

Evaluatie van de kwaliteit
van tarbotpootvis op het
herstockeringssucces
in de Noordzee

**DUURZAAM BEHEER
VAN DE NOORDZEE**

65642

FEDERAAL WETENSCHAPSBELEID

**Plan voor wetenschappelijke ondersteuning van een beleid gericht op
duurzame ontwikkeling (PODO I)**

Duurzaam beheer van de Noordzee

...Z (vzw)
WIS INSTITUTE VOOR DE ZE
EPS MARINE INSTITUTE
Belgium

**Evaluatie van de kwaliteit van tarbotpootvis op het
herstockeringssucces in de Noordzee**

Eindrapport

**Promotor: Prof. P. Sorgeloos
Laboratorium voor Aquacultuur &
Artemia Reference Center
Universiteit Gent
Rozier 44
9000 Gent**

Inhoudstafel:

Inleiding.....	3
ONDERZOEK NAAR DE INVLOED VAN DE WATERKWALITEIT EN KWALITEIT VAN DE MOEDERDIEREN OP TARBOTLARVEN	
Abstract.....	6
Doelstelling	7
Materiaal en methoden	7
Resultaten	9
Besluiten	10
STUDIE NAAR HET EFFECT VAN GESELECTEERDE BACTERIESTAMMEN OP DE PRODUKTIE VAN JUVENIELE TARBOT	
Abstract.....	12
Doelstelling	13
Materiaal en methode	13
Resultaten	14
Besluiten	19
STANDAARDISATIE VAN EEN OPTIMAAL VOEDINGSREGIME EN VOEDSELSAMENSTELLING VOOR JUVENIELE TARBOT	
Abstract.....	22
Doelstellingen	23
Materiaal en methoden	23
Resultaten	25
Besluiten	28
HET EFFECT VAN PEROXIDATIEVE STRESS OP DE GROEI, KWALITEIT EN HET WEERSTANDSVERMOGEN VAN JUVENIELE TARBOT	
Abstract.....	30
Doelstellingen	31
Materiaal en methoden	31
Resultaten	33
Besluiten	34
KWALITEITSCONTROLE VAN TARBOTLARVEN EN JUVENIELEN	
Abstract.....	36
Doelstellingen	37
Inleiding.....	37
Materiaal en methoden	39
Resultaten	41
Besluiten	46
GENETISCHE DIFFERENTIATIE IN TARBOT VAN VERSCHILLENDE BELGISCHE VISGRONDEN	
Abstract.....	48
Inleiding.....	49
Materiaal en methoden	50
Resultaten en discussie	53
Besluit	56
ONDERZOEK NAAR HET OUDERLIJK GENETISCH EFFECT OP DE SELECTIE TIJDENS DE KWEK EN NA UITZETTEN	
Inleiding.....	56

Materiaal en methoden	57
Voorlopige Resultaten	58

TECHNISCHE HAALBAARHEIDSSSTUDIE VOOR EEN TARBOTKWEKERIJ AAN DE BELGISCHE KUST

Abstract.....	60
Doelstelling	61
Inleiding.....	61
Werkingsparameters & berekeningen	61
Produktiviteit	61
Waterkwaliteit.....	63
Konfiguratie kweekstelsel	64
Waterbehandeling	64
Besluiten	65
 Synthese van het onderzoek	 67
 Summary of the research	 71
 Literatuurlijst.....	 75

Inleiding :

De onderzoeksresultaten van dit project met betrekking tot het herstockeren van tarbot kunnen leiden tot een beter beheer van de bedreigde visstocks in de Noordzee door het opstellen van gefundeerde programma's voor een actief herbevolken met pootvis.

Er is speciale aandacht besteed aan de kwaliteit van de geproduceerde pootvis en verificatie daarvan, aangezien dit essentieel is voor het succes van herstockeringsprogramma's.

Er werd tevens gestreefd om de productie zo milieuvriendelijk te laten verlopen door zoveel mogelijk recirculatiesystemen te gebruiken, zowel voor de produktie van levend voedsel, als voor vislarven en juvenielen.

Voor de standaardisatie en optimalisatie van de broedhuis- en 'nursery' productie op laboschaal, werd voornamelijk aandacht besteed aan de impact van aquacultuur op de onmiddellijke omgeving en de invloed van bacteriën op de overleving van tarbotlarven.

Er werden verschillende voedsels getest om een voldoende hoge kwaliteit, stressbestendigheid, van de tarbotjuvenielen te bekomen. Er werden verschillende technieken aangewend om de kwaliteit te bepalen.

Tarbotlarven en -juvenielen afkomstig van genetisch gekende ouderdieren, werden gekarakteriseerd om opgekweekt om de invloed van de ouderdieren te bepalen en werden in een later stadium uitgezet in de Noordzee.

De resultaten van de technische haalbaarheidsstudie tonen aan dat door de slechte kwaliteit van het Belgisch kustwater er enkel kan gewerkt worden met een gesloten recirculatiesysteem. Naast de voordelen van de controle op de inname en uitstoot van water, kunnen de stookkosten voor een dergelijk systeem beperkt worden.

Uit het onderzoek is gebleken dat de eerste 7 dagen na het ontluiken nog steeds de meest kritische zijn. Doordat het immunosysteem van de larven slecht heel zwak is ontwikkeld in het begin, noteert men grote sterftes. Deze sterftes hebben een bacteriële oorsprong, want het gebruik van antibiotica resulteert in een veel betere overleving. Uit de resultaten van deze studie blijkt dat de tarbotlarven kunnen beschermd worden door het gebruik van geselecteerde bacteriestammen. Verder onderzoek in deze richting kan een duurzame oplossing bieden voor de vroege sterfte. Naast de directe enting van bacteriën in de cultuurtanken van de vislarven, moet ook aandacht besteed worden aan de bacteriële lading van het levend voedsel. Controle van de bacteriën in de rotiferencultuur of toedieningswijzen van de geselecteerde bacteriën aan het levend voedsel moeten nog verder worden onderzocht.

Het gebruik van recirculatiesystemen wordt meer en meer als belangrijk ervaren, ook door de sector zelf, zoals is gebleken in de congressen Larvi '01 en Larview 2001 gehouden te Gent begin september 2001. Dit houdt echter in dat er meer onderzoek moet worden verricht naar filtreermethodes. In het voorliggende onderzoek werd geprobeerd de tarbotlarven te houden in een recirculatie systeem vanaf de eerste dag. De waterstroming veroorzaakte echter teveel stress bij de larven. Ondertussen zijn er nieuwe technieken ontwikkeld waarbij geen waterstroming wordt gecreëerd, dit is de zogenaamde membraanfiltratie. Opgeloste stoffen diffunderen door de wand van een holle buis en worden dan naar een waterbehandelingseenheid gepompt. Door het herhaaldelijk heen en weer pompen wordt het behandelde water terug naar de kweektank gebracht. In verder onderzoek naar recirculatiesystemen voor heel jonge vislarven zou dit systeem best worden uitgeprobeerd.

Een technische haalbaarheidsstudie toegespitst op het gebruik van gesloten recirculatie systemen, niet alleen voor de tarbot, maar ook voor het levend voedsel, kan een beter licht werpen commerciële haalbaarheid rekening houdend met de dimensies van een commercieel bedrijf.

**ONDERZOEK NAAR DE INVLOED VAN DE WATERKWALITEIT EN KWALITEIT
VAN DE MOEDERDIEREN OP TARBOTLARVEN.**

P. DHERT¹, K. DIERCKENS¹, D. DELBARE², R. DECLERCK² & P. SORGELOOS¹

- ¹: Laboratorium voor Aquacultuur & Artemia Reference Center, Universiteit Gent
 Rozier 44, 9000 Gent
- ²: Departement voor Zeevisserij, Oostende
 Ankerstraat 1, 8400 Oostende

Abstract:

Tarbotlarven werden opgekweekt in 3 verschillende kweeksystemen. De groei, overleving en pigmentatie werd gevolgd de eerste 11 dagen na hatching. Het eerste systeem heeft een batch fase en daarna, vanaf dag 8, wordt iedere tank verbonden met een aparte biofilter. Het tweede is een recirculatiesysteem waarbij het water wordt gefilterd over een proteïnskimmer met ozoninjectie en een biofilter. Het derde is een recirculatiesysteem waarbij de larven in een kooi worden gehouden. Het water circuleert over een aparte biofilter.

Hoge mortaliteit in het begin van het experiment maakte éénduidige conclusies onmogelijk. De doorstroomsnelheid in beide recirculatiesystemen veroorzaakte te veel stress bij de larven. Het gebruik van probionten moet een alternatief bieden voor antibiotica in de toekomst.

Doelstelling

In deze experimenten worden tarbotlarven van verschillende moederdieren in 2 verschillende kweekopstellingen gehouden met de bedoeling de invloed van de waterkwaliteit en de kwaliteit van de moederdieren op de tarbotlarven te onderzoeken. In een tweede experiment wordt het effect van een recirculatie systeem op de groei en overleving van de tarbotlarven getest.

Materiaal en methoden

1. Transport en acclimatisatie van de proefdieren

De pas ontloken larven waren afkomstig van een kwekerij in Frankrijk (France Turbot, Noirmoutier). De larven werden getransporteerd in vier gedesinfecteerde plastic zakken met een densiteit van 30000 larven per zak. Na aankomst in het ARC vond de acclimatisatie plaats (temperatuur 15-16°C, saliniteit 35 ppt). Na de acclimatisatieperiode werden de larven overgebracht naar 24 donkergrijze cilindroconische PVC tanks van 100 l, gevuld met 70 l water.

2. Oorsprong en verdeling van de proefdieren

De vier groepen larven met een verschillende genetische achtergrond, waren de nakomelingen van twee wijfjes en twee mannetjes. De vier genetische combinaties waren A (wijfje AGBB1, mannetje 358), B (wijfje AGB02, mannetje 358), C (wijfje AGBB1, mannetje 222) en D (wijfje AGB02, mannetje 222).

De vier groepen werden verdeeld over twee verschillende kweeksystemen en gestockeerd met een densiteit van 60 larven per liter. Voor elke oudercombinatie waren er drie herhalingen in elk kweekstelsel.

De tarbotlarven in het tweede experiment waren afkomstig van 1 ouderpaar en werden verdeeld over de 2 opstellingen.

3. Kweeksystemen en kwaliteitsparameters

Het eerste kweekstelsel is het traditioneel recirculatiesysteem, waarbij elke kweektank individueel verbonden is met een biofilter voor waterrecirculatie (Dhert *et al.*, 1991).

In het tweede kweekstelsel zijn er 6 tanks verbonden met dezelfde biofilter, eiwitafschuimer en ozonisator. Via een overloopsysteem met een zeef van 350 µm kwam het water uit de tanks in waterreservoir terecht. Daarna werd het in de eiwitafschuimer gepompt. Na de eiwitafschuimer en ozonisator werd het water gezuiverd in een biofilter. Daarna kwam het met een constant en continu waterdebiet in de tanks terecht.

Een belangrijke parameter in een gesloten recirculatiesysteem is de waterkwaliteit. De eiwitafschuimer heeft een capaciteit van 55 l en een maximum waterdebiet van 1200 l/h (DBPr. 3525861 Aquarien Technik Klaes, Germany). Het zwevend

organisch materiaal in het water wordt verzameld in het schuim van de eiwitafschuimer. De fysische scheiding in de eiwitafschuimer is een eerste zuivering van het recirculatiewater (Suantika *et al.*, 2000). De ozon zorgt voor een desinfectie van het water. De biologische zuivering van het water gebeurt in een biofilter. Er werden 'airwaterlifts' in de biofilter geplaatst om aërobe omstandigheden te creëren en om een goede menging van het water te verzekeren.

Het derde systeem bestond uit een kooi, opgehangen in de tank, waarvan de wanden zijn bedekt met een gaas van 50µm. Dit gaas zorgt ervoor dat niet alleen de larven, maar ook de rotiferen en *Artemia* in de kooi blijven. Een luchtbellengordijn moest ervoor zorgen dat het gaas niet verstopt raakte. Via een overloop kwam het water terecht in een biofilter die op dezelfde manier als opstelling 2 werd geconditioneerd. Het water werd uit de biofilter opgepompt naar de tank.

Aangezien de larven zeer stressgevoelig zijn, is het belangrijk dat ze zo weinig mogelijk hinder ondervinden van deze waterstroom. Daarom werd de toevoer van het water verdeeld over 2 zijden van de kooi.

De biofilters van beide recirculatiesystemen werden 15 dagen vóór het begin van het experiment opgestart met ABIL, een mengsel van nitrificerende bacteriën. Dagelijks werd een ammoniumchloride-oplossing toegevoegd en werden de concentraties ammoniak, nitriet en nitraat alsook de saliniteit en temperatuur opgemeten. De saliniteitsmeting gebeurde met een refractometer (ATAGO). Door de verdamping van het zeewater kon de saliniteit oplopen. Dit werd gecorrigeerd met zoet water. De ammoniak-, nitriet- en nitraatgehaltes werden bepaald door middel van een testkit (Merck's Aquaquant). Het traditionele watersysteem werd opgestart op dag 8, wanneer de larven *Artemia* krijgen als voedsel. De recirculatiesystemen werden al gebruikt van in het begin van het experiment.

De temperatuur bedroeg in ieder systeem de eerste dag 15-16°C en werd verhoogd tot 19°C met maximum 1°C stijging per dag.

De eerste dag werden de dieren in het donker gehouden, maar na de pigmentatie van het oog (op dag twee) werd de lichtintensiteit geleidelijk verhoogd van 100 naar 400 lux.

4. Voeding

De derde dag na het ontluiten werden de larven voor het eerst gevoederd. Van dag 3 tot en met dag 10 werden rotiferen toegediend en vanaf dag 8 werden ook *Artemia* nauplii als voedsel gebruikt.

De larven werden tweemaal per dag gevoederd. Het aantal toegediende rotiferen en/of *Artemia* nauplii verhoogde van dag tot dag en dit volgens een strikt voederregime.

Op dag 4 kregen de larven rotiferen aangerijkt met DHA, vitamine C en vitamine E. De *Artemia* nauplii werden eveneens aangerijkt met hoog onverzadigde vetzuren

(HUFA's), vitamine C en vitamine E. *Artemia* naupli, ontloken na 24 uur incubatie, werden aangerijkt met een emulsie-oplossing (0.3 g/l) (Culture Selco, DHA/EPA= 4 ; INVE Aquaculture N.V., Belgium), vitamine C (10%) en vitamine E (1000 ppm). De aanrijking van de *Artemia* naupli duurde 24 uur met een densiteit van 200 individuen per ml en aan een temperatuur van 27°C.

Resultaten :

Het transport van de pas ontloken tarbotlarven vanuit Frankrijk veroorzaakte geen mortaliteit bij de larven. De larven waren 1 dag oud toen ze op het ARC aankwamen. Op de derde dag van het experiment was het aantal larven, aanwezig in het nieuw ontworpen recirculatiesysteem, echter sterk gedaald. Er werden larven waargenomen in de waterstroom van de recirculatie, waaruit blijkt dat de maaswijdte van de zeef te groot was. In vorige experimenten werden ook zeven gebruikt om de larven tegen te houden, maar daar werd de waterrecirculatie echter pas op dag 8 opgestart, terwijl het nieuwe recirculatiesysteem al vanaf dag 1 in gebruik werd genomen. Er kon echter geen verklaring gevonden worden waarom het effect niet hetzelfde was in alle kweektanks. In sommige kweektanks was de daling in larvale densiteit veel hoger dan in andere tanks. In het nieuwe recirculatiesysteem waren de drie kweektanks, opgevuld met larven afkomstig van wijfje AGB02 en mannetje 358 (groep B), de eerste tanks waarbij de larvale densiteit praktisch op nul terugviel. De reden van sterfte zou ook een genetische oorsprong kunnen hebben. Dhert *et al.* (1995) concludeerden eerder al dat de voeding van, of de genetische verschillen in, de broedstock een invloed hebben op de kwaliteit van tarboteieren en -larven. Vijf dagen later echter was het aantal waargenomen vissen in de andere groepen met meer dan de helft verminderd. De sterfte in groep A (wijfje AGBB1 en mannetje 358), groep C (wijfje AGBB1 en mannetje 222) en groep D (wijfje AGB02 en mannetje 222) was ook quasi 100%. Op dag 10 werd het experiment in het recirculatiesysteem stopgezet.

In het recirculatiesysteem waarbij de larven werden gehouden in de kooien, trad eveneens een hoge mortaliteit op. De meeste larven waren zwart gepigmenteerd. Van dag 1 tot dag 8 was er weinig sterfte waar te nemen in het traditioneel kweekstelsel ('batch' stelsel). Bij de overgang van rotiferen naar *Artemia* op dag 9 werd door een verkeerde berekening een overdosis *Artemia* toegediend. Dit veroorzaakte een mortaliteit van bijna 100%. Op dag 11 restten er geen dieren van groep B meer. De larven van de andere groepen waren sterker en overleefden langer, nochtans trad er ook dagelijks mortaliteit op. De meeste larven bleven zwart, wat erop wees dat ze onderhevig waren aan stress (Dhert *et al.*, 1994). Aan het eind van het experiment, op dag 22, werden de larven van de drie overgebleven groepen geherstockeerd in drie tanks. De overleving werd geschat op respectievelijk 1.3%, 2.2% en 2.7% voor de behandelingen A, C en D. Na dag 25 werden de larven

gespeend en werden ze samengebracht in 1 tank. Uiteindelijk werden er een 50-tal dieren getransporteerd naar Oostende voor verdere opkweek met als doel deze vissen te gebruiken voor het op punt stellen van testen van de bepaling van kwaliteitsklassen.

Besluiten :

Bij de kweek van de tarbotlarven was het de bedoeling de invloed van het waterrecirculatiesysteem op de kwaliteit van de larven te evalueren. De tarbot had een verschillende genetische achtergrond, waarvan het effect ook op de larvale kwaliteit werd onderzocht. Een hoge mortaliteit, reeds in het begin van het experiment, maakte éénduidige conclusies onmogelijk maar bevestigde wel dat de kweek van tarbotlarven nog altijd de grootste struikelblok is.

In het tweede experiment bleek dat de doorvloeisnelheid van het water in de kooi te snel was. Dat veroorzaakte heel waarschijnlijk stress, wat zich uitte in de zwarte pigmentatie.

In toekomstige experimenten is microbiologisch onderzoek nodig om het succes van de larvale kweek te garanderen. Ziekten, veroorzaakt door een bacteriële contaminatie, kunnen voorkomen en behandeld worden met antibiotica. Het doel van de kweek van tarbotlarven is echter de natuurlijke visbestanden aan te vullen, zodat het gebruik van antibiotica moet vermeden worden. Het toepassen van probionten is een goede optie om de ontwikkeling van pathogene bacteriën te inhiberen (Gatesoupe, 1991). Op deze manier kan men niet alleen dezelfde overlevingspercentages bekomen als met antibiotica, maar kan men deze zelfs verbeteren. Gatesoupe (1994) rapporteerde dat de resistentie van tarbotlarven tegen de pathogeen *Vibrio* was verhoogd door het voeden van rotiferen, gekweekt met melkzuurbacteriën (*Lactobacillus plantarum*).

**STUDIE NAAR HET EFFECT VAN GESELECTEERDE BACTERIESTAMMEN OP
DE PRODUKTIE VAN JUVENIELE TARBOT.**

P. DHERT, K. DIERCKENS & P. SORGELOOS

Laboratorium voor aquacultuur & Artemia Reference Center, Universiteit Gent
Rozier 44, 9000 Gent

Abstract:

In deze studie werd het effect van de toevoeging van geselecteerde bacteriën via het water en al dan niet via het voedsel op de overleving en groei van de vislarven bestudeerd. Vijf verschillende bacteriën werden gebruikt: *Vibrio proteolyticus*, *V. mediterranei*, *Aeromonas hydrophila*, *Glucanobacter sp* en een niet identificeerbare Cluster A.

Vanaf dag 5 was er een significant verschil in opname van de rotiferen tussen de controlebehandeling en de behandelingen met probionten. De bacteriële inoculatie van het kweekwater heeft een positieve invloed op de eerste colonisatie van de darm van de vislarven, maar dit kwam slechts na 3 dagen tot uiting.

De bacteriën die toegevoegd werden in de rotiferencultuur werden niet teruggevonden in de rotiferen zelf, waaruit blijkt dat de toevoeging van bacteriën voor de start van de voeding van de vislarven het meest invloed heeft.

Cluster A, *Vibrio proteolyticus* en *Glucanobacter sp.* hadden een positieve invloed op de overleving op dag 5 ten opzichte van de controle: 95%, 93%, 93% en 74% respectievelijk. Zowel *Aeromonas hydrophila* als *Vibrio mediterranei* vertoonden geen significant effect op de larvale overleving.

Uit de resultaten van de studie blijkt dat de geselecteerde bacterie stammen zo vroeg mogelijk moeten toegediend worden. Cluster A, *Vibrio proteolyticus* en *Glucanobacter sp.* zijn potentiële probionten die verder moeten getest worden op grote schaal.

Doelstelling

In dit deelaspect van het project werd getracht om de onmiddellijke omgeving van de tarbotlarven, namelijk de kweektanks en het kweekmedium zelf, op bacterieel vlak onder controle te krijgen door geselecteerde bacteriestammen. Het gebruik van die bacteriestammen (probioten) kan de negatieve interacties tussen de tarbotlarven en bacteriën verminderen. Het effect van verschillende geselecteerde bacteriestammen op de overleving en groei van de tarbotlarven werd nagegaan.

Materiaal en methoden

Gedurende het verloop van het project werden 5 verschillende stammen getest in 2 experimenten waarin de invloed van deze stammen op de larvale overleving werd onderzocht. De geselecteerde stammen, en hun oorsprong, worden weergegeven in Tabel I. Cluster A werd eerst getest in een traditioneel systeem. Daarna werd het effect van 5 stammen op de overleving van niet gevoederde larven getest.

Tabel I. Lijst van geselecteerde bacteriële stammen

Bacteriële stam	Geïsoleerd uit	Referentie
Cluster A	Tarbot <i>Scophthalmus maximus</i>	Huys et al., 2000
<i>Vibrio proteolyticus</i> Q113	Zeebrasem <i>Sparus aurata</i>	Grisez et al., 1996
<i>Vibrio mediterranei</i> Q40	Zeebrasem <i>Sparus aurata</i>	Grisez et al., 1996
<i>Glucanobacter</i> sp. ISOL11	Rotiferen <i>Brachionus plicatilis</i>	Rombaut et al., 1999
<i>Aeromonas hydrophila</i> LVS3	<i>Artemia nauplii</i>	Verschuere et al., 1999

De larven werden in beide experimenten gestockeerd aan een dichtheid van 60 larven/l. Het eerste experiment bestond uit drie verschillende behandelingen, die zich onderscheidten op het gebied van microbiële controle. Voor elke behandeling waren er acht replica's. In de controle groep werden geen probioten aangewend. Bij de tweede behandeling werd op dag 1 en dag 3 een bacteriële suspensie (10^5 CFU/ml) toegevoegd aan het kweekwater van de larven. Bij de derde behandeling werd de bacteriële suspensie toegevoegd elke drie dagen (op dag 1, dag 3, dag 6, ...). Bovendien werd bij behandeling 2 en 3 het kweekwater van de rotiferen preëemptief gecoloniseerd met een geselecteerde bacteriestam (10^9 CFU/ml). Deze geselecteerde stam werd ook dagelijks aan de rotiferen toegediend, zowel bij

behandeling 2 als behandeling 3, en dit zowel via de voedselketen (10^8 CFU/ml) als in het kweekwater (10^9 CFU/ml).

In de tweede reeks experimenten werden de verschillende geselecteerde bacteriële stammen bij alle behandelingen, uitgezonderd de controle behandeling, afhankelijk van het experiment op dag 1 en dag 3 of enkel op dag 3 toegediend aan een concentratie van 10^5 KVE.ml⁻¹. Op deze wijze werd tevens uitgetest of het moment van toediening een effect heeft op de larvale overleving. De totale duur van één experiment is 7-9 dagen.

1. Kweeksystemen en kwaliteitsparameters

Het kweekstelsel is het traditioneel recirculatiesysteem, waarbij elke kweektank individueel verbonden is met een biofilter voor waterrecirculatie (Dhert *et al.*, 1991). De maaswijdte van de netzeven bedroeg 300 µm. Het recirculatiesysteem werd opgestart op dag 8, wanneer de larven *Artemia* krijgen als voedsel.

In de tweede reeks experimenten werden de larven verdeeld over bekken van 1 liter (6 replica's), gevuld met een UV-gefilterd zeewater. Dagelijks werd de overleving bepaald. Op dag 4 en dag 5 na ontluijing werden microbiologische staalnamen van het zeewater en de darmflora van de larven genomen. Deze staalnamen werden uitgeplaat op Mariene Agar (MA Difco®, USA) en Thiosulphate-Citrated-Bile-Salt-Sucrose (TCBS Difco®, USA).

2. Voeding

Van dag 3 tot en met dag 10 na het ontluijen werden rotiferen toegediend en vanaf dag 8 werden ook *Artemia* nauplii als voedsel gebruikt.

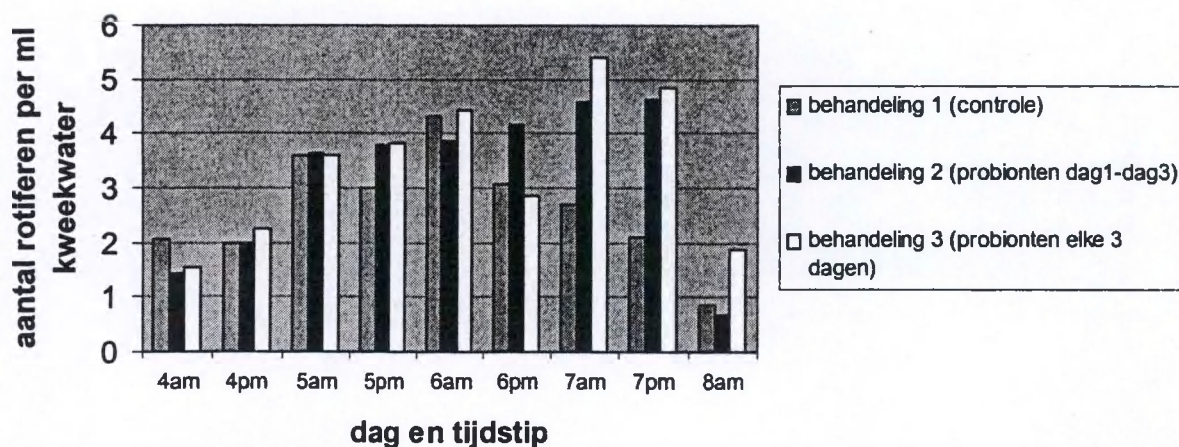
De larven werden tweemaal per dag gevoederd. Aan de rotiferen werd Culture Selco (INVE Aquaculture N.V., Belgium) toegediend. Via dit voedsel werd naargelang de behandeling al of niet cluster A toegediend. Cluster A werd niet alleen in het voedsel maar ook in het kweekwater van de rotiferen toegevoegd bij behandeling 2 en 3. Bij alle behandelingen werden de rotiferen om de vier dagen gespoeld en hergestockeerd.

De *Artemia* werden toegediend vanaf dag 8 en werden aangerijkt met PUFA's vanaf dag 12. Deze *Artemia* werden niet behandeld met geselecteerde bacteriën.

In het tweede experiment werd geen voedsel toegediend.

Resultaten

De consumptie van de rotiferen door de larven van de 3 verschillende behandelingen is in functie van dag en tijdstip weergegeven in figuur 1 voor het eerste experiment.



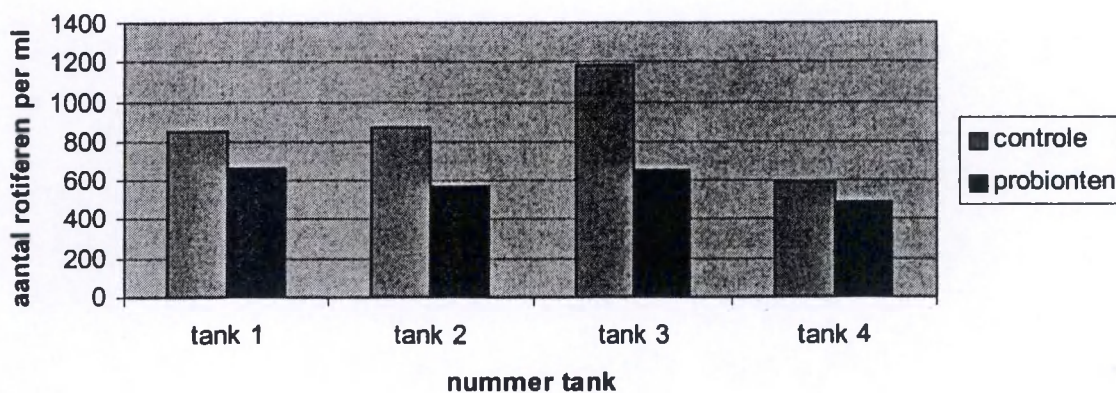
Figuur 1. De consumptie van rotiferen door tarbotlarven al dan niet behandeld met probioten.

Tot dag 5 was er geen verschil in opname van rotiferen tussen de drie behandelingen. Vanaf dag 5 in de namiddag was er een significant verschil in opname van de rotiferen tussen de controlebehandeling en behandelingen met probioten. Op dag 7 was hetzelfde effect aanwezig, zowel in de voor- als namiddag. Op dag 6 in de namiddag was de consumptie van rotiferen door de larven van behandeling 2 significant hoger. Hiervoor is er geen duidelijke verklaring. De andere dagen en tijdstippen was er geen merkbaar onderscheid tussen de behandelingen. De bacteriële inoculatie van het kweekwater heeft een positieve invloed op de eerste colonisatie van de darm van de vislarven (Sorgeloos, 1994), maar in ons experiment duurde het een paar dagen voor dit tot uiting kwam.

Vanaf dag 8 trad er een grote mortaliteit op bij alle drie de behandelingen. Planas (1994) berichtte al eerder dat dag 7-10 een periode is met een typische hoge mortaliteit bij tarbotlarven. Deze sterfte heeft tal van oorzaken zoals een lage kwaliteit van de eieren of de larven en onvoldoende nutritionele kwaliteit van de prooien (Minkoff & Broadhurst, 1994).

Op dag 8 werden tevens *Artemia* toegediend en werd het recirculatiesysteem opgestart. Een controle van de darminhoud toonde dat slechts enkele larven *Artemia* hadden opgenomen. Door de weigering van de opname van *Artemia* nam de sterfte toe tot ongeveer 100% en na dag 10 werd het experiment stopgezet. Op dag 8 werden nog monsters genomen van de larven om de kwaliteit te evalueren met behulp van een CEA-test.

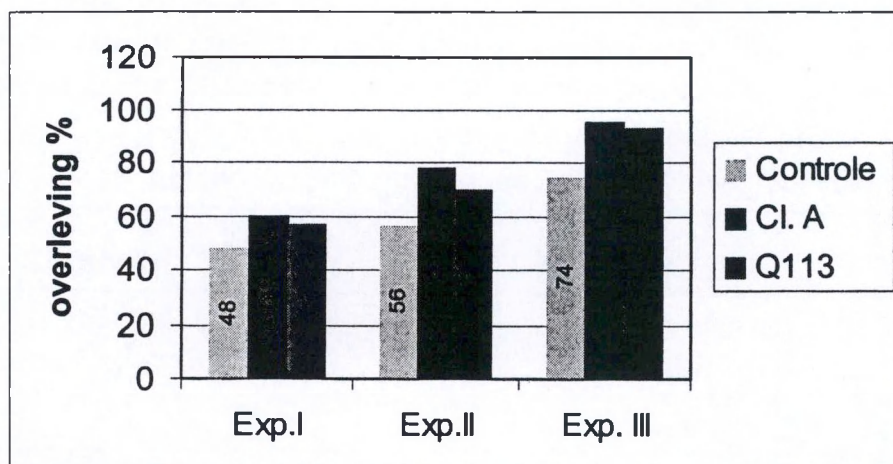
Door de korte duur van het experiment was men er niet in geslaagd verschillen in fysiologische conditie bij de tarbotlarven waar te nemen. Het effect van de geselecteerde bacteriestam kon ook bij de rotiferen onderzocht worden vermits deze tevens een verschillende behandeling ondergingen. Figuur 2 geeft de dichtheid van de rotiferen weer in de 2 kweeksystemen.



Figuur 2. De dichtheid van de rotiferen in de vier tanks van het kweekstelsel met en zonder probioten

In beide systemen werden 4 kweektanks gebruikt en werd dagelijks de dichtheid van de rotiferen geteld. De dichtheid van de rotiferen was significant hoger in de controlebehandeling. Een reden hiervoor kan zijn dat de rotiferen, behandeld met de geselecteerde bacteriestam, vlugger dan 4 dagen werden gespoeld en hergestockeerd aan de oorspronkelijke dichtheid. Op deze manier is niet dezelfde toename in groei mogelijk. Uit analyses bleek echter dat de geselecteerde bacteriestam niet aanwezig was in de rotiferen. Er was een te grote competitie met andere, minder gunstige bacteriën, zodat de stam niet kon opgenomen worden (Huys *et al.*, 2000). De tarbotlarven konden dus ook geen gunstige bacteriën krijgen via het voedsel en konden enkel profiteren van de toevoeging van bacteriën in het kweekwater. Vermits er geen significant verschil werd waargenomen tussen behandeling 2 en 3, kan worden verondersteld dat de toevoeging van gunstige bacteriën vóór de start van de voeding van de larven het meeste invloed heeft. Ringø *et al.* (1996) en Ringø & Vadstein (1998) vermelden dat de inoculatie van geselecteerde stammen de dag van ontluiken het beste tijdstip is en dat bacteriële colonisatie nog voor het levend voedsel is toegediend een positieve invloed heeft.

Uit de tweede reeks experimenten bleek dat zowel Cluster A als *Vibrio proteolyticus* Q113 een positief effect hadden op de larvale overleving t.o.v. de controlegroep. In experiment III bedroeg het verschil in larvale overleving tussen Cl. A en Q113 t.o.v. de controle groep 20 %. De overleving op dag 5 bedroeg 95% en 93% voor respectievelijk Cl. A en Q113 t.o.v. 74% voor de controle behandeling waaraan geen bacteriële stammen werden toegediend (Figuur 3). Deze resultaten werden bevestigd in verscheidene experimenten. De Kaplan-Meier statistische toets werd gebruikt om een significant verschil aan te tonen tussen de verschillende behandelingen.



Figuur 3. Vergelijking van de overlevingspercentages op dag 5 bij experimenten I II en III voor 3 verschillende behandelingen, nl. controle, Cl. A en Q113 (Deze laatste 2 bacteriële stammen werden zowel op dag 1 als op dag 3 toegediend)

Glucanobacter sp. ISOL11 had eveneens een significant positief verschil op de larvale overleving. De overleving op dag 5 bedroeg 93% t.o.v. 74% voor de controle groep. Zowel *Aeromonas hydrophila* LVS3 als *Vibrio mediterranei* Q40 vertoonden geen significant effect op de larvale overleving t.o.v. de controle groep.

Uit de resultaten van de larvale overleving bleek tevens dat toediening van de bacteriële stammen op dag 1 en dag 3 na ontluiking, een beter effect had op de larvale overleving dan een éénmalige toediening op dag 3 (de dag van de mondopening).

De resultaten van de bacteriële lading van het zeewater en de microbiële flora van de tweede reeks experimenten worden weergegeven in tabel II, III en IV. Bij de uitplantingen van de microbiële darmflora en het kweekwater bij experiment 2a hadden de behandelingen met Cl. A en de controle groep op MA kwantitatief ongeveer evenveel kolonies, circa 10^5 à 10^6 KVE.ml⁻¹. Toch werden er bij de behandelingen met Cl. A bijna geen of geen kolonies teruggevonden op TCBS. Dezelfde trend werd ook opgemerkt bij experiment 2b waar bij de uitplantingen van het zeewater, waaraan Cluster A werd toegediend, het aantal kolonies op TCBS aanzienlijk was gereduceerd t.o.v. de controle behandeling. Bij experiment 2a trad zelfs een complete inhibitie op van *Vibrio*'s op TCBS, indien de bacteriële suspensie met Cluster A op dag 1 en op dag 3 werd toegediend. Deze inhibitie van Cluster A was niet alleen terug te vinden in het kweekwater, maar ook in de microbiële darmflora van de larven. De hypothese van deze studie veronderstelt dat de gunstige effecten van een aantal bacteriën mogelijk te wijten zijn aan de vroege darmkolonisatie van geselecteerde probionten, zodat de kolonisatie van de darm door opportunistische pathogenen voorkomen wordt en deze gunstige effecten

zouden zich mogelijk vertalen in een verhoogde overleving van tarbotlarven. Deze geselecteerde bacteriële stammen zouden zo vroeg mogelijk moeten toegediend worden omdat er op dat moment minder competitie is voor de adhesieplaatsen en nutriënten in de darm (Ringø & Vadstein, 1998).

Tabel II. Bacteriële lading van het zeewater op dag 4 bij experiment 2a

Behandeling	KVE/ml	
	MA	TCBS
Controle	$5,7 \cdot 10^5$	$2,4 \cdot 10^3$
Controle	$8,1 \cdot 10^5$	$1,1 \cdot 10^3$
Q113 d1&3	$1,8 \cdot 10^6$	$1,3 \cdot 10^3$
Q113 d1&3	$1,8 \cdot 10^6$	$3,4 \cdot 10^3$
Q113 d3	$1,1 \cdot 10^5$	$7,2 \cdot 10^3$
Q113 d3	$9,7 \cdot 10^5$	$5,4 \cdot 10^3$
Cluster A d1&3	$1,3 \cdot 10^5$	0
Cluster A d1&3	$1,9 \cdot 10^6$	0
Cluster A d3	$6,9 \cdot 10^5$	$9,0 \cdot 10^2$
Cluster A d3	$9,3 \cdot 10^5$	$2,2 \cdot 10^3$

Tabel III. Bacteriële lading van microbiële darmflora op dag 5 bij experiment 2a

Behandeling	KVE/larve	
	MA	TCBS
Controle	$1,2 \cdot 10^3$	0
Controle	$2,1 \cdot 10^2$	0
Q113 d1&3	$1,4 \cdot 10^3$	0
Q113 d1&3	$1,5 \cdot 10^3$	0
Q113 d3	$6,6 \cdot 10^4$	$5,8 \cdot 10^3$
Q113 d3	$7,2 \cdot 10^3$	$6,0 \cdot 10^1$
Cluster A d1&3	$5,8 \cdot 10^3$	0
Cluster A d1&3	$4,2 \cdot 10^5$	0
Cluster A d3	$3,3 \cdot 10^4$	$1,9 \cdot 10^3$
Cluster A d3	$1,9 \cdot 10^3$	0

Tabel IV. Bacteriële lading van het zeewater op dag 4 bij experiment 2b

Behandeling	KVE/ml	
	MA	TCBS
Controle	$2,4 \cdot 10^6$	$4,0 \cdot 10^3$
Controle	$3,8 \cdot 10^5$	$5,0 \cdot 10^3$
Q113 d1&3	$1,4 \cdot 10^6$	$1,4 \cdot 10^3$
Q113 d1&3	$1,6 \cdot 10^6$	$4,3 \cdot 10^3$
Q113 d3	$1,4 \cdot 10^6$	$6,9 \cdot 10^3$
Q113 d3	$1,5 \cdot 10^6$	$5,3 \cdot 10^3$
Cluster A d1&3	$2,1 \cdot 10^5$	0
Cluster A d1&3	$2,5 \cdot 10^6$	$8,5 \cdot 10^1$
Cluster A d3	$1,2 \cdot 10^5$	$2,2 \cdot 10^2$
Cluster A d3	$1,3 \cdot 10^6$	$2,7 \cdot 10^2$

Bij de uitplantingen van de andere bacteriële stammen (LVS3, Q113 en ISOL11) trad geen inhibitie op van bepaalde *Vibrio* stammen. Cluster A en Q113 zouden dus zeker als mogelijke probiont kunnen gebruikt worden. Verder onderzoek dient echter wel uitgevoerd te worden, en dan vooral op grotere schaal om de effecten van de toediening van levend voedsel, dewelke een grote impact hebben op de bacteriële lading, op de werking van de geselecteerde bacteriële stam te bestuderen.

Besluiten

Een bacteriële inoculatie van het kweekwater vóór het begin van de voeding leidde tot een hogere consumptie van rotiferen. Een toevoeging van de bacteriestam in de kweek van de rotiferen bleek geen effect te hebben op dit radardierte. Door de sterke competitie met andere bacterie stammen, werd de probiotische stam verdrongen en dus kon de stam onmogelijk ook de kweek van de tarbotlarven gunstig beïnvloeden.

De resultaten van de tweede reeks experimenten hebben nog bevestiging nodig. Het was de eerste keer dat *Glucanobacter* sp. ISOL 11 werd uitgetest.

**STANDAARDISATIE VAN EEN OPTIMAAL VOEDINGSREGIME EN
VOEDSELSAMENSTELLING VOOR JUVENIELE TARBOT.**

D. DELBARE¹, A. VAN DEREECKEN², M. WILLE², K. DIERCKENS², R.
DECLERCK¹ & P. SORGELOOS²

¹: Departement Zeevisserij

Ankerstraat 1, 8400 Oostende

²: Laboratorium voor Aquacultuur & Artemia Reference Center, Universiteit Gent

Rozier 44, 9000 Gent

Abstract:

Het effect van toevoeging van Vitamine C en E aan een dieet gesupplementeerd met visolie op de kwaliteit van juveniele tarbot werd bestudeerd.

De tarbotjuvenielen werden gehouden in een recirculatiesysteem bestaande uit 3 tanks (elk 2m³) deze zijn verbonden met een drumfilter en een biologisch sproeifilter. Het gefilterde water wordt via UV-sterilisatoren terug naar de tanks gepompt. Er werden 650 juvenielen in iedere tank geplaatst die 3 maal/dag werden gevoederd met 1) een standaardkorrel (Provimi Turbot starter), 2) de standaardkorrel gecoat met 9% visolie (DHA/EPA=4), 10% Vit C en 3) cfr. 2 met toevoeging van 1000 ppm Vit E. Overleving en groei werden gevolgd tijdens het experiment en de lengte werd bepaald net voor het uitzetten. De kwaliteit werd bepaald aan de hand van een gemodificeerde saliniteit stresstest.

Toen de vissen in zee werden uitgezet, was er een significant lengteverschil. De vissen gevoederd met dieet 3 waren groter (16.04 ± 1.52) dan de controlegroep (15.17 ± 1.53). De vissen gevoederd met dieet 2 hadden een intermediaire lengte (15.62 ± 1.49). De overleving op het eind van de experimentele periode bedroeg 85%, 92% en 90% respectievelijk voor de 3 diëten.

Uit de resultaten van de gemodificeerde stress test bleek dat de dieren van dieet 2 het best de saliniteitsstress konden weerstaan. Het toevoegen van vitaminen, vooral Vit E en extra HUFA's aan het dieet verhoogt de kwaliteit van de juvenielen en is dus sterk aan te raden in herstockeringsprogramma's en voor commerciële doeleinden.

Doelstellingen:

In het eerste bestonden de 3 diëten uit een controledieet, een dieet rijk aan visolie en vitamine C en een dieet rijk aan visolie, vitamine C en E. Het was de bedoeling om het effect van Vit C en E na te gaan op de kwaliteit van de tarbotlarven. De kwaliteit van de larven werd bepaald aan de hand van de fagocytosecapaciteit.

Materiaal en methoden

De eieren voor het eerste experiment waren afkomstig uit een commerciële kwekerij in Frankrijk (France Turbot, Noirmoutier). De ei-ontluiking en de larvale kweek gebeurden in het Laboratorium voor Aquacultuur & Artemia Reference Center (ARC) te Gent. Op een leeftijd van 127 dagen werden 1950 tarbotjuvenielen vervoerd van Gent naar het Departement Zeevisserij-CLO in Oostende, waar de verdere opkweek plaats had.

1. Kweekstelsel

Het circulatiesysteem omvat ± 18000 l en bestaat uit 3 tanks van 2 m^3 met centrale afvoer en 19×120 l tanks. Het effluent water wordt via een drumfilter ($40\text{ }\mu\text{m}$ maaswijdte) geleid naar het biologisch sproeifilter (10 m^3) gevuld met Bionet 200 PE (met een specifiek oppervlak gelijk aan 260 m^2 per m^3). Het gefilterde water wordt via twee UV-sterilisatoren (elk 80 W) terug naar de viltanks gepompt. De temperatuurscontrole gebeurt aan de hand van twee koelaggregaten en een teflon spiraalverwarming (12 kW) met bijhorende thermostaat. Een blower ($5\text{ m}^3/\text{h}$) verzorgt de aëratie van het water. Tevens wordt het zwevend organisch materiaal uit het water verwijderd door een eiwitafschuimer.

Dagelijks wordt het systeem op waterkwaliteit gecontroleerd, om zo vlug en adequaat te kunnen ingrijpen bij een plotse achteruitgang in waterkwaliteit. De gecontroleerde parameters zijn saliniteit, pH, karbonaathardheid, en concentraties aan ammonium, nitriet, nitraat, fosfaat en de temperatuur.

2. Voeding

Driemaal daags werden de dieren gevoederd met Provimi Turbot starter. Dit complete voer werd speciaal voor tarbot ontwikkeld en bestaat uit viseiwitten van hoge kwaliteit met toegevoegde attractantia. Verteerbaarheid was hierdoor meer dan 95%. De geëxtrudeerde korrels zijn traag zinkend, wat de voedselopname bevorderde. In het totaal werd dagelijks ongeveer 4% van het lichaamsgewicht gevoederd.

Aan de drie tanks, met in elke tank 650 tarbotjuvenielen, werd een verschillend dieet toegediend, namelijk een standaardkorrel, een standaardkorrel verrijkt met visolie en vitamine C en een standaardkorrel verrijkt met visolie en vitamine C en E. Als de standaardkorrel verrijkt was, werd deze gecoat met 9% olie met een DHA/EPA

verhouding van 4. De oliefractie omvatte 10% vitamine C (onder palmitaat vorm) en/of 1000 ppm vitamine E acetaat.

Analyse van de standaardkorrel : (Provimi Turbot starter)	Ruwe eiwitten	62%
	Ruwe vetten	11%
	Ruwe vezels	0.5%
	As	10%
	Vocht	8%
	Vitamine A	20000 IE/kg
	Vitamine C	200 mg/kg
	Vitamine D ₃	2000 IE/kg
	Vitamine E	100 mg/kg

3. Groei en overleving

Iedere dag werd er gecontroleerd op dode dieren. Indien dit het geval was, werden deze uit de visstank verwijderd, en zo werd voor iedere tank en dus voor elk dieet een cumulatieve mortaliteit genoteerd. De registratie van de mortaliteit gebeurde tot 3 weken voor het uitzetten van de dieren. Wegens technische redenen kon de laatste mortaliteit maar tot 272 dagen na het ontluiten van de tarbot waargenomen worden. In elke tank werd op een deel van de populatie, namelijk bij dertig individuen, lengtemetingen uitgevoerd. Deze metingen gebeurden op een halve centimeter nauwkeurig en vonden plaats toen de dieren 211, 242 en 272 dagen oud waren. De vissen waren toen al respectievelijk gedurende 84, 115 en 145 dagen met de drie verschillende diëten gevoederd. Men bekwam drie resultaten en zo kon men een evolutie in groei waarnemen.

Bij het merken van de tarbot, juist vóór het uitzetten in zee, werd de lengte van alle vissen eveneens gemeten bij een leeftijd van 298 dagen. Na 171 dagen werd het experiment beëindigd.

4. Saliniteit stresstest

De test die werd uitgevoerd is een variant van de saliniteit stresstest beschreven door Dhert *et al.* (1992). In dit experiment was de stressindicator geen index gebaseerd op de sterfte van de dieren vermits de tarbot betrokken was in een restockingsproject en de dieren de stresstest dus moesten overleven. Bij deze test was de stressindicator de respiratiegraad van de dieren. Een hogere respiratiegraad wijst op een meer gestresseerde situatie en een grote wijziging in de respiratiegraad wijst op een slechtere fysiologische conditie van de proeforganismen.

Bij het experiment, dat werd uitgevoerd één maand voor het uitzetten in zee, werd de tarbot verplaatst van de vistanks naar kleinere aquaria met een hogere saliniteit. De saliniteit werd verhoogd van 35 ppt naar 60 ppt. De dieren ondergingen gedurende

tien minuten een saliniteitsschok. Daarna werd de respiratiegraad gedurende één minuut gemeten. Hierbij werd gekeken naar de beweging van de mond of de kieuwen. Er werd gemeten hoeveel maal het operculum op en neer ging of hoeveel maal de mond open en dicht ging.

Om het recuperatievermogen waar te nemen, werden de juvenielen vijf minuten in kleinere aquaria met een normale saliniteit (35ppt) geplaatst. Weer werd de respiratiegraad gemeten gedurende één minuut.

Voor elk individu zijn er bij elke test twee metingen uitgevoerd. Voor elke test werd een steekproef genomen van twintig individuen, afkomstig uit één van de drie tanks.

Er werden ook controlemetingen uitgevoerd in de vistanks zelf. Gedurende één minuut werd de respiratiegraad van 40 individuen gemeten en dit werd gedaan in elk van de drie tanks. Op deze manier bekomen we de respiratiegraad in rusttoestand.

In het water met hoge saliniteit stijgt de respiratiegraad. De mate waarin deze respiratiegraad stijgt, is een maat voor de resistentie tegen een saliniteitsschok. De dieren met een minder hevige reactie (een minder grote stijging van de respiratiegraad) zijn beter bestandig tegen stress en hebben een betere conditie.

5. Bepalen van de fagocytosecapaciteit

Er werden telkens 3 verschillende tarbotten van ieder voedselrégime onderzocht op de fagocytosecapaciteit. Op het bloedmonster van elke vis werd de bepaling van de fagocytosecapaciteit drie maal herhaald.

Het volledige protocol wordt beschreven in het deel 'Kwaliteitscontrole van tarbotlarven en juvenielen'.

Resultaten

1. Groei en overleving

De gegevens van de groei van de tarbotten, die gedurende 5 maanden gevoed werden op Provimi, Provimi verrijkt met visolie en vitamine C of Provimi verrijkt met visolie, vitamine C en vitamine E staan vermeld in Tabel I.

Tabel I : De lengte (in cm) van de tarbot, gevoederd met 3 diëten, en gemeten op 4 verschillende tijdstippen.

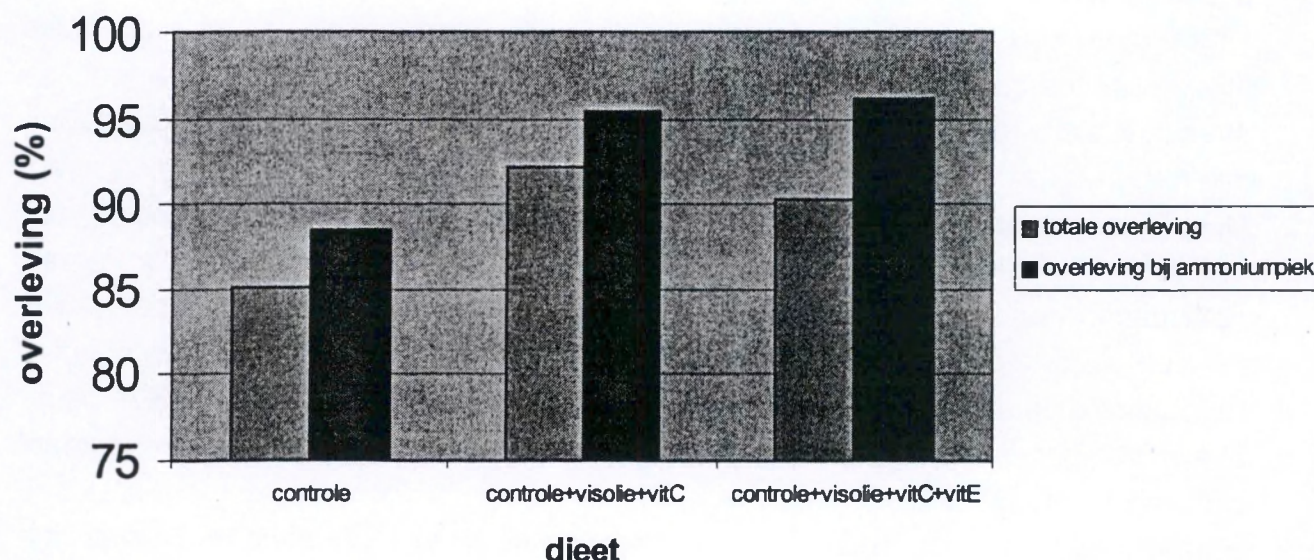
		Controle	Controle+ visolie+vitC	Controle+ visolie+vitC+vitE
ouderdom van de dieren	duur van het experiment			
211 dagen 12.25 ± 1.16	84 dagen	12.13 ± 1.17		12.17 ± 1.15
242 dagen 14.12 ± 1.36	115 dagen	13.80 ± 1.28		13.80 ± 1.31
272 dagen 15.87 ± 1.34 ^a	145 dagen	14.76 ± 1.64 ^b		15.43 ± 1.21 ^{ab}
298 dagen 16.04 ± 1.52 ^a	171 dagen	15.17 ± 1.53 ^c		15.62 ± 1.49 ^b

* getallen zonder superscript zijn niet significant verschillend

Pas na 4 maand toediening van de diëten konden er significante verschillen tussen de behandelingen waargenomen worden. De vissen, gevoederd met een supplement visolie en vitamine C en E waren significant groter dan de vissen van de controlegroep. Bij de tarbot, gevoederd met dieet 2, werd een intermediaire lengte waargenomen. Op dag 171, de dag waarop het experiment beëindigd werd en de vissen in zee werden uitgezet, was er een significant verschil waarneembaar in de lengte van de vissen gevoed op de 3 diëten. De vissen uit de controlegroep waren het kleinst. De tarbot, gevoederd met een supplement visolie en vitamine C, was significant groter dan de controlegroep. De vissen, die het voeder aangerijkt met visolie, vitamine C en E, ontvingen, waren significant groter dan de tarbot gevoed met dieet 2.

De positieve invloed van de vitaminen en de HUFA's op de groeisnelheid is belangrijk wanneer de vissen betrokken zijn in een stockeerproject. Omdat bij het uitzetten van de dieren in zee het risico van predatie vermindert bij toenemende grootte, is een hoge groeisnelheid voordelig voor de overleving in zee. De groeisnelheid van de uitgezette vis hangt in hoge mate af van de voorafgaande kweekomstandigheden, zoals het dieet dat een significante invloed heeft op de groeicapaciteit van de gekweekte vis (Howell, 1994). Het toevoegen van vitaminen, vooral vitamine E, en extra HUFA's aan het dieet is dus aangeraden in

stockeerprogramma's en natuurlijk ook voor commerciële doeleinden. Een vis, die vlugger de gewenste marktgrootte bereikt, levert grotere economische voordelen op. De invloed van de 3 diëten op de overleving van de tarbot is weergegeven in Figuur 1.



Figuur 1. De overleving (in %) van de tarbotten gevoederd met Provimi, Provimi verrijkt met visolie en vitamine C of Provimi verrijkt met visolie, vitamine C en E.

Op het eind van de experimentele periode (171 dagen) bedroeg de totale overleving voor dieet 1 (standaardkorrel), dieet 2 (standaardkorrel+ visolie+ vit C) en dieet 3 (standaardkorrel+ visolie+ vit C+ vit E) respectievelijk 85%, 92% en 90%. Deze overleving zou bij tarbotjuvenielen hoger moeten zijn. De lagere overleving was vooral het gevolg van een probleem met de waterrecirculatie, die plaats vond op dag 270 van het experiment. Gedurende drie dagen werd in het water een hoge ammoniumpiek vastgesteld. Deze stress-situatie veroorzaakte een grote mortaliteit in de drie tanks. Er werd een sterfte van 12%, 5% en 4% genoteerd. De controlegroep leed het meest onder deze situatie. De vitamines en HUFA's in het voeder verhoogden de weerstand van de tarbot tegen deze stress. Als we deze periode niet in beschouwing nemen, krijgen we een overleving van respectievelijk 96%, 97% en 94% voor de 3 behandelingen. Dit zijn normale overlevingspercentages voor juveniele tarbot.

De resultaten van de overleving leveren interessante informatie op. Vermits de controlegroep minder weerstand heeft tegen stress, bestaan er kwalitatieve verschillen tussen de behandelingen. De aangerijkte voeders verhogen de overleving van juveniele tarbot in stress-situaties. Een supplement vitamine E in het dieet had

bovendien een extra positieve invloed op de groei. Door een wijziging in de samenstelling van het voeder is het mogelijk kwalitatieve verschillen bij tarbot te creëren. Stresstesten kunnen dit verschil in dieetkwaliteit of nutritionele onevenwichten verduidelijken.

2. Saliniteit stresstest

Uit de gegevens die verzameld zijn, blijkt dat een optimalisering van de nutritionele inputs van de gekweekte vis belangrijk is voor maximalisering van de groei, de stresstolerantie en de overleving (Howell, 1994). Groei, stresstolerantie en overleving zijn parameters die verschillen in fysiologische conditie bij vissen kunnen weergeven. Dergelijke criteria die de kwaliteit van de vis bestemd voor het uitzetten in zee bepalen, zijn noodzakelijk omdat dit het effect van de stockeringsprogramma's beïnvloedt. Vissen met een hogere stressweerstand en vitaliteit zullen meer kans hebben om in zee te overleven en zullen bovendien beter in staat zijn tot reproductie. In tegenstelling tot overleving en groei kan een stresstest kwaliteitsverschillen bij de dieren vlugger aantonen. Er zijn minder lange experimentele periodes nodig zodat zelfs in het larvaal stadium al een verschil in fysiologische conditie van de dieren kan worden waargenomen. Toch zijn parameters zoals groei, overleving en osmotische regulatie niet voldoende om de kwaliteit van de vis weer te geven (Tsukamoto & Masuda, 1997) en moet gezocht worden naar meer gevoelige criteria die in staat zijn kleine kwalitatieve verschillen naar voor te brengen.

3. Fagocytosecapaciteit

De resultaten van deze tests worden vermeld onder "Kwaliteitscontrole van tarbotlarven en juvenielen.

Besluiten

Bij de kwaliteitsevaluatie van de tarbotjuvenielen kwam de hoge behoefte van tarbot aan vitamine C in stresssituaties tot uiting. Een positief effect van vitamine E in de saliniteit stresstest was niet waarneembaar. Een hogere groeisnelheid en een betere overleving was wel aantoonbaar als beide vitaminen en HUFA's in het voeder aanwezig waren.

**HET EFFECT VAN PEROXIDATIEVE STRESS OP DE GROEI, KWALITEIT EN
HET WEERSTANDSVERMOGEN VAN JUVENIELE TARBOT.**

A. VAN DEREECKEN, M. WILLE, P. DHERT & P. SORGELOOS

Laboratorium voor Aquacultuur & Artemia Reference Center, Universiteit Gent
Rozier 44, 9000 Gent

Abstract:

Een experiment werd uitgevoerd om het effect van oxidatie van de olie in het voeder op de Vit E behoefte bij juveniele tarbot na te gaan. Dieten met verschillende gehalten Vit E (0 of 200 ppm) in combinatie met al dan niet geoxideerde triglyceride olie (60 of 7 meq peroxide/Kg). Een standaard ICES weaning dieet werd gebruikt als controle.

Nat en droog gewicht van de volledige vis en de lever, specifieke groeisnelheid, hepatosomatische index en Vit E en C gehalte in de lever werden bepaald.

Op het einde van het experiment waren het gewicht en de specifieke groeisnelheid van de vissen gevoederd met het dieet zonder Vit E en met geoxideerde olie significant lager dan die van de andere vissen. Uit een tweevoudige variantieanalyse bleek dat er een significant effect was van de oxidatie, maar niet van het Vit E gehalte in het voeder op het gewicht en de specifieke groeisnelheid. Het gewicht van de lever en de hepatosomatische index daarentegen waren afhankelijk van het Vit E gehalte in het voeder. De voeders zonder Vit E resulteerden in een hoger levergewicht en een grotere hepatosomatische index.

Reeds na 36 dagen werd het tocopherolgehalte in de voeders gereflecteerd in de tocopherolgehaltes van de levers.

Doelstelling:

Het doel van deze reeks experimenten was de effecten van een verhoogde peroxidatieve stress heeft op de groei, kwaliteit en het weerstandsvermogen van de juveniele tarbot te bepalen.

Materiaal en methoden:**1. Oorsprong van de dieren:**

De juveniele tarbot (75 dagen) werden opgestuurd vanuit een commerciële kwekerij (France Turbot, Ile de Noirmoutier, Frankrijk). De dieren werden in een 1000 L container, gevuld met zeewater op 4°C en voorzien van voldoende beluchting, vervoerd.

In het labo werden de dieren voorzichtig geacclimatiseerd gedurende een week in een tank van 1000 L die was verbonden met een biofilter om het geproduceerde ammonium te verwijderen. De temperatuur werd traag verhoogd tot 19°C. Tijdens deze week werden de vissen gevoederd met een ICES dieet.

2. Diëten:

Er werden 5 verschillende diëten getest. Vier diëten werden door Ewos Ltd. (UK) geformuleerd. Ze bestonden voor 87.4 % uit een geëxtrudeerd basis dieet, gecoat met 12.6% triglyceride visolie. De diëten verschilden van elkaar door de peroxidatieve waarde van de olie (7 of 60 meq/kg) en door de hoeveelheid Vitamine E dat er werd toegevoegd (0 of 200 ppm) (tabel I). De peroxidatie van de olie werd bekomen door verhitting in een zuurstofrijke omgeving. Het vijfde dieet was een standaard ICES dieet dat werd gebruikt als controle dieet .

Tabel I: Samenstelling van de experimentele diëten:

	Dieet HO	Dieet HXO	Dieet HXE	Dieet HE
Geëxtrudeerd basis dieet				
Vismeel	72.0	72.0	72.0	72.0
Zetmeel	10.0	10.0	10.0	10.0
Finnstim/betafin	0.5	0.5	0.5	0.5
Premix mineralen M2	2.4	2.4	2.4	2.4
Vit. E premix	0.5	0.5	0.5	0.5
Vit. E vrije visolie	2.0	2.0	2.0	2.0
Coating				
Vit. E vrije visolie	12.6	0	0	0
Geoxideerde Vit. E vrije visolie	0	12.6	0	0
Visolie + Vit E (200 ppm)	0	0	0	12.6
Geoxideerde visolie + Vit. E (200 ppm)	0	0	12.6	0

De vissen werden gestockeerd aan een dichtheid van 93 vissen per tank (30L). Er werden telkens 5 tanks aangesloten op 1 biofilter van 100L. In de biofilter werden ammonium en nitriet door *Nitrosomonas* en *Nitrobacter* bacteriën verwijderd.

Dagelijks werd de waterkwaliteit (saliniteit, ammonium en nitriet) en de temperatuur gecontroleerd en werd 50 % van het water ververs.

Er werd een dag/nacht cyclus toegepast (12/12).

In iedere tank die op dezelfde biofilter werd aangeschakeld, werd er een ander dieet uitgetest.

3. Staalname en analyse:

Voor het experiment begon, werden de vissen gedurende 24 uur niet gevoederd en werd het nat en droog gewicht bepaald aan de hand van 20 vissen.

Voor de volgende analyses werden 4 keer 3 vissen gebruikt: de vetsamenstelling en -hoeveelheid, de activiteit van anti-oxidatie enzymen, de peroxidatie producten en Vitamine C en E.

Na 5 en 10 weken werden opnieuw stalen genomen. Om contaminatie door de maaginhoud te vermijden, werden de dieren 24 uur voor de staalnamen niet meer gevoederd. Er werden stalen genomen van de volledige vis en van de lever. De vissen werden verdoofd met een phenoxy-ethanol verdunning voor ze werden gedissecteed op ijs. Direct nadat de lever uit de vis werd gedissecteed werd ze

gespoeld met stikstof en bevroren op -80°C om oxidatie te voorkomen. Telkens werden het nat en droog gewicht van de vis en de lever bepaald. Uit deze resultaten werd de specifieke groei snelheid bepaald gebruikmakende van de volgende formule: $(\ln \text{NG}_t - \ln \text{NG}_{t_0})/t$, waarbij NG_t het nat gewicht is op moment t , NG_{t_0} het initiële nat gewicht en t het aantal dagen.

De hepatosomatische index (HSI) werd berekend aan de hand van de volgende formule:

$$\text{gewicht lever/lichaamsgewicht} \times 100$$

Resultaten:

In Tabel II, worden de groeiparameters weergegeven van de staalnamen na 5 en 10 weken.

Tabel II: Groeiparameters van tarbotlarven gevoederd met verschillende diëten.

Na 5 weken	HO	HXO	HXE	HE	Controle
NG (g)	3.02 ± 0.65^b	2.61 ± 0.65^c	2.52 ± 0.69^c	2.75 ± 0.59^{bc}	3.76 ± 1.02^a
DG (g)	0.627	0.623	0.545	0.614	
NG lever (mg)	37.85 ± 6.38^a b	27.92 ± 4.4^c	29.59 ± 6.4^c	33.73 ± 7.98^{bc}	48.86 ± 13.80 a
DG lever (mg)	10.66 ± 2.38	6.44 ± 0.29	9.51 ± 1.8	8.49 ± 1.95	13.48 ± 5.22
HIS (%)	1.25 ± 0.19^a	1.07 ± 0.15^a	1.16 ± 0.22^a	1.23 ± 0.25^a	1.21 ± 0.07^a
SGR (%)	3.74 ± 0.68^b	3.04 ± 0.72^e	2.92 ± 0.78^c	3.2 ± 0.63^{bc}	4.09 ± 0.66^a
Na 10 weken					
NG (g)	8.06 ± 1.97^{ab}	6.81 ± 1.94^c	7.02 ± 2.09^{bc}	7.01 ± 0.93^{bc}	9.59 ± 2.00^a
DG (g)	2.17 ± 0.47^a	1.63 ± 0.68^a	1.67 ± 0.66^a	1.99 ± 0.54^a	2.24 ± 0.45^a
NG lever (mg)	97.70 ± 18.0 3 ^a	89.73 ± 14.02 a	79.06 ± 17.51 a	77.06 ± 10.48 a	68.61 ± 21.52 a
DG lever (mg)	28.56 ± 10.4 7	227.6 ± 4.17	20.02 ± 3.89	18.74 ± 2.20	21.86 ± 8.23
HIS (%)	1.26 ± 0.10	1.26 ± 0.13^b	1.12 ± 0.14^b	1.16 ± 0.14^b	0.76 ± 0.19^a
SGR (%)	2.97 ± 0.36^{ab}	2.72 ± 0.42^c	2.76 ± 0.42^b	2.76 ± 0.41^b	3.23 ± 0.32^a

Waarden uit het bovenste of onderste deel van de tabel in dezelfde kolom met en verschillend superscript zijn significant verschillend met $p < 0.05$.

De vissen gevoederd met het controle dieet groeiden het best en hadden de laagste HSI. Vissen gevoederd met het dieet dat geoxideerde olie en geen Vitamine E bevatte hadden een significant lagere groeisnelheid dan de andere vissen van de andere behandelingen.

Uit de resultaten van de staalnamen na 5 weken blijkt dat het gewicht en de SGR van de vissen die een dieet kregen met een laag vitamine E gehalte lager waren

ongeacht de oxidatieve status van de olie. Peroxidatie van de olie resulteerde in een lager lichaams- en levergewicht en een lagere groei snelheid ongeacht het vitamine E gehalte in het dieet (tabel III).

Tabel III: De resultaten van 2 way-ANOVA (p-waarden) voor de staalnamen na 5 weken.

	Vitamine E gehalte	Peroxidatieve waarde	Interactie
NG vis	P= 0.010	P=0.000	P=0.207
SGR	P=0.013	P=0.000	P=0.352
NG lever	P=0.463	P=0.000	P=0.086

Na 10 weken, blijkt dat de oxidatie van de olie een negatief effect had op het lichaamsgewicht en op de specifieke groeisnelheid. Het gewicht van de lever en de HSI werd beïnvloed door het gehalte aan vitamine E in het dieet. Vissen gevoederd met een dieet zonder Vitamine E hadden een hoger levergewicht en HSI dan de andere vissen (tabel IV).

Tabel IV: De resultaten voor een 2 way-ANOVA (p-waarden) voor de staalnamen na 10 weken.

	Vitamine E gehalte	Peroxidatieve waarde	Interactie
NG vis	P=0.169	P=0.041	P=0.038
SGR	P=0.162	P=0.040	P=0.045
NG lever	P=0.021	P=0.638	P=0.435
HIS	P=0.031	P=0.694	P=0.831

Besluiten:

Vissen die gevoederd worden met een dieet met een supplement Vitamine E hadden een groter gewicht. Een dieet met niet-geoxideerde olie heeft een betere groei.

KWALITEITSCONTROLE VAN TARBOTLARVEN EN JUVENIELEN.

K. DIERCKENS¹, D. DELBARE², R. A. RUEDA¹, R. DECLERCK² & P. SORGeloos¹

¹ :Laboratorium voor Aquacultuur & Artemia Reference Center, Universiteit Gent
Rozier 44, 9000 Gent

²: Departement Zeevisserij
Ankerstraat 1, 8400 Oostende

Abstract:

De kwaliteit van de tarbotlarven werd bepaald aan de hand van 3 verschillende, reproduceerbare testen: de saliniteit stresstest, de Cellulaire Energie Allocatie methode en de bepaling van de fagocytosecapaciteit.

In de eerste test was de stressindicator de respiratiegraad van de dieren. Een hogere respiratiegraad wijst op een meer gestresseerde situatie en een slechtere fysiologische conditie van de proeforganismen. Het CEA-concept is een goed alternatief voor de conventionele 'Scope for growth' methode, die te arbeidsintensief is om routinematig te worden toegepast. De energiereserve wordt gequantificeerd via een bepaling van het vet-, suiker- en eiwitgehalte in het testorganisme. De metingen worden uitgevoerd met behulp van spectrofotometrische methoden. Het verschil tussen de energiereserve en het energieverbruik wordt uitgedrukt in mJ per organisme per uur en reflecteert de energie, beschikbaar voor groei en reproductie. De fagocytosecapaciteit is een maat voor stress bij vis. Fagocyterende cellen hebben namelijk een belangrijke functie tijdens de immunorespons. Hiertoe behoren enerzijds de granulocyten, waarvan de neutrofielen in dit kader de belangrijkste zijn. Anderzijds ook de monocyten, die via de bloedbaan migreren naar plaatsen van ontsteking, waar ze zich differentiëren in macrofagen, die gebroken cellen, dode micro-organismen en lichaamsvreemde partikels vernietigen.

De gemodificeerde stress test geeft significante verschillen naargelang de verschillende dieten die werden gebruikt zonder de dieren te doden. Deze test kan bijgevolg gebruikt worden om de kwaliteit van tarbotjuvenielen te bepalen voor ze worden uitgezet in zee.

Het bepalen van de energiereserves aan de hand van suikers en proteïnen bleek geen problemen op te leveren. Het is wel zo dat het protocol aangepast dient te worden naargelang de grootte van de vislarve. Bij kleine larven is het onmogelijk om organen apart te behandelen. Als ook de andere componenten (energiereserve aan lipiden en energieverbruik) kunnen bepaald worden, is de CEA test in de toekomst bruikbaar om de stressweerstand en de kwaliteit van tarbot te bepalen.

Met het bepalen van de fagocytosecapaciteit kon de voorgeschiedenis betreffende het toegediende voedselregime, al dan niet verrijkt met vitamine C en/of vitamine E, achterhaald worden. Dit zelfs acht weken nadat de dieren op een zelfde dieet werden geplaatst, namelijk visafval.

Doel:

De kwaliteit van de tarbotlarven bepalen aan de hand van een eenvoudige, reproduceerbare test, de saliniteit stresstest. Daarnaast werd de fysiologische conditie bepaald met behulp van de Cellulaire Energie Allocatie methode die reeds eerder werd gebruikt bij *Daphnia* (De Coen, 1999). Een derde kwaliteitsbepaling die werd gebruikt is bepaling van de fagocytosecapaciteit.

Inleiding:

De eerste test die werd uitgevoerd is een variant van de saliniteit stresstest beschreven door Dhert *et al.* (1992). In dit experiment was de stressindicator geen index gebaseerd op de sterfte van de dieren vermits de tarbot betrokken was in een restockingsproject en de dieren de stresstest dus moesten overleven. Bij deze test was de stressindicator de respiratiegraad van de dieren. Een hogere respiratiegraad wijst op een meer gestresseerde situatie en een grote wijziging in de respiratiegraad wijst op een slechtere fysiologische conditie van de proeforganismen.

De CEA-methodologie werd al eerder gebruikt om het effect van toxische stoffen op de energietoestand en de fysiologische conditie van o.a. *Daphnia magna* na te gaan (De Coen, 1999). Men wou de geschiktheid van deze test voor de toepassing op tarbotweefsel te weten komen.

Het CEA-concept is een goed alternatief voor de conventionele 'Scope for growth' methode, die te arbeidsintensief is om routinematig te worden toegepast. 'Scope for growth' is frequent gebruikt als algemene stress-index omdat het de energietoestand van een organisme op een specifiek moment weergeeft (Maltby & Naylor, 1990). Het geeft de hoeveelheid energie weer, beschikbaar voor groei en voortplanting, nadat aan de metabolische behoeften van het organisme is voldaan. Het wordt uitgedrukt als volgt: $P = A - (R + U)$, met A de hoeveelheid energie geabsorbeerd, R de hoeveelheid energie geconsumeerd en U de hoeveelheid energie geëxcreteerd.

Men probeert effecten op niveau van het individu te voorspellen, uitgaande van effecten op moleculair of cellulair niveau. De bepaling van de CEA is gebaseerd op een biochemische schatting van het energieverbruik enerzijds en de energiereserve anderzijds. Het energieverbruik wordt bepaald via een meting van de electronentransportsysteemactiviteit, die een maat is voor de ademhalingssnelheid. De energiereserve wordt gequantificeerd via een bepaling van het vet-, suiker- en eiwitgehalte in het testorganisme. De metingen worden uitgevoerd met behulp van spectrofotometrische methoden. Het verschil tussen de energiereserve en het energieverbruik wordt uitgedrukt in mJ per organisme per uur en reflecteert de energie, beschikbaar voor groei en reproductie (De Coen, 1999).

Het gebruik van dergelijke suborganismale eindpunten, in tegenstelling tot de conventionele eindpunten zoals groei en reproductie, kan leiden tot een snellere en

meer kosten-effectieve bepaling van chronische effecten die anders slechts na lange tijd tot uiting zouden komen op hogere niveau's van organisatie (De Coen, 1999).

Om de energietoestand van het organisme te achterhalen, bepaalt men eerst de energiereserves beschikbaar voor het metabolisme. Het totaal vet-, suiker-, en eiwitgehalte van het testorganisme wordt gemeten. Daarna wordt het energieverbruik bepaald door de electronentransportactiviteit (ETS) op mitochondriaal niveau te meten. Het verschil tussen beide termen is een algemene stressindicator.

In deze eerste fase van het onderzoek werd de methode voor het bepalen van CEA op punt gesteld. Dit is verschillend naargelang de grootte van het organisme. Bij kleine larven is het onmogelijk om bepaalde weefsels apart uit te prepareren, hierdoor moeten volledige larven homogeniseren voordat de bepaling kan worden uitgevoerd. Bij grotere individuen kan men het spijsverteringskanaal uit de vis halen of steeds eenzelfde gedeelte van het weefsel gebruiken.

Fagocytose kan gebruikt worden voor stressbepaling bij vis (Mathews et al., 1990). Fagocyterende cellen hebben namelijk een belangrijke functie tijdens de immuno-respons. Hiertoe behoren enerzijds de granulocyten, waarvan de neutrofielen in dit kader de belangrijkste zijn. Anderzijds ook de monocytten, die via de bloedbaan migreren naar plaatsen van ontsteking, waar ze zich differentiëren in macrofagen, die gebroken cellen, dode micro-organismen en lichaamsvreemde partikels vernietigen (Darnell et al., 1990).

Vitaminen zijn essentiële nutriënten die dus niet gesynthetiseerd kunnen worden door mariene vissen. Vooral vitamine C heeft als mogelijke kwaliteitsparameter enorm veel aandacht gekregen. Vitamine C of ascorbinezuur is bij vissen voornamelijk te vinden in de lever, de milt, de nieren, de bijniere en de kristallens van het oog. Vitamine C heeft een belangrijke functie in het stimuleren van het immunosysteem. Het werkt enerzijds in op het specifiek immunosysteem, dat kan opgesplitst worden in twee systemen bij vissen, namelijk het humorale (B-lymfocyten) en het celgemedieerde (T-lymfocyten) immunosysteem. De invloed van vitamine C is op korte termijn niet rechtstreeks. Zo wordt de vorming van humorale antilichamen niet direct door een verhoogde dosis vitamine C in het dieet beïnvloed, maar resulteert in een verhoogde chemotactische reactie bij de neutrofielen (zie boven). Een verhoogde dosis vitamine C geeft wel een hogere humorale antilichaamvorming na ongeveer zes tot tien weken immunisatie (Navarre, 1985). Het celgemedieerde immunosysteem wordt gezien als de primaire reactie tegen vreemde cellen en vormt antilichamen tegen uitwendige schimmels en virussen en tegen interne vreemde cellen (cytotoxisch). Vitamine C heeft ook een invloed op het niet specifiek immunosysteem, namelijk met de vorming van interferon (= cytokine dat als afweerstof dient) (Thomson et al., 1993).

Van vitamine E is gekend dat er bij deficiëntie er een reductie plaatsgrijpt van het humorale immunosysteem en van diverse niet specifieke resistentiefactoren (Landolt, 1989).

Materiaal en methode:

Saliniteits stresstest:

Bij het experiment, dat werd uitgevoerd één maand voor het uitzetten in zee, werd de tarbot verplaatst van de vistanks naar kleinere aquaria met een hogere saliniteit. De saliniteit werd verhoogd van 35 ppt naar 60 ppt. De dieren ondergingen gedurende tien minuten een saliniteitsschok. Daarna werd de respiratiegraad gedurende één minuut gemeten. Hierbij werd gekeken naar de beweging van de mond of de kieuwen. Er werd geteld hoeveel maal het operculum op en neer ging of hoeveel maal de mond open en dicht ging.

Om het recuperatievermogen waar te nemen, werden de juvenielen vijf minuten in kleinere aquaria met een normale saliniteit (35ppt) geplaatst. Hierna werd de respiratiegraad opnieuw gemeten gedurende één minuut.

Voor elk individu zijn er bij elke test twee metingen uitgevoerd. Voor elke test werd een steekproef genomen van twintig individuen, afkomstig uit één van de drie tanks.

Er werden ook contolemetingen uitgevoerd in de vistanks zelf. Gedurende één minuut werd de respiratiegraad van 40 individuen gemeten en dit werd gedaan in elk van de drie tanks. Op deze manier bekomen we de respiratiegraad in rusttoestand.

In het water met hoge saliniteit stijgt de respiratiegraad. De mate waarin deze respiratiegraad stijgt, is een maat voor de resistentie tegen een saliniteitsschok. De dieren met een minder hevige reactie (een minder grote stijging van de respiratiegraad) zijn beter bestandig tegen stress en hebben een betere conditie.

Cellular energy allocation (CEA):

Kleine larven werden gehomogeniseerd op 0°C en de stalen werden verdund indien nodig. Na 10 minuten centrifugeren op 4°C aan 3000 rpm, werd het supernatans opgevangen. Van dit supernatans werd telkens 50 µL samen met 50 µL NADH + NADPH in een multiwell plaat gebracht. Daarna wordt 100 µL idonitrotetraolium (INT) oplossing toegevoegd en wordt de plaat in een spectrofotometer (492nm) gebracht.

Bepaling van de fagocytose capaciteit:

Er werden telkens 3 verschillende tarbotten van ieder voedselrégime onderzocht op de fagocytosecapaciteit. Op het bloedmonster van elke vis werd de bepaling van de fagocytosecapaciteit drie maal herhaald.

Voor het afnemen van het bloed werd de kieuwboog eerst ontsmet met 70% isopropylalcohol en droog-gewreven met absorberend papier. De kieuw werd doorgeknipt. 0,5ml bloed werd opgevangen in een tapval buisje met EDTA, teneinde de bloedformule te kunnen onderzoeken. Na het volledig uitbloeden van de vis werd de kopnier met steriel dissectiemateriaal weggenomen en in een plastic potje, voorzien van AIMV-medium, gebracht. Voor de bereiding van 0,5 liter AIMV-medium worden 244ml AIMV + 244ml Leibovitz L15 + 2ml heparine (5000 I.E/ml) en 10ml penicilline\streptomycine (10000 I.E/g) aangewend. Het AIMV-medium werd gesteriliseerd met behulp van een membraanfilter (0,22 μ) en bewaard bij 4°C. De kopnier werd tot een pasta verwerkt in een homogenisator (V.E.I. catalogus art nr 7351502) zonder daarbij de bloedcellen te breken en daarna gefiltreerd over een 40 μ m steriel filter. De gewassen kopnieroplossing (15ml) werd op 15ml histopaque 1077 (Sigma) aangebracht en gedurende 30 minuten bij 700xg (2000T/min) afgecentrifugeerd bij een temperatuur van 12°C. Hierna werd de bovenlaag afgezogen en daarna de witte bloedcellenlaag afgezonderd. De witte bloedcellenlaag werd 2x gewassen met 5ml AIMV-medium en gedurende 10 minuten bij 200g afgecentrifugeerd. Daarna werd de neergeslagen bloedcellen in 5 ml AIMV-medium bewaard. Voor de uitvoering van de fagocytosecapaciteit werd er naar een concentratie van 40 leucocyten per Kova slide rooster gestreefd.

Het percentage cellen die fagocyteren en de fagocytoseindex werden in functie van de tijd bepaald. De fagocytosetest wordt met behulp van gistcellen uitgevoerd. Er werd een verhouding bloedcellen \ gistcellen van circa 1 op 10 nagestreefd. Bij hoge fagocytose activiteit, werd na ongeveer 4 uur incubatie, een supplement van 20-40 μ l gistceloplossing aan het medium toegevoegd.

Voor wat de bepaling van de fagocytosecapaciteit bij tarbot betreft, werd zowel het AIMV-medium met kabeljauwserum (test A) of zonder (test B) kabeljauwserum; het PBS-medium (test C) als het RPMI-medium (test D) uitgetest. De incubatietemperatuur waarbij de fagocytose werd uitgevoerd bedroeg 4°C.

Daar de tarbotexemplaren te klein waren om voldoende serum te bekomen werd beroep gedaan op kabeljauwserum. Dit serum bleek goed geschikt bij de bepaling van de fagocytosecapaciteit van bot (*Platichthys flesus*).

De invloed van de temperatuur op de fagocytosecapaciteit en fagocytose-index bij tarbot werd bestudeerd. Er werden vier verschillende incubatietemperaturen, namelijk 4°C, 12°C, 20°C en 30°C onderzocht. Het incubatiemedium omvatte 1000 μ l WBC + 70 μ l gistcellen + 1500 μ l AIMV-medium.

De invloed van de ouderdom van de fagocyten op de fagocytosecapaciteit bij tarbot werd bestudeerd. De afgezonderde fagocyten werden bij 12°C opgeslagen. Na 1d, 2d, 3d, 6d, 8d en 10dagen bewaren werd het fagocytoseproces bij 4°C uitgevoerd.

De overleving van de geïsoleerde (polymorfnucleaire en mononucleaire leucocyten) cellen werd met trypaanblauw oplossing getest (vitaliteitstest).

Proefopstelling voor de bepaling van de fagocytosecapaciteit bij tarbot:

A- 1000µl WBC + 500µl kabeljauwserum + 70µl gistcellen + 500µl AIMV-medium

B- 1000µl WBC + 70µl gistcellen + 1500µl AIMV-medium

C- 1000µl WBC + 70µl gistcellen + 1000µl PBS-medium

D- 500µl WBC + 70µl gistcellen + 1500µl RPMI-medium

Resultaten:

Saliniteit stresstest:

De stresstest werd door twee verschillende personen uitgevoerd. Een T-toets voor gepaarde waarnemingen maakte duidelijk dat er geen effect is van de testpersoon op de resultaten van de stresstest.

De resultaten van de saliniteit stresstest zijn weergegeven in Tabel I.

Zowel het dieet als de omstandigheid (rusttoestand, hoge saliniteit of recuperatie) hebben een significant effect op de gemiddelde respiratiegraad. Er was geen significant interactie-effect van beide factoren (dieet, test) op de gemiddelde respiratiegraad waarneembaar.

Tabel I: De respiratiegraad van de tarbot, gevoederd met Provimi al dan niet verrijkt met visolie, vitamine C en/of vitamine E, in rusttoestand, bij hoge saliniteit en na recuperatie.

	In rusttoestand	Bij hoge saliniteit	Na	
recuperatie				
Controle	56.4 ± 8.5 ^b	75.7 ± 7.2 ^a	65.0	±
7.9 ^b				
Controle+visolie+vitC	62.5 ± 6.8 ^a	74.3 ± 8.4 ^a	66.2	±
8.6 ^b				
Controle+vitC+vitE	63.8 ± 6.1 ^a	78.6 ± 7.5 ^a	69.5	±
9.6 ^b				

* getallen zonder superscript zijn niet significant verschillend

In rusttoestand vertoonde de vis, gevoederd met de standaardkorrel, een significant lagere respiratiegraad dan de vissen gevoederd met dieet 2 of dieet 3. Er was geen onderscheid merkbaar tussen de respiratiegraad in rusttoestand van dieet 2 en dieet 3. Bij hoge saliniteit en na 5 minuten recuperatie kon er geen verschil waargenomen worden in de respiratiegraad tussen de drie diëten. Bij de vissen van de controle was het aantal ademhalingen per minuut significant verschillend in de drie testen of in de drie verschillende situaties. Door de saliniteitsschok was de respiratiegraad bij de

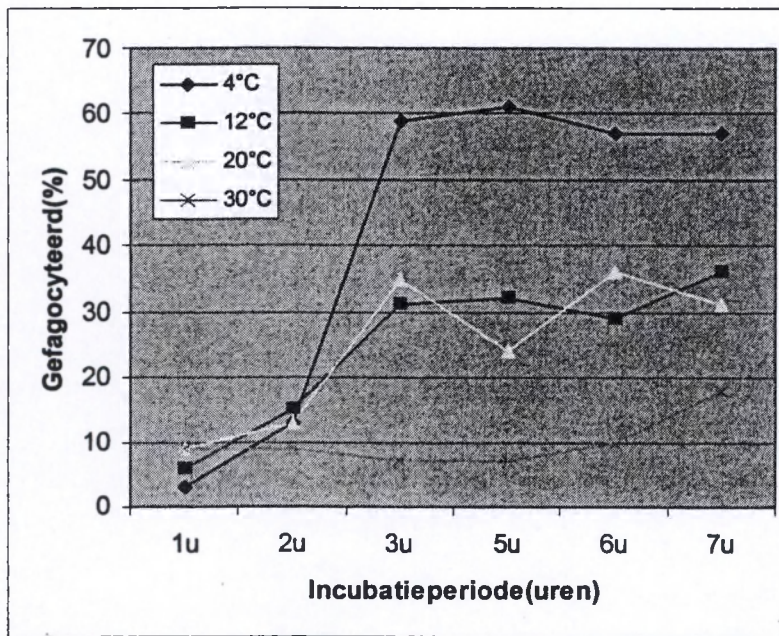
tarbot van de controle met 34% gestegen. Na 5 minuten recuperatie was de respiratiegraad nog steeds 15% hoger dan bij rusttoestand. De vissen van dieet 2 hadden ook een significant verschillende respiratiegraad bij de hoge saliniteit. In vergelijking met de rusttoestand was het aantal ademhalingen per minuut met 19% gestegen. De ervaren saliniteitsschok was dus niet zo hoog als bij de controlegroep. Bovendien hadden de vissen, gevoederd met dieet 2, met 5 minuten in normale omstandigheden wel voldoende om te recupereren. Na 5 minuten was de respiratiegraad nog maar 6% hoger dan in rusttoestand. De vissen van dieet 3 hadden significant verschillende respiratiegraden in de drie omstandigheden. Door de hoge saliniteit was het aantal ademhalingen met 23% gestegen. Na 5 minuten recuperatie was de respiratiegraad nog 9% hoger dan de respiratiegraad in rusttoestand.

Uit de vorige resultaten blijkt dat alle vissen een duidelijk saliniteitsschok ervaarden. Deze was echter het kleinst bij de vissen van dieet 2. De tarbot van de controlegroep leed het meest onder deze saliniteitsstress. Enkel de vissen van dieet 2 slaagden erin na 5 minuten voldoende te recupereren. Hieruit kan besloten worden dat de tarbot gevoederd met visolie en vitamine C heeft een grotere stressweerstand. Een extra positieve invloed van vitamine E op de conditie van de dieren komt in deze stresstest niet tot uiting.

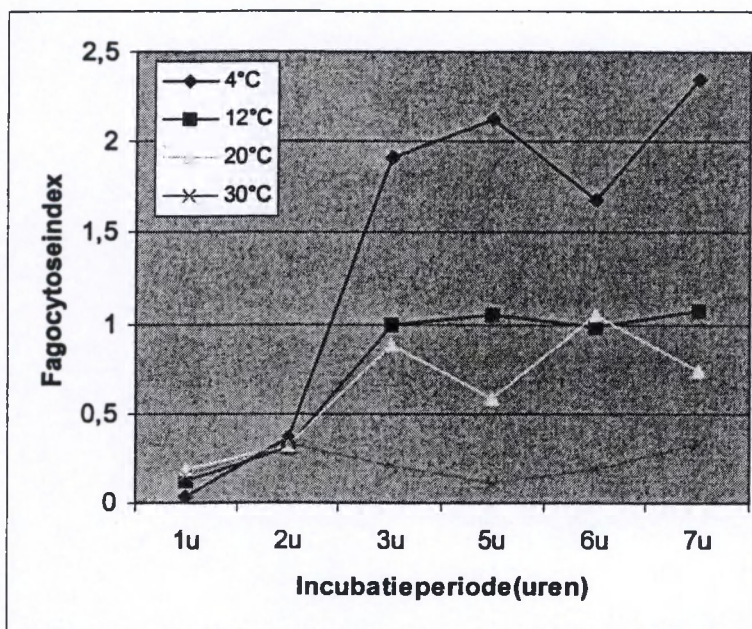
Fagocytosecapaciteit:

Bij de proefopstelling A, waarbij AIMV-medium en kabeljauwserum werd gebruikt, werd geen fagocytose waargenomen. De toevoeging van kabeljauwserum aan het medium bleek de opname van gedode gistcellen door de fagocyten te verhinderen. Deze zienswijze werd bevestigd door proefopstelling B waarbij voldoende fagocytose werd waargenomen in aanwezigheid van het AIMV-medium en zonder kabeljauwserum. Bij de proefopstelling C in aanwezigheid van het PBS-medium en bij proefopstelling D in aanwezigheid van het RPMI-medium werd eveneens geen fagocytose waargenomen. De proefnemingen werden vijf maal herhaald en gaven steeds dezelfde resultaten.

In vergelijking met de twee hoogst ingestelde incubatietemperaturen (20°C en 30°C) kwam de fagocytose bij 4°C en 12°C incubatie, trager op gang. Bij 4°C bereikte de fagocytose reeds een maximum na 3 uur incubatie (Figuren 1 en 2). Circa 60% van de leucocyten fagocyteerden bij 4°C, terwijl bij 12°C en 20°C slechts 30% aan het fagocytoseproces deelnamen. Het hoogst aantal gefagocyteerde gistcellen per tarbotfagocyt bedroeg 7 à 8. Het fagocyteren bij 30°C kwam gedurende het eerste uur goed op gang, doch viel achteraf stil.

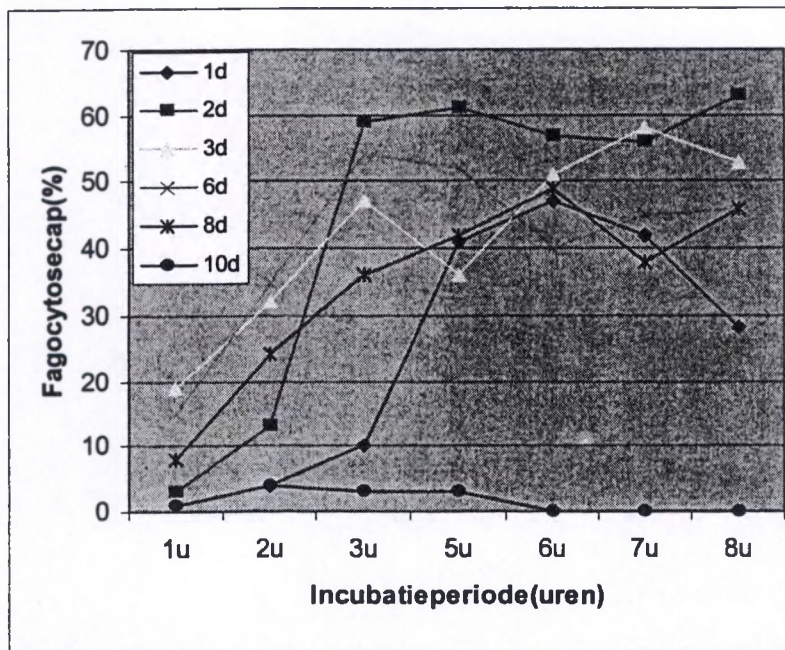


Figuur 1. Invloed van de incubatietemperatuur op de fagocytosecapaciteit bij tarbot

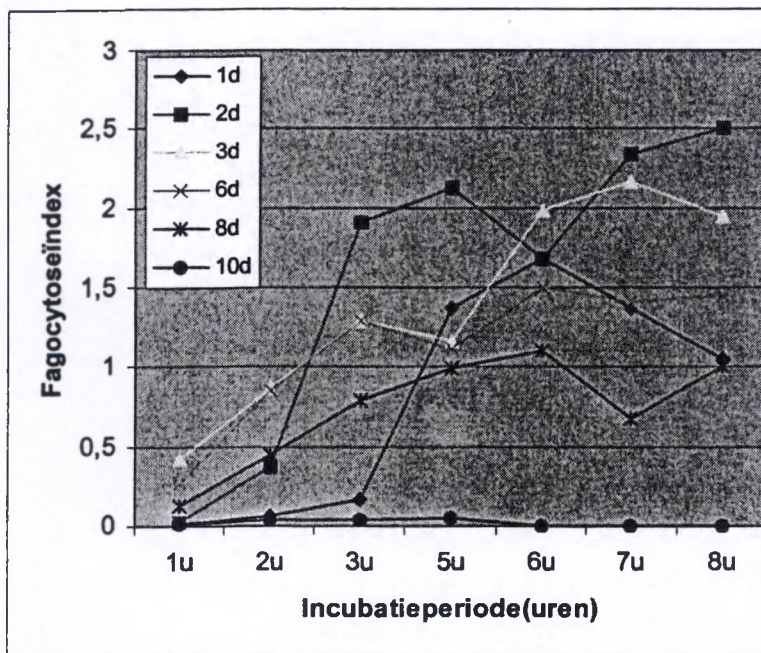


Figuur 2. Invloed van de incubatietemperatuur op de fagocytose-index bij tarbot.

De resultaten van de invloed van de ouderdom van de fagocyten op de fagocytosecapaciteit bij tarbot werden in de Figuren 3 en 4 opgenomen. Bij de fagocyten die slechts 1 dag oud waren kwam het fagocytoseproces slechts langzaam op gang. De oudere fagocyten fagocyteerden bijna onmiddellijk en bereikten reeds een maximum na 3 uur incubatie. De polymorf nucleaire leucocyten en monocyten verloren hun fagocytosecapaciteit na 10 dagen bewaren bij 12°C.

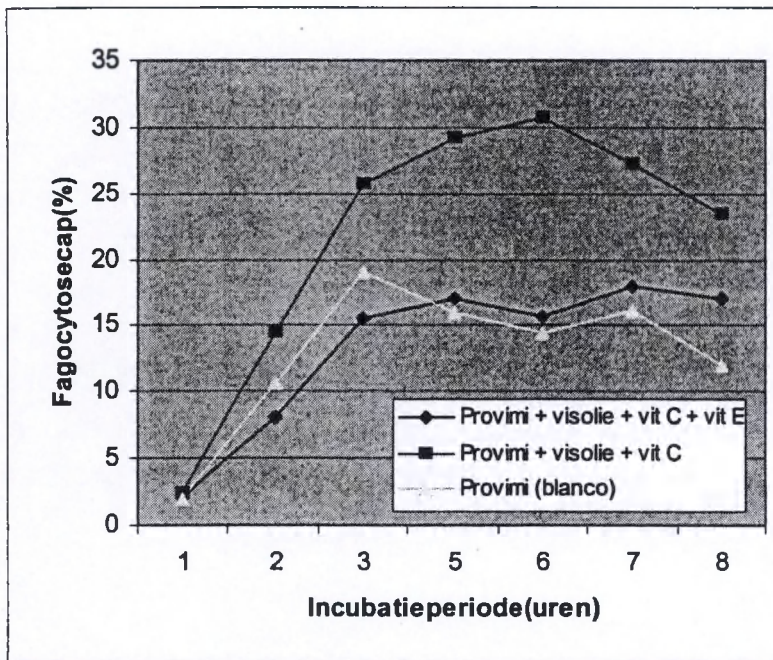


Figuur 3. Invloed van de ouderdom van de fagocyten op de fagocytosecapaciteit bij tarbot.

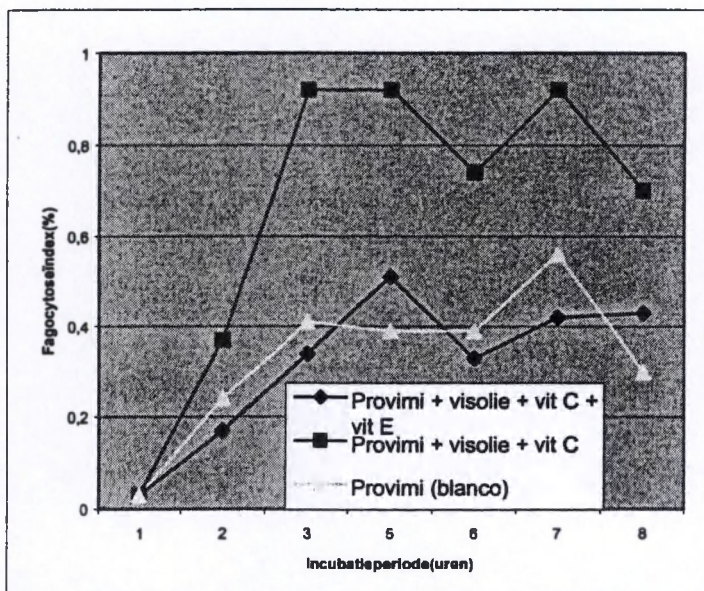


Figuur 4. Invloed van de ouderdom van de fagocyten op de fagocytoseindex bij tarbot.

De gemiddelde resultaten van de bepalingen van de fagocytosecapaciteit en de fagocytose-index zijn in de figuren 5 en 6 opgenomen.



Figuur 5. Invloed van het voedselregime op de fagocytosecapaciteit van tarbot.



Figuur 6. Invloed van het voedselregime op de fagocytose-index van tarbot

Het beste resultaat werd bekomen bij de toevoeging van vitamine C aan het basisvoedsel Provimi. De toevoeging van vitamine E deed het effect van de toevoeging van vitamine C teniet. Uit de bepalingen van de fagocytosecapaciteit kwam verder tot uiting dat de invloed van het basisregime een zekere tijd blijft doorwerken na de vervanging van de diverse voedselregimes door visafval.

Besluiten :**Saliniteit stresstest:**

De gemodificeerde stress test geeft significante verschillen naargelang de verschillende dieten die werden gebruikt zonder de dieren te doden. Deze test kan bijgevolg gebruikt worden om de kwaliteit van tarbotjuvenielen te bepalen voor ze worden uitgezet in zee.

Cellular Energy Allocation:

Het bepalen van de energiereserves aan suikers en proteïnen bleek geen problemen op te leveren. Als ook de andere componenten (energiereserve aan lipiden en energieverbruik) kunnen bepaald worden, is de CEA test in de toekomst bruikbaar om de stressweerstand en de kwaliteit van tarbot te bepalen.

Fagocytosecapaciteit

Met het bepalen van de fagocytosecapaciteit kon de voorgeschiedenis betreffende het toegediende voedselregime, al dan niet verrijkt met vitamine C en/of vitamine E, achterhaald worden. Dit zelfs acht weken nadat de dieren op een zelfde dieet werden geplaatst, namelijk visafval.

**GENETISCHE DIFFERENTIATIE IN TARBOT VAN VERSCHILLENDE
BELGISCHE VISGRONDEN.**

D. DELBARE¹, R. DECLERCK¹ & P. SORGELLOOS²

¹: Departement Zeevisserij

Ankerstraat 1, 8400 Oostende

²: Laboratorium voor Aquacultuur & Artemia Reference Center, Universiteit Gent

Rozier 44, 9000 Gent

Abstract:

Uitzetten van gekweekte dieren in natuurlijke ecosystemen geeft automatische genetische implicaties. Het is daarom noodzakelijk om enerzijds geen vreemd genetisch materiaal in te brengen op de plaats waar het uitzetten van gekweekte dieren gebeurt. Om die reden moet men gebruik maken van ouderdieren die tot een zelfde populatie behoren als deze die op de locatie van het uitzetten voorkomt. Het is daarom noodzakelijk een kijk te krijgen op de populatiestructuur van de doelsoort binnen zijn verspreidingsgebied. Genetische analyse van tarbotten afkomstig uit diverse locaties binnen het natuurlijk verspreidingsgebied van deze soort, heeft aangetoond dat dieren afkomstig uit de Ierse Zee als een aparte stock kunnen beschouwd worden. Daarnaast bestaan er indicaties dat tarbot nog verder kan opgesplitst worden in een (sub)populatie Engels Kanaal – Baai van Biscaye en een (sub)populatie Noordzee – Keltische Zee.

Anderzijds is het noodzakelijk de genetische diversiteit van de uitgezette dieren zo hoog mogelijk te maken, door het minimaliseren van inteelt, domesticatie en genetische drift. Gezien het ouderlijk genetisch effect mee de stressconditie en de overleving bepaald, zal de genetische diversiteit van de pootvis en de uitgezette dieren eveneens bepaald worden door het ouderlijk genetisch effect, namelijk door genetische uitval. Dit luik tracht aan de hand van vier groepen genetisch gekende juvenielen het ouderlijk genetisch effect te kwantificeren tijdens de kweek (nursery) en na het uitzetten (nog lopende).

1. INLEIDING

Lang werd aangenomen dat zeevissen gekenmerkt werden door een groot verspreidingsgebied met daaraan verbonden lage waarden van populatiestructuren. Toch heeft genetisch onderzoek uitgewezen dat dit niet altijd het geval is. Zo kunnen weinig migrerende soorten met een grote geografische verspreiding significante niveaus aan populatiestructuren vertonen. Daarnaast kunnen ook sterk migrerende soorten dergelijke niveaus van populatiestructuur vertonen, vooral wanneer deze specifieke afzetgebieden hebben met een variatie in eiafzetting qua plaats en tijd.

1.1. GENETISCH ONDERZOEK BIJ TARBOT: KORTE ACHTERGROND

Verscheidene genetische merkers vertonen een verschillende resolutie om genetische verschillen tussen vispopulaties te verduidelijken. Voor kabeljauw (*Gadus morhua*) toonden variaties in bloedproteïnen (allozyme loci) significante verschillen aan (Møller, 1968; Jamieson, 1975; Cross & Payne, 1978; Dahle & Joerstad, 1993), terwijl deze verschillen verdwenen wanneer grotere aantallen bloedproteïne loci onderzocht werden. Mitochondriaal DNA variaties toonden beperkte of geen populatieverschillen aan (Smith et al., 1989; Carr & Marshall, 1991; Arnason & Rand, 1992). Terwijl met nucleair DNA 'restriction fragment length polymorphism' (RFLP) loci en microsatelliet loci significante populatiestructuren in kabeljauw konden aangetoond worden (Bentzen et al., 1996; Pogson et al., 1995; Ruzzante et al., 1996, 1997, 1998, 1999). Dit was eveneens het geval bij coho zalm, *Onchorhynchus kisutch*, waarbij analyse in proteïnevariatie (enzymen) alleen geringe verschillen konden aangetoond worden (Wehrhahn & Powell, 1987), terwijl met minisatelliet DNA variatie men zelfs regionale stock structuren kon aantonen (Beacham et al., 1996).

Renaud et al., 1986 werkten op de allozymeren van de tarbot cestode parasiet, *Bothriocephalus gregarius* en kon aan de hand daarvan significante verschillen aantonen tussen de parasieten van Atlantische en Mediterrane tarbot. De splitsing tussen deze twee vormen was gesitueerd in zuid Portugal, tussen Lissabon en Faro. Allozymeren-analyse van de tarbot toonde bijna geen genetische verschillen aan, enkel deze van de Egeïsche Zee waren verschillend, maar enkel met als resultaat een te negeren genetische afstand (Blanquer et al., 1992). Ze ontdekten dat door het gebruik van allozyme merkers een lage genetische verscheidenheid in zowel natuurlijke populaties als in tarbot uit diverse kwekerijen. Studies uitgevoerd met microsatelliet loci op wilde en gekweekte tarbot die afkomstig waren van twee verschillende locaties (Noorwegen en Ierland) toonden eveneens vrij geringe differentiatie tussen beide wilde populaties (Coughlan et al., 1998). Wat in overeenstemming is met de resultaten die gevonden werden bij de allozyme studies (Blanquer et al., 1992). Nochtans beklemtoonden Coughlan et al. (1998) het belang

van verdere genetische analyse met meer microsatelliet loci om wilde tarbot uit verschillende verspreidingsgebieden te testen.

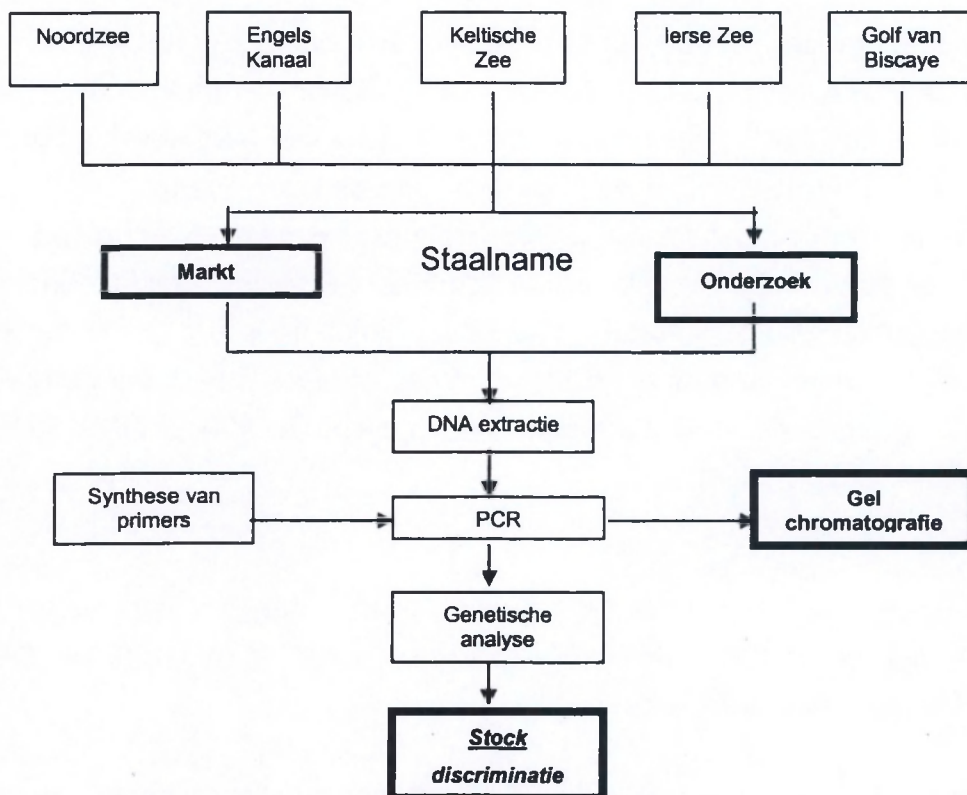
1.2. ALGEMENE KENMERKEN VAN MICROSATELLIETEN

Microsatellieten zijn terugkerende velden van korte nucleotideketens, die di-, tri- of tetranucleotiden bevatten. Ze omvatten 9 tot 65 basisparen (bp), zijn vaak G-rijk (hoewel deze bevinding beïnvloed kan zijn door de isolatiemethode), en bevatten specifieke allelen die in grootte kunnen variëren, tot 25 hbp op sommige loci (Wright, 1993). Deze microsatelliet loci zijn overvloedig en wijd verspreid doorheen het eukaryotisch genoom en vertonen vaak hoge waarden van polymorfisme, die worden overgeërfd op een Mendeliaanse wijze en waarvan wordt geloofd dat ze selectief neutraal zijn (Jarne en Lagoda, 1996). Elke microsatelliet locus wordt geflankeerd door een unieke sequentie, waaraan complementaire primers gesynthetiseerd kunnen worden voor isolatie door PCR vermeerdering. Variatie in het aantal kernsequenties resulteert in veel allelen en heterozygosiën. Door hun aantal, verspreiding, polymorfisme, en gemakkelijke isolatie van zelfs uiterst kleine stukjes weefsel die jaren werden bewaard (Estoup et al., 1996), zijn microsatellieten uitstekende kandidaten om als genetische merkers te worden gebruikt voor studies in verband met populatie- en stockidentificatie (Park & Moran, 1994; Wright & Bentzen, 1994), bloedverwantschap en ouderlijke uitsluiting (Amos et al., 1993; Kellogg et al., 1995) en het in kaart brengen van het genoom (Hearne et al., 1992). Er zijn een aantal publicaties waar analyse van microsatellieten significante populatieverschillen aantonen, daar waar meer traditionele merkers, zoals allozymen, dat niet deden.

2. MATERIAAL EN METHODEN

Teneinde een overzicht te krijgen van de populatie- of stockstructuur bij tarbot uit het wild, werden diverse stalen afkomstig van verschillende plaatsen binnen het natuurlijk verspreidingsgebied genetisch onderzocht. Dergelijk onderzoek is noodzakelijk, vooraleer gedacht kan worden aan massale restocking programma's, om er zeker van te zijn geen nieuw genetisch materiaal in de wilde populatie te brengen. Waardoor de capaciteit zou kunnen verminderen van de natuurlijke populatie na vermenging met de gekweekte dieren om aan natuurlijke variaties het hoofd te bieden.

2.1. WERKSHEMA EN STAALNAMEPROGRAMMA



2.2. WEEFSELCOLLECTIE

Spier-, lever- en kieuwweefsels werden verzameld van tarbot gevangen op 5 verschillende locaties in de Noordoost Atlantische Zee tijdens visserij-onafhankelijke staalnamecampagnes (Figuur 1.). De weefselstalen werden bewaard in pure ethanol (99%) en bij -20°C .



Figuur 1. Gebieden in de Noordoost Atlantische Zee waar stalen werden genomen.

2.3. DNA EXTRACTIE

DNA extractie van de op alcohol bewaarde weefsels werd uitgevoerd doormiddel van de "mouse tail"methode, waarbij een weefselstaal van ongeveer 100 mg samen met 120 µL 0.5 M EDTA (pH8), 500 µl Nuclei Lysis Solution (Promega) en 350 µg/ml Proteinase K, 3 uur werd geïncubeerd op 55°C. RNA-activiteit werd gestopt door toevoeging van 3 µl Rnase oplossing (Promega) aan de kernbevattende oplossing en 30 minuten geïncubeerd werd op 37°C. Proteïnen werden gescheiden van de kernbevattende oplossing door toevoeging van 200 µl Proteïne Precipitatieoplossing met daaropvolgende een centrifugatie van 4 minuten op 13.000 x g. Precipitatie van het DNA werd uitgevoerd met 600 µl 70% ethanol op kamertemperatuur, luchtgedroogd gedurende 10 – 15 minuten en opnieuw in 100 µl DNA Rehydratie oplossing (Promega) opgelost.

2.4. KEUZE VAN HET PRIMER KOPPEL

Vier microsatelliet loci (Sma3-8INRA, Sma3-129INRA, Sma5-111INRA en Sma1-125INRA (Estoup et al., 1998) werden gekozen, resp. DVZSM2, DVZSM4, DVZSM6 en DVZSM8 in dit onderzoek (Tabel I.).

Tabel I. Sequentie van microsatelliet allelen, primer sequenties en de gebruikte MgCl₂ concentratie per primerkoppel.

Locus	Sequentie	Primer (5'-3')	MgCl ₂ (mM)
DVZSM2F	(GT) ₁₈ ---(CT) ₅	CCCTCCGTCAGACAAAGAG	1.0
2R		GACGAAGTTAATGTTTCATTG	
DVZSM4F	(GT) ₂₉	GCACTGCCTTTTCATTGG	1.5
4R		CAGCTCTAGATTGTTTATCCC	
DVZSM6F	(TG) ₁₃	TCTACACTGCAGGTTGGG	1.2
6R		CTGATTATGGGCTGGACG	
DVZSM8F	(TAGA) ₁₁ ---(TG) ₄	CACACCTGACAAAGCTCAAC	1.0
8R		GCTGAACATTTTCATGTTGATAG	

2.5. POLYMERASE KETTINGREACTIE VERMEERDERING - PCR

PCR vermeerdering van de vier loci, DVZSM2, DVZSM4, DVZSM6, DVZSM8 (Estoup et al., 1998) gebeurde aan de hand van volgende procedure. De standaard reactie bevatte 50 ng DNA, 1 µM van elke primer, 0.14 µl polymerase (Expand High Fidelity PCR System – Boehringer Mannheim), 0.5 U 10x buffer, MgC₂ (concentratie voor elk primer koppel, zie tabel I), en 0.2 mM dNTP.

De PCR reactie werd uitgevoerd op een PCR Express van HYBAID en bestond uit een eerste denaturatiestap op 96°C gedurende 5 min, en een cyclusprofiel van 1 min

op 96°C (denaturatie), 30 s op 52°C (uitharden), en 75 s op 72°C (extensie) voor 5 reactiecycli, gevolgd door een cyclusprofiel van 30 s op 95°C (denaturatie), 30 s op 52°C (uitharden), en 75 s op 72°C (extensie) voor 30 reactiecycli. De reactie werd beëindigd met een extensiestap op 72°C gedurende 8 min.

De PCR producten werden gescheiden door middel van electrophorese op een 3-3.5% Metaphor Agarose gel in 1 x TAE buffer met recirculatie op 10°C. Electrophorese werd beëindigd en gekleurd met 0.5 µg.ml⁻¹ ethidiumbromide. De gels werden dan op een UV transilluminator geplaatst en gefotografeerd. De allelen werden gemeten ten opzichte van een 100 bp ladder (Promega). Het maximum aantal tarbot dat getest per locatie bedroeg 23 en 4 loci scoorden op elk staal.

2.6. Data analyse

De gegevens werden naar Dr. D. Ruzzante gestuurd voor statistische analyse van de verschillende loci voor de vijf verschillende visgronden. Omdat er grote verschillen waren in het aantal stalen per locatie, terwijl het aantal zelf klein was, werd de populatiestructuur geschat door het gebruik van F_{ST} waarden (Wright, 1951) volgens de Weir en Cockerham methode (1984). Multiloci schatting F_{ST} werd berekend door gemiddelden te nemen van variatiecomponenten over de loci (Weir & Cockerham, 1984; Slatkin, 1995; Goodman, 1997). Omdat schattingen van genenstroom verkregen door deze methode naar boven toe beïnvloed zijn ($Nm \gg 1$, Slatkin & Barton, 1989), werd de genenstroom berekend met Nei's (1973) G_{ST} schatter, die schattingen geeft van genenstroom die kleiner zijn dan de echte waarde (Slatkin & Barton, 1989). Bijgevolg liggen de echte waarden van genenstroom ergens tussen de G_{ST} en de F_{ST} schattingen (Ruzzante et al., 1998). Om de verschillende populaties te vergelijken, werd de DA (Nei et al., 1983) geschat. Deze genetische afstandsschatter is een niet-SMM schatting met lage variatie relatief aan andere niet-SMM metingen (Takezaki & Nei, 1996; Ruzzante et al., 1998).

3. RESULTATEN EN DISCUSSIE

Omdat het aantal stalen laag is en omdat niet alle loci succesvol versterkt werden op alle individuen, moeten deze resultaten als voorlopig worden beschouwd.

De F_{ST} schatting door loci met hun respectievelijke P-waarden (van 1000 permutaties van individuen over de populaties) is terug te vinden in Tabel II. Het is duidelijk dat locus DVZSM2 niet bijdraagt tot de differentiatie, in vergelijking met de andere loci. Vooral in locus DVZSM8 met een P-waarde van 0.000 ($P < 0.001$), wat een belangrijke differentiatie betekent in deze locus.

Tabel II. F_{ST} schatting per locus met hun respectievelijke P-waarden.

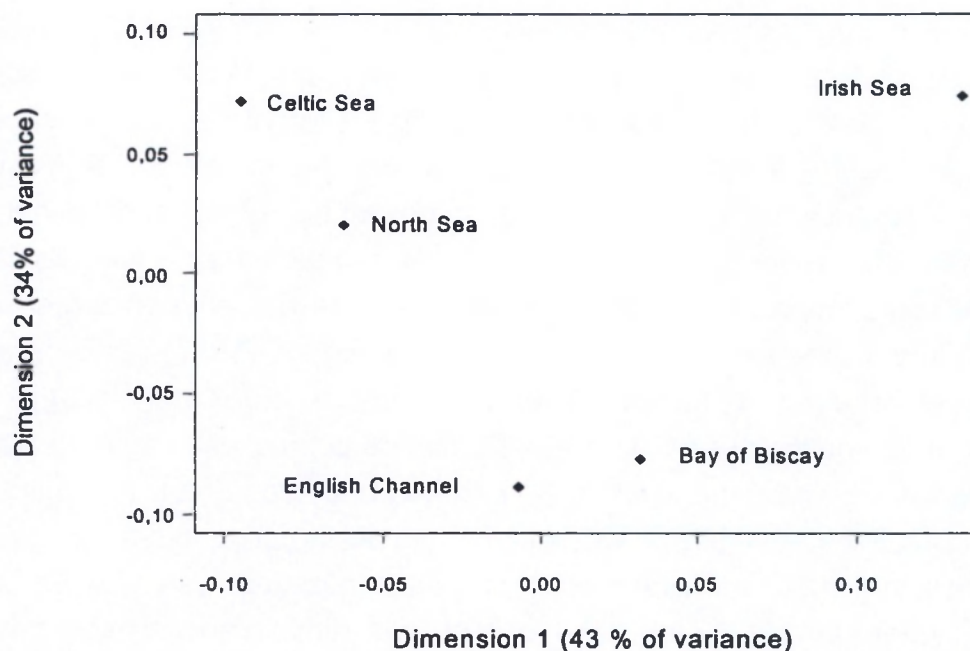
	DVZSM2	DVZSM4	DVZSM6	DVZSM8
F_{ST} - estimates	0.037	0.005	0.026	0.056
P-values	0.003	0.292	0.035	0.000

De F_{ST} schatting over alle loci is 0.032, $P=0.000$ ($P<0.001$) wat een belangrijke genetische differentiatie betekent over de 5 populaties. Om te bepalen welke populatie verschilt van welke, werden de DA paarsgewijs genetische afstanden geschat (Tabel III.) (P-waarden werden geschat uit 1000 permutaties van individuen uit populaties). De voorlopige resultaten tonen aan dat het Kanaal genetisch niet te onderscheiden lijkt van de Baai van Biskaje. Ook dieren afkomstig uit de Noordzee zijn niet van die uit de Keltische Zee te onderscheiden. De tarbot uit de Ierse Zee lijkt genetisch verschillend te zijn ten opzichte van tarbot uit alle andere onderzoeksgebieden.

Tabel III. Matrix van genetische afstand (DA) schattingen boven de diagonaal en P-waarden onder de diagonaal, tussen tarbot van verschillende visgronden.

	Noordzee	Engels Kanaal	Keltische Zee	Ierse Zee	Baai van Biscaye
Noordzee	-	0.169	0.151	0.220	0.171
Het kanaal	0.052	-	0.196	0.220	0.120
Keltische zee	0.111	0.005	-	0.235	0.208
Ierse Zee	0.002	0.000	0.000	-	0.195
Baai van Biscaye	0.019	0.367	0.002	0.001	-

Een multidimensionele schaalanalyse (MDSA) werd toegepast op de DA genetische afstandsmatrix om de verschillen tussen populaties aan te tonen. Dit is vooral consistent met de resultaten van de DA genetische afstandsmatrix. Het voorlopig scattergram van de relatie tussen dimensie 1 (wat 43% van de variatie verklaart) en dimensie 2 (die 34% van de variatie verklaart) toont aan dat tarbot van de Ierse Zee duidelijk van de andere populaties kan onderscheiden worden (Figuur 2). Er is eveneens een verschil tussen tarbot van de Keltische Zee en de Noordzee, en het Kanaal en de Baai van Biskaje, maar minder opvallend.



Figuur 2. Scattergram van een multidimensionele schaalanalyse toegepast op de DA matrix van genetische afstanden tussen 5 NO Atlantische tarbotpopulaties.

Hoewel het aantal talen per locatie klein was en deze schattingen als voorlopig moeten worden beschouwd, tonen deze preliminaire resultaten van de statistische analyse dat de tarbot in de Ierse Zee genetisch verschilt van de tarbot uit de andere onderzoeksgebieden. Er is ook een verschil (maar niet zo duidelijk) tussen tarbot van de Keltische Zee en de Noordzee, en tarbot van het Kanaal en de Baai van Biskaje. Dit zou kunnen betekenen dat de genetische flux tussen de Noordzee en de Keltische zee plaats grijpt aan de westkust van het Verenigd Koninkrijk en Ierland, wat in overeenstemming zou zijn met de resultaten van Coughlan *et al.* (1998). Die toonde ook aan dat er geen betekenisvol verschil was tussen wilde tarbot van de Keltische Zee, de Westelijke Benaderingen (51°N, 10°W), en van de westkust van Noorwegen (62°N, 4°E). Zij vonden wel belangrijke genetische heterogeniteit tussen wilde en gekweekte tarbotstalen van elk land.

In de literatuur zijn nog andere indicatie van populatiestructuur bij tarbot in zijn volledig verspreidingsgebied. Studies uitgevoerd op het effect van temperatuur en saliniteit op de embryonische ontwikkeling van tarbot toonde aan dat er een groot onderscheid is tussen tarbot afkomstig van de Noordzee (zuidkust van Noorwegen) en de Baltische Zee (Karas & Klingheim, 1997). De tarbot van de Baltische Zee had het hoogste overlevingspercentage in saliniteit tussen 10-15 promille, een interval waar er geen of slechts beperkte overleving was bij de tarbot uit de Atlantische Oceaan, wat overeenstemt met de resultaten van Kuhlman & Quantz (1980). De

auteurs besloten dat de Baltische en de Atlantische tarbot moeten beschouwd worden als verschillende rassen. Zulke aanpassingen aan lagere saliniteiten werden ook aangetoond voor bot en pladijs (Solemdal, 1967 en 1973), en Baltische kalbeljauw (Nissling & Westin, 1991 a&b). De studies op tarbot stemden eveneens overeen met het experiment waarbij Baltische tarbot werd gemerkt (Aneer & Weston, 1990) en aantoonde dat meer dan 90% van de teruggevangen tarbot werd gevangen op minder dan 20km van het punt van uitzetting, met een gemiddelde van slechts 6 km. Zulke korte migraties, enkel van ondiep water tijdens de late lente en zomer naar dieper water tijdens herfst en winter, werden ook door Bagge (1987) geobserveerd voor tarbot in het Kattegat. Hij kwam tot het besluit dat de stock van tarbot in het centrale Kattegat een eenheidsstock kon zijn. Dit kan de populatiestructuur verklaren die werd gevonden door Imsland et al. (1996). In hun onderzoek naar hemoglobine types van tarbot uit de Atlantische Oceaan en het Kattegat, vonden ze dat de genenfrequenties in tarbot van IJsland en Noorwegen dezelfde waren, waar HG-I frequenties in tarbot van het Kattegat verschilden van tarbot van de andere twee staalname locaties.

4. BESLUIT

Genetische analyse van tarbotten afkomstig uit diverse locaties binnen het natuurlijk verspreidingsgebied van deze soort, heeft aangetoond dat dieren afkomstig uit de Ierse Zee als een aparte stock kunnen beschouwd worden. Daarnaast is het mogelijk dat populatiestructuur bij tarbot nog verder kan opgesplitst worden in een populatie Engels Kanaal – Baai van Biscaye en Noordzee – Keltische Zee. Bij het uitvoeren van grootschalige restocking programma's dient men hiermee rekening te houden, ten einde de natuurlijke populaties genetisch te verzwakken met inbreng van vreemd DNA materiaal.

ONDERZOEK NAAR HET OUDERLIJK GENETISCH EFFECT OP DE SELECTIE TIJDENS DE KWEK EN NA UITZETTEN.

1. INLEIDING

Uitzetten van gekweekte dieren in natuurlijke ecosystemen geeft automatische genetische implicaties, daar marine vissoorten en meer bepaald tarbot een zeer hoog reproductie potentiaal en lage accidentele genetische drift ten toon spreidt. De mogelijkheid tot aanpassing van de natuurlijke populatie aan veranderingen in de locale omstandigheden kan tegengewerkt worden door de inbreng van dieren met een kleine genetische diversiteit (Blanco et al. 1998; Carvalho & Cross, 1998; Cross & Galvin, 1998). Daarom is het noodzakelijk dat bepaalde voorzorgen worden getroffen bij het uitzetten van gekweekte vissen: 1) gebruik maken van ouderdieren die afkomstig zijn van de locatie waar het uitzetten zal plaats vinden; 2) minimaliseren van inteelt; 3) minimaliseren van domesticatie (Doyle et al., 1995); en 4)

minimaliseren van de genetische drift binnen de natuurlijke populatie. Dergelijke voorzorgen in relatie met restocking werden reeds uitgeschreven door Yokota & Watanabe (1997) en Carvalho & Cross (1998). Het minimaliseren van het effect van inteelt en genetische drift kan tegengegaan worden door gebruik te maken van een groot aantal ouderdieren. Maar experimenten hebben kunnen aantonen dat hiermee nog geen brede genetische diversiteit is gegarandeerd, daar maar een bepaalde percentage van de ouderdieren actief deelneemt aan de reproductie. Daarnaast is het zo dat het ouderlijk genetisch effect de stressconditie en de overleving mede zal bepalen tijdens de larvale en de juveniele fase. Daarom is het mogelijk dat een hoeveelheid juvenielen gekweekt uit een groot aantal ouderdieren toch een lage genetische diversiteit vertoont door genetische uitval (mortaliteit) tijdens de kweek. Dit luik binnen het onderzoek dient om deze uitval te kwantificeren en eventueel raadgevingen te formuleren voor later onderzoek in toekomstige restocking programma's

2. MATERIAAL EN METHODEN

Deze proef is nog steeds lopende, vanwege de opgelopen problemen met de larvale kweek van tarbot tijdens de duur van het project.

In contradictie met de algemene raadgeving over het gebruik van een groot aantal ouderdieren, is het noodzakelijk voor dit onderzoek het aantal ouderdieren te reduceren. Dit is belangrijk daar van het beperkt aantal uitgezette dieren, maar een klein percentage zal teruggevangen worden (in een preliminaire studie bedroeg dat 17%) voor DNA analyse. Daarom wordt voor deze studie gebruik gemaakt van twee genetisch gekende mannetjes en twee gekende wijfjes.

2.1. OORSPRONG EN VERDELING VAN DE PROEFDIEREN

In samenspraak met France Turbot werd een bestelling gedaan van een 4000 tal juvenielen, die vier verschillende genetische achtergronden hadden, namelijk de nakomelingen van twee wijfjes en twee mannetjes. De vier genetische combinaties waren L29*407, L29*601, T7*407 en T7*601 (Figuur 3).

Bij aankomst werden de overlevende dieren geteld en gelijkmatig verdeeld over twee vistanks, gekoppeld aan een zelfde recirculatiesysteem (voor meer details, zie boven).

Tijdens de kweekfase worden de tanks dagelijks op dode dieren gecontroleerd. Deze worden uit de tank verwijderd en bewaard bij -80°C voor verder genetisch onderzoek. Na uitzetten van de dieren zullen ook de teruggevangen tongen onderworpen worden aan een genetische analyse.



Figuur 3. Reproductieschema met twee genetische gekende mannetjes en twee genetisch gekende vrouwtjes

2.2. KWALITEITSKLASSEN

Eenzijds zullen diverse kwaliteitsklassen gecreëerd worden aan de hand van verschillende diëten. De juvenielen worden verdeeld over twee tanks, die elk een apart voedselregime zullen toegediend krijgen, namelijk één met een standaardkorrel verrijkt met visolie en de andere wordt verrijkt met visolie en 10% vitamine C.

Anderzijds zal juist voor het uitzetten elke tank in twee geslits worden, waarbij één helft zal blootgesteld worden aan temperatuurschommelingen, terwijl de ander helft bij een stabiele temperatuur zal gehouden worden. Dit heeft als doel diverse hitte shock eiwitten (Hsp) te activeren, waarbij een betere resistentie tegen temperatuurvariaties voor korte duur kan bekomen worden in de uitgezette dieren.

2.3. GENETISCHE EN STATISTISCHE ANALYSE

De genetische karakterisatie van de tarbot zal gebeuren aan de hand van microsatelliet analyse (meer details, zie boven).

De data zal daarna statistisch worden geanalyseerd, waarbij de keuze van de programma's gekozen zal worden in functie van het aantal stalen.

3. VOORLOPIGE RESULTATEN

Tijdens het transport van France Turbot, Noirmoutier naar Oostende werden de juvenielen blootgesteld aan hoge temperaturen, waardoor er een hoge mortaliteit plaats vond (Tabel IV).

Tabel IV. Overleving van tarbotjuvenielen na transport.

Groep	Totaal aantal	Overlevenden	Overlevingspercentage
L29*407	972	570	59.6
L29*601	1221	890	72.9
T7*407	1065	230	21.6
T7*601	1190	880	73.9

TECHNISCHE HAALBAARHEIDSSSTUDIE VOOR EEN TARBOTKWEKERIJ AAN DE BELGISCHE KUST

K. DIERCKENS¹, D. DELBARE², R. DECLERCK² & P. SORGELOOS¹

- ¹: LABORATORIUM VOOR AQUACULTUUR & ARTEMIA REFERENCE
 CENTER, UNIVERSITEIT GENT
 ROZIER 44, 9000 GENT
- ²: DEPARTEMENT VOOR ZEEVISSERIJ, OOSTENDE
 ANKERSTRAAT 1, 8400 OOSTENDE

Abstract:

In deze studie werd nagegaan als een tarbotkwekerij aan de Belgische kust een haalbare kaart is. Daar de eisen van tarbotlarven voor de waterkwaliteit hoog liggen, werd voornamelijk aandacht besteed aan de waterkwaliteit en het verbeteren daarvan.

Uit de gegevens blijkt dat de waterkwaliteit aan onze kust te laag ligt om een rendabel systeem te ontwikkelen. Er zou dus moeten gewerkt worden in een gesloten recircualtiesysteem, waarbij de biofilters voldoende groot gedimensioneerd zijn om de metabolieten, geproduceerd in de kweektanks, op een voldoende laag peil te houden. Daarnaast heeft een dergelijk systeem ook het voordeel dat de stookkosten die de groei bevorderen tot en minimum kunnen worden herleid.

Naast de voordelen van een microbiële controle, zien we hier opnieuw dat er zal moeten overgeschakeld worden op recirculatie systemen, willen we spreken van een duurzame aquacultuur.

Doelstelling:

Nagaan als er aan de Belgische kust een mogelijkheid bestaat om een tarbot hatchery en nursery te vestigen die commercieel rendabel is.

Inleiding:

De waterkwaliteit is een zeer belangrijke factor voor het bepalen van een site voor een viskwekerij. Daarom is naast de theoretische berekeningen en overwegingen is groot deel van de tijd aan dit onderwerp besteed. Er werd geopteerd voor een doorstroom kweekstelsel daar er meest informatie over dergelijke systemen verkrijgbaar is. Daar de verschillende stadia die het water doorloopt vanaf inname tot lozing, elk een andere waaier bieden aan keuzemogelijkheden met betrekking tot de behandelingen die doorgevoerd kunnen worden, zal hier voor elk van die stadia een mogelijkheid van waterbehandeling beschreven worden. Het spreekt vanzelf dat de kwaliteit van het ingenomen water in belangrijke mate zal bepalen hoe rigoureuze de benodigde behandelingen moeten zijn en, daarmee onafscheidelijk verbonden, hoe hoog de kosten zullen zijn.

Werkingsparameters en berekeningen

1. Produktiviteit

De belangrijkste factor in de planning van een commerciële tarbotkweek is de beoogde produktie. Deze produktie kan uitgedrukt worden in termen van produktiviteit (eenheid $\text{kg} \cdot \text{M}^{-2} \cdot \text{jaar}^{-1}$), het produkt van de groeisnelheid en de gemiddelde kweekdichtheid.

1.1. De specifieke groeisnelheid (Specific Growth Rate, SGR)

Kamstra et al. (1992) berekende de regressie tussen de specifieke groeisnelheid (SGR, $\% \cdot \text{dag}^{-1}$) en het gewicht (g) van tarbot, uitgaande van een database opgesteld door Danielssen & Hjertness (1991), die de groei van tarbot bestudeerden in een breed gewichtsinterval. Uitgaande van deze regressie werd een formule voor de specifieke groeisnelheid opgesteld (met W het gewicht in g)

$$\text{SGR} = 13,09 \cdot W^{-0,525}$$

Met behulp van de SGR kan door iteratie een theoretische groei opgesteld worden. In tabel I wordt enkel een deel van het gebruikte rekenblad afgebeeld : een maand wordt als dertig dagen ondersteld en enkel de gewichten na maand 1 tot en met 30 worden weergegeven.

In de praktijk zal elke vis een andere groeikurve vertonen : er zullen snellere en tragere groeiers zijn. Er wordt hier echter verondersteld dat een evenwichtssituatie ontstaat tussen de verschillende groeisnelheden, met andere woorden, er wordt verondersteld dat de verschillen in groeisnelheden van de verschillende individuele vissen uitmiddelen en dat op deze manier de verschillen tussen de tragere en snellere groeiers de totale produktie niet zullen beïnvloeden.

Tabel I: Gewicht W (g) van de tarbot na elke maand (T), tot 30 maanden

T (maand)	W (g)	T (maand)	W (g)	T (maand)	W (g)	T (maand)	W (g)	T (maand)	W (g)
1	16	7	212	13	610	19	1199	25	1974
2	34	8	264	14	695	20	1315	26	2120
3	58	9	322	15	785	21	1437	27	2272
4	87	10	386	16	881	22	1563	28	2429
5	123	11	455	17	982	23	1695	29	2590
6	165	12	530	18	1088	24	1832	30	2757

1.2. Kweekdensiteit

Uit praktijk is gebleken dat een verband bestaat tussen het lichaamsgewicht van de tarbot en de dichtheid waarbij hij gestockeerd mag worden (tabel II).

TABEL II : Maximum toegelaten kweekdensiteiten (kg.m^{-2}) volgens Kamstra et al. (1992), berekend uit literatuur, en volgens Cachelou (1992), gebruikt in de praktijk.			
Kamstra (1992)		Cachelou (1992)	
Gewicht (g)	Max. densiteit (kg.m^{-2})	Gewicht (g)	Max. densiteit (kg.m^{-2})
5-10	5	5-50	10
10-40	10	50-200	20
40-100	20	200-500	25
100-300	30	500-800	30
0-600	40	800-1500	40
600-1000	50	> 1500	50
> 1000	60		

Omdat de waarden van Cachelou (1992) gebruikt worden in de praktijk, zullen ze ook gebruikt worden voor de hier uitgevoerde berekeningen.

Het hele proces van vetmesting wordt onderverdeeld in periodes van drie maanden, om de drie maanden wordt de inhoud van elke productie-eenheid overgebracht naar de volgende, wordt productie-eenheid 1 voorzien van 18631 aangekochte larven van 5 g en wordt de inhoud van productie-eenheid 9 verkocht (ongeveer 36 ton tarbot). De eerste 27 maanden na opstarten heeft men dus geen opbrengsten uit verkoop.

De leeftijd staat voor de tijd dat de larven zich in de betreffende productie-eenheid bevinden : beschouwt men bijvoorbeeld productie-eenheid 1, dan bedraagt de tijd dat de larven zich in deze productie-eenheid bevinden 90 dagen (van dag 1, maand 1 tot dag 30, maand 3). De termen 'begin' en 'eind' moeten ook in deze kontekst gezien worden : 'begin' staat voor dag 1, maand 1, terwijl 'einde' staat voor dag 30, maand 3.

De mortaliteitsgegevens worden overgenomen van Kamstra et al. (1992), terwijl de berekening van de benodigde oppervlakte gebeurde aan de hand van de gegevens van Cachelou (1992), zoals getoond in tabel II.

De steeds toenemende benodigde oppervlakte kan als volgt verklaard worden : na 3 maanden verblijf van de larven in produktie-eenheid 1, is hun individuele biomassa toegenomen van 5 tot 58 g. Men bekomt dus hier een (eind)stock van 962 kg en dit in een oppervlak van 96 m². De (eind)densiteit bedraagt dus 10 kg.m⁻² en de dieren wegen 58 g. Uit tabel II blijkt nu dat eens een gewicht van 50 g bereikt is, de larven moeten uitgedund worden tot een densiteit van 20 kg.m⁻². Vandaar de noodzaak tot overbrenging van de larven uit produktie-eenheid 1 naar produktie-eenheid 2 (grotere oppervlakte, dus dalende densiteit bij eenzelfde aantal larven).

2. Waterkwaliteit

TABEL III : Eisen gesteld aan de waterkwaliteit voor de vetmesting van tarbot. Een "?" betekent onzekerheid.

Parameter	Optimum	Grenzen	Bron
Temperatuur (°C)	14-18	< 24	1,2,3
pH	7,0-7,2	6,0-9,0	9
Saliniteit (g.kg ⁻¹)	25-30	22 ?	4
Zuurstof (gO ₂ . m ⁻¹)	6-8	> 5	9
Koolstofdioxide (gCO ₂ .m ⁻³)	-	< 25 ?	5,1
NH ₃ -N (g.m ⁻³)	-	< 0,1	6,7
NO ₂ ⁻ -N (g.m ⁻³)	-	?	9
NO ₃ ⁻ -N (g.m ⁻³)	-	100	8
Zwevende stoffen	-	25 ?	9

1 : Jones et al. (1980); 2 : Scherrer & Person-Le Ruyet (1983); 3 : Kamstra & Nijhof (1991); 4 : Scherrer (1984); 5 : Smart et al. (1979); 6 : Alderson (1979); 7 : Wickins (1980); 8 : Poxton et al. (1981); 9 : Kamstra et al. (1992).

Voor de berekening van de benodigde debieten om deze grenzen te handhaven, dienen ook de afvalproduktie en zuurstofkonsumptie per kg opgenomen voedsel gekend te zijn.

Tabel IV: Afvalproduktie en zuurstofkonsumptie van tarbot in g.kg⁻¹.voedsel⁻¹, naar Kamstra et al (1992).

Parameter	Produktie (g.kg ⁻¹ .voedsel ⁻¹) ('-' = konsumptie)
Zuurstof	-1200
Koolstofdioxide	1320
Zwevende stoffen	150
NH ₄ ⁺ -N	72
NO ₃ ⁻ -N	72

Vooraleer over te gaan tot de berekeningen, dient opgemerkt te worden dat het influent verondersteld wordt te voldoen aan volgende eisen:

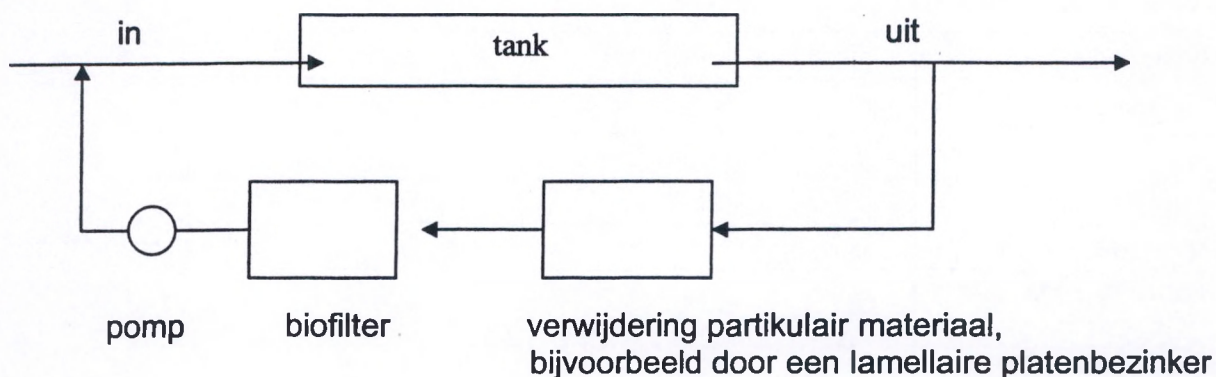
$T = 16^{\circ}\text{C}$

$\text{pH} = 7,1$

$S = 27,5 \text{ g/kg}$ (S = saliniteit)

3. Konfiguratie kweekstelsel

Op figuur 1 wordt een mogelijke configuratie tank – biofilter getoond. Stelt men bijvoorbeeld dat alle tanks op niveau 0 (gelijkvloers) opgesteld worden en de biofilters op niveau -1 (kelder), dan kan een deel van de uitstroom van de tanks gravitair naar de waterbehandeling stromen, terwijl het andere deel geloosd wordt. Na de eigenlijke rekonditionering wordt het water met behulp van een pomp terug naar de tank gevoerd.



Figuur 1: Opstelling van de kweektank en biofilter.

Omdat tanks van het raceway-type gebruikt worden, moet, om dichtslibbing van de biofilters te voorkomen, een verwijdering van partikulair materiaal doorgevoerd worden voor het water de biofilter binnenstroomt. Dit kan op verschillende manieren gebeuren, hier wordt als voorbeeld een lamellaire platenbezinker genomen. Er zijn ook zandfilters beschikbaar die onder druk werken en terzelfdertijd functioneren als biofilter.

4. Waterbehandeling

Verwijdering van partikulair materiaal:

De verwijdering van partikulair materiaal wordt bekomen door het filteren van het zeewater. De diameter van de kleinste deeltjes die dienen verwijderd te worden bepalen de diameter van de filteropeningen. De verwijdering van partikels moet in hoofdzaak gebeuren op 2 punten in het systeem: aan de pompen waar de waterinname gebeurt en voor de biofilters om het dichtslibben ervan te vermijden. Huguenin en Colt (1989) geven een overzicht van welk type filter het best kan

gebruikt worden bij een zeker debiet om partikels met een bepaalde diameter te verwijderen.

De noodzaak tot filtering aan het innamepunt is tweërlei: in de eerste plaats om beschadiging van de pompen te voorkomen en in de tweede plaats om te verhinderen dat ongewenste organismen in het systeem geraken. Daar het water verder in het systeem ontsmet wordt, volstaat het om aan het innamepunt een grove filtratie door te voeren van 150 tot 1000 μm . Deze filtertypes worden vervaardigd en zijn beschikbaar in verschillende materialen, vormen en afmetingen en werken al dan niet onder druk.

Het water dat de kweektanks verlaat, is zwaar belast met faekaliën en voedselresten. Om te verhinderen dat de biofilters zouden dichtslibben, moeten deze partikels verwijderd worden. Dit kan op 2 manieren gebeuren. Een zeer eenvoudige, maar doeltreffende vorm van sedimentatie kan doorgevoerd worden aan de hand van een lamellaire platenbezinker (Sorgeloos et al., 1986). De werking van een lamellaire platenbezinker steunt op het feit dat het water onderaan de bezinkingskamer turbulentieloos stijgt over de ruimtes tussen de platen. In de zo ontstane lamellaire stroming zetten de partikels zich neer op de platen en schuiven af naar de bodem. Het geakkumuleerde slib wordt regelmatig afgelaten.

De tweede mogelijkheid, filtering, kan op verschillende wijzen gebeuren, gaande van zeer eenvoudig (filternet of filterzak) tot gesofistikeerd (filteren onder druk of in zandfilters).

Verwijdering van metabolieten:

De waterbehandeling in een biofilter dient er voor te zorgen dat de afvalstoffen geproduceerd door de vissen en eventueel andere organismen worden afgebroken tot niet toxische componenten.

Hierna volgt de beschrijving van 2 gebruikte biofilters.

Sproeifilters of oxidatiebedden (Trickling filters):

Na een primaire sedimentatie om het water van het grootste particulier materiaal toe ontdoen, stroomt het water de biofilter binnen. De hoogte van de filterkolom van variëren van 3 tot maximaal 10 m. De gemiddelde BOD (Biological Oxygen Demand) die door dit type filter verwerkt kan worden, bedraagt 1 tot 5 $\text{Kg BOD} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{d}^{-1}$ bij een debiet van 1,5 tot 2,5 $\text{m}^3 \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{h}^{-1}$ (Verstraete, 1991).

Roterende biologische kontaktoren (Biodiscs)

Biodiscs zijn in essentie ook trickling filters, met het verschil dat de microflora hier vastgehecht zit op verticale schijven (discs) bevestigd aan een horizontale rotor. Biodiscs kunnen hoge belastingen aan (Verstraete, 1991): tot 2 $\text{Kg BOD} \cdot \text{d}^{-1} \cdot \text{m}^{-3}$ reaktor. Daarbij moet nog vermeld worden dat het energieverbruik van dit type filters laag is, namelijk $\pm 0,25 \text{ kWh}$ per Kg BOD input (Verstraete, 1991).

5. Besluit:

Technisch en biologisch gezien is de kweek van tarbot in het hier ontworpen systeem zeker haalbaar. De waterkwaliteit aan de Belgische kust voldoet echter niet aan de eisen, in het bijzonder met betrekking tot de ammonium- en nitraatstikstof. Gezien de zeer toxische werking van de niet-geïoniseerde fraktie van de ammoniumstikstof (ammoniak), is zonder verwijdering van deze component voorafgaand aan het gebruik

in de kweekinstallatie de kans op massale starfte van de tarbot in de kweektanks bijzonder groot. Verder onderzoek wordt dan ook aangeraden op de economische haalbaarheid van een tarbotkweek met volledige recirculatie aan de Belgische kust. Kamstra et al. (1992) voerden dit uit voor een 50 ton produktiesysteem in Nederland. De verwachte groeisnelheid van de tarbot versus de prijs per kilo verhindert een duidelijk besluit omtrent de economische haalbaarheid. Er dient eveneens onderzoek te gebeuren naar een voedsel samenstelling en dosering die resulteert in een optimale pigmentatiegraad van de gekweekte dieren.

Synthese van het onderzoek

De beperkingen van de visbestanden in zee werden pas duidelijk in het begin van de jaren negentig, toen de jaarlijkse produktie continu afnam met 2,5%. Het is duidelijk dat de aquacultuurproductie van marien vis deze afname niet kan compenseren, hoewel het aandeel van gekweekte vis exponentieel toeneemt (13 % in 1994), bovendien voorzien schattingen van de toekomstige vraag naar vis en schaaldieren in een toename met 50% tegen het jaar 2025. De effecten van onvoldoende natuurlijke hernieuwing van de visbestanden kunnen verholpen worden door het laten aangroeien van het bestand, d.w.z. door het in het wild uitzetten van gekweekte juvenielen om de natuurlijke populatie te laten aangroeien.

In deze studie werd speciale aandacht besteed aan de kwaliteit van de geproduceerde pootvis, naast cruciale biologische aspecten in verband met de overleving, groei en fysiologische toestand (m.a.w. specifieke kwaliteitskenmerken) van de uit te zetten pootvis.

Er werd speciale aandacht besteed aan de invloed van de tarbotkweek op de omgeving. Er werden geen antibiotica tijdens de larvale fase gebruikt, daar de gevaren die schuilen in het gebruik van antibiotica zijn genoegzaam bekend. Alle experimenten werden uitgevoerd in recirculatie systemen, waardoor men een betere controle heeft op het affluent en de hoeveelheid effluent wordt gereduceerd tot een minimum.

Tarbotlarven werden opgekweekt in 3 verschillende kweeksystemen. De groei, overleving en pigmentatie werd gevolgd de eerste 11dagen na hatching. Het eerste systeem heeft een batch fase en daarna, vanaf dag 8, wordt iedere tank verbonden met een aparte biofilter. Het tweede is een recirculatiesysteem waarbij het water wordt gefilterd over een proteïnskimmer met ozoninjectie en een biofilter. Het derde is een recirculatiesysteem waarbij de larven in een kooi worden gehouden. Het water circuleert over een aparte biofilter.

Hoge mortaliteit in het begin van het experiment maakte éénduidige conclusies onmogelijk. De doorstromingsnelheid in beide recirculatiesystemen veroorzaakte te veel stress bij de larven. Het gebruik van probionten moet een alternatief bieden voor antibiotica in de toekomst.

In de daarop volgende experimenten werd geprobeerd de vislarven te beschermen door geselecteerde bacteriën met een positieve invloed aan het kweekmedium en/of aan het voedsel van de vislarven toe te voegen. De overleving en groei van de vislarven werd gevolgd.

Vijf verschillende bacteriën werden gebruikt: *Vibrio proteolyticus*, *V. mediterranei*, *Aeromonas hydrophila*, *Glucanobacter sp* en een niet identificeerbare Cluster A.

Vanaf dag 5 was er een significant verschil in opname van de rotiferen tussen de controlebehandeling en de behandelingen met probionten. De bacteriële inoculatie

van het kweekwater heeft een positieve invloed op de eerste colonisatie van de darm van de vislarven, maar dit kwam slechts na 3 dagen tot uiting. De bacteriën die toegevoegd werden in de rotiferencultuur werden niet teruggevonden in de rotiferen zelf, waaruit blijkt dat de toevoeging van bacteriën voor de start van de voeding van de vislarven het meest invloed heeft.

Cluster A, *Vibrio proteolyticus* en *Glucanobacter* sp. hadden een positieve invloed op de overleving op dag 5 ten opzichte van de controle: 95%, 93%, 93% en 74% respectievelijk. Zowel *Aeromonas hydrophila* als *Vibrio mediterranei* vertoonden geen significant effect op de larvale overleving.

Cluster A, *Vibrio proteolyticus* en *Glucanobacter* sp. zijn potentiële probionten die verder moeten getest worden op grote schaal.

Naast het zoeken naar alternatieven voor antibiotica, werd geprobeerd tarbot juvenielen te produceren van hoge kwaliteit. Daartoe werden verschillende additieven aan commercieel voedsel toegevoegd.

Het effect van toevoeging van Vitamine C en E aan een dieet gesupplementeerd met visolie op de kwaliteit van juveniele tarbot werd bestudeerd.

De tarbotjuvenielen werden gehouden in een recirculatiesysteem bestaande uit 3 tanks (elk 2m³) deze zijn verbonden met een drumfilter en een biologisch sproeifilter. Het gefilterde water wordt via UV-sterilisatoren terug naar de tanks gepompt. Er werden 650 juvenielen in iedere tank geplaatst die 3 maal/dag werden gevoederd met 1) een standaardkorrel (Provimi Turbot starter), 2) de standaardkorrel gecoat met 9% visolie (DHA/EPA=4), 10% Vit C en 3) cfr. 2 met toevoeging van 1000 ppm Vit E.

Overleving en groei werden gevolgd tijdens het experiment en de lengte werd bepaald net voor het uitzetten. De kwaliteit werd bepaald aan de hand van een gemodificeerde saliniteit stresstest.

Toen de vissen in zee werden uitgezet, was er een significant lengteverschil. De vissen gevoederd met dieet 3 waren groter (16.04 ± 1.52) dan de controlegroep (15.17 ± 1.53). De vissen gevoederd met dieet 2 hadden een intermediaire lengte (15.62 ± 1.49). De overleving op het eind van de experimentele periode bedroeg 85%, 92% en 90% respectievelijk voor de 3 diëten.

Uit de resultaten van de gemodificeerde stress test bleek dat de dieren van dieet 2 het best de saliniteitsstress konden weerstaan. Het toevoegen van vitamines, vooral Vit E en extra HUFA's aan het dieet verhoogt de kwaliteit van de juvenielen en is dus sterk aan te raden in herstockeringsprogramma's en voor commerciële doeleinden.

Een experiment werd uitgevoerd om het effect van oxidatie van de olie in het voeder op de Vit E behoefte bij juveniele tarbot na te gaan. Diëten met verschillende gehalten Vit E (0 of 200 ppm) in combinatie met al dan niet geoxideerde triglyceride olie (60 of 7 meq peroxide/Kg). Een standaard ICES weaning dieet werd gebruikt als controle.

Nat en droog gewicht van de volledige vis en de lever, specifieke groeisnelheid, hepatosomatische index en Vit E en C gehalte in de lever werden bepaald.

Op het einde van het experiment waren het gewicht en de specifieke groeisnelheid van de vissen gevoederd met het dieet zonder Vit E en met geoxideerde olie significant lager dan die van de andere vissen. Uit een tweevoudige variantieanalyse bleek dat er een significant effect was van de oxidatie, maar niet van het Vit E gehalte in het voeder op het gewicht en de specifieke groeisnelheid. Het gewicht van de lever en de hepatosomatische index daarentegen waren afhankelijk van het Vit E gehalte in het voeder. De voeders zonder Vit E resulteerden in een hoger levergewicht en een grotere hepatosomatische index.

Reeds na 36 dagen werd het tocopherolgehalte in de voeders gereflecteerd in de tocopherolgehaltes van de lever.

Er werden verschillende methodes gebruikt en/of op punt gesteld om de kwaliteit van tarbotlarven en juvenielen te bepalen. Het is immers belangrijk dat de uitgezette dieren van hoge kwaliteit zijn om een voldoende hoge overleving te garanderen.

De kwaliteit van de tarbotlarven werd bepaald aan de hand van 3 verschillende, reproduceerbare testen: de saliniteit stresstest, de Cellulaire Energie Allocatie methode en de bepaling van de fagocytosecapaciteit.

In de eerste test was de stressindicator de respiratiegraad van de dieren. Een hogere respiratiegraad wijst op een meer gestresseerde situatie en een slechtere fysiologische conditie van de proeforganismen. Het CEA-concept is een goed alternatief voor de conventionele 'Scope for growth' methode, die te arbeidsintensief is om routinematig te worden toegepast. De energiereserve wordt gequantificeerd via een bepaling van het vet-, suiker- en eiwitgehalte in het testorganisme. De metingen worden uitgevoerd met behulp van spectrofotometrische methoden. Het verschil tussen de energiereserve en het energieverbruik wordt uitgedrukt in mJ per organisme per uur en reflecteert de energie, beschikbaar voor groei en reproductie. De fagocytosecapaciteit is een maat voor de kwaliteit bij vis.

De gemodificeerde stress test geeft significante verschillen naargelang de verschillende dieten die werden gebruikt zonder de dieren te doden. Deze test kan bijgevolg gebruikt worden om de kwaliteit van tarbotjuvenielen te bepalen voor ze worden uitgezet in zee.

Het bepalen van de energiereserves aan de hand van suikers en proteïnen bleek geen problemen op te leveren. Het is wel zo dat het protocol aangepast dient te worden naargelang de grootte van de vislarve. Bij kleine larven is het onmogelijk om organen apart te behandelen. Als ook de andere componenten (energiereserve aan lipiden en energieverbruik) kunnen bepaald worden, is de CEA test in de toekomst bruikbaar om de stressweerstand en de kwaliteit van tarbot te bepalen.

Met het bepalen van de fagocytosecapaciteit kon de voorgeschiedenis betreffende het toegediende voedselregime, al dan niet verrijkt met vitamine C en/of vitamine E,

achterhaald worden. Dit zelfs acht weken nadat de dieren op een zelfde dieet werden geplaatst, namelijk visafval.

Uitzetten van gekweekte dieren in natuurlijke ecosystemen geeft automatische genetische implicaties. Het is daarom noodzakelijk om enerzijds geen vreemd genetisch materiaal in te brengen op de plaats waar het uitzetten van gekweekte dieren gebeurt. Om die reden moet men gebruik maken van ouderdieren die tot een zelfde populatie behoren als deze die op de locatie van het uitzetten voorkomt. Het is daarom noodzakelijk een kijk te krijgen op de populatiestructuur van de doelsoort binnen zijn verspreidingsgebied. Genetische analyse van tarbotten afkomstig uit diverse locaties binnen het natuurlijk verspreidingsgebied van deze soort, heeft aangetoond dat dieren afkomstig uit de Ierse Zee als een aparte stock kunnen beschouwd worden. Daarnaast bestaan er indicaties dat tarbot nog verder kan opgesplitst worden in een (sub)populatie Engels Kanaal – Baai van Biscaye en een (sub)populatie Noordzee – Keltische Zee.

Anderzijds is het noodzakelijk de genetische diversiteit van de uitgezette dieren zo hoog mogelijk te maken, door het minimaliseren van inteelt, domesticatie en genetische drift. Gezien het ouderlijk genetisch effect mee de stressconditie en de overleving bepaald, zal de genetische diversiteit van de pootvis en de uitgezette dieren eveneens bepaald worden door het ouderlijk genetisch effect, namelijk door genetische uitval.

Volgens de resultaten van de technische haalbaarheidsstudie, is de waterkwaliteit aan de Belgische kust te laag om tarbotcultuur toe te laten. Daardoor is een compleet gesloten recirculatie systeem de enige mogelijke kweekmethode. Naast de voordelen van de controle over de inlaat van het systeem, heb je ook een lagere uitstoot in de natuurlijke omgeving. Het is heel moeilijk, economisch gezien, om besluiten te trekken over de haalbaarheid van tarbotkweek, daar de verandering van de marktprijs niet te voorspellen is.

Summary of the research

The restrictions of the fish populations became only clear in the nineties, when the yearly production decreased continuously with 2.5%. Clearly, the aquaculture production cannot compensate this decrease, although the share of the cultured fish increases exponentially (13% in 1994). In addition, the estimations of the future demand for fish and crustaceans expect a raise of 50% by the year 2025. The effects of insufficient natural renewal of the fish populations can be rectified by letting the population increase.

In this study special attention was given to the quality of the produced fish, next to crucial biological aspects in connection with the survival, growth and physiological condition (in other words specific quality characteristics) of the fish that will be put out in the sea.

Special attention was also given to the influence of turbot culture on the environment. No antibiotics were used during the larval phase, as the dangers that come with the use of antibiotics are well known. All experiments were conducted in recirculation systems, which results in a better control of the affluent and the effluent is reduced to a minimum.

Turbot larvae were cultured in 3 different systems. The growth, survival and pigmentation were monitored the first 11 days post-hatching. The first system has a batch phase and afterwards, from day 8 onwards, every tanks is connected to a separate biofilter. The second system is a recirculation system. The water passes through a protein skimmer with ozone injection and a biofilter. The third system is again a recirculation system where the larvae are kept in a cage. The water recirculates over a separate submerged biofilter.

High mortality in the beginning of the experiment made clear cut conclusions impossible. The flow rate in both recirculation systems caused the larvae too much stress. The use of probionts should offer an alternative for antibiotics in the future.

In the following experiments it was tried to protect the fish larvae by adding selected bacteria with a positive influence to the culture medium and/or to the food of the fish larvae. Survival and growth of the larvae were monitored.

Five different bacteria were used: *Vibrio proteolyticus*, *V. mediterranei*, *Aeromonas hydrophila*, *Glucanobacter sp* and a not identifiable Cluster A.

From day 5 onwards, there was a significant difference in the consumption of rotifers between the control and the treatments with probionts. The bacterial inoculation of the culture water has a positive effect on the first colonization of the gut of fish larvae, but this only became clear after 3 days. The bacteria that were added to the rotifer culture were not recovered in the rotifers themselves. From these data it can be concluded that the addition of bacteria before start feeding has the biggest effect.

Cluster A, *V. proteolyticus* and *Glucanobacter* sp. have a positive effect on the survival on day 5 compared to the controls: 95%, 93%, 93% and 74%, respectively. *A. aeromonas* as well as *V. mediterranei* had no significant effect on larval survival. Cluster A, *V. proteolyticus* and *Glucanobacter* sp. are potential probiotics that need to be tested on larger scale.

Next to the experiments on alternatives for antibiotics, high quality turbot juveniles needed to be produced.

The effect of addition of Vitamins C and E to a diet supplemented with fish oil on the quality of the produced turbot larvae was studied.

The turbot juveniles were kept in a recirculation system with 3 tanks (2 m³ each) connected to a drum filter and a biological trickling filter. The filtered water is pumped back to the tanks through UV-sterilisers. 650 juveniles were put in each tank and fed 3 times a day with 1) a standard granule (Provimi Turbot Starter), 2) the standard granule coated with 9% fish oil (DHA/EPA = 4%), 10% Vit C and 3) cfr. 2 with addition of 1000 ppm Vit E.

Survival and growth were monitored during the experiment and the length was measured just before release in the sea. The quality was determined using a modified salinity stress test.

When the fishes were released into the sea, there was a significant size difference. The fishes fed with diet 3 were bigger (16.04 ± 1.52) than the control group (15.17 ± 1.53). The fishes fed diet 2 had an intermediate size (15.62 ± 1.49). The survival at the end of the experiment was 85%, 92%, 90%, respectively for the 3 diets.

The results of the modified stress test showed that the fish fed diet 2 had the highest quality. The addition of vitamins, especially Vit E, and addition of HUFA's enhances the quality of the juveniles and should be recommended in restocking programs and for commercial purposes.

An experiment was conducted to evaluate the effect of oxidation of the oil present in the feed on the need of Vit E in juvenile turbot. Diets with different Vit E (0 or 200 ppm) in combination with either oxidized (60 meq peroxide/Kg) or unoxidized (7 meq peroxide/Kg) triglyceride oil. A standard ICES weaning diet was included as a control.

Wet and dry weight of the whole body fish and the liver, specific growth rate, hepatosomatic index and levels of vitamin C and E in the liver were measured.

At the end of the experiment, the whole body weight and the specific growth of the fish fed the diet containing oxidized oil, without additional Vit E were significantly lower than of the other fish. A two-way analysis of variance showed a significant effect of the oxidation, but not of the dietary Vit E level on the weight and on the specific growth rate of the fish. The liver weight and the hepatosomatic index on the other hand were affected by the vitamin E level. Diets without Vit E resulted in the highest liver weight and hepatosomatic index.

Already after 36 days, the tocopherol level in the diets was reflected in the one in the liver.

Several methods to determine the quality of turbot larvae and juveniles were used and/or made perfect. It is of utter most importance that the released fish have a high quality to guarantee a high survival rate.

The quality of the turbot larvae was determined by 3 different reproducible tests: the salinity stress test, the Cellular Energy Allocation method and the determination of the phagocytosis capacity.

In the first test, the respiration speed was the stress indicator. A higher respiration speed is caused by a stressful situation and a worse physiological condition of the experimental organisms. The CEA-concept is a good alternative for the conventional 'Scope of Growth' method, which is too labour intensive to be used routinely. The energy reserve is quantified via the determination of the fat, sugar and proteine content of the test organism. A spectrophotometer is used for the measuring the levels. The difference between the energy reserve and the energy consumption is expressed in mJ per organism per hour and reflects the energy available for growth and reproduction. The phagocytosis capacity is a measure for the quality of the fish.

The modified salinity stress test gives significant differences according to the different diets used without killing the organisms. Therefore, this test can be used to determined the quality of the turbot juveniles before they are released into the sea.

The determination of the energy reserves through the sugars and proteins did not give any problems. The protocols had to be adjusted according to the size of the fish larvae. It is impossible to use separate organs in small fish. If the other components (energy reserve and the use of lipids and energy) could be determined, then the CEA test is convenient to determine the stress resistance and the quality of turbot in the future.

Through the determination of the phagocytosis capacity, one is able to define the diet used before, even 8 weeks after the fish have been given fish trash.

The release of farmed animals into natural ecosystems has genetic implications. It is therefore necessary on the one hand not to introduce genetically foreign organisms on the place of release. For this reason, one should use brood stock originating from the population present at the site of the release of the cultured juveniles. Therefore, it is important to document the structure of the populations of the target species within its range of distribution. Genetic analysis of turbot originating from different locations within the natural range of distribution has shown that the animals coming from the Irish Sea can be considered as a separate stock. There are also indications that this species can be further divided into a (sub)population English Channel – Bay of Biscay and a (sub)population North sea- Celtic Sea.

On the other hand, it is necessary to enlarge the range of genetic diversity of the released animals, by minimizing the inbreeding, domestication and genetic drift. As

the parental genetic effect also determines the stress resistance condition and the survival, the genetic diversity of the juveniles and the released fish will as well be determined by the parental genetic effect, namely by genetic loss.

According to the technical feasibility study, the water quality at the Belgian coast is too low to allow turbot larviculture. For that reason, a complete closed recirculation system is the only possible culture method. Next to the advantages of the control of the inlet, you have also less effluent flowing back to the natural environment. It is very difficult, economically spoken, to draw conclusions on the feasibility of the turbot culture, as the variation of the market prize is not predictable.

Literatuurlijst

- Alderson, R. 1979. The effect of ammonia on the growth of juvenile dover sole, *Solea solea* (L.) and turbot, *Scophthalmus maximus* (L.) Aquaculture, 17: 291-309
- Amos, B., Schlötterer, C., en Tautz, D. 1993. Social structure of pilot whales revealed by analytical DNA profiling. Science (Washington, D.C.) 260: 670-672.
- Aneer, G. en Weston, L. 1990. Migration of turbot (*Psetta maxima* L.) in the northern Baltic proper. Fisheries Research 9: 307-315.
- Arnason, E. en Rand, D.M. 1992. Heteroplasmy of short tandem repeats in mitochondrial DNA of Atlantic cod, *Gadus morhua*. Genetics 132: 211-220.
- Bagge, O. 1987. Tagging of turbot and brill in the Kattegat 1965-1970. ICES C.M. 1987/G:10, 27 pp.
- Beacham, T.D., Miller, K.M. en Withler, R.E.. 1996. Minisatellite DNA variation and stock identification of coho salmon. Journal of Fish Biology 49: 411-429.
- Bentzen, P., Taggart, C.T., Ruzzante, D.E. en Cook, D. 1996. Microsatellite polymorphism and the population structure of cod (*Gadus morhua*) in the North West Atlantic. Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences 53: 2706-2721.
- Blanco G., Cagigas, E., Vasquez, E. en Sanchez, J.A. 1998. Genetic impact of introduced domesticated strains of brown trout, *Salmo trutta*, on native Spanish populations. In: Stocking and introduction of fish (Ed. I.G. Cowx). Fishing News Book. A division of Blackwell Science Ltd. 456 pp.
- Blanquer, A., Alayse, J.-P., Berrada-Rkhami, O. en Berrabi, P. 1992. Allozyme variation in turbot (*Psetta maxima*) and brill (*Scophthalmus rhombus*) (Osteichthyes, Pleuronectiformes, Scophthalmidae) throughout their range in Europe. Journal of Fish Biology 41: 725-736.
- Cachelou 1992. Vermeld in Dhert, P. (1992) Persoonlijke communicatie.
- Carr, S.M. en Marshall, H.D.. 1991. Detection of intraspecific DNA sequence variation in the mitochondrial cytochrome b gene of Atlantic cod (*Gadus morhua*) by the polymerase chain reaction. Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences 48: 48-52.
- Carvalho, G.R. en Cross, T.F. 1998. Enhancing fish production through introductions and stocking: genetic perspectives. In: Cowx, I.G. (Ed.). Stocking and introduction of fish: 329-337.
- Coughlan, J.P., Imsland, A.K., Galvin, P.T., Fitzgerald, R.D., Naevdal, G. en Cross, T.F. 1998. Microsatellite DNA variation in wild populations and farmed strains of turbot from Ireland and Norway: a preliminary study. Journal of Fish Biology 52: 916-922.

- Cross, T.F. en Payne, R.H. 1978. Geographic variation in Atlantic cod, *Gadus morhua*, off Eastern North America: a biochemical systematics approach. *Journal of Fisheries Research Board of Canada* 35: 117-123.
- Cross, T.H. en Galvin, P. 1998. Genetic considerations in stocking Atlantic salmon, *Salmo salar*. In: *Stocking and introduction of fish* (Ed. I.G. Cowx). Fishing News Book. A division of Blackwell Science Ltd. 456 pp.
- Dahle, G. en Jørstad, K.E. 1993. Haemoglobin variation in cod – a reliable marker for Arctic cod (*Gadus morhua* L.). *Fisheries Research* 16: 301-311.
- Danielssen, D.S. & Hjertness, T. 1991. Effects of dietary protein levels in diets for turbot (*Scophthalmus maximus* L.) to market size. Poster presented at the 14th Symposium on Fish Feeding and Nutrition, Biarritz, France, June 1991
- Darnell et al., 1990. *Molecular cell biology*. Second edition. New York. Freeman and company. pp. 555 - 560.
- De Coen, W.M., 1999: Energiemetabolisme, DNA-schade en populatiedynamica van de watervlo *Daphnia magna* Straus onder toxische stress. Doctoraatswerk, Gent, Faculteit Landbouwkundige en Biologische Wetenschappen. 545 pp.
- Delbare, D. 1992. Broedhuistechnieken voor de continue productie van de tarbot, *Scophthalmus maximus* L. Afstudeerwerk, Gent, Fakulteit Landbouwkundige en Toegepaste Biologische Wetenschappen, 99 p.
- Dhert, P., P., Lavens and P., Sorgeloos, 1991: A recirculation system for the experimental hatching-rearing of turbot (*Scophthalmus maximus*) larvae. p. 339-342. In: P., Lavens, P., Sorgeloos E., Jaspers and F., Ollevier (Eds) Larvi'91 Fish and Crustacean Larviculture Symposium. European Aquaculture Society, Special publication N° 15, Gent, Belgium.
- Dhert, P., P., Lavens and P., Sorgeloos, 1992: Stress evaluation: a tool for quality control of hatchery-produced shrimp and fish fry. *Aquaculture Science*, *Aquaculture Europe*. 17 : 6-16.
- Dhert, P., P., Lavens; M., Dehasque and P., Sorgeloos, 1994: Improvements in the larviculture of turbot *Scophthalmus maximus*: zootechnical and nutritional aspects, possibility for disease control. p. 32-46. In: P., Lavens & R. A. M., Remmerswaal (Eds). *Turbot Culture: problems and prospects*, European Aquaculture Society, Special Publication, N° 22, Gent, Belgium.
- Doyle, R.W., Herbinger, C., Taggart, C.T. en Lochmann, S. 1995. Use of DNA microsatellite polymorphism to analyse genetic correlations between hatchery and natural fitness. In: H.L. Scramm & R.G. Piper (Eds). *Uses and effects of cultured fishes in aquatic ecosystems*. Bethesda: American Fisheries Society, pp. 205-211.
- EIFAC symposium on new developments in the utilization of heated effluents and of recirculation systems for intensive aquaculture, Stavanger, May 1980.

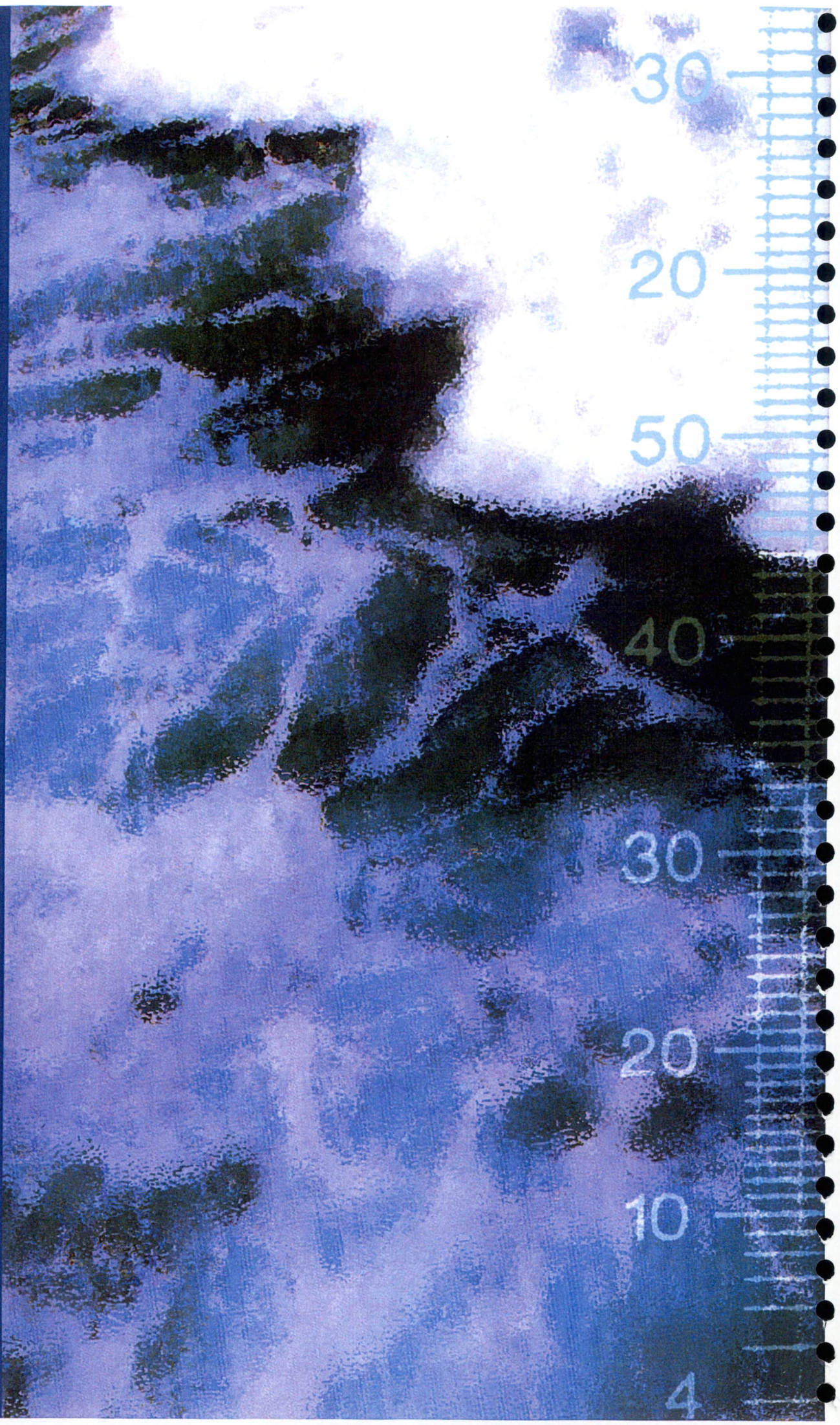
- Estoup, A., Gharbi, K., SanCristobal, M., Chevalet, C., Haffray, P. en Guyomard, R. 1998. Parentage assignment using microsatellites in turbot (*Scophthalmus maximus*) and rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) hatchery populations.
- Estoup, A., Largardier, C.E., Perrot, E. en Chourrout, D. 1996. Rapid one-tube DNA extraction for reliable PCR detection of fish polymorphic markers and transgenes. *Mol. Mar. Biol. and Biotechnol.* 5 : 295-298.
- Gatesoupe, F.J., 1991: The use of probiotics in fish hatcheries. Results and Prospects. Mariculture Committee. ICES C.M. 1990, paper F: 37.
- Gatesoupe, F.J., 1994: Lactic acid bacteria increase the resistance of turbot larvae, *Scophthalmus maximus*, against pathogenic *Vibrio*. *Aquaculture Living Resource.* 7: 277-282.
- Goodman, S.J. 1997. RST CALC: a collection of computer programs for calculating estimates of genetic differentiation from microsatellite data and determining their significance. *Molecular Ecology* 6: 881-885.
- Grisez, L., Chair, M., Sorgeloos, P. and F., Ollevier, 1996 Mode of infection and spread of *Vibrio anguillarum* in turbot *Scophthalmus maximus* larvae after oral challenge thorough live feed. *Diseases of Aquatic Organisms*, 86, 181-187.
- Hearne, C.M., Ghosh, S., en Todd, J.A. 1992. Microsatellite for linkage analysis of genetic traits. *Trends Genet.* 8: 288-294.
- Howell, B.R., 1994: Fitness of hatchery-reared fish for survival in the sea. *Aquaculture and Fisheries Management.* 25: 3-17.
- Huguenin, J.E. & Colt, J. 1989. Design and operating guide for aquaculture seawater systems. Amsterdam, Elsevier 264 p
- Huys, L.; P., Dhert; R., Robles ; F., Ollevier ; P., Sorgeloos & J., Swings, 2000: Search for beneficial bacterial strains for turbot (*Scophthalmus maximus* L.) larviculture. *Journal of World Aquaculture.* (in press).
- Imsland, A.K., Scanu, G. en Naevdal, G. 1996. New variants of the hemoglobins of turbot (*Scophthalmus maximus*): possible use in population genetic studies and aquaculture. ICES paper C.M. 1996/F:14 Ref. G. 9 pp.
- In: Tiews, K; (ed.) Proceedings in world symposiums on aquaculture in heated effluents and recirculation systems. Berlin, 369-382.
- Jamieson, A. 1975. Enzyme type of Atlantic cod stocks on the North American banks. In: *Isozymes. IV. Genetics and Evolution* (Ed. Marckert CL), pp. 491-515. Academic Press, New York.
- Jarne, P. en Lagoda, P.J.L. 1996. Microsatellites, from molecules to populations and back. *Trends Ecol. Evol.* 11(10): 424-429.

- Jones, A., Brown, J.A.G., Douglas, M.T. & Thompson, S.J. 1980. Progress towards developing methods for the intensive farming of turbot (*Scophthalmus maximus* L.) in cooling water from a nuclear power station. EIFAC symposium on new developments in the utilization of heated effluents and of recirculation systems for intensive aquaculture, Stavanger, May 1980.
- Kamstra, A. & Nijhof, M. 1991. Verslag van een studiereis naar tarbotkwekerijen in Spanje en Frankrijk. Rapport AQ 91-03, Rijksinstituut voor Visserijonderzoek, IJmuiden, Nederland
- Kamstra, A.; Davidse, W.P. & Klomp, G. 1992. De technische en economische haalbaarheid van tarbotteelt in recirkulatiesystemen. Raport A 92-02, Rijksinstituut voor Visserijonderzoek, IJmuiden, Nederland
- Karas, P. En Klingheim, V. 1997. Effects of temperature and salinity on embryonic development of turbot (*Scophthalmus maximus* L.) from the North Sea, and comparisons with Baltic populations. Helgolander meeresuntersuchungen 51: 241-247.
- Kellogg, K.A., Markert, J.A., Stauffer, J.R. en Kocher, T.D. 1995. Microsatellite variation demonstrates multiple paternity in lekking cichlid fishes from Lake Malawi, Africa. Proc. R. Soc. London Ser. B. 260: 79-84.
- Kuhlmann, D. en Quantz, G.. 1980. Some effects of temperature and salinity on the embryonic development and incubation time of the turbot, *Scophthalmus maximus* L., from the Baltic Sea. Meeresforschung 28: 172-178.
- Kursusnota's, Gent, Fakulteit Landbouwkundige en Toegepaste Biologische Wetenschappen, 362 p.
- Landolt, M.L. 1989. The relation between diet and the immune response of fish. Aquaculture 79: 193-206.
- Maltby, L. and C., Naylor, 1990: Preliminary observations on the ecological relevance of the *Gammarus* 'scope for growth' assay: effect of zinc on reproduction. Functional Ecology. 4: 393-397.
- Mattews, E.S. et al., 1990. Assays of immune function in fish macrophages. Techniques used as indicators of environmental stress. Techniques in Fish Immunology. Fish Immunology Technical Communications 1. Edition by Stolen J.S et al.
- Minkhoff, G. and A.P., Broadhurst, 1994: Intensive production of turbot, *Scophthalmus maximus* fry. p. 14-31 In: Turbot culture : Problems and Prospects. Lavens, P. and R.A.M., Remmerswaal (Eds) European Aquaculture Society, Special publication N° 22, Gent Belgium.
- Møller, D. 1968. Genetic diversity in spawning cod along the Norwegian coast. Hereditas 60: 1-32.
- Navarre, O. 1985. The effects of vitamin C status on infection and antibody formation induced by *Vibrio anguillarum* in rainbow trout (*Salmo gairdneri*). Matsers Thesis, University of Washington, Seattle, W.A., 124 pp.

- Nei, M. 1973. Analysis of gene diversity in subdivided populations. Proceedings of the National Academy of Sciences, USA 70: 3321-3323.
- Nei, M., Tajima, F. en Tatenno, Y. 1983. Accuracy of estimated phylogenetic trees from molecular data. Journal of Molecular Evolution 19: 153-170.
- Nissling, A. en Westin, L. 1991a. Egg mortality and hatching rate of Baltic cod (*Gadus morhua*) in different salinities. Marine Biology 111: 29-32.
- Nissling, A. en Westin, L. 1991b. Egg buoyancy of Baltic cod (*Gadus morhua*) and its implications for cod stock fluctuations in the Baltic. Marine Biology 111: 33-35.
- Park, L.A. en Moran, P. 1994. Developments in molecular genetic techniques in fisheries. Rev. Fish Biol. Fish. 4: 272-299.
- Planas, M., 1994: R&D on production systems. p. 57-73. In: Turbot culture Problems and prospects. Lavens, P. and R.A.M. Remmerswaal (Eds). European Aquaculture Society, Special publication N° 22, Gent Belgium.
- Pogson, G.H., Mesa, K.A. en Boutillier, R.G. 1995. Genetic population structure and gene flow in Atlantic cod *Gadus morhua*: a comparison of allozyme and nuclear RFLP loci. Genetics 139: 375-385.
- Poxton, M.G., Murray, K.R., Linfoot, B.T. & Pooley, A.B.W. 1981. The design and performance of biological filters in an experimental mariculture facility.
- Renaud, F.G. en Pasteur, N. 1986. Geographical divergence in *Bothriocephalus* (Cestoda) of fishes demonstrated by enzyme electrophoresis. International Journal for Parasitology 16: 553-558.
- Ringø, E. and O., Vadstein, 1998: Colonization of *Vibrio pelagius* and *Aeromonas caviae* in early developing turbot (*Scophthalmus maximus* L.) larvae. Journal of Applied Microbiology 84(2): 227-233.
- Ringø, E.; T.H., Birkbeck; Munro, P.D.; O., Vadstein and K., Hjeleland, 1996: The effect of early exposure to *Vibrio pelagius* on the aerobic bacterial flora of turbot, *Scophthalmus maximus* (L.), larvae. Journal of Applied Bacteriology. 81: 207-211.
- Rombaut, G., P., Dhert, J., Vandenberghe, L., Verschuere, P. Sorgeloos and W., Verstraete, 1999: Selection of bacteria enhancing the growth rate of axenically hatched rotifers (*Brachionus plicatilis*). Aquaculture 176: 195-207.
- Ruzzante, D.E., Taggart, C.T. en Cook, D. 1998. A nuclear DNA basis for shelf- and bank-scale population structure in northwest Atlantic cod (*Gadus morhua*): Labrador to Georges Bank. Molecular Ecology 7: 1663-1680.
- Ruzzante, D.E., Taggart, C.T. en Cook, D. 1999. A review of the evidence for genetic structure of cod (*Gadus morhua*) populations in the NW Atlantic and population affinities of larval cod off Newfoundland and the Gulf of St. Lawrence. Fisheries Research 43: 79-97.

- Ruzzante, D.E., Taggart, C.T., Cook, D. en Goddard, S.V. 1996. Genetic differentiation between inshore and offshore Atlantic cod (*Gadus morhua* L.) off Newfoundland: microsatellite DNA variation and antifreeze level. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 53: 634-645.
- Ruzzante, D.E., Taggart, C.T., Cook, D. en Goddard, S.V. 1997. Genetic differentiation between inshore and offshore Atlantic cod (*Gadus morhua* L.) off Newfoundland: a test and evidence of temporal stability. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 54: 2700-2708.
- Scherer, P. & Person-Le Ruyet, J. 1983. Effects de la température sur la croissance du turbot (*Scophthalmus maximus*) entre 3 et 20 g. ICES paper C.M. 1983/F :22
- Scherrer, P. 1984. Influence de la température et de la salinité sur la croissance et la consommation d'oxygène du juvénile de turbot (*Scophthalmus maximus* L.) (phase nurserie). Dissertatie, Université de Bretagne Occidentale.
- Slatkin, M. 1995. A measure of population subdivision based on microsatellite allele frequencies. *Genetics* 139: 457-462.
- Slatkin, M. en Barton, N.H. 1989. A comparison of three indirect methods for estimating average levels of gene flow. *Evolution* 43: 1349-1368.
- Smart, G.R., Knox, D., Harrison, J.G., Ralph, J.A. & Richards, R.H. 1979. Nephrocalcinosis in rainbow trout; the effect of exposure to elevated CO₂ concentrations. *J. Fish Disease*, 2: 279-289.
- Smith, P.J., Birley, A.J., Jamieson, A. en Bishop, C.A. 1989. Mitochondrial DNA in the Atlantic cod, *Gadus morhua*: lack of genetic divergence between eastern and western populations. *Journal of Fish Biology* 34: 369-373.
- Solemdal, P. 1967. The effect of salinity on buoyancy, size and development of flounder eggs. *Sarsia* 29: 431-442.
- Solemdal, P. 1973. Transfer of Beltic flatfish to a marine environment and long-term effects on reproduction. *Oikos (Suppl.)* 15: 268-276.
- Sorgeloos, P., 1994: State of the art in marine fish culture. *World Aquaculture*. 25: 34-37.
- Suantika, G.; P., Dhert; M., Nurhudak and P., Sorgeloos, 2000: High density production of the rotifer *Brachionus plicatilis* in a recirculation system: consideration of water quality and zootechnical and nutritional aspects. *Aquacultural Engineering* 21: 201-214.
- Takezaki, N. en Nei, M. 1996. Genetic distances and reconstruction of phylogenetic trees from microsatellite DNA. *Genetics* 144: 389-399.
- Thomson, I., White, A., Fletcher, T.C., Houlihan, D.F. en Secombes, C.J. 1993. The effect of stress on the immune response of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) fed diets containing different amounts of vitamin C. *Aquaculture* 114: 1-18.

- Verschuere, L., Rombaut, G., Huys, G., Dhont, J., Sorgeloos, P. and W., Verstraete, 1999 Microbial control of the culture of *Artemia* juveniles through preemptive colonization by selected bacterial strains. Applied and Environmental Microbiology, 65, 2527-2533.
- Verstraete, W. 1991. Biotechnological processes in environmental technology.
- Wehrhahn, C.F. en Powell, R.. 1987. Electrophoretic variation, regional differences, and gene flow in the coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*) of southern British Colombia. Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences 44: 822-831.
- Weir, B.S. en Cockerham, C.C.. 1984. Estimating F-statistics for the analysis of population structure. Evolution 38: 1358-1370.
- Wickins, J.F. 1980. Water quality requirements for intensive aquaculture: a review.
- Wright, J.M. 1993. DNA fingerprinting of fishes. In: Biochemistry and Molecular Biology of Fishes, Vol. 2 (Eds. P.W. Hochachka and T. Mommsen), pp. 57-91. Elsevier Science Publishers, Amsterdam, The Netherlands.
- Wright, J.M. en Bentzen, P. 1994. Microsatellites: genetic markers for the future. Rev. Fish Biol. Fish. 4: 384-388.
- Wright, S. 1951. The genetical structure of populations. Annals Eugenics 15: 323-354.
- Yokota, M. en Watanabe, S. 1997. One-way gene flow by stocking and its effects on a fish population. Fisheries Science 63(4): 539-542.



FEDERAAL
WETENSCHAPSBELEID

Wetenschapsstraat 8
1000 Brussel

www.belspo.be/fedra