is de precieze oorzaak van deze sterfte? Is het alleen de osmotische schok van het achterblijvende zout of speelt ook de temperatuur en het licht mee? Dit zijn vragen die grote invloed kunnen hebben ook omdat zij meer inzicht kunnen geven op de vraag wat de invloed van uitdroging dieper in de wiermat is.

Behalve indirecte competitie tussen microalgen en wier over licht en nutriënten is het waarschijnlijk dat wier ook directe invloed uitoefent op de microalgen (J. Rijstenbil, pers. Comm.) door uitscheiding van remmende stoffen. In de literatuur is hier niets concreets over gevonden dus verder onderzoek is noodzakelijk om dit fenomeen beter te begrijpen.

Verder is het denkschema van figuur 2 nog niet volledig ingevuld. Licht en CO₂ zijn belangrijke bronnen voor microalgen en wier maar deze zijn niet in deze studie belicht. Denk bijvoorbeeld aan een onderzoek naar de lichtextinctie door microalgen en de invloed die dit heeft op de groei van wier. Ook de invloed van zoöplankton verdient een vervolgonderzoek. Vooral de vermindering van de hoeveelheid zoöplankton door bijvoorbeeld de inzet van planktivore vis kan grote invloed hebben op de microalg populatie.

- Bessho K, Iwasa Y, 2010**, Optimal seasonal schedules and the relative dominance of heteromorphic and isomorphic life cycles in macroalgae, **Journal of Theoretical Biology** vol.ume 267, Issue 2, 21 November 2010, Pages 201-212,
- Brzezinski, M.A.1985**, The Si:C:N ratio of marine diatoms: interspecific variability and the effect of some environmental variables. **Journal of Phycology**, Vo. 21, pp. 347-357
- Caputoa E. Cegliea V, Lippolisa M., Roccab N. Ia, De Tullio a M.C.** 2010 Identification of a NaCl-induced ascorbate oxidase activity in *Chaetomorpha linum* suggests a novel mechanism of adaptation to increased salinity, **Environmental and Experimental Botany** Vol. 69, no. 1 pp. 63-67
- Fabregas, M Patino, ED Morales, B Cordero and A Otero** 1996 Optimal Renewal Rate and Nutrient Concentration for the Production of the Marine Microalga *Phaeodactylum tricornutum* in Semicontinuous Cultures **Appl. Environ. Microbiol.** vol. 62, No. 1 pp. 266-268
- Fidalgo E Costa P, Oliveira R en Cancela Da Fonseca L** 2006 Feeding Ecology of *Nereis diversicolor* (O.F. Müller) (Annelida, Polychaeta) on Estuarine and Lagoon Environments in the Southwest Coast of Portugal **Pan-American Journal of Aquatic Sciences** pp. 114-126
- Guiry, M.D. en Guiry, G.M.** 2012. ALGAEBASE. World-wide electronic publication, National University of Ireland, Galway. http://algaebase.org/search/species/detail/?species_id=222; searched on 10 June 2012.
- Humphrey G.F., 1975**, the photosynthesis: Respiration ratio of some unicellular marine algae, **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology** vol. 18, no. 2, pp. 111-119
- Lavery P.S. en McComb A. J.** 1991, Macroalgal-sediment nutrient interactions and their importance to macroalgal nutrition in a eutrophic estuary, **Estuarine, Coastal and Shelf Science** vol. 32 no. 3, pp. 281-295
- Lynch J.J.** 1939, Marine Algae In Food Of Rhode Island Waterfowl, **The Auck** vol. 56, No. 4
- Hay M.E.** 1981, The Functional Ecology Of Seaweed: Persistence In Stressful Conditions, **Ecology** vol. 62 pp. 739-750
- Hemminga, M.A and G.J.C. Buth, 1992.** Decomposition in salt marsh ecosystems of the SW. Netherlands: The effects of biotic and abiotic factors, **Vegetatio** vol. 92. pp. 73-84.
- Kamermans P, Blanco A, Brummelhuis E, Smaal A, 2009** Zeeuwse Tong Deelproject 8: Binnendijkse schelpdierkweek **Imares Rapport C043/09**
- Kornmann, 1976** Ein Beitrag zur Taxonomie der Gattungborstelwier (*Cladophorales*, Chlorophyta) **Helgoland Marine Research Volume 23, no. 1**
- Krause-Jensen D, McGlathery K, Rysgaard S, Christensen P.B. , 1996**, Production within dense mats of the filamentous macroalga *Chaetomorpha linum* in relation to light and nutrient availability, **MARINE ECOLOGY PROGRESS SERIES** vol. 135
- Achary G.P.K, Rani Mary G, Thomas K.T. en Mathew J,1993** The Role Of Gametes And Asexual Products Of Algae In The Food Chain Of Aquatic Medium, **Seaweed Research and Utilisation** Vol. 16 no. 1 en 2 pp. 77-90
- Menéndez M , Martinez M, Comin F.A,** 2000, A comparative study of the effect of pH and inorganic carbon resources on the photosynthesis of three floating macroalgae species of a Mediterranean coastal lagoon, **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology** vol. 256 pp. 123–136
- Menéndez M,** 2005, Effect of nutrient pulses on photosynthesis of *Chaetomorpha linum* from a shallow Mediterranean coastal lagoon, **Aquatic botany** pp. 181-192
- McGlathery K.J,** 1999, The Effect Of Growth Irradiance On The Coupling Of Carbon And Nitrogen Metabolism In *Chaetomorpha Linum* (Chlorophyta), **Journal of Phycology** vol. 35, 721–73
- Olivier M, Gaston Desrosiers, Alain Caron, Christian Retiere, Aline Caillou, 1997,** Juvenile growth of *Nereis diversicolor* (O.F. Muller) feeding on a range of marine vascular and macroalgal plant sources under experimental conditions, **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology** vol. 208, no 1-3, pp. 1-12,
- OTTO S.P., MARKS J.C,** Mating systems and the evolutionary transition between haploidy and diploidy, **Biological Journal of the Linnean Society** vol.e 57, no 3, pp. 197-218
- Orav-Kotta, H, Kotta, J** Food and habitat choice of the isopod *Idotea baltica* in the northeastern Baltic Sea **Hydrobiologia** Vol. 514 p. 79-85

- Pedersen M.F, Borum J**, 1996, Nutrient control of algal growth in estuarine waters. Nutrient limitation and the importance of nitrogen requirements and nitrogen storage among phytoplankton and species of macroalgae, **Marine Ecology Progress Series vol. 142: 261-272**,
- Premalatha M, Dhasarathan. P and P. Theriappan**, 2011 Phytochemical Characterization And Antimicrobial Efficiency of Seaweed Samples, *Ulva fasciata* and *Chaetomorpha antennina*., **International Journal of Pharma and Bio Sciences vol. 2 no. 1**
- Redfield A.C., 1934**. On the proportions of organic derivations in sea water and their relation to the composition of plankton. **James Johnstone Memorial Volume. University Press of Liverpool, pp. 177-192**
- Scheffer M, Hosper, S. H., Meijer, M. L. en Moss, B. 1993** Alternative equilibria in shallow lakes. **Trends Ecology Evolution vol. 8, pp. 275-279**
- Scheffer M, Carpenter S, Foley JA, Folke C en Walker B. 2001** Catastrophic shifts in ecosystems **NATURE vol. 413**
- Scheibling R.E, Lyons DA, Sumi C.B.T, 2008**, Grazing of the invasive alga *Codium fragile* ssp. *tomentosoides* by the common periwinkle *Littorina littorea*: Effects of thallus size, age and condition, **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology vol. 355 no 2, pp. 103-113**
- Shunula J.P en Ndibalema V.**, 1986, Grazing preferences of *Diadema setosum* and *Heliocidaris erythrogramma* (Echinoderms) on an assortment of marine algae, **Aquatic Botany vol. 25, pp. 91-95**
- Siddhanta A.K., Prasad K, Ramavatar Meena, Gayatri Prasad, Gaurav K. Mehta, Mahesh U. Chhatbar, Mihir D. Oza, Sanjay Kumar, Naresh D. Sanandiya, 2009** Profiling of cellulose content in Indian seaweed species, **Bioresource Technology vol.ume 100, Issue 24, Pages 6669-6673**,
- Sterner R.W, Elser J.J.** Ecological stoichiometry: the biology of elements from molecules to the biosphere Princeton University Press, 2002 ISBN: 0-691-07490-9
- Valiela I, McClelland J, Hauxwell J, Behr P.J, Hersh D,' and Foreman K** 1997 Macroalgal blooms in shallow estuaries: Controls and ecophysiological and ecosystem consequences **Limnology and Oceanography vol. 42 pp. 1108-1118**
- Wilhelmsen U. en Reise K**, 1994, Grazing on green algae by the periwinkle *Littorina littorea* in the Wadden Sea, **Helgoland Marine Research Vol.48, no. 2-3, pp. 233-242**
- Zipperle A en Reise K** 2005, Freshwater springs on intertidal sand flats cause a switch in dominance among polychaete worms, **Journal of Sea Research vol. 54 pp. 143-150**



BIJLAGE 1: PROCEDURE WIERWEGING

Dit is de simpele standaardprocedure voor het reproduceerbaar wegen van wier. De uitdaging is om het water dat tussen het wier blijft zitten zo min mogelijk mee te wegen zonder het wier te beschadigen.

1. Haal al het wier uit het water met een standaard aquariumnetje (maaswijdte $\pm 0,5$ mm)
2. Laat het wier ongeveer een halve minuut uitlekken
3. Dep het wier aan alle kanten met keukenpapier, als het goed is is het nu nog vochtig maar zijn er geen waterdruppels meer zichtbaar en ziet het eruit als figuur 19 (pagina 23)
4. Weeg het wier en noteer het gewicht
5. Plaats het wier terug in het juiste bassin of aquarium.

Een analyse van deze methode geeft aan dat deze redelijk nauwkeurig is, een standaard deviatie van 5,8% van het gemiddelde bij de kleine hoeveelheid en 3,4% van het gemiddelde bij de grote hoeveelheid is goed.

	N	Minimum	Maximum	Gemiddelde	Std. Deviatie
Kleine hoeveelheid	15	5,95	7,16	6,5193	,34874
Grote hoeveelheid	15	73,34	82,33	78,3887	2,56032

Tabel 5: de statistische analyse van 15 wegingen van een grote en een kleine hoeveelheid wier.

BIJLAGE 2: METHODE VOOREXPERIMENT ZAGERS

In dit experiment is uitgezocht of zagers het wier *Chaetomorpha linum* zouden opeten en verteren. Doel van het onderzoek was niet om kwantitatieve data te zoeken maar vooral om uit te zoeken of zagers het wier überhaupt het wier eten en er dus een verder, preciezer, onderzoek mogelijk was.

METHODE

In een aquarium van 30x60x30cm is een laag zand van ongeveer 10 centimeter aangebracht en het aquarium is verder gevuld met grondwater van het SEAlab. In het aquarium zijn vervolgens 25 zagers geplaatst en een pluk wier. De monitoring gebeurde volledig visueel. Na ongeveer een maand is de opstelling afgebroken en zijn de zagers geteld.

RESULTAAT

Gedurende een aantal weken werd gezien dat er kleine stukken borstelwier de gangen welke door de zagers zijn gegraven in is geslept.

Alle 25 zagers zijn terug gevonden aan het eind van het experiment.

ACHTERGROND

Omdat er voor de bepaling van NO_3^- geen kleurentwikkelaar beschikbaar is, wordt deze geanalyseerd m.b.v. spectrometrie in het UV- gebied. Deze methode is samengesteld aan de hand van een voorschrift verkregen van NIOO, te Yerseke.

BENODIGDE CHEMICALIËN/ APPARATUUR

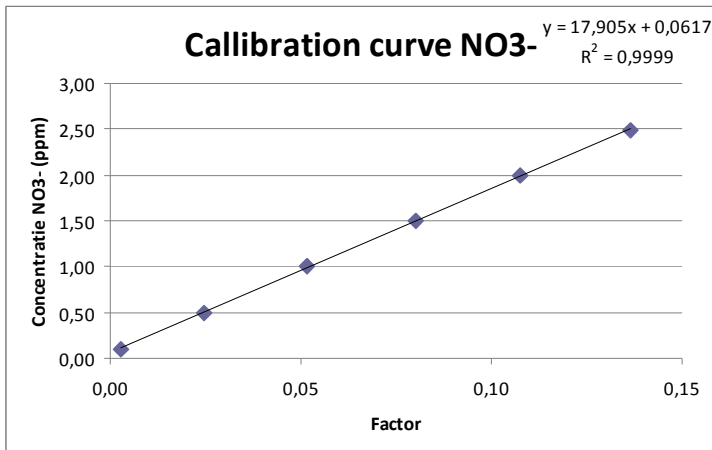
- Perkin Elmer Spectrofotometer (locatie L0) (Zie afbeelding 1)
- Quarts kuvetten en bijbehorend kuvet papier
(Quarts kuvetten vragen bij labbeheerster, kuvet papier aanwezig in L023)
- KNO_3 (aanwezig in chemicaliënmagazijn, afdeling Chemie)
- 100 ppm NO_3^- stock oplossing
- Kallibratie reeks NO_3^- 0,1 ppm – 2,5 ppm
- Synthetisch zeewater 33 g.L^{-1} (bij monsters in zout water medium)
33 gram zout dient te worden opgelost in 1 L demiwater
- .45 μm filter of whatmann GF/C

Deze methode berust op analyse in het UV gebied. De absorptie wordt gemeten op 220 nm en op 275 nm. De nitraat concentratie wordt op de volgende manier berekend:

$$\text{Factor} = \text{Abs.}(220 \text{ nm}) - 2 * \text{Abs.}(275 \text{ nm})$$

Voor callibratie wordt eerst een verdunningsreeks gemaakt van bekende concentraties NO_3^- (zie kader) in synthetisch zeewater met een saliniteit die gelijk is aan de te meten monsters.

De volgende callibratiecurve wordt verkregen:



Aan de hand van de verkregen formule kan de onbekende concentratie NO_3^- in het monster bepaald worden.

Aanmaken verdunningsreeks:

1. Aanmaken stock oplossing NO_3^- 100 ppm (mg/L)
Weeg 163,03 mg KNO_3 af.
Breng deze kwantitatief over in een maatkolf van 1 L, homogeniseer en vul aan tot de maatstreep.
2. Aanmaken stock oplossing NO_3^- 10 ppm
Breng 10 ml van de 100 ppm stockoplossing kwantitatief over in een maatkolf van 100 ml, homogeniseer en vul aan tot de maatstreep.
3. 0,1 ppm NO_3^- oplossing

Breng 1,0 ml van de 10 ppm stock oplossing kwantitatief over in een maatkolf van 100 ml, homogeniseer en vul aan tot de maatstreep.

4. 0,5 ppm NO_3^- oplossing

Breng 5,0 ml van de 10 ppm stock oplossing kwantitatief over in een maatkolf van 100 ml, homogeniseer en vul aan tot de maatstreep.

5. 1,0 ppm NO_3^- oplossing

Breng 10,0 ml van de 10 ppm stock oplossing kwantitatief over in een maatkolf van 100 ml, homogeniseer en vul aan tot de maatstreep.

6. 1,5 ppm NO_3^- oplossing

Breng 15,0 ml van de 10 ppm stock oplossing kwantitatief over in een maatkolf van 100 ml, homogeniseer en vul aan tot de maatstreep.

7. 2,0 ppm NO_3^- oplossing

Breng 20,0 ml van de 10 ppm stock oplossing kwantitatief over in een maatkolf van 100 ml, homogeniseer en vul aan tot de maatstreep.

8. 2,5 ppm NO_3^- oplossing

Breng 25,0 ml van de 10 ppm stock oplossing kwantitatief over in een maatkolf van 100 ml, homogeniseer en vul aan tot de maatstreep.

Let op! De kallibratie curve wordt opgesteld aan de hand van de gecorrigeerde concentraties. Bijv. er dient 163,03 mg afgewogen te worden, toch wordt er 164,2 mg afgewogen. Hieraan dienen de gestelde concentraties te worden aangepast.

Voorbeeld berekening:

Concentratie NO_3^- (ppm)	Concentratie NO_3^- gecorrigeerd (ppm)
0,1000	0,0998
0,5000	0,4992
1,0000	0,9984
1,5000	1,4976
2,0000	1,9968
2,5000	2,4959

Afwegen: 163,03 mg KNO_3

Afgewogen: 164,2 mg KNO_3

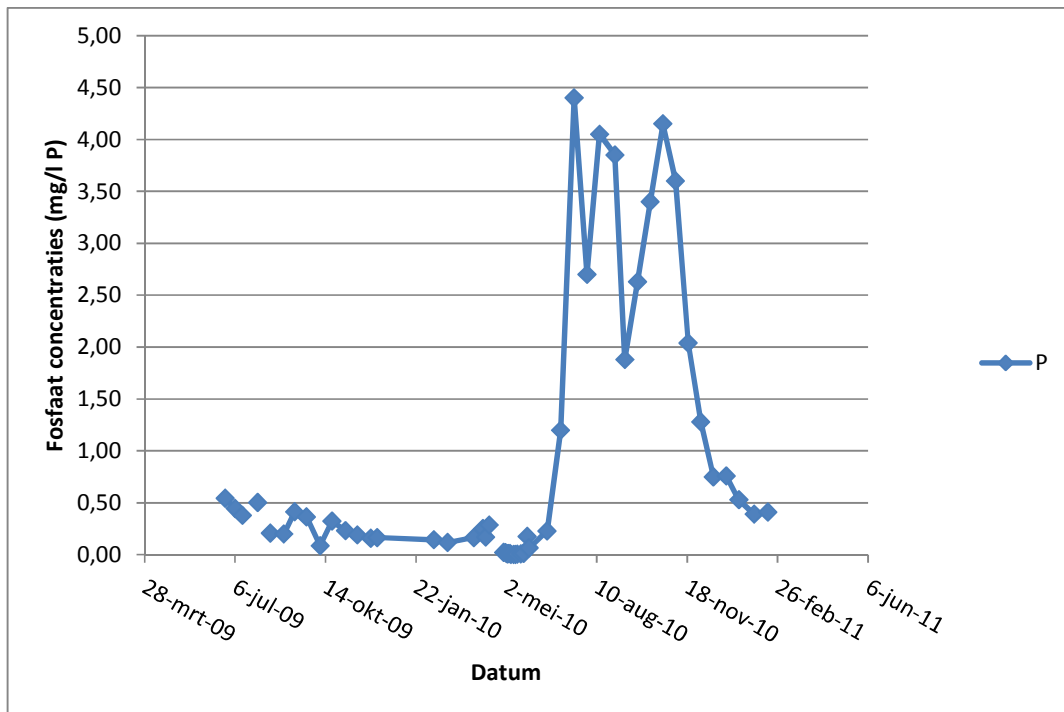
$164,2/1000$ (mg \rightarrow gram) = 0,1642

$(0,1642/101,1(\text{molmassa } \text{KNO}_3)) * 62(\text{molmassa } \text{NO}_3) = 0,0998$ ppm (mg.L^{-1})

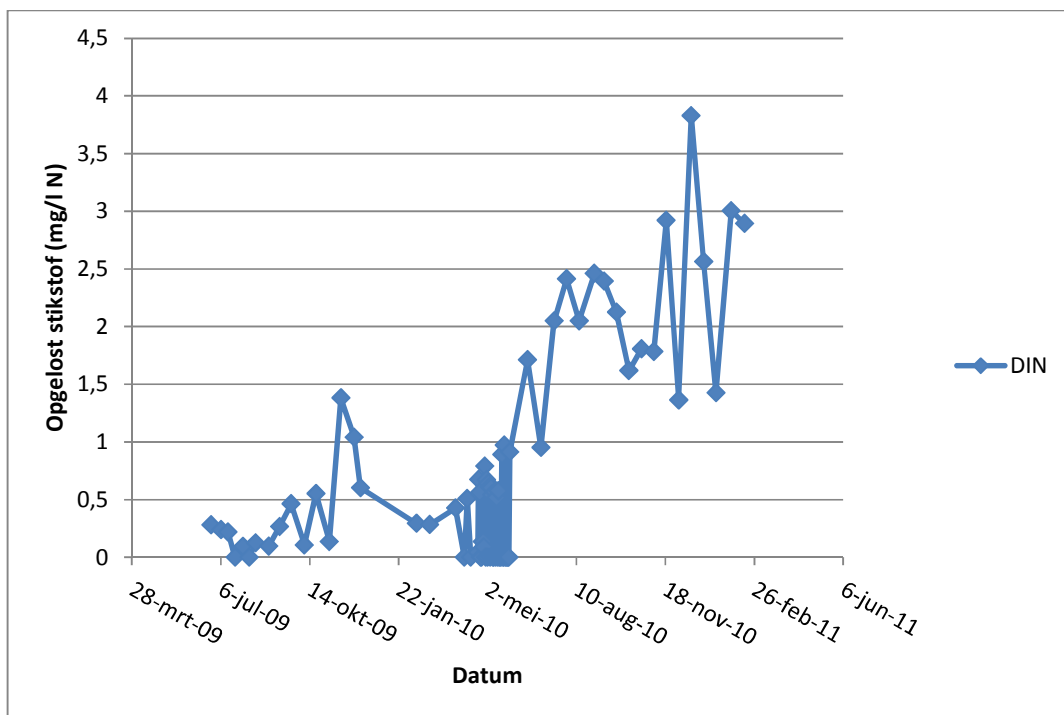
PROCEDURE METINGEN:

- Filtreer alle monster met .45 filter of Whatman GF/C filter
- Stel de Perkin Elmer spectrofotometer via 'Wave Program' in op golflengte 275 nm en 220 nm.
- Voer aantal monsters in, eventueel bijbehorende naam.
- Meet de blanco. (Hetgeen waarmee de kallibratie reeks is aangevuld, demiwater bij analyses in zoet water en synthetisch zeewater bij analyses in zout water.)
- Bij de Perkin Elmer spectrofotometer dienen bij het meten van de blanco twee quartz kuvetten geplaatst te worden. De achterste kuvet blijft gedurende alle analyses op zijn plek. De voorste kuvet wordt na het meten van de blanco met de te analyseren monsters gevuld.
- Meet de monsters. Let erop dat er geen luchtbelletjes aan de binnenkant van het kuvet zitten, of waterdruppels aan de buitenkant van het kuvet!
- Bepaal met behulp van de gemeten absorptiewaarden de factor (Factor = $\text{Abs.}(220 \text{ nm}) - 2 * \text{Abs.}(275 \text{ nm})$)
- Bepaal aan de hand van de verkregen formule uit de callibratiecurve de onbekende concentratie NO_3^- in het monster.
- Bij verdunning van monsters dient bij de berekening rekening gehouden te worden met de verdunningsfactor! Verdunning is nodig wanneer de factor hoger ligt dan de factor op de x as van de callibratiecurve.

BIJLAGE 4: ABSOLUTE CONCENTRATIES N EN P IN DE VIJVER VAN DE KMWP



Figuur 30: Fosfaatconcentraties in het water van de microalgenvijver van de KMWP. De data is afkomstig van het monitoringsprogramma van de microalgenvijver.



Figuur 31: Stikstofconcentraties in het water van de microalgenvijver van de KMWP. De data is afkomstig van het monitoringsprogramma van de microalgenvijver.

BIJLAGE 5: WAARDEN TIJDENS DE NUTRIENTENEXPERIMENT

Tabel 6: absolute hoeveelheden *Chaetomorpha linum* tijdens het nutriëntenexperiment.

Absolute hoeveelheden wier (g)

OSW +N	OSW ±	OSW +P	GW +N	GW ±	GW +P
50	50	50	50	50	50
65,49	53,7	48	75,72	90,63	80,44
149,7	119,2	102	119	122,7	89,6
158	117,7	121	132,7	117,2	106

Tabel 7: De specifieke groei van *Chaetomorpha linum* tijdens het nutriëntenonderzoek.

Specifieke groei van het wier (g/g/dag sinds vorig meetmoment)

t (dagen)	OSW +N	OSW ±	OSW +P	GW +N	GW ±	GW +P
0	nvt	nvt	nvt	nvt	nvt	nvt
6	0,04	0,01	-0,01	0,07	0,10	0,08
9	0,28	0,27	0,25	0,15	0,10	0,04
14	0,01	0,00	0,03	0,02	-0,01	0,03

Tabel 8: Aantallen *Pheodactylum tricornutum* tijdens het nutriëntenexperiment.

Aantallen algen (aantal/ml)

t (dagen)	OSW +N	OSW ±	OSW +P	GW +N	GW ±	GW +P
0	30400	30400	30400	30400	30400	30400
2	230000	250000	220000	410000	470000	460000
4	340000	500000	400000	540000	520000	530000
7	790000	710000	470000	560000	540000	530000
11	670000	300000	340000	450000	230000	240000
14	540000	230000	240000	340000	150000	90000

Tabel 9: De specifieke groei van *Pheodactylum tricornutum* tijdens het nutriëntenonderzoek.

Specifieke groei van het algen (g/g/dag sinds vorig meetmoment)

t (dagen)	OSW +N	OSW ±	OSW +P	GW +N	GW ±	GW +P
0	nvt	nvt	nvt	nvt	nvt	nvt
2	6,10	6,15	6,08	6,42	6,50	6,49
4	5,80	6,21	6,05	5,89	5,41	5,58
7	4,34	4,08	3,72	3,30	3,30	0,00
11	-2,92	-3,23	-2,94	-2,90	-3,16	-3,14
14	-3,93	-3,72	-3,84	-3,87	-3,76	-3,97