

De auteur en de promotor geven de toelating deze scriptie voor consultatie beschikbaar te stellen en delen ervan te kopiëren voor persoonlijk gebruik. Elk ander gebruik valt onder de beperkingen van het auteursrecht, in het bijzonder met betrekking tot de verplichting uitdrukkelijk de bron te vermelden bij het aanhalen van resultaten uit deze masterproef.

The author and promotor give the permission to use this thesis for consultation and to copy parts of it for personal use. Every other use is subjected to the copyright laws, more specifically the source must be extensively specified when using results from this thesis.

The promotor:

The author:

Prof. Dr. ir. W. Verstraete

An Lambert

Gent, augustus 2009

# Dankwoord

Het labowerk en daaropvolgende schrijven van een thesis, dat kan je niet alleen.

Daarom geef ik het eerlijk toe: wat zou deze thesis zijn zonder al deze mensen? Niet veel, vrees ik.

Prof. Verstraete en prof. Boon, dank u voor het advies

Roselien, dank je voor het geduld wanneer je iets uitlegde, de talrijke uren hulp in het labo, het schier eindeloze naleeswerk en natuurlijk de leuke en motiverende babbels

Mijn welgemeende dank voor het advies en de praktische hulp in het labo aan Rita, Siska, Ellen VG, Diederik en Tim. Zonder jullie zou ik er veel langer over gedaan hebben om overal mijn weg te vinden en zou de sfeer in het labo heel wat minder zijn!

Geert, dank u voor de hulp bij de vetextracties, FAME- en vitamine C-analyses

A special thanks to Kartik for all the help in solving the mystery of my non-sterile hatching. Without you I'd have given up on them.

En dan zijn er natuurlijk nog de mede-thesisstudenten: Ellen, Piet, Lore, Lieve, Thomas, Davy, Renzo en de rest. De ene kwam je al wat vaker tegen dan de andere, maar steeds was het een fijn weerzien. De sfeer in het labo was fantastisch!

The thesisstudents at the ARC: Jijing, Jayant and Ruben: thanks for the nice chats in the lab and the comfort of not being there on your own at the craziest moments

Ik mag zeker ook Karen, mijn 'aquacultuurmaatje' zoals ze het zelf omschreef, niet vergeten. De hulp bij het verdelen en tellen van *Artemia*, het advies en de koffiekletsmomenten, ik zal ze missen

Ook mijn nalees-team mag ik niet vergeten: Lies, Tamara, Sofie, Wouter, papa en mama. Dank u voor de steun in die laatste, spannende momenten

Al mijn vrienden en familie voor het tolereren van de talloze afwezigheden in de loop van het jaar

En natuurlijk al mijn klas- en jaargenoten bij de bio-ingenieurs voor 5 fantastische jaren!

## Samenvatting

De voornaamste vorm van stikstofafval die voorkomt in een aquacultuursysteem is ammonium ( $\text{NH}_4^+$ ), dat geëxcreteerd wordt door de gekweekte aquatische dieren. Ammonium staat in evenwicht met het, voor de gekweekte dieren toxische, ammoniak ( $\text{NH}_3$ ). In een intensief aquacultuursysteem stapelt TAN ( $\text{NH}_4^+ + \text{NH}_3$ ) zich op en dient het dus regelmatig extra verwijderd te worden. De klassieke manier om het water te zuiveren is het gebruik van een nitrificerende biofilter waarin het ammonium wordt omgezet in nitraat. Een alternatieve manier om TAN uit het water te verwijderen is de bio-vlokkentechnologie. Hierbij wordt stikstof door heterotrofe bacteriën ingebouwd in microbiële biomassa. Deze omzetting wordt gestimuleerd door de C/N verhouding in het water te verhogen tot minimum 10. In de praktijk wordt hiervoor commercieel voeder met een lager eiwitgehalte gebruikt of wordt er een koolstofbron toegediend aan het systeemwater.

In deze masterproef werden vijf extra koolstofbronnen gebruikt, namelijk acetaat, zetmeel, betaïne, MBA en glycerol. Acetaat werd toegepast omdat het een makkelijk decomposeerbare koolstofbron is. Zetmeel werd toegepast omdat het een complexe koolstofbron is. Betaïne werd gebruikt omdat het een component is die aan commerciële voeders toegevoegd wordt wegens zijn stimulerende werking voor de voederopname. MBA werd toegepast omdat het boterzuur bevat wat mogelijk het aquacultuurdier kan beschermen tegen infecties wanneer het de bio-vlokken consumeert. Glycerol werd toegepast omdat het een goedkoop nevenproduct is van de bio-dieselindustrie.

De vijf types bio-vlokken zorgden voor een voldoende verwijdering van TAN uit het water.

In een eerste luik van deze masterproef werd de biochemische samenstelling van de acetaat-, zetmeel-, betaïne- en MBA-bio-vlokken bepaald om de mogelijkheid tot gebruik of de geschiktheid van de bio-vlokken als additioneel voeder na te gaan. De hoogste eiwitinhoud werd bekomen in de betaïne- en zetmeel-bio-vlokken (respectievelijk  $66 \pm 14\%$  DS en  $65 \pm 15\%$  DS). De MBA-bio-vlokken bevatten minder eiwit, namelijk  $44 \pm 13\%$  DS en de acetaat-bio-vlokken  $36 \pm 8\%$  DS. Alle vier de beschouwde types bio-vlokken bleken dus voldoende eiwit te bevatten om een significante eiwitbron te kunnen vormen in het dieet van het gekweekte dier. De gehalten aan essentiële vetzuren waren in alle vier de types bio-vlokken laag, met enkel in de betaïne-bio-vlokken een hoge n-6/n-3 vetzuurverhouding ( $34 \pm 2$ ). Het vitamine C-gehalte kon enkel in de acetaat-bio-vlokken bepaald worden ( $490 \pm 149 \mu\text{g/g}$  DS). De bio-vlokken kunnen het gebruik van commercieel voeder dus niet volledig vervangen vermits er via het aangekochte voeder verzekerd moet worden dat het dieet voldoende essentiële vetzuren, vitamines, ... bevat aangezien de bio-vlokken, afhankelijk van de toegepaste koolstofbron, niet steeds voldoen in de vraag van het aquatisch dier naar dergelijke essentiële componenten. De vereiste inzake eiwitinhoud, wat de belangrijkste factor is, voldoet wel aan de kwaliteitseisen die gesteld worden aan voeder.

Het gebruik van de koolstofbronnen in een commercieel aquacultuursysteem is economisch haalbaar behalve in het geval van betaïne.

In het tweede luik van deze masterproef werd de invloed van bio-vlokken op de opportunistische pathogenen *Vibrio harveyi* BB120 en *Vibrio campbellii* LMG21363 onderzocht. Er werd zowel naar de invloed van de bio-vlokken op de pathogeen zelf als naar de invloed van de bio-vlokken op de virulentie van de pathogeen ten aanzien van een gastheer gekeken. Om de invloed op de pathogeen zelf na te gaan, werd de luminescentie en celdensiteit of optische densiteit bepaald. De resultaten van deze testen wijzen in de richting dat bio-vlokken de quorum sensing bij *Vibrio harveyi* BB120 beïnvloeden. Op *Vibrio campbellii* LMG21363 lijken de bio-vlokken geen invloed te hebben.

De virulentie van de pathogenen ten opzichte van een gastheer werd onderzocht aan de hand van challenge testen met gnotobiotische *Artemia* nauplii. De resultaten van deze testen wijzen aan dat zowel de glycerol-, betaïne- als MBA-bio-vlokken de *Artemia* beschermen tegen *Vibrio harveyi* BB120. Dit beschermende effect is beperkt tot de levende bio-vlokken, want indien de bio-vlokgemeenschap werd afgedood door autoclaveren was er geen sprake van een beschermend effect. Geen enkele van de drie types bio-vlokken bood bescherming tegen *Vibrio campbellii* LMG21363.

Het mechanisme achter dit beschermend effect werd echter niet ontsluitend in dit onderzoek.

In dit onderzoek werd dus aangetoond dat de waterkwaliteit in situ kan gecontroleerd worden door de C/N verhouding in het systeem op te drijven aan de hand van het toedienen van een koolstofbron. De beschouwde types bio-vlokken bevatten voldoende eiwit om een significant deel van het dieet van het aquacultuurdier uit te maken waardoor de toepassing van BFT een reductie in de voederkost kan teweegbrengen. Bovendien bleken de drie types bio-vlokken waarvan het effect op pathogenen werd onderzocht, een beschermend effect tegen *Vibrio harveyi* BB120 te vertonen, wat gezien de impact op de aquacultuur die veroorzaakt wordt door *Vibrio* spp. een belangrijk bijkomend voordeel van BFT kan zijn.

## Abstract

The most important form of nitrogen waste in aquaculture systems is ammonium ( $\text{NH}_4^+$ ), which is excreted by the animals in the aquaculture system. Ammonium is in equilibrium with the, for aquatic animals toxic, ammonia ( $\text{NH}_3$ ). In an intensive aquaculture system TAN ( $\text{NH}_4^+ + \text{NH}_3$ ) accumulates and has to be removed regularly. The classical way to remove TAN is by using a biofilter where the ammonium is converted to nitrate. An alternative way to remove TAN from the water in an aquaculture system is the bio-flocs technology, where the nitrogen is converted into microbial biomass by heterotrophic bacteria. This conversion is stimulated by increasing the C/N ratio in the water till minimum 10. In practice this adjustment of the C/N is carried out by using a commercial feed that contains less protein or by adding a carbon source to the culture water.

In this master thesis five carbon sources were used; acetate, starch, betaine, MBA and glycerol. Acetate is an easy decomposable carbon source. Starch is a complex carbon source. Betaine is used in commercial aquaculture feeds because of its property to stimulate feed uptake. MBA contains butyric acid, which could protect the animal from infections when the bio-flocs are consumed. Glycerol was used because it is a cheap by-product of the production of bio-diesel.

The five types of bio-flocs provided for adequate removal of the TAN from the water.

In a first part of this master thesis the biochemical composition was determined of the bio-flocs which had acetate, starch, betaine or MBA as a carbon source. This biochemical composition is important for the possible use of the bio-flocs as feed for the animals in the aquaculture system. The highest protein content was recorded in de betaine- and starch-bio-flocs (resp.  $66 \pm 14\%$  DM en  $65 \pm 15\%$  DM). The MBA-bio-flocs showed a lower carbon content ( $44 \pm 13\%$  DM) and the acetate-bio-flocs  $36 \pm 8\%$  DM. The protein content was high enough in all four types of bio-flocs to be able to represent a significant source of protein in the diet of the cultured animal. The levels of essential fatty acids were low in all four types of bio-flocs. The betaine-bio-flocs contained the highest n-6/n-3 fatty acid ratio ( $34 \pm 2$ ). The level of vitamin C could only be determined in the acetate-bio-flocs ( $490 \pm 149 \mu\text{g/g}$  DS). It is clear that the bio-flocs can not replace the use of commercial feed completely since the commercial feed has to provide the essential fatty acids, vitamins,... that are (partially) lacking in the bio-flocs to content the demand of the animal, depending on the applied carbon source. The demand considering protein, which is the most important one, was met.

The use of the considered carbon sources in a commercial aquaculture system is economically viable except for betaine.

The influence of the bio-flocs on the opportunistic pathogens *Vibrio harveyi* BB120 en *Vibrio campbellii* LMG21363 was investigated in the second part of this master thesis. The research focused on both the influence of the bio-flocs on the pathogen itself and on the influence on the virulence towards a host of the pathogen. To determine the influence on the pathogen, the luminescence and the optical density were determined. The results of these tests indicate that

the bio-flocs influence the quorum sensing system of *Vibrio harveyi* BB120, whereas they do not seem to have any influence on *Vibrio campbellii* LMG21363.

The virulence of the pathogens towards a host was determined in challenge tests on gnotobiotic *Artemia*. The results of these tests indicate that the glycerol-, betaine- and MBA-bio-flocs protect the *Artemia* from *Vibrio harveyi* BB120. This protective effect is limited to the living bio-flocs since the use of a bio-floc community that was killed of by autoclaving did not show any protective influence. None of the three types of bio-flocs protected the *Artemia* from *Vibrio campbellii* LMG21363.

The mechanism underlying this protective effect was not revealed in this research.

In this research it was shown that the considered types of bio-flocs contained sufficient protein to provide a significant part of the diet of the cultured animal. As a consequence the application of BFT lowers the feeding costs. Moreover had the three types of bio-flocs that were considered in the research on the influence of bio-flocs on the virulence of the pathogens, a protective effect against *Vibrio harveyi* BB120. Considering the serious impact on aquaculture of diseases caused by *Vibrio* spp., this could be an important additional advantage of BFT.

## Gebruikte afkortingen

ABC	ATP-binding cassette
AHL	N-acyl homoserine lacton
AI	autoinducer
ALA	$\alpha$ -linoleenzuur
BFT	bio-vlokkentechnologie ('bio-flocs technology')
C/N	koolstof-stikstof verhouding
CZV	chemische zuurstofvraag
DHA	docosahexaeenzuur
DS	droge stof
EPA	eicosapentaeenzuur
FAME	methylesters van vetzuren ('fatty acid methyl esters')
FAO	Food and Agriculture Organisation of the United Nations
FCR	voederconversie verhouding ('feed conversion ratio')
HAI	harveyi autoinducer
HUFA	sterk onverzadigde vetzuren ('highly unsaturated fatty acids') (n>4)
kve	kolonie-vormende eenheden
LA	linolzuur
MBA	Matrix Bound Butyric Acid
OD	optische dichtheid
PCB	polycyclische koolwaterstoffen
PHB	poly- $\beta$ -hydroxybutyraat
PUFA	meervoudig onverzadigde vetzuren ('poly unsaturated fatty acids') (n>2)
RAS	recirculating aquaculture system
SAM	S-adenosylmethionine
ROI	return on investment
SBR	sequencing batch reactor
SS	zwevende stoffen ('suspended solids')
SVI	slibvolume index ('sludge volume index')
TAN	totale ammoniak- en ammonium-stikstof
VSS	vluchtige zwevende stoffen ('volatile suspended solids')

# Inhoudsopgave

<b>Deel I</b>	<b>Literatuurstudie</b>	<b>1</b>
1	Aquacultuur	2
1.1	Belang van aquacultuur	2
1.2	Problemen in aquacultuur	3
1.2.1	Gebruik van vismeel en visolie	3
1.2.2	Vervuiling van oppervlakte- en kustwaters	4
1.2.3	Impact op natuurlijke fauna	5
1.2.4	Problemen binnen de aquacultuursystemen	8
1.2.5	Socio-economische gevolgen	9
2	Stikstof in aquacultuursystemen	11
2.1	Generatie van stikstof-afval	11
2.2	Verwijdering van het stikstof-afval	12
2.3	Conventionele methodes om het stikstof-afval te verwijderen	13
2.3.1	Groen water	13
2.3.2	Nitrificerende biofilter	13
2.4	Perifyton	14
2.5	Bio-vlokken	15
2.5.1	Principe en eigenschappen	15
2.5.2	Bio-vlokkentechnologie in de praktijk	18
3	Pathogenen	21
3.1	Belang in aquacultuur	21
3.2	<i>Vibrio harveyi</i> en <i>Vibrio campbellii</i>	22
3.2.1	<i>Vibrio harveyi</i>	22
3.2.2	<i>Vibrio campbellii</i>	23
3.2.3	Mechanisme van de pathogeniciteit	23
3.3	Quorum sensing	25
3.3.1	Algemeen	25
3.3.2	Mechanisme	26
3.4	Voorkomen en behandelen van een infectie	32
3.4.1	Desinfectantia en antibiotica	32
3.4.2	Probiotica	32



3.4.3	Immunostimulatoren.....	34
3.4.4	Vaccinatie.....	34
3.4.5	Verstoren van quorum sensing .....	34
4	Doelstelling.....	36
<b>Deel II Materiaal en methoden .....</b>		<b>37</b>
1	Media.....	38
2	Opkweken van de bio-vlokken .....	39
2.1	Influent .....	39
2.2	Koolstofbron.....	39
2.3	Inoculatie.....	40
2.4	Technische installatie .....	40
3	Fysico-chemische analyses .....	41
3.1	Chemische zuurstofvraag (CZV).....	41
3.2	Totale ammoniakale stikstof (TAN) ( $\text{NH}_4^+$ en $\text{NH}_3$ ).....	42
3.3	Kjeldahl-stikstof (Kj-N) .....	42
3.4	Zwevende stoffen, vluchtige zwevende stoffen en asgehalte .....	43
3.5	Slib volume index .....	44
3.6	pH .....	44
3.7	Vetextractie .....	44
3.8	Opstellen van een FAME-profiel .....	45
3.9	Bepaling van het vitamine C-gehalte.....	46
3.10	Bepaling van het PHB-gehalte .....	47
4	Moleculaire analyses van de bio-vlokken.....	48
4.1	DNA-extractie .....	48
4.2	DNA-opzuivering.....	49
4.3	Bepaling van de DNA-concentratie .....	50
4.4	Polymerase Chain Reaction (PCR) .....	50
4.5	Agarose gelelektroforese .....	52
4.6	Denaturerende Gradiënt Gelelektroforese (DGGE).....	53
4.7	Verwerking van DGGE-resultaten .....	56
4.8	Analyse van de DGGE-patronen.....	56
4.8.1	Moving window analyse.....	56
4.8.2	Pareta-Lorenz distributie curves en Gini-coëfficiënt.....	56

5	Pathogenen en LVS3 .....	57
5.1	Opgroeien van de pathogenen en LVS3 .....	57
5.2	Bepaling van de celdensiteit.....	57
6	Luminescentie- en groeitesten .....	58
6.1	Testen met de meting na 24u .....	58
6.2	Testen met de meting gedurende 24u.....	59
7	Experimenten met <i>Artemia fransiscana</i> .....	60
7.1	Hydratatie van de <i>Artemia</i> cysten.....	60
7.2	Decapsulatie van de cysten .....	60
7.3	Hatchen van <i>Artemia</i> .....	60
7.4	Uitgevoerde experimenten.....	60
7.4.1	Testen met de koolstofbronnen van de bio-vlokken .....	60
7.4.2	Voedertesten.....	61
7.4.3	Challenge testen.....	62
7.5	Nagaan van overleving <i>Artemia</i> .....	65
7.6	Controle van de steriliteit .....	66
7.7	Aanvullende analyses na het beëindigen van de challenge test.....	66
7.7.1	Groei van de <i>Artemia</i> .....	66
7.7.2	Overleving van de <i>Vibrio</i> in de vloeistof en kolonisatie van het gastrointestinaal kanaal van <i>Artemia</i> .....	66
<b>Deel III Resultaten .....</b>		<b>68</b>
1	Samenstelling van de bio-vlokken .....	69
1.1	Zwevende en vluchtige zwevende stoffen.....	69
1.2	Biochemische samenstelling.....	70
1.2.1	Vetzuurprofiel.....	70
1.2.2	Vitamines .....	72
1.2.3	PHB.....	72
2	Luminescentie- en groeitesten .....	73
2.1	Testen met de meting na 24u .....	73
2.2	Testen met de meting gedurende 24u.....	75
2.3	Testen in fysiologische oplossing .....	75
2.4	Testen in mariene broth .....	76
2.4.1	<i>Vibrio harveyi</i> .....	76

2.4.2	<i>Vibrio campbellii</i> .....	80
2.5	Artificieel zeewater.....	81
2.5.1	<i>Vibrio harveyi</i> .....	81
2.5.2	<i>Vibrio campbellii</i> .....	82
3	Testen met <i>Artemia franciscana</i> .....	84
3.1	Testen met de koolstofbronnen. ....	84
3.2	Voedertesten.....	87
3.3	Challenge testen.....	89
3.4	Aanvullende analyses bij de laatste challenge test .....	100
3.4.1	Suspensie .....	100
3.4.2	<i>Artemia</i> .....	104
<b>Deel IV Discussie .....</b>		<b>106</b>
1	Inleiding.....	107
2	Samenstelling van de bio-vlokken.....	109
2.1	Zwevende en vluchtige zwevende stoffen.....	109
2.2	Biochemische samenstelling en nutritionele waarde.....	109
2.2.1	Vetzuurprofiel.....	112
2.2.2	Vitamines.....	115
2.2.3	PHB.....	116
2.3	Moleculaire analyses van de bio-vlokken .....	116
2.4	Financiële impact van de toepassing van BFT in een aquacultuursysteem ...	117
2.5	Morfologie en taxonomische samenstelling van de bio-vlokken.....	118
2.6	Conclusie.....	123
3	Luminescentie- en groeitesten .....	125
3.1	Testen met de meting na 24u .....	125
3.2	Testen met de meting gedurende 24u.....	126
3.2.1	Fysiologische oplossing .....	126
3.2.2	Mariene broth.....	126
3.2.3	Artificieel zeewater .....	127
3.2.4	Vergelijking van de resultaten bekomen aan de hand van de twee proefopzetten .....	128
3.3	Conclusie.....	129
4	Testen met <i>Artemia franciscana</i> .....	131

4.1	Testen met de koolstofbronnen .....	131
4.2	Voedertesten.....	132
4.3	Challenge testen.....	133
4.3.1	Glycerol-bio-vlokken .....	133
4.3.2	Betaïne-bio-vlokken .....	134
4.3.3	MBA-bio-vlokken.....	135
4.3.4	Test met de drie types bio-vlokken.....	136
4.4	Aanvullende analyses bij de laatste challenge test .....	136
4.4.1	Suspensie .....	137
4.4.2	<i>Artemia</i> .....	137
4.5	Conclusies .....	138
5	Conclusies.....	144
<b>Bibliografie .....</b>		

Deel I  
Literatuurstudie

# 1 Aquacultuur

Volgens de definitie van het FAO (Food and Agriculture Organisation of the United Nations) omvat aquacultuur alle vormen van de cultuur van aquatische dieren en planten in zoet, brak en zout water waarbij een menselijke interventie tijdens de cultuur voor een toename van de productie zorgt.

## 1.1 Belang van aquacultuur

In 2006 bedroeg de dierlijke productie aan de hand van aquacultuur 51,7 miljoen ton terwijl er 92 miljoen ton dieren in natuurlijke aquatische systemen gevangen werden. De plantaardige productie aan de hand van aquacultuur was 15,1 miljoen ton ten opzichte van 1,1 miljoen ton die in het wild geoogst werd (FAO, 2009a).

Het grootste deel van de totale hoeveelheid aquacultuurproductie vindt in China plaats. Het is echter moeilijk om hier een cijfer op te plakken aangezien geweten is dat de statistieken uit China onnauwkeurig zijn, maar niet in hoeverre ze afwijkend zijn (The Economist, 2003). Volgens de cijfers vrijgegeven door FAO produceerde China in 2005, 67% van de totale kwantiteit van de wereldwijde aquacultuurproductie terwijl het slechts voor 18% van de wereldwijde visvangst zorgde. Deze sterke dominantie van aquacultuur in China staat in contrast met de situatie in de meeste andere landen waar de visvangst nog steeds belangrijker is dan aquacultuur wanneer de kwantiteit bekeken wordt.

Wereldwijd kwamen 99,8% van de gekweekte waterplanten, 97,5% van de karperachtigen, 87,4% van de penaeïde garnalen en 93,4% van de oesters uit Azië of de Stille Oceaan in 2005 (FAO, 2007). Dit duidt duidelijk aan dat Europa, Amerika, Afrika en Oceanië slechts voor een marginaal deel van de totale hoeveelheid die geproduceerd wordt aan de hand van aquacultuur, zorgen. Zo werden in 2006 in België 23 000 ton dieren gevangen en 1 200 ton dieren gekweekt (FAO, 2009b).

Er is een grote variatie in de geproduceerde producten in verschillende landen. Zo produceert de aquacultuur in China hoofdzakelijk karperachtigen en komt meer dan de helft van de geproduceerde zalmachtigen uit West-Europa.

Wereldwijd groeit de aquacultuur sinds 1970 met een gemiddelde snelheid van 8,8% per jaar. Zo zorgde aquacultuur in 1970 slechts voor 3,9% van de totale productie van aquatische dieren (op basis van gewicht), terwijl dit in 2004 al 32,4% bedroeg. (Zonder de bijdrage van China is de jaarlijkse groei van aquacultuur sinds 1990 kleiner dan 5% (The Economist, 2003).) Ter vergelijking: tussen 1970 en 2004 groeide de visserij slechts met 1,2% en de terrestrische vleesproductie met 2,8% (FAO, 2007).

In 2005 werd 52% van de door de FAO gemonitorde natuurlijke stocks volledig geëxploiteerd. Deze productie van deze natuurlijke stocks ligt dus dicht bij de maximale duurzame productielimiet en biedt dus geen mogelijkheid tot verdere expansie van de vangst.

Vijftientig procent van de stocks was overgeëxploiteerd, uitgeput of herstellend van uitputting en heeft dus geen potentieel voor expansie van de vangst op korte of middellange termijn. In 2005 bood dus slechts 23% van de stocks nog mogelijkheid tot expansie van de vangst terwijl dit in 1974 nog voor 40% van de stocks het geval was. Dit wijst erop dat de maximale vangst in het wild waarschijnlijk bereikt is (FAO, 2007).

Mariene producten zijn belangrijk in het menselijk dieet. Vis heeft een hoge nutritionele waarde, is rijk aan micronutriënten, mineralen, essentiële vetzuren en proteïnen. In vele landen, voornamelijk in de ontwikkelingslanden, heeft vis, zelfs in de kleine hoeveelheden die geconsumeerd worden per capita, een belangrijke impact op de kwaliteit van de proteïnen in het dieet doordat het voor essentiële aminozuren zorgt die slechts in kleine hoeveelheden aanwezig zijn in plantaardige diëten (FAO, 2007). Wereldwijd voorziet vis in 15% van de totale hoeveelheid dierlijk eiwit in het menselijk dieet (Casal, 2006). De wereldwijde visconsumptie per capita is de laatste 40 jaar toegenomen van 9 kg in 1961 tot een geschatte 16,5 kg in 2003 (FAO, 2007).

De Verenigde Naties verwacht dat de wereldpopulatie tussen 2005 en 2030 met 1,8 miljard zal toenemen tot 8,3 miljard (United Nations Population Division, 2009). Om in 2030 dezelfde per capita consumptie van vis te kunnen verzekeren moet de bulk van de grotere productie van vis door aquacultuur geleverd worden aangezien de visvangst, zoals eerder reeds vermeld, niet veel potentieel voor grotere productie meer heeft. Tegen 2030 zou de aquacultuurproductie moeten verdubbelen. Indien er echter rekening mee wordt gehouden dat de groei van de bevolking groter is in ontwikkelingslanden dan in geïndustrialiseerde landen (83% van het totale bevolkingscijfer in 2030 ten opzichte van 79% in 2005) en dat er toenemende urbanisatie, een toename van het inkomen en een stijgend aandeel aan dierlijke producten in het dieet is in ontwikkelingslanden, dan wordt een nog grotere vraag aan dierlijke producten verwacht. Om aan de verwachte 19 tot 20 kg vis per capita per jaar te kunnen voldoen, zal de aquacultuur moeten verdrievoudigen tegen 2030 (Bruinsma, 2003).

Een van de troeven van aquacultuur is dat aquatische organismen veel efficiënter omspringen met hun voedsel dan terrestrische dieren zoals wordt aangegeven door de hogere omzettingsefficiëntie (Emerson, 1999).

## **1.2 Problemen in aquacultuur**

### **1.2.1 Gebruik van vismeel en visolie**

Vismeel en visolie worden gebruikt als eiwitbron in voeder voor aquatische kweekdieren. Eiwit maakt 18-50% van het voeder uit en is de duurste component. Hierdoor kan de kost van het voeder tot 40-50% van de totale productiekost oplopen (Craig en Helfrich, 2002).

Als bronnen voor vismeel worden enerzijds pelagische vissoorten die normaal gezien niet door de mens geconsumeerd worden, zoals haring en makreel, gebruikt en anderzijds bijvangst (Emerson, 1999). In het wild organismen opvissen voor de productie van vismeel

heeft natuurlijk ook een directe impact op de natuurlijke stocks van die organismen. Het deel van de globale visvangst dat gebruikt wordt voor de productie van vismeel en visolie is al tientallen jaren ongeveer 30 miljoen ton per jaar (Bruinsma, 2003). Dit lijkt tegenstrijdig aangezien die aquacultuur toeneemt, maar dit kan verklaard worden doordat vismeel in het verleden ook gebruikt werd in het voeder voor varkens en gevogelte en dit nu steeds minder het geval is. Tegenwoordig gebruiken de viskwekerijen 40% van alle visolie en 31% van alle vismeel (The Economist, 2003).

Aangezien het vismeel verkregen wordt uit in het wild gevangen vis, is het aanbod aan vismeel onderworpen aan natuurlijke schommelingen in de populatie van de visstocks in het wild. Hierdoor kan er een tekort aan vismeel ontstaan en de kostprijs van het voeder stijgen (Biofloc Workgroup, 2009).

Het gebruik van vismeel en -olie kan vermeden worden door in aquacultuur herbivore soorten zoals tilapia, karper, en oesters te produceren of door vismeel en -olie door andere producten te vervangen in de voeders. Er wordt volop onderzoek gevoerd om vismeel en -olie te vervangen door bijvoorbeeld plantaardige eiwitten (Amaya et al., 2006; Goda et al., 2007), bijproducten van gevogelte (Cruz-Suarez et al., 2007) of mariene algen. Een van de problemen bij het gebruik van plantaardige eiwitten in voeder is dat er eerst een verwerking van de plantaardige eiwitten moet gebeuren die de aanwezige antinutritionele componenten vernietigt (Subasinghe et al., 2003). Het vervangen van vismeel en -olie door alternatieve eiwitbronnen zorgt er ook voor dat het voeder goedkoper wordt aangezien deze alternatieven minder kosten dan vismeel. De publieke bezorgdheid over het gebruik van vismeel in voeder zorgt tegenwoordig voor een extra motivatie in de zoektocht naar eiwitten van meer duurzame oorsprong om vismeel te vervangen (Subasinghe et al., 2003).

### **1.2.2 Vervuiling van oppervlakte- en kustwaters**

Het effluent van aquacultuursystemen komt in de naburige oppervlakte- en kustwaters terecht. In klassieke aquacultuursystemen is dit effluent nutriëntrijk doordat niet alle nutriënten die aanwezig zijn in het voeder opgenomen worden in de gekweekte organismen. Avnimelech en Ritvo (2003) berekenden uit eerder gepubliceerde data dat gemiddeld 13% van de C aanwezig in het voeder, 29% van de N input en 16% van de P input door vissen of garnalen omgezet wordt in oogstbaar product. Zo is in het effluent N aanwezig onder de vorm van voederresidu, in het excretieproduct ammonium ( $\text{NH}_4^+\text{-N}$ ) en als organische N in de faeces (Avnimelech, 1999).

De nutriënten die in de oppervlakte- en kustwaters terechtkomen, kunnen een impact hebben op de waterkwaliteit en de aanwezige voedselketens. Zo kunnen de aanwezige nutriënten de groei van bepaalde organismen bevorderen of voor een sterkere microbiële decompositie zorgen ter hoogte van de bodem waardoor er minder zuurstof beschikbaar is voor sedentaire organismen (Emerson, 1999). Een specifiek voorbeeld hiervan is eutrofiëring waarbij de hogere gehalten aan nutriënten (voornamelijk fosfaten en nitraten) zorgen voor algenbloei. Het is



mogelijk dat tijdens de algenbloei toxines voor mariene organismen en/of mensen geproduceerd worden. Wanneer de algen sterven, zinken ze naar de bodem waar massale microbiële decompositie plaatsvindt waardoor er zuurstofdepletie optreedt.

Bij open systemen in gebieden met veel stroming is de accumulatie van afval binnen het aquacultuursysteem beperkt en de hydrodynamische dispersie zorgt ervoor dat de gehalten aan nutriënten in de omgeving laag zijn zodat ze makkelijk opgenomen kunnen worden in de lokale voedselketen. De natuurlijke stroming zorgt ook voor de vervanging van het anoxische water in het aquacultuursysteem door zuurstofrijk water uit de omgeving.

Er kan ook getracht worden om de pollutie controle te houden. Bij landgebaseerde systemen kan de effluentstroom gecontroleerd en behandeld worden. Polycultuur is ook een optie. Hierbij worden verschillende soorten (zowel planten als dieren) sequentieel gekweekt zodat het afval van de ene cultuur als voedingsbron voor de volgende dient.

Er werd aangetoond dat overvoeding ervoor kan zorgen dat de efficiëntie van de voederomzetting daalt en de fecale productie toeneemt. Daarom is het opvolgen van de voederconsumptie een belangrijke manier om de pollutie te verminderen (Pillay, 2004). Het monitoren van de voederconsumptie maakt het mogelijk om de hoeveelheid toegediend voeder aan te passen aan de hoeveelheid die werkelijk opgegeten wordt. Verder kan de pollutie ook verminderd worden door de voederpellets aan te passen zodat ze niet meer nutriënten bevatten dan nodig is voor het gekweekte organisme. Ook kunnen de voederpellets zodanig gemaakt worden dat ze langer in de waterkolom blijven en dus langer beschikbaar zijn voor opname (Emerson, 1999).

Op de N-problematiek wordt in 2. nog dieper in gegaan.

### **1.2.3 Impact op natuurlijke fauna**

Naast nutriënten kunnen ook nog andere componenten via het effluent van aquacultuur in de oppervlakte- en kustwaters terechtkomen.

Ziektes worden gezien als een belangrijke belemmering van de groei van aquacultuur in het algemeen (Subasinghe, 1997) en als de primaire restrictie in de kweek van garnalen (Moriarty, 1998). Antibiotica worden toegevoegd aan het voeder om ziektes te voorkomen en te behandelen (Emerson, 1999). Via het effluent komen deze antibiotica echter ook in de omgeving terecht, waar ze andere dan de doelorganismen kunnen beïnvloeden. Er werd een verband gelegd tussen het gebruik van antibiotica en het ontstaan van resistente en zelfs multiresistente bacteriën in het systeem en zijn omgeving (Tendencia en de la Peña, 2001). Dit dient natuurlijk vermeden te worden om in de toekomst ziektes in aquacultuur en elders nog te kunnen behandelen. De toevoeging van antibiotica aan voeder kan ingeperkt worden door vissen individueel te vaccineren. Dit kan uitgevoerd worden aan de hand van een injectie of door de vissen onder te dompelen of te baden in een vaccin (Lillehaug, 1989). Het toedienen van het vaccin wordt bijvoorbeeld vaak uitgevoerd bij het uitzetten van de vissen in de uitgroebassins. Vaccinatie is standaard geworden in de intensieve aquacultuur van

zalmachtigen wereldwijd en wordt steeds meer gebruikt ter bescherming van zeebaars in de Mediterrane gebieden. Het gebruik van vaccins vindt ook steeds meer ingang in de intensieve cultuur van zeebrasem, meervalachtigen, heilbot, tarbot en andere vissoorten (Thorarinnsson en Powell, 2006). Een duidelijk voorbeeld van de impact van het gebruik van vaccins is de aquacultuur van zalm en forel in Noorwegen. In de jaren 1980 werden bacteriële infecties behandeld met antibiotica die soms in zeer hoge dosissen werden toegediend. Zo werd in 1987 voor de productie van bijna 60 000 ton zalm en forel bijna 50 ton antibiotica gebruikt. Door het toepassen van betere milieumaatregelen en het vaccineren van alle gekweekte zalm, viel de hoeveelheid gebruikte antibiotica sterk terug terwijl de hoeveelheid zalm en forel die geproduceerd werd, toenam. In 2004 werd voor de productie van bijna 600 000 ton zalm en forel minder dan 1 ton antibiotica gebruikt, wat relatief gezien dus 500 maal minder is (Directorate of Fisheries Norway, 2009).

Er worden ook andere chemicaliën gebruikt in aquacultuursystemen zoals onder andere algiciden en desinfectantia. Wanneer deze chemicaliën in de omgeving terecht komen, kunnen ze ook andere dan de doelorganismen beïnvloeden.

Een lager gebruik van antibiotica en andere chemicaliën zorgt er niet enkel voor dat de impact van deze componenten op het milieu daalt, maar het zorgt er tegelijk ook voor dat de aquacultuurproducten net door deze kleinere impact aanvaardbaarder worden voor de consumenten (Subasinghe, 1997).

Omwille van verschillende redenen worden in aquacultuursystemen ook dieren gekweekt in gebieden waar ze oorspronkelijk niet voorkomen. Het is bijvoorbeeld zo dat er niet voor alle kweekbare soorten voldoende technologieën ontwikkeld zijn waardoor de kweker verzekerd is van een succesvolle productie. De lokaal voorkomende soorten kunnen andere eigenschappen hebben qua groei en productie, andere voedingsvereisten of aanvaardbaarheid voor de consument (Pillay, 2004).

Volgens Casal (2006) mag er van uitgegaan worden dat het onvermijdbaar is dat er uiteindelijk dieren zullen ontsnappen uit een aquacultuursysteem. Wanneer geïntroduceerde dieren ontsnappen, komen ze in een milieu terecht waarin ze vaak geen natuurlijke vijanden hebben en waar ze in directe of indirecte competitie voor voedsel en plaats zullen treden met de natuurlijk aanwezige soorten (Casal, 2006; Subasinghe, 1997). Hierdoor verstoren ze de voedselketen. Biologische invasies worden, na de destructie van de habitat, als de tweede belangrijkste oorzaak voor de extinctie van soorten beschouwd (Vitousek et al., 1997). In 2004 waren er van de 1 205 geregistreerde introducties van species ten gevolge van aquacultuuractiviteiten, in 50% van de gevallen rapporten opgesteld dat de soort zich in het wild gevestigd heeft (Casal, 2006). Een voorbeeld hiervan zijn de zalmachtigen. Ze zijn afkomstig uit het noordelijk halfrond en zijn gekend als invasieve vissen. Zo werd in de periode 1978-1989 de Chinookzalm uit westelijk Noord-Amerika uitgezet in Chili en berichtte Correa in 2008 dat de Chinookzalm genaturaliseerd is en teruggevonden wordt in een groot

deel van Zuid-Amerika. Het is volgens Casal (2006) dus noodzakelijk dat het introduceren van exotische species geminimaliseerd wordt.

De introductie of transfer van vis en schelpdieren kan ook voor de introductie van nieuwe ziekten en ongewenste organismen zorgen (Emerson, 1999). Zo werden *Penaeus stylirostris* en *Penaeus vannamei* geïmporteerd in de Filipijnen en Taiwan en wordt vermoed dat deze introducties de verspreiding van virale ziektes onder gekweekte garnalen hebben veroorzaakt (Pillay, 2004). Samen met de Pacifische oester (*Crassostrea gigas*) werd de Japanse oesterboor geïntroduceerd in Noord-Amerika. Deze predator tast ook de inheemse oesterstocks aan (Subasinghe, 1997). Voorafgaande quarantaine van de dieren of het gebruik van dieren met gezondheidscertificaten kunnen tegen de introductie van ongewenste organismen en ziekten helpen beschermen.

Het gebruik van uit het wild afkomstige adulten (als broodstock) of larven in de aquacultuur zorgt ervoor dat de natuurlijke stocks afnemen. Om dit tegen te gaan en om de afhankelijkheid van de fluctuerende natuurlijke stocks te verminderen, kunnen ook spat of post larvae uit een hatchery gebruikt worden. Het gebruik van kuit of post larvae uit een hatchery is echter niet noodzakelijk een garantie dat er geen problemen met ziektes kunnen optreden. Het is aan te raden om enkel te werken met stocks die afkomstig zijn van programma's met gezondheidscertificaten zoals 'specifieke pathogeen-vrij' (SPF) of 'high-health' (Moss, 2002). Dit wordt geïllustreerd door de enorme economische verliezen die de garnalenkwekerijen in de jaren 1990 wereldwijd leden door lage opbrengsten en hoge sterftcijfers die veroorzaakt werden door ziekten. De belangrijkste vector voor de ziekten bleek spat van garnalen dat drager was van de ziekten en dit zowel voor spat uit het wild als van hatcheries (Pruder, 2004). Het gebruik van een hatchery voor de productie van larven biedt voor de aquacultuurproducenten als extra voordeel dat de dieren gekweekt (of zelfs genetisch gemodificeerd) kunnen worden om abnormaal hoge groeisnelheden te bereiken. Deze eigenschap wordt meestal verkregen ten koste van andere eigenschappen die niet belangrijk zijn in de aquacultuur (Emerson, 1999). Wanneer deze dieren echter ontsnappen uit de aquacultuursystemen, treedt er (minstens tijdelijke) competitie op en kunnen ze eventueel zelfs kruisen met de inheemse dieren (Emerson, 1999). Voor vele schelpdieren kan een oplossing hiervoor het gebruik van triploïde dieren zijn aangezien deze zich niet kunnen reproduceren. Triploïde schelpdieren kunnen in een hatchery gecreëerd worden aan de hand van een hitte- of chemische shock van de larven. De triploïde dieren spenderen meer energie aan de vorming van spierweefsel dan van reproductief weefsel dan normale dieren waardoor ze steriel zijn. Wanneer ze ontsnappen, kunnen ze zich dus niet reproduceren en zeker niet kruisen met de inheemse soorten (Emerson, 1999). In enkele gevallen werden in hatcheries gekweekte dieren gebruikt om de natuurlijke stocks weer aan te vullen door ze uit te zetten in het wild. In Japan gebeurt dit bijvoorbeeld al sinds 1890 (Emerson, 1999).

#### 1.2.4 Problemen binnen de aquacultuursystemen

Zoals eerder reeds besproken kunnen TAN en andere metabolieten accumuleren in aquacultuursystemen. Dit vindt slechts in geringe mate plaats in een flow through systeem, maar kan limiterend zijn voor de productie in een systeem met minder vervanging van het water. De mogelijke acties om dit te verhelpen worden in 2.2 in detail besproken.

In open systemen worden echter niet enkel de metabolieten afgevoerd, er kunnen ook ongewenste componenten in het systeem binnen gebracht worden via het influent. Zo kunnen virussen van bassin naar bassin en zelfs van bedrijf naar bedrijf overgaan als het onbehandelde effluent van het ene bedrijf in het oppervlakte- of kustwater terecht komt dat door een ander bedrijf als influent gebruikt wordt. Aquacultuurbedrijven dienen dus zowel hun influent als effluent te desinfecteren. Voor open systemen die dagelijks grote gehalten water vervangen, loopt de kostprijs hierdoor snel op.

Dit is één van de redenen waarom overgeschakeld wordt naar systemen met beperkte of zelfs zonder wateruitwisseling ('zero water exchange system'). Dit zorgt er niet enkel voor dat de kans dat een pathogeen in het aquacultuursysteem geïntroduceerd wordt kleiner is, maar ook dat de pollutie van het milieu afneemt. Op het westelijk halfrond is op deze manier het gehalte water dat vervangen wordt in garnalenkwekerijen verminderd van 9,5% per dag in 1998 tot 3,5% in 2001 (Moss, 2002).

Het is ook mogelijk om de garnalen in het binnenland te kweken in de plaats van aan de kust. Dan valt het probleem in verband met het gebruik van water door verschillende producenten weg, waardoor de kans dat er een pathogeen in het aquacultuursysteem geïntroduceerd wordt ook kleiner wordt. Productie in het binnenland heeft als extra voordeel dat de productie dicht bij de markt kan plaatsvinden en de systemen kunnen op stukken land geplaatst worden die niet geschikt zijn voor bijvoorbeeld landbouw (Boyd, 2001). Bij landgebaseerde aquacultuursystemen zorgen grondwater of oppervlaktewater voor de watertoevoer. Indien er echter te veel grondwater gebruikt wordt, kan dit leiden tot verzilting van de bodem wat nadelig is voor de landbouw. Het gebruik van oppervlaktewater heeft minder ernstige negatieve gevolgen voor de omgeving (Pillay, 2004). Het is dus duidelijk dat de selectie van de lokatie belangrijk is voor de impact van een systeem op het milieu en daarom dus ook essentieel is in duurzaam management van aquacultuur (Pillay, 2004).

In Amerika evolueerde de kweek van garnalen van vijvers met grote oppervlakte en een lage dichtheid aan garnalen waarin steeds betere technologieën voor fertilisatie en voeding werden toegepast in de jaren 1980 naar systemen met weinig of geen watervervanging in de jaren 1990. Maar in deze systemen in open lucht zijn ondanks alle toegepaste technologieën nog steeds maar 1 of 2 oogsten per jaar mogelijk in de meeste gematigde en tropische streken. Daarom wordt steeds meer overgeschakeld op indoor cultuursystemen met zero water exchange. Deze systemen bieden verschillende voordelen: geen uitwisseling van water, verhoogde productiviteit door het gebruik van geavanceerde voedertechnieken en dergelijke, verhoogde

bioveiligheid en productie die het ganse jaar door mogelijk is doordat temperatuurscontrole makkelijker wordt (Wasielesky et al., 2006).

### 1.2.5 Socio-economische gevolgen

Aquacultuur beïnvloedt niet enkel het milieu waarin de systemen voorkomen, maar ook de inwoners en de economie van de landen waar ze zich bevinden.

Wereldwijd was 38% van de totale visserij- en aquacultuurproductie in 2004 bestemd voor de export. Op deze manier vormt het een belangrijke bron van buitenlandse valuta (FAO, 2007). Verder zorgt aquacultuur ook voor tewerkstelling en voedselzekerheid (FAO, 2007). Hierdoor staan vele overheden positief ten opzichte van aquacultuur, maar aquacultuur zorgt ook voor talrijke negatieve sociale gevolgen.

Het belang van de export zorgt ervoor dat er vaak aan monocultuur gedaan wordt waardoor de risico's voor de producent niet gespreid worden (Pillay, 2004).

Vaak zijn er conflicten tussen de kwekerijen en de bevolking. Een voorbeeld hiervan is pollutie van de omgeving waardoor de natuurlijke fauna teruggedrongen wordt en de traditionele vissers veel minder kunnen bovenhalen (Emerson, 1999). Bovendien zijn voor het opstarten van een kwekerij aanzienlijke fondsen vereist die vaak gevonden worden bij externe investeerders. Hierdoor wordt de 'return on investment' (ROI) van de kwekerij belangrijk. Indien de maximale ROI niet gehaald wordt, is het mogelijk dat de investeerders zich terugtrekken en dat de kwekerij moet worden stilgelegd. Een onvoldoende ROI kan bijvoorbeeld veroorzaakt worden door ziektes die uitbreken in de kwekerij of door overproductie waardoor de marktwaarde van het product sterk daalt. Dit is in het verleden vaak gebeurd bij de aquacultuur van garnalen (Pillay, 2004). Wanneer een kwekerij gesloten wordt, dan valt de werkgelegenheid weg, wat dramatische gevolgen kan hebben voor de inwoners.

Onder andere door het belang van de ROI was het doel van onderzoek in het verleden het genereren van steeds grotere opbrengsten aan de hand van steeds intensere cultuurmethoden. De economische leefbaarheid van een kwekerij op korte termijn was dus het belangrijkste. Tegenwoordig wordt het belang van een duurzame aquacultuur steeds meer erkend (Pillay, 2004). Een vaak geciteerde definitie van duurzaamheid is die die werd opgesteld door de Brundtland commissie in 1987: duurzame ontwikkeling is ontwikkeling die beantwoordt aan de noden van de huidige generatie zonder de mogelijkheid van de komende generaties om te voorzien in hun noden te compromiteren (World in balance). Tegenwoordig worden in veel landen, al dan niet strenge, richtlijnen opgelegd door de overheid en worden er controles in verband met zowel milieu als sociale omstandigheden uitgevoerd om de duurzaamheid te verzekeren (Emerson, 1999). Een voorbeeld van zo'n maatregel is het verbod op het gebruik van mangrove voor aquacultuur dat werd uitgevaardigd om de overblijvende mangrove te beschermen (FAO, 2007). In het verleden werd in Azië namelijk 400 000 ha mangrove vervangen door brakwater voor de aquacultuur van garnalen (Emerson, 1999). Mangrove is

belangrijk voor de preventie van erosie, de kwaliteit van het kustwater en de reproductie van vele mariene organismen in die streken. Hierbij dient opgemerkt te worden dat aquacultuur niet de enige oorzaak is voor het verdwijnen van mangrove. Slechts 10% van het wereldwijde verlies aan mangrove zou aan aquacultuur te wijten zijn. De rest werd veroorzaakt door rijstteelt, urbanisatie, toerisme,... (The Economist, 2003).

## 2 Stikstof in aquacultuursystemen

### 2.1 Generatie van stikstof-afval

In een aquacultuursysteem dient voedsel beschikbaar te zijn voor de gekweekte dieren. Daarom wordt regelmatig voeder toegediend aan het systeem. Wanneer de dieren in hoge dichtheden gekweekt worden, moet het gebruikte voeder alle componenten bevatten die noodzakelijk zijn opdat de dieren snel zouden kunnen groeien en gezond blijven. De typische samenstelling van zo'n nutritioneel compleet voeder is 18-50% eiwit, 10-25% vet, 15-20% koolhydraten, minder dan 8,5% as, minder dan 1,5% P, minder dan 10% water en sporen van vitamines en mineralen (Craig en Helfrich, 2002). De exacte samenstelling van het voeder is onder andere afhankelijk van het species, de levensfase van de dieren en het toegepaste cultuursysteem. Zo is de nood aan eiwit kleiner bij herbivore en omnivore vissen dan bij carnivore vissen en geldt als algemene regel dat wanneer een vis groeit, de vereiste hoeveelheid eiwit relatief ten opzichte van de massa van de vis afneemt. De nood aan eiwit is ook hoger wanneer de dieren in hoge dichtheden gekweekt worden dan bij lagere dichtheden (Craig en Helfrich, 2002). In intensieve systemen wordt typisch voeder met 25-30% eiwit (op drooggewicht) gebruikt en wordt gevoed aan 1-4% van het levend gewicht gekweekte dieren per dag (20 g voeder/kg vis) (Lim en Webster, 2006).

De eiwitten in het voeder bevatten de essentiële aminozuren voor het gekweekte organisme, wat belangrijk is voor de groei. De koolhydraten in het voeder doen dienst als C-bron en kunnen samen met de vetten als energiebron dienen. Vissen zijn echter minder efficiënt in het gebruik van koolhydraten als energiebron dan zoogdieren. Indien er onvoldoende vetten en koolhydraten beschikbaar zijn in het dieet, wordt ook eiwit gebruikt voor het genereren van energie en het overleven van het dier (Stickney, 2005). Het is dus belangrijk dat de verhouding van de hoeveelheid eiwit en de hoeveelheid componenten die door het organisme voor energiegeneratie gebruikt kunnen worden, in het voeder goed gebalanceerd is volgens de noden van het gekweekte dier zodanig dat zo weinig mogelijk eiwit 'verloren gaat' doordat het gekataboliseerd moet worden.

De efficiëntie van de productie van oogstbaar product wordt in de aquacultuur uitgedrukt aan de hand van de voederconversie-ratio (FCR). De FCR is de massa voeder in droog gewicht die nodig is voor de aangroei van het organisme met 1 kg levend gewicht. Typisch is er 1-3 kg voeder in droog gewicht nodig om 1 kg vis in levend gewicht te produceren, wat dus overeenkomt met een FCR van 1-3 (Naylor et al., 2000). De FCR varieert volgens het species, de grootte, het activiteitsniveau, omgevingsparameters en het toegepaste cultuursysteem.

Het intestinaal kanaal van vissen is zeer kort ten opzicht van hun lichaamslengte (Hertrampf en Piedad-Pascual, 2000). Hierdoor heeft de chymus maar een korte verblijftijd in het intestinaal kanaal en kan een groot deel van het voeder niet (voldoende) verteerd worden. Zo wordt ongeveer 36% van het voeder als organisch afval geëxcreteerd (Brune et al., 2003). Het is

dus belangrijk dat het gebruikte voeder zeer makkelijk verteerbaar is (Crab et al., 2007). Algemeen kan verondersteld worden dat 80% van de N in het voeder opgenomen wordt door het dier en dat hiervan 80% opnieuw geëxcreteerd wordt (Ebeling et al., 2006). Gemiddeld wordt slechts 20-25% van de nutriëntinput via het voeder in oogstbaar product omgezet en komt 71% van de N en 84% van de P uit het voeder in het water terecht (Avnimelech en Ritvo, 2003). Het gebruik van eiwit voor de energiegeneratie in combinatie met de slechte vertering van het voedsel zorgt ervoor dat vissen twee tot drie maal meer eiwit nodig hebben dan zoogdieren (Crab et al., 2007).

Het gebruik van eiwitten voor de overleving in de plaats van voor de groei zorgt er ook voor dat er andere afvalproducten gevormd worden dan bij het katabolisme van koolhydraten en vetten. De aminozuren in de eiwitten geven aanleiding tot de vorming van  $\text{NH}_3$  dat geëxcreteerd wordt via de kieuwen (Ebeling et al., 2006). In water is het gasvormige ammoniak ( $\text{NH}_3$ ) in evenwicht met het wateroplosbare ammonium ( $\text{NH}_4^+$ ). De relatieve concentraties aan ammoniak en ammonium zijn afhankelijk van de pH, de temperatuur en het zoutgehalte in het water. In de chemie van de aquacultuur is het de gewoonte om de anorganische N-componenten uit te drukken volgens de N die ze bevatten, zoals bijvoorbeeld  $\text{NH}_3\text{-N}$  en  $\text{NO}_3\text{-N}$ . De som van  $\text{NH}_3\text{-N}$  en  $\text{NH}_4^+\text{-N}$  wordt TAN (total ammoniacal nitrogen) genoemd. Het is voornamelijk dit TAN dat van belang is als N-afval, want 90% van het geëxcreteerde N wordt als TAN uitgescheiden terwijl de overige 10% zich in ureum en andere organische afvalstoffen in de faeces bevindt (Ebeling et al., 2006). De organische N in de faeces en in het voeder dat niet werd opgegeten, ondergaat decompositie door micro-organismen in de waterkolom en het sediment en wordt uiteindelijk in TAN omgezet (Asaduzzaman et al., 2008).

Indien er veel voeder aan het systeem wordt toegediend, dan zal de concentratie aan TAN hoog zijn. Dit kan gevaarlijk zijn omdat  $\text{NH}_3$  toxisch kan zijn voor het gekweekte dier. Het is  $\text{NH}_3$  en niet  $\text{NH}_4^+$  dat de toxische vorm is doordat het ongeladen is en vetoplosbaar waardoor het biologische membranen kan passeren. Data over de kritische concentratie aan  $\text{NH}_3$  variëren sterk volgens het beschouwde species en zijn afhankelijk van de voorgaande blootstelling aan  $\text{NH}_3$ . Stickney (2005) vermeldt een maximumblootstelling voor koudwater-soorten van 1,0 mg  $\text{NH}_3\text{-N/l}$  en voor warmwater-soorten van 2,5 mg  $\text{NH}_3\text{-N/l}$ .

## 2.2 Verwijdering van het stikstof-afval.

Het  $\text{NH}_4^+\text{-N}$  kan op drie manieren verwijderd worden: consumptie door fotoautotrofe algen, omzetting tot  $\text{NO}_3^-$  door autotrofe bacteriën en omzetting tot microbiële biomassa door heterotrofe bacteriën (Ebeling en Timmons, 2008). Deze drie processen kunnen in meer of mindere mate van nature doorgaan in de kweekeenheid en zowel het  $\text{NH}_4^+$  als  $\text{NO}_3^-$  kunnen geassimileerd worden door het fytoplankton dat aanwezig is in het water. Maar in de meeste aquacultuursystemen accumuleert TAN wegens onvoldoende nitrificatie waardoor toch een regelmatige extra verwijdering van ammonium nodig is (Crab et al., 2007). De verwijdering van TAN wordt uitgevoerd door een of meerdere van diezelfde drie processen te stimuleren.



Een systeem dat gedomineerd wordt door fotoautotrofe algen wordt ook een 'groen water' systeem genoemd. De omzetting tot  $\text{NO}_3^-$  kan toegepast worden in een actief slib-systeem. De incorporatie van TAN in microbiële biomassa door heterotrofe bacteriën vindt plaats in de bio-vlokkentechnologie.

## 2.3 Conventionele methodes om het stikstof-afval te verwijderen

Conventioneel wordt het stikstof buiten de cultuureenheid uit het water verwijderd.

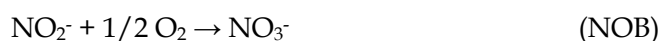
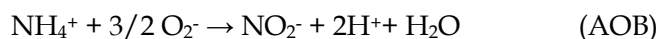
### 2.3.1 Groen water

Een eerste mogelijkheid is het gebruik van bekkens (earthen ponds genoemd) waarin het effluent water gedurende enkele uren of dagen gehouden wordt. Hierdoor kunnen de natuurlijke fysische, chemische en biologische processen doorgaan die ervoor zorgen dat de waterkwaliteit verbetert (Diab et al., 1992; Hargreaves, 2006). In deze extensieve systemen, primeert de fotosynthese door algen.

Aangezien dit systeem op natuurlijk voorkomende processen berust en niet gestuurd wordt door de kweker, is het mogelijk dat ongewenste fenomenen zoals bijvoorbeeld anaërobe omstandigheden in het sediment optreden. Dit kan de voederopname bemoeilijken, de groei vertragen en stress veroorzaken voor het gekweekte dier (Avnimelech en Ritvo, 2003). Verder vindt in een groen water-systeem ook de van nature voorkomende opeenvolging van algensoorten plaats. Deze fenomenen zorgen ervoor dat de hoeveelheid biomassa en de diversiteit aan aanwezige soorten onvoorspelbaar is en de mate van zuivering van het water variabel (Hargreaves, 2006). Dit is een belangrijk nadeel wanneer het water opnieuw gebruikt dient te worden in het kweekstelsel.

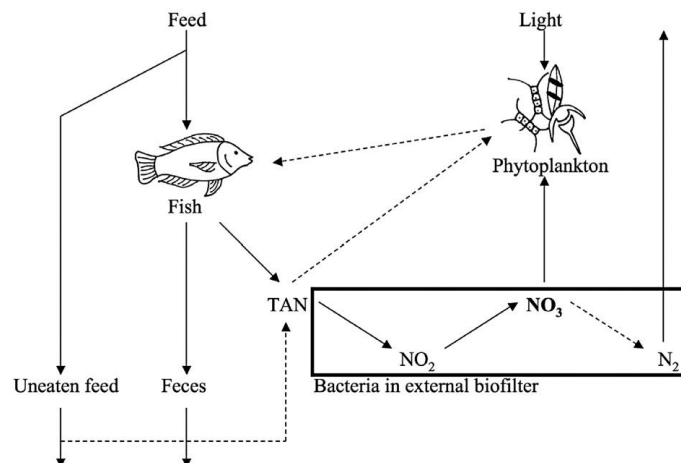
### 2.3.2 Nitrificerende biofilter

Het gebruik van een biofilter om stikstof-afval uit het water te verwijderen berust op een twee opeenvolgende omzettingen. Allereerst wordt nitraat gevormd uit ammonium. Deze omzetting wordt uitgevoerd door ammonium-oxiderende bacteriën (AOB) zoals *Nitrosomas*, *Nitrosococcus* en *Nitrosospira* (Ebeling et al., 2006). Hierna vindt de omzetting van nitriet tot nitraat plaats, die wordt uitgevoerd door nitriet-oxiderende bacteriën (NOB) zoals *Nitrobacter*, *Nitrococcus* en *Nitrospira* (Ebeling et al., 2006). De reacties die optreden worden hieronder weergegeven.



De nitrificatie gaat door in een al dan niet ondergedompeld systeem zoals bijvoorbeeld een RBC (rotating biological contactor), trickling filter, gefluïdiseerd bed,...

De toepassing van dergelijke systemen voor de verwijdering van stikstof in aquacultuursystemen is succesvol en wordt ook het meest in de praktijk toegepast, maar brengt grote investerings- en operatiekosten met zich mee.



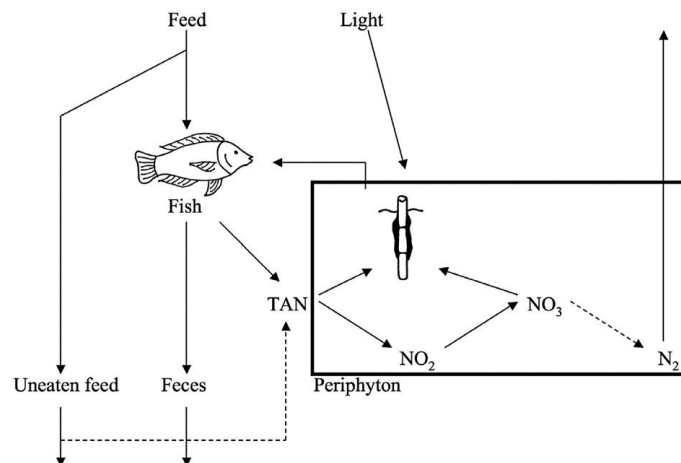
**Figuur 1: Schematisch overzicht van de N-cyclus in een aquacultuursysteem waarin de combinatie van nitrificatie en denitrificatie wordt toegepast voor de verwijdering van TAN (Crab et al., 2007).**

## 2.4 Perifyton

Perifyton is een complex mengsel van auto- en heterotrofe organismen zoals algen, bacteriën, fungi, protozoa, zoöplankton en andere invertebraten die vastgehecht zijn aan ondergedompelde matrices die in de cultuureenheid of in een afzonderlijke behandelingseenheid werden geplaatst (Azim et al., 2005). Het is echter niet correct om perifyton als een vastgehecht equivalent van fytoplankton te beschouwen (Asaduzzaman et al., 2008).

Perifyton zorgt voor de verwijdering van nutriënten en organisch afval zoals TAN uit het water waardoor de waterkwaliteit verbetert. Een extra voordeel van perifyton is dat het als voeder of schuilplaats kan dienen voor het aquacultuurorganisme.

De productiviteit van perifyton is typisch slechts 1-3 g C/m<sup>2</sup> dag (Azim et al., 2005) en de C/N bedraagt 10 (Azim en Asaeda, 2005). Verder is de groei van perifyton ook sterk afhankelijk van de beschikbaarheid van voldoende zonlicht. Hierdoor is er een groot oppervlak nodig voor de zuivering van afvalwater en is het gebruik van perifyton voor de verwijdering van NH<sub>4</sub><sup>+</sup> uit het water van intensieve aquacultuursystemen in de praktijk niet mogelijk (Crab et al., 2007).



**Figuur 2: Schematisch overzicht van de N-cyclus in een systeem waarin perifyton instaat voor de verwijdering van TAN (Crab et al., 2007).**

## 2.5 Bio-vlokken

### 2.5.1 Principe en eigenschappen

De verwijdering van TAN uit het water aan de hand van bio-vlokken berust op de omzetting van TAN in microbiële biomassa.

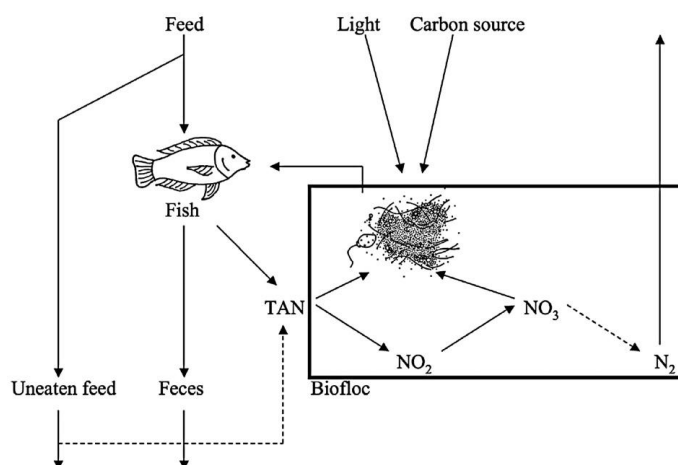
Op de organische detritus in de waterkolom vormt zich een film van bacteriën (Chamberlain et al., 2001a). In deze film zijn ook grazers van de bacteriën te vinden, net zoals micro-algen, fungi, protozoa en oligochaeta (Serfling, 2000; Azim et al., 2008). Op deze manier worden aggregaten in suspensie gevormd die vergelijkbaar zijn met de vlokken die van nature voorkomen in nutriëntrijke mariene estuaria (Serfling, 2006). Burford et al. (2003) stelden vast dat in hun systeem tot 40% van de bacteriën in het systeem geassocieerd waren met vast materiaal. De verhouding tussen de verschillende fracties in de bio-vlokken is afhankelijk van de omstandigheden in het bekken en kan dus door de kweker gestuurd worden. Zo stelden Ju et al. (2008) vast dat in de bio-vlokken in de garnalen-bekken die ze bestudeerden 25% van de massa werd ingenomen door fytoplankton, 3% door bacteriën en 33,2% door detritus en zoöplankton. Volgens Chamberlain et al. (2001a) nemen bacteriën en andere micro-organismen gemiddeld 5-10% van de massa van bio-vlokken in. In het systeem van Avnimelech en Kochba (2009) daarentegen werd ongeveer 70% van de massa van de bio-vlokken ingenomen door jonge microbiële cellen.

Het is belangrijk dat de aanwezige C en N goed gebalanceerd zijn zodat het  $\text{NH}_4^+$  en ander N-afval door de bacteriën in biomassa omgezet kan worden (Avnimelech, 1999). Fontenot et al. (2007) stelden vast dat een C/N van 10 de beste resultaten geeft qua verwijdering van het anorganische stikstof. Om deze C/N te bereiken dient een extra C-bron toegediend te worden of moet voeder met een lager eiwitgehalte gebruikt worden (Avnimelech, 1999). Er werd vastgesteld dat de  $\text{NH}_4^+$ -concentratie sneller daalt bij de toediening van koolhydraten (zodat een C/N van minimum 10 bereikt wordt) dan indien nitrificatie wordt toegepast (Hargreaves,

2006). Dit kan verklaard worden doordat de groeisnelheid en de opbrengst aan microbiële biomassa per eenheid substraat tien maal hoger is bij heterotrofe bacteriën (zoals in de vlokken) dan bij nitrificerende bacteriën. De opbrengst van heterotrofe bacteriën is typisch 0,5 g biomassa/g substraat-C (Eding et al., 2006) en de C/N bedraagt 5 (Verstraete et al., 2007).

Deze techniek houdt dus in dat de microbiële controle van de waterkwaliteit gecombineerd wordt met de heterotrofe productie van single cell protein (SCP) in de kweekeenheid door het toevoegen van een C-bron. Er werden in de loop der jaren verschillende benamingen aan deze techniek gegeven zoals onder andere AST: "activated suspension technique" (Azim et al., 2008), AMR: "aerated microbial reuse systems" (Chamberlain et al., 2001a), IMR: "intensive microbial reuse systems" (Moss, 2002), ODAS: "organic detrital algae soup" (Serfling, 2000) en BFT: "bio-floc technology" (Avnimelech, 2007).

Een belangrijk voordeel van de de bio-vlokken-technologie is dat ze in tegenstelling tot periphyton, zowel in een intensief als in een extensief systeem en zelfs indoor toegepast kan worden aangezien de hoeveelheid organisch substraat en niet de beschikbaarheid van licht de voornaamste bepalende factor is in dit systeem. Hierbij dient ook nog vermeld te worden dat deze technologie zowel in zoet als zout water toepasbaar is.



**Figuur 3: Schematisch overzicht van de N-cyclus in systemen waar de bio-vlokkentechnologie wordt toegepast (Crab et al., 2007).**

Naast de controle van de C/N (of de organische belasting van het systeem) moet ook de menging geoptimaliseerd worden (Chamberlain et al., 2001c). Indien er onvoldoende organische belasting van het systeem is, zullen er niet voldoende vlokken gevormd worden en indien de menging niet intens genoeg is, zullen de vlokken bezinken en zullen ongewenste, anaërobe condities optreden. Dit houdt dus in dat er voor een grote organische ladingssnelheid sterke turbulentie (en beluchting) nodig is om het systeem met bio-vlokken operationeel te houden. Een sterke menging veroorzaakt echter stress voor de gekweekte aquacultuurorganismen, wat ongewenst is aangezien dit de voederopname en groei van het kweekorganisme kan vertragen. Als oplossing hiervoor zou overwogen kunnen worden om

het water te zuiveren aan de hand van microbiële vlokken die afgezonderd zijn van de cultuureenheid. Dit zou ook zinvol kunnen zijn qua voorziening in de zuurstofvraag en operatiekosten aangezien bio-vlokken meestal een veel lagere zuurstofvraag hebben dan de kweekdieren (Kuhn et al., 2008), maar het zorgt wel voor een hogere investeringskost.

Vermits enkel de C/N, de aëratie en de menging in het systeem gecontroleerd moeten worden en er geen extern systeem voor waterbehandeling nodig is, is de installatie behoorlijk simpel en robuust waardoor de investeringskost lager is dan bijvoorbeeld van een RAS (recirculating aquaculture system) en waardoor het systeem makkelijker te managen is (Little et al., 2008).

De verversing van water is minimaal bij BFT (zero water exchange). Dit is positief voor de impact van het aquacultuursysteem op de omgeving, maar het kan er wel voor zorgen dat binnen het systeem op lange termijn essentiële nutriënten die niet in het voeder zitten, uitgeput zullen raken en dat bepaalde metabolieten of voedercontaminanten die niet opgenomen of verbruikt worden door de bio-vlokken zullen accumuleren in het systeem waardoor er een progressieve afname van de waterkwaliteit kan plaatsvinden zoals door Tacon et al. (2002) werd vastgesteld.

Het is mogelijk dat bij hoge dichtheden aan kweekdieren er zodanig veel bio-vlokken gevormd moeten worden om de stikstof uit het water te verwijderen, dat de concentratie aan bio-vlokken zo hoog wordt dat de kweekdieren er stress door ervaren. Indien dit zich voordoet, moet een deel van de bio-vlokken verwijderd worden. Het design van zo'n zuiveringssysteem is echter moeilijk wegens de variabele kwaliteit van de bio-vlokken en bovendien gaat door het overschakelen op een semi-continu systeem een deel van het voordeel van de toepassing van de bio-vlokkentechnologie verloren (Little et al., 2008).

Het belangrijkste voordeel van de bio-vlokkentechnologie is dat de bio-vlokken door het gekweekte dier als voeder gebruikt kunnen worden. Vroeger werd reeds geprobeerd om SCP als eiwitcomponent in het voeder te gebruiken in aquacultuur. Zo werd een deel van het vismeel in voeder voor forel vervangen door SCP, maar de toepassing hiervan was economisch niet haalbaar wegens de hoge kostprijs voor het opconcentreren, drogen en verpakken van het SCP voordat het aan het voeder toegevoegd kan worden (Chamberlain et al., 2001b). Aangezien de SCP in bio-vlokken in situ geproduceerd en geconsumeerd wordt, is het opconcentreren en dergelijke niet nodig waardoor deze kosten wegvallen en de toepassing van SCP in aquacultuur economisch wel mogelijk wordt. Vermits de bio-vlokken door het gekweekte dier als voeder gebruikt kunnen worden, dient er minder eiwit toegediend te worden aan het systeem aan de hand van aangekocht voeder. Dit kan gerealiseerd worden door minder voeder toe te dienen of door voeder met een lagere eiwitinhoud te gebruiken. Er werd vastgesteld dat de eiwit conversie ratio (PCR) met ongeveer de helft afneemt wanneer de eiwitinhoud van het voeder van 30 tot 20% gereduceerd wordt (Avnimelech, 1999). Dit kan verklaard worden doordat het eiwit dat via het voeder aan het systeem toegediend wordt als het ware twee maal opgegeten wordt door het gekweekte organisme. De eerste maal wordt het via het voeder opgenomen en de tweede maal via de bio-vlokken waarin het eiwit dat de

eerste maal niet werd opgenomen of dat werd omgezet in ammonium opnieuw als eiwit ter beschikking wordt gesteld aan het gekweekte organisme. Dit wordt bevestigd door de vaststelling van Avnimelech (2006) dat de hoeveelheid N uit het voeder die in oogstbare tilapia-biomassa wordt teruggevonden, toeneemt van 23% tot 43% wanneer overgeschakeld wordt op een systeem met BFT. Aangezien de eiwitcomponent de belangrijkste prijsbepalende factor van het voeder is (Bender et al., 2004), houdt een verhoogde benutting van het eiwit in dat de voederkosten afnemen. In een aquacultuursysteem zonder BFT zorgt het aankopen van voeder voor de gekweekte dieren voor 50% of meer van de operatiekosten (Bender et al., 2004). Volgens Taw (2008) kunnen deze operatiekosten met 20% gereduceerd worden door BFT toe te passen. De Schryver et al. (2008) berekenden dat in het geval van de kweek van tilapia in België er door het toepassen van BFT 10% op de voederkosten bespaard kan worden. Hier dient nog de besparing in investeringskosten bij opgeteld te worden aangezien het toepassen van BFT ervoor zorgt dat er niet geïnvesteerd dient te worden in infrastructuur voor de behandeling van het effluent (Crab et al., 2007).

### 2.5.2 Bio-vlokkentechnologie in de praktijk

In 1999 waren er wereldwijd 375 913 garnalenkwekerijen (FAO, 2000). Van de uitgroei-bekkens waren er 54% extensief (minder dan 2,5/m<sup>2</sup>, opbrengst 50-500 kg/ha.jaar), 28% semi-intensief (minder dan 30/m<sup>2</sup>, 500-5 000 kg/ha.jaar) en 18% intensief (meer dan 30/m<sup>2</sup>, 5 000-20 000 kg/ha.jaar) (Rosenberry, 1999). Om aan de steeds grotere vraag te voorzien schakelen producenten vaak over op systemen met een hogere intensiteit. Dit heeft een impact op de omgeving van de productie-eenheid en zorgt er ook voor dat de beveiliging van het systeem tegen pathogenen en dergelijke belangrijker wordt. Daardoor zoeken de producenten naar meer duurzame kweektechnieken die tevens voor eenzelfde of betere groei en gezondheid van het gekweekte dier zorgen. Een van de mogelijkheden hierbij is het toepassen van BFT in de uitgroei-bekkens.

De eerste testen op laboschaal voor een toepassing van BFT in de intensieve cultuur van *Penaeus vannamei* werden al in 1978 uitgevoerd (Serfling, 2006). Hierbij werd gehakt stro als C-bron gebruikt. Het systeem werd in de jaren 1980 en 1990 verder ontwikkeld op experimentele schaal. In de jaren 1990 werd Belize Aquaculture Ltd. (BAL, Belize) opgericht en na enkele jaren onderzoek, werd in 1999 met het commerciële garnalenbedrijf gestart. Tegenwoordig wordt BFT ook al in Australië (Taw, 2008) en in Azië op industriële schaal toegepast voor het kweken van garnalen. In Indonesië is er de Global Group Shrimp Farm die ontworpen werd als een flow-through systeem maar waarin nu ook BFT toepast wordt (Taw, 2008) en de kwekerij Central Pertiwi Bahari (CPB) (Taw, 2005). Een overzicht van enkele karakteristieken en de opbrengsten van deze systemen is te vinden in Tabel 1.

**Tabel 1. Enkele karakteristieken en opbrengstgegevens van commerciële productie-eenheden die BFT toepassen.**

	BAL, Belize (Burford et al., 2003; McIntosh, 2001)	CPB, Indonesië (Taw, 2005)	Global Group Shrimp Farm, Indonesië (Taw, 2008)	Solar Aquafarms Inc., USA (Serfling, 2000)
	intensief	intensief	intensief, partiële oogst	intensief
gekweekt organisme	<i>Penaeus vannamei</i>	<i>Penaeus vannamei</i>	<i>Penaeus vannamei</i>	tilapia
voeder	voeder met 24% en 31% eiwit, voeder op basis van tarwe, maïs en soja		voeder met 34% eiwit, voeder op basis van graan	voeder met 28- 30% eiwit
extra koolstof- bron	melasse bij overgang van autotrofe naar heterotrofe gemeenschap		melasse	melasse of maïsstroop, enkel bij periodieke denitrificatie
dichtheid	125-140/m <sup>2</sup>	130-150/m <sup>2</sup>	145-280/m <sup>2</sup>	300/m <sup>3</sup>
opbrengst	15 ton/ha.cyclus	20-24 ton/ha.cyclus	23-49,5 ton/ha.cyclus	65-70 kg/m <sup>3</sup> .jaar
FCR	2,0		1,1-1,2	1,3

Er werden reeds talrijke onderzoeken naar de invloed van BFT op de groei en gezondheid van garnalen uitgevoerd. Het merendeel hiervan gebeurde op laboschaal. De evolutie in de concentraties aan anorganische N-verbindingen (TAN, NO<sub>2</sub>-N, NO<sub>3</sub>-N) en de groei van *Penaeus monodon* werd gevolgd in tanks waaraan voeder met verschillend eiwitgehalte werd toegediend en waarin er dus een andere C/N geldt (Avnimelech, 1999). Tacon et al. (2002) bestudeerden de groei en overleving van *Penaeus vannamei* in outdoor gesloten systemen waarin BFT werd toegepast en in indoor open systemen. Ook Wasielesky et al. (2006) volgden de groei en overleving van *Penaeus vannamei* op. Zowel de invloed van het eiwitgehalte in het voeder als van het toegepaste kweekstelsel werden onderzocht. Er werden namelijk zowel raceways met helder water als systemen met water dat bio-vlokken van een industriële garnalenkwekerij bevat, gebruikt. Izquierdo et al. (2006) volgden eveneens de groei van *Penaeus vannamei* op bij het gebruik van verschillende voeders en bij het al dan niet toepassen van BFT. Verder bepaalde Izquierdo ook de vetzuursamenstelling van de verschillende gebruikte diëten en van de aanwezige bio-vlokken. Taw (2008) bestudeerde de groei van *Penaeus vannamei* in bekkens met bio-vlokken waarin verschillende dichtheden van post-larvae werden gebracht en waaruit de garnalen regelmatig gedeeltelijk werden geoogst afhankelijk van hun grootte. Ook naar de invloed van de natuurlijke biota in extensieve systemen werd onderzoek verricht aangezien nog steeds een aanzienlijk deel van de garnaalproductie in Azië

in dergelijke systemen plaatsvindt. Hari et al. (2006) bestudeerde de waterkwaliteit en de groei van *Penaeus monodon* in een extensief, niet geagiteerd systeem waaraan voeders met verschillende eiwitgehalten en al dan niet een extra C-bron werden toegediend. Asaduzzaman et al. (2008) volgde de concentraties aan anorganische N-verbindingen en de groei van *Macrobrachium rosenbergii* in extensieve, niet geagiteerde bekkens waarin bamboe werd aangebracht als substraat voor de vasthechting van de algen en micro-organismen.

Ook voor het kweken van vissen wordt gezocht naar technieken met een kleinere impact op de omgeving. In 1990 beschreven Mires et al. het gebruik in Israël van een combinatie van intensieve eenheden waarin de tilapia gekweekt wordt en extensieve bekkens waarin het water gezuiverd wordt aan de hand van natuurlijke processen waarna het water hergebruikt kan worden. In 1983 werd de volgende aanzet tot het gebruik van BFT voor het kweken van tilapia gegeven door het effluent van een alcoholstokerij in India succesvol om te zetten in microbieel eiwit dat (na verdunning) gebruikt werd als voeder voor tilapia (Serfling, 2006). Het dient opgemerkt te worden dat de mate waarin de bio-vlokken als voeder gebruikt kunnen worden afhankelijk is van de voedselvoorkeur, de mogelijkheid tot opname en de mate van verteerbaarheid van de bio-vlokken door het gekweekte dier. Aangezien tilapia zowel filtervoeders als detrivoren zijn, zijn ze ideaal voor de toepassing van BFT (Azim en Little, 2008). In 1999 was er al een eenheid op pilotschaal voor de kweek van tilapia met behulp van BFT in Israël (Avnimelech, 1999) en tegenwoordig zijn er al talrijke voorbeelden van toepassingen op commerciële schaal van de kweek van tilapia met behulp van de BFT. In Californië (USA) was er van 1986 tot 1994 Solar Aquafarms (Serfling, 2000) en is er tegenwoordig Pacific Aquafarms (Avnimelech, 2007). Enkele eigenschappen van de productie in Solar Aquafarms worden in Tabel 1 weergegeven. Ook in Belize (Fresh Catch Belize Ltd.; FAO-site) en Israël (Taw, 2008) zijn er industriële kwekerijen van tilapia waar de BFT wordt toegepast.

Ook voor tilapia werd op laboschaal onderzocht wat de invloed van de BFT is op de groei en de gezondheid van de dieren. Zo bestudeerden Azim en Little (2008) de verschillen tussen systemen waaraan voeders met verschillend eiwitgehalte werd toegediend en al dan niet een extra C-bron. Crab et al. (2009a) onderzochten het effect van de toepassing van BFT op de waterkwaliteit en op de overleving en gezondheid van tilapia tijdens overwintering in Israël. De resultaten van dit onderzoek hebben ertoe geleid dat BFT in de toekomst in Israël op industriële schaal toegepast zal worden tijdens de overwintering van tilapia (Crab et al., 2009a).



### 3 Pathogenen

Er zijn twee types pathogenen: de obligaat ziekte-veroorzakende en de inheemse, opportunistische pathogenen. Algemeen kan gesteld worden dat de obligaat ziekte-veroorzakende pathogenen enkel kunnen overleven in een bepaalde omgeving wanneer er vatbare gastheren aanwezig zijn. Deze gastheren kunnen na de infectie werkelijk ziek worden of enkel drager worden van de pathogeen. Opportunistische pathogenen daarentegen kunnen enkel ziekte veroorzaken wanneer de weerstand van de gastheer verzwakt is of wanneer uitzonderlijke omstandigheden hun groei en ontwikkeling bevorderen (Pillay, 2004).

#### 3.1 Belang in aquacultuur

De ziektes die door pathogenen veroorzaakt worden hebben een grote impact op de opbrengsten van aquacultuur doordat de dieren trager groeien, vervormd zijn,... of zelfs sterven. De Wereldbank schatte in 1997 de jaarlijkse verliezen in aquacultuur wegens ziekte op 3 miljard US\$ (Subasinghe et al., 2001). Verder kan het wegvallen van (een deel van) de oogst in bepaalde gevallen ook voor grote sociale problemen zorgen. Zo kan dit ervoor zorgen dat er in de regio minder voedsel beschikbaar is en dat de mensen geen inkomen hebben waardoor hun levensonderhoud in gevaar kan komen en ze onder de armoedegrens van de Verenigde Naties kunnen terechtkomen (Subasinghe et al., 2001).

Het Office International des Épizooties (OIE) stelde een lijst op met ziektes die van belang zijn bij aquatische dieren wegens hun economische impact, internationale verspreiding,... Bij de vissen staan onder andere het epidemisch ulceratief syndroom (EUS: epizootic ulcerative syndrome) en virale hemorrhagische sepsis (VHSV: viral hemorrhagic septicaemia virus) op de lijst (website OIE). EUS werd voor het eerst gerapporteerd in 1971 en wordt veroorzaakt door de schimmel *Aphanomyces*. EUS tast meer dan 100 soorten wilde en gekweekte vissen in zoetwater en in mindere mate in brakwater aan (Subasinghe et al., 2001). Voor 1990 bedroegen de verliezen veroorzaakt door EUS in verschillende Aziatische landen meer dan 10 miljoen US\$ (Subasinghe et al., 2001). De verliezen door het VHSV bedragen in West-Europa 60 miljoen US\$ per jaar (Subasinghe et al., 2001).

Bij de weekdieren werd onder andere *Bonamia* in de lijst opgenomen (website OIE).

Bij de schaaldieren zijn onder andere het White spot syndroom (WSSV: white spot syndrome virus), het Taura syndroom (TSV: Taura syndrome virus) en het Yellowhead syndroom (YHV: yellow head virus) op de lijst van OIE terug te vinden (website OIE). In 1997 waren er al meer dan 20 virussen bekend die van belang zijn bij garnalen (Subasinghe, 1997). Garnalen zijn zeer vatbaar voor infecties. Dit kan verklaard worden doordat vertebraten over een immuunsysteem met 'geheugen' en specifieke responsen beschikken, terwijl dit bij invertebraten niet zo lijkt te zijn of toch niet in dezelfde mate (Rowley en Powell, 2007). Daarom zijn invertebraten hoofdzakelijk afhankelijk van de niet-specifieke immunrespons

om een infectie te overwinnen. Dan is er ook nog het feit dat de net gehatchede dieren afhankelijk zijn van de micro-organismen in hun omgeving om hun primaire biota te ontwikkelen terwijl deze omgeving net de groei van sommige pathogenen ondersteunt waardoor deze hoge densiteiten kunnen bereiken (Verschuere et al., 2000). De eerste melding van het WSSV was in 1991-1992. WSSV tast de penaeïde garnaal in Azië en Amerika aan. De verliezen ten gevolge van WSSV bedroegen in 1993 in China meer dan 400 miljoen US\$, in 1994 in India 17,6 miljoen US\$ en in 1997 in Thailand 600 miljoen US\$ (Subasinghe et al., 2001). Het TSV is voornamelijk in Amerika een belangrijke ziekte voor *Peneaus vannamei* en het YHV is zowel voor garnalen als voor prawn een belangrijke ziekte. De verliezen wegens ziekte van garnalen bedroegen in 1990 in Equador 280 miljoen US\$ (Subasinghe et al., 2001) en in 1993 in China 1 miljard US\$ (Subasinghe, 1997).

Austin en Zhang stelden in 2006 dat luminescente vibriose een belangrijke restrictie was geworden op de garnaalproductie in Zuid-Amerika en Azië. Zo bedroegen de verliezen wegens luminescente vibriose in hatcheries in 1991 in Indonesië zo'n 100 miljoen US\$ (APEC/FAO/NACA/SEMARNAP, 2000). Deze ziekte wordt veroorzaakt door luminescente vibrios, namelijk *Vibrio harveyi* en de sterk verwante species *Vibrio campbellii* en *Vibrio parahaemolyticus* (Defoirdt et al., 2007). De verwante bacteriën *Vibrio cholerae* en *Vibrio vulnificus* zijn bekend als humane pathogenen.

Gezien de enorme verliezen die geleden werden door infecties met pathogenen en de moeilijkheid om een infectie te bestrijden, werden talrijke pogingen gedaan om infecties te voorkomen. Er werden internationale overeenkomsten gemaakt, technische handleidingen opgesteld in verband met de omstandigheden in de productie en het transport van dieren, kwaliteitssystemen opgericht, een meldingsplicht ingevoerd,... zodanig dat de kans dat een infectie zich voordoet kleiner wordt en indien dit toch gebeurt, de kans kleiner is dat ze zich zal ontwikkelen tot een ziekte (in het geval van een opportunistische pathogeen) of verspreiden naar andere aquacultuursystemen (Subasinghe et al., 2001).

## 3.2 *Vibrio harveyi* en *Vibrio campbellii*

### 3.2.1 *Vibrio harveyi*

Volgens de definitie is *Vibrio harveyi* een marien, Gramnegatief, luminescerend organisme dat natriumchloride vereist (Farmer et al., 2005). Het is ook een facultatief anaerobe bacterie, wat wil zeggen dat indien nodig overgeschakeld kan worden op een anaeroob metabolisme (Proctor en Gunsalus, 2000). Hierdoor kan *Vibrio harveyi* overleven in omstandigheden waar weinig zuurstof beschikbaar is. *Vibrio harveyi* is een natuurlijke bewoner van zeewater, ondiepe sedimenten en de darm van verschillende mariene dieren (Schauder en Bassler, 2001). In tegenstelling tot het verwante species *Vibrio fischeri* gaat *Vibrio harveyi* geen symbiotische relaties aan, maar is het een vrijlevende bacterie.

*Vibrio harveyi* is een opportunistische pathogeen van zowel vertebraten als invertebraten (Austin en Zhang, 2006). In de literatuur zijn ziektes met een grote variatie aan symptomen en

bij een grote verscheidenheid van dieren te vinden. Symptomen die geassocieerd worden met vibriose zijn onder andere lethargie, necrose van weefsels, vertraagde groei en metamorfose, lichaamsvervormingen, bioluminescentie, gastro-enteritis, bolitas negricans en vasculitis (Aguirre-Guzmán, 2004; Austin en Zhang, 2006). De mortaliteit bij vibriose kan tot 100% bedragen (Defoirdt et al., 2007). *Vibrio harveyi* is een belangrijke pathogeen voor penaeïde garnaal, vissen en Bivalvia (Soto-Rodriguez et al., 2003). Vooral de infecties van de penaeïde garnaal zijn van groot belang gezien het grote economische belang van deze dieren in de aquacultuur.

### 3.2.2 *Vibrio campbellii*

De species *Vibrio harveyi* en *Vibrio campbellii* zijn sterk verwant. De genetische verwantschap wordt geïllustreerd door een 16S rRNA gelijkheid die groter is dan 97% (Gomez-Gil et al., 2004).

Traditioneel worden vibrios uit een aquacultuuromgeving geïdentificeerd aan de hand van hun fenotype. Alsina en Blanch (1994) stelden hiervoor een schema op dat berust op talrijke biochemische en fysiologische testen, wat de identificatie arbeidsintensief maakt. De capaciteit van *Vibrio harveyi* om ornithine decarboxylase te produceren wordt als een heel belangrijke fenotypische eigenschap gezien om het onderscheid met *Vibrio campbellii* te kunnen maken (Alsina en Blanch, 1994). Volgens Holt et al. (1994) kan *Vibrio harveyi* onderscheiden worden van *Vibrio campbellii* aan de hand van negen eigenschappen. Op basis van fenotypische eigenschappen werden talrijke stammen als *Vibrio campbellii* geïdentificeerd, maar omdat ze eigenschappen deelden met *Vibrio harveyi* werden ze '*Vibrio campbellii*-like' genoemd (Hameed et al., 1996). Gomez-Gil et al. (2004) onderzochten 50 stammen van *Vibrio harveyi*, *Vibrio campbellii* en *Vibrio rotiferianus* die afkomstig waren van zieke aquatische dieren. *Vibrio harveyi* en *Vibrio campbellii* bleken fenotypisch niet te onderscheiden aan de hand van meer dan 100 fenotypische eigenschappen. Geen enkele van de testen gesuggereerd door Holt et al. (1994) bleek bruikbaar om *Vibrio harveyi* en *Vibrio campbellii* te onderscheiden wegens overlappende resultaten. De analyses met genetische fingerprinting en bepaling van de homologie van DNA toonden aan dat stammen die in eerdere onderzoeken als *Vibrio harveyi* waren geïdentificeerd eigenlijk *Vibrio campbellii* waren. Aangezien er in het verleden talrijke sterftes in aquacultuur aan *Vibrio harveyi* werden toegeschreven, suggereren deze resultaten dat *Vibrio campbellii* een belangrijke pathogeen van aquatische organismen kan zijn.

### 3.2.3 Mechanisme van de pathogeniciteit

Het pathogeniciteitsmechanisme van *Vibrio harveyi* is nog niet volledig ontsluit. Soto-Rodriguez et al. (2003) stelden vast dat de pathogene karakteristieken van de verschillende stammen belangrijker waren voor de overleving van *Artemia nauplii* na 48u dan de hoeveelheid bacteriën die werden opgenomen en de kolonisatiefactoren. Er werden reeds verschillende hypothesen in verband met de werking van het pathogeniciteitsmechanisme naar voor geschoven.

Zo werd de productie van extracellulaire enzymen onderzocht. Bij een onderzoek met *Artemia franciscana* nauplii en verschillende *Vibrio harveyi*-stammen werd vastgesteld dat er een significante correlatie is tussen de sterfte van de nauplii na 48u en de productie van proteasen, fosfolipasen en sideroforen (Soto-Rodriguez et al., 2003). Zhang en Austin (2000) stelden vast dat de extracellulaire hemolysine-activiteit een rol speelt in de pathogenese in zalmen.

Het is ook mogelijk dat lipopolysacchariden belangrijk zijn voor de pathogeniciteit van *Vibrio harveyi*. Montero en Austin (1999) behandelden de extracellulaire producten van één stam van *Vibrio harveyi* door ze te verwarmen (10 min bij 100°C) of door een proteïnase toe te voegen. De behandelde extracellulaire producten veroorzaakten dezelfde pathologie in prawns als de onbehandelde. Na analyse bleken beiden een lipopolysaccharide met een laag moleculair gewicht te bevatten, dat daarom als toxine beschouwd werd.

Er werd ook geopperd dat de capaciteit om ijzer te binden aan de hand van gesecreerde sideroforen een belangrijke virulentiefactor kan zijn bij *Vibrio harveyi* aangezien er zo minder ijzer beschikbaar is voor de gastheer (Owens et al., 1996). Dit werd bevestigd door het significant verband tussen de sterfte van nauplii na 48u en de productie van sideroforen door verschillende stammen van *Vibrio harveyi* (Soto-Rodriguez et al., 2003).

Het is ook mogelijk dat stoffen die niet direct een effect hebben op de gastheer zelf van belang zijn voor de pathogeniciteit van *Vibrio harveyi*. Zo isoleerden Prasad et al. (2005) een nieuwe BLIS ('bacteriocin-like inhibitory substance') uit een pathogene stam van *Vibrio harveyi*. De productie van deze stof kan ervoor zorgen dat de *Vibrio*-stam een competitief voordeel heeft ten opzichte van andere stammen en species binnen de gastheer waardoor hij makkelijker aan nutriënten kan geraken en hij dus een grotere kans op overleving en dominantie van de bacteriële gemeenschap heeft.

Het is mogelijk dat de pathogeniciteit door één van deze factoren bepaald wordt, maar het lijkt waarschijnlijker dat het eerder een interactie van verschillende factoren is die de pathogeniciteit stuurt (Soto-Rodriguez et al., 2003).

De virulentie van verschillende pathogene bacteriën werd reeds in verband gebracht met quorum sensing (De Kievit en Iglewski, 2000). Quorum sensing is communicatie van de ene bacteriële cel naar de andere via signaalmoleculen. Verschillende quorum sensing-systemen worden besproken in 3.3. Fenotypes van *Vibrio harveyi* die gecontroleerd worden door quorum sensing zijn bioluminescentie (Bassler et al., 1993) en de productie van verschillende virulentiefactoren (Henke en Bassler, 2004), een extracellulair toxine (Manefield et al., 2000) en een siderofoor (Lilley en Bassler, 2000).

Aangezien *Vibrio harveyi* luminescente vibriose veroorzaakt, werd onder andere het verband tussen luminescentie en virulentie van *Vibrio harveyi* onderzocht. Defoirdt et al. (2008) vonden echter geen significante correlatie tussen de luminescentie van verschillende stammen en de sterfte die ze veroorzaakten bij *Artemia nauplii*. In ditzelfde onderzoek waren er stammen met een lagere virulentie dan andere terwijl alle stammen alledrie de signaalmoleculen (HAI-1, AI-

2 en CAI-1) leken te produceren. Daarom stelden Defoirdt et al. (2008) volgende hypothese op: het verschil in de regulatie van virulentie aan de hand van quorum sensing kan verklaard worden door verschillen in de relatieve hoeveelheden virulentiefactoren die geproduceerd worden door de verschillende stammen en door het feit dat waarschijnlijk niet alle virulentiefactoren quorum sensing gereguleerd zijn.

Het is belangrijk dat er rekening mee wordt gehouden dat de meeste studies op basis van laboratoriumculturen van *Vibrio harveyi* en in vitro gebeuren. Dit kan een grote impact hebben op de resultaten. Verder blijkt dat er verschillen zijn in de pathogeniciteitsmechanismen tussen verschillende stammen (Austin en Zhang, 2006; Nakayama et al., 2006; Defoirdt et al., 2008).

### 3.3 Quorum sensing

#### 3.3.1 Algemeen

Met quorum sensing wordt verwezen naar de communicatie tussen cellen die door bacteriën gebruikt wordt om hun genexpressie te reguleren. In het cytoplasma worden chemische signaalmoleculen geproduceerd, die gesecreteerd worden waarna ze in de omgeving van de cel accumuleren en gedetecteerd kunnen worden door dezelfde of een andere bacterie. Voor de detectie van deze signaalmoleculen is het noodzakelijk dat een bepaalde drempelconcentratie (het quorum) overschreden wordt. Wanneer deze concentratie bereikt wordt, dan worden de signalen (of de signaalmoleculen zelf) binnen de cel gebracht waar ze wijzigingen in de genexpressie veroorzaken (Waters, 2005).

Er zijn tot nu toe twee mogelijke hypothesen waarom bacteriën quorum sensing toepassen. De eerste is dat quorum sensing gebruikt wordt om de populatiedensiteit te bepalen (Fuqua, 1994). De drempelconcentratie aan signaalmoleculen zal namelijk pas bereikt worden bij hoge celdensiteiten, waardoor genexpressie gereguleerd kan worden volgens de celdensiteit en bepaalde eigenschappen dus pas tot expressie zullen komen wanneer er voldoende bacteriën aanwezig zijn in een gemeenschap. Een typisch voorbeeld van deze expressie van functies die voornamelijk gunstig zijn wanneer ze simultaan door een grote populatie aan cellen worden uitgevoerd is de productie van enzymen die de gastheer aanvallen. Het is enkel indien de concentratie van deze enzymen voldoende groot is, wat mogelijk is indien ze tegelijk door vele bacteriële cellen vrijgesteld wordt, dat het afweersysteem van de gastheer 'kansloos' is. Doordat de bacteriën tegelijk hetzelfde enzym aanmaken, is de kans dus groter dat de aanval op de gastheer succesvol zal zijn.

Een tweede, meer recente hypothese voor de functie van quorum sensing door bacteriën is dat het dient om de diffusie en menging in de buurt van de bacteriële cellen te volgen: diffusion sensing (Redfield, 2002). Een lage diffusie en menging zorgen er immers voor dat de concentratie aan signaalmoleculen in de buurt van de bacteriële cel hoog is, waardoor de signaalmolecule gedetecteerd zal worden en de genexpressie wijzigt. Als voorbeeld kan de opname van nutriënten door bacteriële cellen bekeken worden. Bacteriën moeten macromoleculen eerst extracellulair afbreken voordat de kleinere deeltjes als nutriënten

opgenomen kunnen worden. Om deze afbraak mogelijk te maken, secreteren de bacteriën extracellulaire enzymen zoals proteasen, cellulasen, pectinasen, collagenasen en chitinasen (Redfield, 2002). Het is echter belangrijk voor de bacterie dat er zo veel mogelijk nutriënten kunnen opgenomen worden. Indien er echter sterke diffusie of menging is, dan zal slechts een kleine fractie van de enzymen bij de macromolecule geraken en gaat een groot deel van de beschikbaar gestelde nutriënten verloren doordat het niet door de bacteriële cel opgenomen kan worden. De bacterie heeft dan dus nodeloos geïnvesteerd in de aanmaak en secretie van extracellulaire enzymen. Om dit te vermijden, kan de bacterie de mate van diffusie en menging waarnemen door moleculen te secreteren die van nature niet voorkomen in de omgeving. Wanneer er een hoge concentratie aan deze moleculen waargenomen wordt, is het dus zinvol voor de bacterie om enzymen te secreteren voor de afbraak van macromoleculen. Verder is het zo dat diffusie en menging in de omgeving zeer variabel kunnen zijn en een dergelijk systeem biedt dus de mogelijkheid om snel te reageren op wijzigingen en de passende genexpressie te induceren.

Het dient opgemerkt te worden dat quorum sensing steeds *in vitro* bestudeerd wordt, namelijk in bacteriële culturen die opgegroeid worden in medium. Het wordt echter steeds duidelijker dat het effect dat bacteriële communicatie veroorzaakt ook afhankelijk is van de omgevingscondities en interacties met de gastheer (Newton en Fray, 2004).

### 3.3.2 Mechanisme

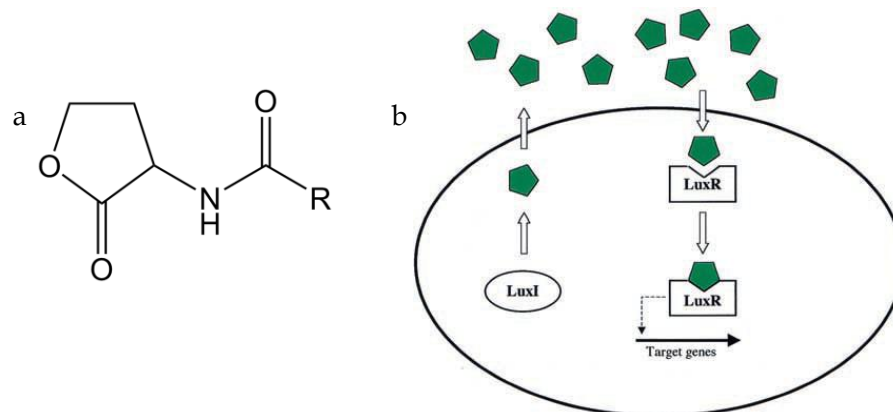
Er werden tot nu toe drie duidelijk verschillende klassen van signaalmoleculen, die geassocieerd zijn met quorum sensing in bacteriën, geïdentificeerd: N-acyl homoserine lactonen (AHL), oligopeptiden en autoinducer-2 (AI-2). De AHLs komen typisch voor bij Gramnegatieve bacteriën, de oligopeptiden bij Grampositieve bacteriën en AI-2 bij zowel Gram-negatieve als -positieve bacteriën (Reading, 2006; Waters, 2005; Bassler, 2006).

#### Quorum sensing aan de hand van AHL bij Gramnegatieve bacteriën

*Vibrio fischeri* is het eerste species waarvan ongeveer 30 jaar geleden het quorum sensing-mechanisme ontcijferd werd (Nealson et al., 1979). Alle Gramnegatieve bacteriën waarvan sindsdien het quorum sensing-mechanisme werd onderzocht, behalve *Vibrio harveyi* en *Myxococcus xanthus*, hebben een mechanisme dat analoog is aan dat bij *Vibrio fischeri*. Bij allen zijn het homologen van de regulatorische proteïnen LuxI en LuxR van *Vibrio fischeri* die voor quorum sensing zorgen (Miller en Bassler, 2001).

In de cel worden AHLs gesynthetiseerd door LuxI-homologe proteïnen. De algemene structuur van deze N-acyl homoserine lactonen wordt weergegeven in Figuur 1, de acylgroep is echter specifiek voor de beschouwde bacterie. De AHLs kunnen vrij in en uit de cel diffunderen. Wanneer de drempelconcentratie bereikt wordt, diffunderen de AHL-moleculen in de cel, waar ze binden aan LuxR-homologe proteïnen. De karakteristieke acylgroep zorgt ervoor dat een bepaald AHL aan het correcte, overeenkomstige LuxR-homologe proteïne bindt aangezien LuxR-homologe proteïnen heel gevoelig zijn voor kleine wijzigingen in de acylketen

van het AHL (Gray et al., 1994). Deze binding van het AHL aan het amino-uiteinde van het LuxR-homologe proteïne, zorgt voor een conformationele wijziging van het proteïne die het mogelijk maakt dat het carboxyl-uiteinde van het LuxR-homologe proteïne kan binden aan de specifieke promotor die de transcriptie van het gen activeert (Choi en Greenberg, 1992). Op deze wijze induceren AHLs in de verschillende bacteriën een grote variatie aan processen. Zo wordt in *Vibrio fischeri* op deze manier luminescentie gereguleerd en in *Erwinia carotovora* de secretie van extracellulaire enzymen (Miller en Bassler, 2001).



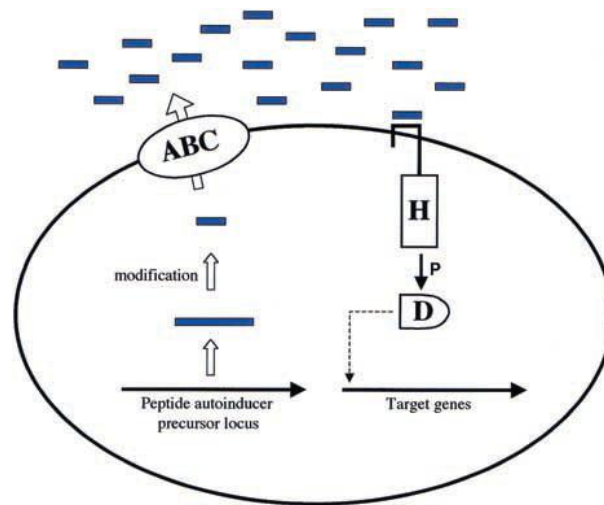
**Figuur 4:** (a) Structuur van de signaalmolecule N-acyl homoserine lacton (AHL). (b) Schematische voorstelling van het quorum sensing-mechanisme aan de hand van AHL. De acylgroep (R) in het AHL is species-afhankelijk en zorgt voor de specifieke binding aan het overeenkomstige proteïne in de cel. (Figuur mechanisme: Schauder en Bassler, 2001)

#### Quorum sensing aan de hand van oligopeptiden bij Grampositieve bacteriën

Net zoals bij de Gramnegatieve bacteriën, is er ook bij de Grampositieve bacteriën een quorum sensing-mechanisme dat als basis voor de specifieke mechanismen van de verschillende species dienst doet. De sleutel in dit mechanisme is een fosforylatie/defosforylatie cascade (Schaudler en Bassler, 2001).

In de cel wordt een precursorpeptide geproduceerd dat gesplitst en nog verder gemodificeerd wordt zodanig dat het peptide dat als autoinducer dienst doet, wordt vrijgesteld. Deze autoinducers kunnen niet zoals de AHLs vrij door de celmembraan diffunderen, maar moeten aan de hand van actief transport via een ATP binding cassette-transport (ABC-transporter) buiten de cel gebracht worden (Miller en Bassler, 2001). Wanneer de extracellulaire concentratie van het peptide de drempelwaarde bereikt, zal het gedetecteerd worden door een membraangebonden sensor kinase van een tweecomponent signaalsysteem. Bij detectie autofosforyleert een geconserveerd histidineresidu in het sensor kinase. De fosforgroep wordt hierna overgedragen naar een gelijkaardige respons regulator dat hierdoor wordt gefosforyleerd ter hoogte van een geconserveerd aspartaatresidu. Het is deze gefosforyleerde respons regulator die aan de specifieke promotor bindt en op deze wijze de expressie van de genen onder controle van deze promotor stuurt (Kleerebezem et al. 1997).

Een voorbeeld waarbij peptiden als signaalmoleculen de genexpressie regelen is de sporulatie bij *Bacillus subtilis* (Grossman, 1995).



**Figuur 5: Schematische voorstelling van het quorum sensing-mechanisme aan de hand van peptiden. (Figuur: Schauder en Bassler, 2001)**

#### Quorum sensing aan de hand van AI-2

De molecule autoinducer-2 (AI-2) werd voor het eerst ontdekt bij de Gramnegatieve bacterie *Vibrio harveyi* (Bassler et al., 1994). Ondertussen werd AI-2 al teruggevonden bij meer dan 70 verschillende bacteriën, zowel Grampositieve als -negatieve, en werden er al meer dan 50 LuxS-homologen geïdentificeerd aan de hand van sequencing van de genomen (Sun et al., 2004). Daarom wordt verondersteld dat deze autoinducer zowel voor interspecies als voor intraspecies communicatie kan zorgen (Bassler en Losick, 2003).

AI-2 wordt in het cytoplasma gesynthetiseerd aan de hand van een meerstaps enzymatische pathway waarin LuxS het terminale synthase is. Vervolgens wordt AI-2 actief uit de cel getransporteerd. Wanneer de kritische concentratie aan AI-2 in het extracellulaire milieu bereikt is, wordt AI-2 gedetecteerd. Het detectie-apparaat voor AI-2 is enkel nog maar in *Vibrio harveyi* geïdentificeerd. In *Vibrio harveyi* is het het oplosbare, periplasmatische ribose-analoge eiwit LuxP waaraan AI-2 bindt (Bassler et al., 1994), waarna de signaaltransductie via een tweecomponent fosforylatie/defosforylatie cascade plaatsvindt. Uiteindelijk reageert de gefosforyleerde respons regulator met de transporter repressor LsrR, die verantwoordelijk is voor de expressie van de doelgenen.

De structuur van AI-2 werd bepaald in een complex met het primaire receptoreiwit LuxP en bleek een furanosyl-boraat-diëster te zijn (Chen et al., 2002) (Figuur 6).

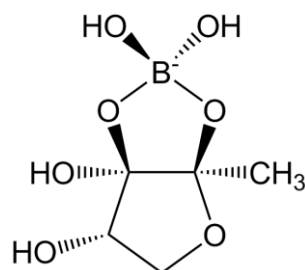
Wanneer de interpretatie dat quorum sensing toegepast wordt om de celdensiteit te bepalen, gevolgd wordt, impliceert het voorkomen van deze autoinducer, die niet species-specifiek is, dat bacteriën ook in staat zijn om de populatiedichtheid van andere bacteriën in hun nabijheid



waar te nemen. Verder kan gesteld worden dat wegens de verschillende respons ten aanzien van interspecies en intraspecies signaalmoleculen, bacteriën hun gedrag/genexpressie reguleren afhankelijk van het feit of ze een meerderheid of minderheid van de volledige populatie uitmaken (Schauder en Bassler, 2001).

Er zijn onderzoeken die indiceren dat de virulentie van *Escherichia coli*, *Shigella flexneri*, *Staphylococcus aureus* en *Vibrio vulnificus* gereguleerd wordt door AI-2 (Sperandio et al., 1999; Kim et al., 2000; Lyon et al., 2000; Day en Maurelli, 2001).

Het dient echter opgemerkt te worden dat het wegens talrijke redenen moeilijk is om te bewijzen dat AI-2 als autoinducer dienst doet in het quorum sensing-mechanisme van een bepaalde bacterie. Ten eerste kan LuxS ook een rol spelen in methyleringsreacties in de cel. Verder wijzen Sun et al. (2004) er ook op dat bij experimenten de aanwezigheid van AI-2 gecontroleerd wordt door te kijken of *Vibrio harveyi* BB170 erop reageert, maar dat er niet onderzocht wordt of de structuur werkelijk een furanosyl-boraat-diëster betreft. In het onderzoek van Sun et al. (2004) werd de bekende signaaltransductie cascade aan de hand van LuxQ en LuxO enkel teruggevonden in *Vibrio* species. Tot nu toe werd er nog maar één alternatieve signaaltransductie cascade voor AI-2 ontdekt, namelijk in *Salmonella typhimurium* (Taga et al., 2001) en hierbij is er geen bewijs dat AI-2 als quorum sensing-molecule dienst doet. Momenteel is er dus nog geen bewijs dat AI-2 in niet-*Vibrio* species dezelfde structuur heeft en of het er wel een signaalfunctie heeft. Een extra moeilijkheid is het feit dat het niet noodzakelijk zo is dat een bacterie enkel receptoren voor een signaalmolecule heeft indien ze de bewuste molecule ook zelf kan produceren. Zo kan (Duan et al., 2003) AI-2 detecteren terwijl het de autoinducer niet kan aanmaken.



**Figuur 6: Structuur van de signaalmolecule autoinducer-2 (AI-2).**

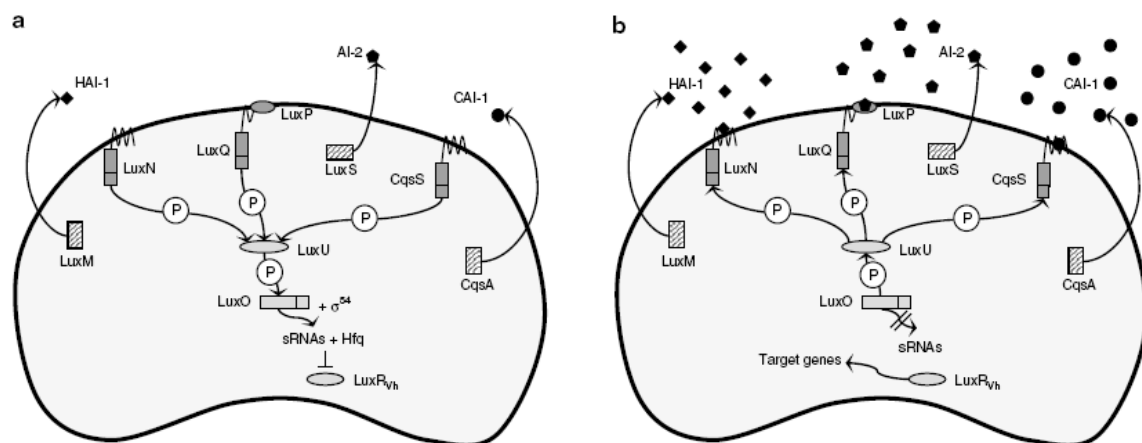
### Quorum sensing bij *Vibrio harveyi*

Het quorum sensing-systeem van *Vibrio harveyi* bevat eigenschappen van de systemen van zowel Grampositieve als Gramnegatieve bacteriën. Er werden bij *Vibrio harveyi* drie quorum sensingmechanismen gevonden die parallel werken.

Het eerste systeem maakt gebruik van harveyi autoinducer 1 (HAI-1). Dit is een N-(3-hydroxybutanoyl)-homoserine lacton dat geproduceerd wordt door LuxLM. Alhoewel LuxLM niet homoloog is aan LuxI van *Vibrio fischeri*, lijkt de synthese van HAI-1 toch op identieke wijze te gebeuren aan die van andere AHLs (Bassler et al., 1993). Het tweede systeem maakt gebruik

van AI-2. Dit furanosyl-boraat-diëster wordt uit S-adenosylmethionine (SAM) geproduceerd via drie enzymatische stappen, waarbij LuxS voor de laatste stap zorgt. Het derde systeem maakt gebruik van cholerae autoinducer 1 (CAI-1), die werd ontdekt bij *Vibrio cholerae* en *Vibrio harveyi* (Henke en Bassler, 2004). De structuur van deze molecule is nog niet bekend. CAI-1 wordt geproduceerd door QqsA. Het Cqs-systeem werd voor het eerst gekarakteriseerd in *Vibrio cholerae*, wat de naam ervan verklaart: cholerae quorum sensing (Cqs) (Henke en Bassler, 2004).

De membraangebonden sensors LuxN, LuxP en CqsS detecteren respectievelijk HAI-1, AI-2 en CAI-1 (Milton, 2006). LuxP is een oplosbaar periplasmatisch eiwit en doet dienst als de primaire receptor van AI-2. Het complex van AI-2 met LuxP interageert met LuxQ waardoor het signaal doorgegeven wordt aan LuxQ. LuxN, LuxQ en CqsS zijn tweecomponent eiwitten die elk een sensor kinase en respons regulator domein bevatten. Ze geven het fosforylatiesignaal door aan een gemeenschappelijk integrator proteïne LuxU. LuxU geeft op zijn beurt het signaal door daar de finale respons regulator LuxO (Freeman en Bassler, 1999; Schauder en Bassler, 2001). Gefosforyleerd LuxO inhibeert indirect de productie van het regulator proteïne LuxR<sub>Vh</sub> (Tu en Bassler, 2007). Dit LuxR<sub>Vh</sub> lijkt helemaal niet op het LuxR dat belangrijk is in het quorum sensing-systeem van *Vibrio fischeri* of de analogen in de andere Gramnegatieve bacteriën. LuxR<sub>Vh</sub> activeert direct het lux operon en indirect via kleine regulatorische RNAs de andere quorum sensing-gereguleerde genen (Waters en Bassler, 2007; Tu en Bassler, 2007).



**Figuur 7: Quorum sensing in *Vibrio harveyi*.** De LuxM, LuxS en CqsS enzymen zorgen voor de synthese van de respectievelijke autoinducers HAI-1, AI-2 en CAI-1. Deze autoinducers worden ter hoogte van de celmembraan gedetecteerd door de respectievelijke LuxN, LuxQ en CqsS tweecomponent eiwitten. Voor de detectie van AI-2 door LuxQ is het periplasmatische eiwit LuxP noodzakelijk.

(a) In de afwezigheid van autoinducers, autofosforyleren de receptoren en wordt er via LuxU fosfaat doorgegeven naar LuxO. Het gefosforyleerd LuxO is de actieve vorm en het activeert samen met  $\sigma^{54}$  de productie van de vijf kleine regulatorische RNAs (sRNAs). Deze sRNAs destabiliseren samen met het chaperon Hfq het mRNA dat codeert voor de

transcriptieregulator LuxR<sub>Vh</sub>. Hierdoor is er geen genexpressie in de afwezigheid van autoinducers.

(b) In de aanwezigheid van hoge concentraties aan autoinducers veranderen de receptoreiwitten van kinasen in fosfatasen waardoor LuxO via LuxU zijn fosfaatgroep moet afgeven. Aangezien gedefosforyleerd LuxO inactief is, worden de sRNAs niet gevormd en zal de transcriptie van het mRNA dat codeert voor LuxR<sub>Vh</sub> doorgaan. Het geproduceerde LuxR<sub>Vh</sub> zal binden aan de promotor van doelgenen en transcriptie activeren (Defoirdt et al., 2008).

Bij een lage celdensiteit, is de concentratie aan HAI-1, AI-2 en CAI-1 zeer laag en binden de receptoren dus geen signaalmoleculen. LuxN, LuxQ en CqsS zijn dan autofosforylerende kinasen die via LuxU een fosfaatmolecule doorgeven aan LuxO waardoor LuxO geactiveerd wordt (Freeman en Bassler, 1999). LuxO conjugeert met de sigma<sup>54</sup> en samen activeren ze de genen die coderen voor vijf kleine regulatorische RNAs (sRNAs). Deze sRNAs gaan samen met RNA chaperon Hfq het mRNA dat codeert voor het activator eiwit LuxR<sub>Vh</sub> destabiliseren. Hierdoor wordt geen LuxR<sub>Vh</sub> geproduceerd. Aangezien LuxR<sub>Vh</sub> essentieel is voor de expressie van de verschillende quorum sensing gereguleerde genen, zal er dus geen transcriptie van deze genen plaatsvinden waardoor *Vibrio harveyi* bijvoorbeeld niet luminescent is. Dit mechanisme wordt voorgesteld in Figuur 7a.

Bij een hoge celdensiteit is de extracellulaire concentratie aan HAI-1, AI-2 en CAI-1 hoog en zullen ze dus aan hun respectievelijke receptoren LuxN, LuxP en CqsS binden. Hierdoor worden deze tweecomponent eiwitten LuxN, LuxQ en CqsS fosfatasen in de plaats van kinasen. Deze fosfatasen zorgen ervoor dat de fosfaatgroep via LuxU wordt weggehaald bij LuxO. Door deze defosforylatie wordt LuxO inactief en zullen er dus geen sRNAs geproduceerd worden. Daardoor kan de transcriptie van het mRNA dat codeert voor LuxR<sub>Vh</sub> wel doorgaan en kan het geproduceerde LuxR binden aan de promotors en de genexpressie activeren. Daardoor kan *Vibrio harveyi* bij hoge celdensiteiten bijvoorbeeld wel luminescent zijn. Dit mechanisme wordt voorgesteld in Figuur 7b.

Opmerkelijk is dat de verschillende genen die quorum sensing-gereguleerd zijn, allemaal afhankelijk zijn van de LuxR<sub>Vh</sub>-concentratie maar toch niet in dezelfde mate reageren op de autoinducers. Waters en Bassler (2007) verklaarden dit door een verschillende affiniteit van de beschouwde promotors voor LuxR<sub>Vh</sub>. Zo vereisen de promotors die een lage affiniteit voor LuxR<sub>Vh</sub> hebben een hoge concentratie aan LuxR<sub>Vh</sub>. Deze hoge concentratie kan enkel bereikt worden wanneer de drie autoinducers tegelijk aanwezig zijn. De genen die daarentegen door de aanwezigheid van één van de autoinducers al tot expressie komen, hebben een promotor met een hoge affiniteit voor LuxR<sub>Vh</sub> zodat een lage concentratie aan LuxR<sub>Vh</sub> al voldoende is voor het induceren van de genexpressie. Bij een promotor met intermediaire affiniteit voor LuxR<sub>Vh</sub> zal er expressie zijn bij aanwezigheid van slechts één autoinducer, maar zal de respons veel sterker zijn indien alledrie de autoinducers aanwezig zijn.

Het feit dat *Vibrio harveyi* aan zowel interspecies als intraspecies communicatie doet, kan verklaard worden doordat *Vibrio harveyi* zich in zijn natuurlijke habitat in een mengcultuur bevindt. In dergelijke omstandigheden kan het belangrijk zijn dat *Vibrio harveyi* de densiteit van de eigen populatie en het aandeel in de volledige populatie kan bepalen om op basis daarvan zijn gedrag aan te passen (Miller en Bassler, 2001).

Een hybride quorum sensing-mechanisme is echter niet beperkt tot *Vibrio harveyi*. Er werden ondertussen ook al andere bacteriën gevonden die naast het feit dat ze LuxS bezitten en AI-2 produceren, ook nog een ander quorum sensing-mechanisme bezitten. Als voorbeeld hiervan kunnen *Bacillus subtilis* en *Staphylococcus aureus* gegeven worden (Schauder en Bassler, 2001).

### **3.4 Voorkomen en behandelen van een infectie**

#### **3.4.1 Desinfectantia en antibiotica**

Wanneer in een aquacultuursysteem een ziekte optreedt, dan zijn antibiotica het klassieke redmiddel waarop de kweker terugvalt. Antibiotica worden echter vaak niet enkel gebruikt om een ziekte te bestrijden, ze worden samen met desinfectantia ook gebruikt om een infectie te voorkomen. Door het wijdverspreide gebruik van antibiotica komen er echter steeds meer (multi)resistente bacteriën voor in het aquacultuursysteem en zijn omgeving (Karunasagar et al. (1994); Tendencia en de la Peña (2001); Alcaide et al; (2005)).

Doordat er reeds verscheidene keren (meervoudig) resistente vibrio's aangetroffen werden, vormen antibiotica tegenwoordig geen effectieve behandeling meer van luminescente vibriose (Defoirdt et al., 2007). Er dienen dus andere manieren gevonden te worden om een infectie met *Vibrio* spp. te vermijden en/of te behandelen.

#### **3.4.2 Probiotica**

Een probioticum wordt gedefinieerd als zijnde een levend microbiel toevoegsel dat een voordelig effect heeft op de gastheer door de met de gastheer geassocieerde of de omringende microbiële gemeenschap te wijzigen, door het gebruik of de nutritionele waarde van het voeder te verbeteren, door de respons van de gastheer op ziekte te verbeteren of door de omgevingskwaliteit te verbeteren (Verschuere et al., 2000). De gebruikte probiotische stammen dienen niet-pathogeen en veilig te zijn.

Zoals de definitie al aangeeft, kunnen bacteriën op verschillende manieren als probioticum fungeren. Een eerste mogelijkheid is de productie van een inhiberende component zoals bacteriocines, sideroforen, lysozymes, proteasen, organische zuren of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> waardoor de bacterie de groei van bepaalde pathogeen remt (Brune en Montville, 1993, Pybus et al., 1994). Een tweede manier waarop een bacterie als probioticum kan optreden is door competitie voor een bepaalde component (Verschuere et al., 2000). Een voorbeeld hiervan is de competitie tussen heterotrofen en pathogenen voor organische componenten die zowel als koolstofbron als energiebron dienst doen. Een derde mogelijkheid is de competitie voor adhesieplaatsen (Westerdahl et al., 1991, Vine et al., 2004). De belangrijkste routes voor infectie in vissen zijn

via de huid, kieuwen en het gastrointestinaal kanaal (Ringø et al., 2007). Adhesie aan de mucus of de celwand in het gastrointestinaal kanaal is voor bepaalde pathogenen essentieel in de eerste fasen van kolonisatie en infectie (Ringø en Gatesoupe, 1998). Adhesie kan ofwel specifiek aan de hand van adhesines op de bacterie en receptoren op de adhesieplaats ofwel aspecifiek aan de hand van fysicochemische interacties plaatsvinden. Wanneer een adhesieplaats reeds 'bezet' is door een probiotische bacterie, is het mogelijk dat de pathogeen niet op dezelfde plaats kan binden waardoor kolonisatie en infectie bemoeilijkt wordt. Een vierde mogelijkheid om als probioticum dienst te doen is het verbeteren van de immuunrespons van de gastheer. In de praktijk worden hier echter meestal celcomponenten of dode cellen gebruikt, wat niet onder de definitie van een probioticum valt. Een vijfde mogelijkheid is de productie door de probiotische bacterie van essentiële nutriënten zoals vitamines of enzymen die meehelpen bij een betere vertering door de gastheer (Bairagi et al., 2002). Ook het vrijstellen van korte ketenvetzuren valt hieronder. Dat deze moleculen een positief effect hebben op de gastheer bleek uit onderzoek door Defoirdt et al. (2006). Ze toonden aan dat door het toedienen van 20 mM formiaat, acetaat, propionaat, butyraat of valeraat tijdens een challenge test met *Vibrio campbellii* LMG21363, de overleving van de *Artemia franciscana* nauplii significant toenam. Indien er dus voor gezorgd kan worden dat een korte ketenvetzuur geproduceerd kan worden door een bacterie en in een werkzame vorm op de plaats van actie terechtkomt, dan kan de producerende bacterie als probioticum toegepast worden. Als laatste mogelijkheid voor de werking als probioticum beschouwen sommige auteurs bacteriën die zorgen voor een verbetering van de kwaliteit van het water waarin de gastheer zich bevindt (Verschuere et al., 2000). Hierbij is voornamelijk de verwijdering van toxische stikstofcomponenten van belang om als probiotische bacterie aangeduid te worden.

Naast het feit dat een probiotische bacterie een positieve invloed moet hebben op de gastheer, is het ook belangrijk dat het de plaats van de actie kan bereiken en zich daar kan handhaven (Verschuere et al., 2000). Hargreaves (2006) merkte op dat de groei van bacteriën in een aquacultuursysteem voornamelijk gestuurd wordt door de omgevingscondities en niet door het gebruikte inoculum. Indien de probiotische bacterie zich niet kan handhaven in het milieu waar het zijn actie dient te volbrengen, dan moet het continu toegediend worden aan het systeem waardoor de economische haalbaarheid van het gebruik van het probioticum in het gedrang komt.

Bacteriën die vaak onderzocht worden als probiotica behoren tot de melkzuurbacteriën en de genera *Vibrio*, *Bacillus* en *Pseudomonas* (Verschuere et al., 2000). In de praktijk worden meestal *Bacillus* spp., fotosynthetiserende bacteriën of gist toegepast (Wang et al., 2008).

Moriarty (1998) beschreef dat de toepassing van *Bacillus* in kweekvijvers voor penaeïde garnalen in Indonesië ervoor zorgde dat er 160 dagen geen problemen met pathogenen optraden. In andere kweekvijvers, die zeewater gebruikten dat via hetzelfde kanaal werd aangevoerd als voor de andere vijvers, waarin dit probioticum niet werd toegepast, doodden luminescente vibrio's de garnalen binnen de 80 dagen.

Hierbij dient opgemerkt te worden dat bij het onderzoek van een probioticum ook dient nagegaan te worden of het effect enkel op korte termijn of ook op lange termijn geldt (Verschuere et al., 2000). Het is namelijk mogelijk dat het probioticum er niet voor zorgt dat de pathogeen uitgeschakeld is, maar eerder dat hij trager groeit waardoor pas later in de kweekcyclus van het aquatische organisme de hoge concentraties aan pathogeen, die infecties veroorzaken, bereikt worden.

Verder is het ook mogelijk dat de pathogeen niet enkel resistent is tegen antibiotica, maar ook tegen bepaalde probiotica (Moriarty, 2005). In deze gevallen is de keuze van de probiotische bacterie belangrijk.

### 3.4.3 Immunostimulators

Immunostimulators zijn componenten die het niet-specifieke immuunsysteem stimuleren. Dit is van belang bij dieren zoals garnalen en vislarven die niet over een specifiek immuunsysteem beschikken. Aangezien het om het niet-specifieke immuunsysteem gaat, is er geen immunologisch geheugen en is het effect beperkt tot de korte termijn. Dit houdt dus in dat immunostimulators herhaaldelijk aan het systeem toegediend moeten worden. Er zijn echter indicaties dat bij langdurig gebruik van immunostimulators het effect afneemt (Smith et al., 2003).

Tot de immunostimulators behoren onder andere levende bacteriën, afgedode bacteriën, glucanen, peptidoglycanen en lipopolysacchariden (Smith et al., 2003).

### 3.4.4 Vaccinatie

Het is mogelijk om een infectie van de aquatische organismen met een pathogeen te voorkomen aan de hand van vaccinatie. Bij vaccinatie worden de verzwakte of afgedode pathogeen of componenten van de pathogeen toegediend aan het organisme. Dit kan gebeuren aan de hand van inenting of onderdompeling (Lillehaug, 1989). Hierdoor wordt het afweersysteem van de gastheer gestimuleerd waardoor aan de hand van het immunologisch geheugen een langdurige bescherming tegen de pathogeen ontstaat.

Vaccinatie is echter behoorlijk duur en arbeidsintensief waardoor het slechts toegepast wordt bij een voldoende groot economisch risico (Thorarinsson, 2006). Bovendien is een vaccin niet in alle dieren werkzaam aangezien het de werking van het immunologisch geheugen vereist. Zo beschikken bijvoorbeeld vislarven niet over een specifiek immuunsysteem waardoor ze niet in aanmerking komen voor het toepassen van vaccinatie. Daarom moet bij vislarven om een infectie te voorkomen eerder op het aspecifiek immuunsysteem ingewerkt worden aan de hand van immunostimulatie met probiotica of celcomponenten (Vadstein O., 1997).

### 3.4.5 Verstoring van quorum sensing

Bij verschillende pathogenen is de virulentie (gedeeltelijk) quorum sensing-gereguleerd. Zo wordt bij *Vibrio harveyi* de productie van verschillende virulentiefactoren (Henke en Bassler,

2004), een extracellulair toxine (Manefield et al., 2000) en een siderofoor (Lilley en Bassler, 2000) door quorum sensing gecontroleerd.

Er zijn verschillende mogelijke mechanismen om de quorum sensing van de pathogenen te verstoren. Ten eerste kan de quorum sensing verstoord worden door de biosynthese van de autoinducer te verstoren (Defoirdt et al., 2004). Een tweede mechanisme is het gebruik van antagonisten. Dit zijn analogen aan de autoinducers die ook aan de receptorproteïnen kunnen binden, maar deze niet activeren. Door de binding van een antagonist aan de receptor wordt de binding van de autoinducer aan de receptor en het in gang zetten van de cascade verhinderd (Reverchon et al., 2002). Een derde manier is chemische inactivatie van de signaalmoleculen (Michels et al., 2000). Als vierde manier om quorum sensing te verstoren, kunnen de signaalmoleculen door enzymen geïnactiveerd worden (Dong, 2000). Zo produceren talrijke bacteriën enzymen die AHLs degraderen. Een vijfde mechanisme is het gebruik van agonisten (Mäe et al., 2001). Dit zijn analogen aan de autoinducers die aan de receptoren binden en op deze manier de expressie van de quorum sensing-gereguleerde genen veroorzaken. Deze analogen zullen de expressie echter induceren wanneer de populatiedensiteit nog te laag is. Wanneer de genen die tot expressie gebracht worden voor een virulentiefactor coderen, zal de gastheer dus in staat zijn om de aanval af te slaan aangezien de virulentiefactor slechts in lage concentraties aanwezig is wegens de lage populatiedensiteit. Hierdoor kan de gastheer resistentie opbouwen tegen de pathogeen.

In het geval van *Vibrio harveyi* werd waargenomen dat voor de virulentie ten opzichte van *Artemia* zowel de signaalmoleculen AI-2 en CAI-1 noodzakelijk zijn en HAI-1 niet (Defoirdt et al., 2008). Tinh et al. (2007) stelden vast dat zowel HAI-1 als AI-2 geïnactiveerd moet worden om geen negatieve effecten van *Vibrio harveyi* BB120 op gnotobiotische rotiferen te hebben. Het feit dat HAI-1 bij rotiferen een rol speelt in de virulentie van *Vibrio harveyi* en schijnbaar niet bij *Artemia* kan op twee manieren verklaard worden. Enerzijds kan de aanwezigheid van het HAI-1-systeem erop wijzen dat er een hogere concentratie aan LuxRVh nodig is om rotiferen te infecteren dan *Artemia*. Anderzijds is het ook mogelijk dat de pathogeniciteit van *Vibrio harveyi* ten aanzien van rotiferen gemedieerd wordt door een specifieke virulentiefactor die gereguleerd wordt door HAI-1 via een nog niet gekende pathway.

## 4 Doelstelling

Bio-vlokkentechnologie wordt toegepast om stikstofafval uit het water in een aquacultuursysteem te verwijderen en zorgt voor het behoud van een goede waterkwaliteit. De vorming van de heterotrofe biomassa wordt gestimuleerd door het verhogen van de C/N verhouding (Avnimelech, 1999). In de praktijk wordt dit gedaan door het gebruik van een commercieel voeder met een lager eiwitgehalte of door een extra koolstofbron toe te dienen.

Aangezien BFT in de kweekbekkens van het aquacultuursysteem wordt toegepast, is de gegenereerde microbiële biomassa beschikbaar voor consumptie door het gekweekte aquatisch organisme. Hierdoor dient er minder commercieel voeder aan het systeem toegediend te worden.

Een tweede neveneffect van de toepassing van BFT is de mogelijkheid dat de aanwezigheid van de bio-vlokken in het systeem voor een lagere incidentie van ziektes bij de gekweekte dieren zorgt (Serfling, 2000; Michaud et al., 2006; Sinha et al., 2008). Dit zou een zeer belangrijk neveneffect van BFT kunnen zijn gezien de economische impact van ziektes in aquacultuur. De Wereldbank schatte in 1997 de jaarlijkse verliezen in aquacultuur wegens ziekte op 3 miljard US\$ (Subasinghe et al., 2001). Tot op heden is niet geweten of het beschermende effect van de bio-vlokken veroorzaakt wordt doordat de bio-vlokken de aquatische dieren minder vatbaar maken voor infectie of doordat ze op de pathogenen inwerken (of een combinatie van beide).

In een eerste luik van deze masterproef werd de invloed van de gebruikte koolstofbron op de biochemische samenstelling van de bio-vlokken onderzocht. Deze analyses werden uitgevoerd voor bio-vlokken waarvoor acetaat, zetmeel, betaine of MBA als koolstofbron gebruikt werd.

In een tweede luik van deze masterproef werd de invloed van bio-vlokken op de opportunistische pathogenen *Vibrio harveyi* en *Vibrio campbellii* onderzocht. Hierbij werd aan de hand van celdensiteits- of OD-bepalingen en luminescentiemetingen de invloed op de *Vibrio* zelf onderzocht en aan de hand van een challenge test de invloed op de virulentie van *Vibrio* ten aanzien van *Artemia*. Ook dit onderzoek werd voor verschillende types bio-vlokken uitgevoerd teneinde te achterhalen of een eventueel effect beperkt is tot één type bio-vlokken of het eerder een algemene eigenschap van bio-vlokken betreft.



Deel II  
Materiaal en methoden

# 1 Media

## **Fysiologische oplossing (FO)**

Hiervoor werd NaCl (VWR International, Leuven, België) opgelost in gedestilleerd water aan een concentratie van 8,5 g/L waarna de oplossing geautoclaveerd werd.

## **Artificieel zeewater (AAS)**

Hiervoor werd Instant Ocean synthetic sea salt (Aquarium Systems, Sarrebourg, Frankrijk) opgelost in gedestilleerd water aan een concentratie van 35 g/L waarna de oplossing geautoclaveerd en aan de hand van een 0,22 µm-filter gefiltersteriliseerd werd.

## **Marine Broth (MB) medium**

Dit medium werd aangemaakt door 37,4 g/L van Marine Broth (Gentaur, Brussel, België) op te lossen in gedestilleerd water waarna de oplossing geautoclaveerd werd. Voor mariene agar werd 15g/L agar toegevoegd.

## **Thiosulfate Citrate Bile-Salts Sucrose Agar (TCBS) medium**

Dit medium werd aangemaakt door 89 g/L van Thiosulfate Citrate Bile-Salts Sucrose Agar (Merck, Darmstadt, Duitsland) op te lossen in gedestilleerd water waarna de oplossing geautoclaveerd werd.

## 2 Opkweken van de bio-vlokken

In elke reactor wordt een aquacultuursysteem met een visbezetting van 35 kg vis/m<sup>3</sup> gesimuleerd.

Hierbij wordt verondersteld dat de voeding wordt toegediend aan 2% biomassa vis/dag en dat de excretie door de vissen 75% van de voeding bedraagt (Avnimelech en Ritvo, 2003). Verder wordt er van uitgegaan dat het voeder 30% eiwit bevat en dat het gehalte aan N in proteïne 16% is (Craig en Helfrich, 2002).

Op basis van deze veronderstellingen kan berekend worden dat er in een dergelijk aquacultuursysteem 25 mg N/L in het water terecht komt.

### 2.1 Influent

Het influent bevat 25 mg (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (VWR International, Leuven, België) en 5 mg KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (VWR International, Leuven, België) per liter leidingwater.

De peristaltische pomp (Watson Marlow 205S) werd ingesteld op een debiet van 5 L/dag influent, waardoor dagelijks 125 mg NH<sub>4</sub>-N en 25 mg KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>-P door de reactoren stroomt.

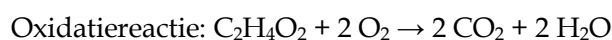
Op elke reactor is een overloop geïnstalleerd zodat het volume van de reactoren nooit meer dan 5 L kan bedragen. De hydraulische verblijftijd van de reactoren bedraagt dus 1 dag.

### 2.2 Koolstofbron

Aan elke reactor wordt een maal per dag één type koolstofbron toegediend zodat C/N = 10 (Avnimelech et al., 1999). Dit houdt in dat de reactoren elke dag een hoeveelheid koolstofbron toegediend moeten krijgen zodat de concentratie net na het toedienen 250 mg C/L bedraagt.

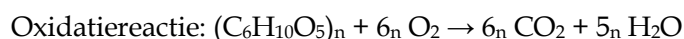
Er wordt verondersteld dat al de toegediende koolstofbron in een periode van 24 uur gemetaboliseerd wordt door de bio-vlokken.

#### Acetaat (C<sub>2</sub>H<sub>3</sub>O<sub>2</sub>Na)



De hoeveelheid acetaat die toegediend moet worden, werd berekend aan de hand van de theoretische C-inhoud van natriumacetaat (Merck, Darmstadt, Duitsland): 1250 mg C \* 82/24 = 4,31 g/dag acetaat.

#### Maïszetmeel (C<sub>6</sub>H<sub>10</sub>O<sub>5</sub>)<sub>n</sub>



De hoeveelheid zetmeel die toegediend moet worden, werd berekend aan de hand van de theoretische C-inhoud van maïszetmeel (Delhaize, Brussel, België): 1250 mg C \* 162/72 = 2,81 g/dag zetmeel.

**Betaïne (C<sub>5</sub>H<sub>11</sub>NO<sub>2</sub>.HCl)**

Oxidatiereactie:  $C_5H_{11}NO_2 + 21/2 O_2 \rightarrow 5 CO_2 + 11/2 H_2O + NO_2$

De hoeveelheid betaïne die toegediend moet worden, werd berekend aan de hand van de theoretische C-inhoud van betaïne.HCl (AppliChem, Darmstadt, Duitsland):  $1250 \text{ mg C} \cdot 153/60 = 3,19 \text{ g/dag betaïne}$ .

Wegens het gebruik van betaïne.HCl diende betaïne toegediend te worden in de vorm van een oplossing die met NaOH op pH 7-7,5 werd gebracht.

**Glycerol (C<sub>3</sub>H<sub>8</sub>O<sub>3</sub>)**

Oxidatiereactie:  $C_3H_8O_3 + 7/2 O_2 \rightarrow 3 CO_2 + 4 H_2O$

De hoeveelheid glycerol die toegediend moet worden, werd berekend aan de hand van de theoretische C-inhoud van semi-geraffineerde glycerol (80% glycerol; Proviron, Oostende, België):  $1250 \text{ mg C} \cdot 92/36 \cdot 1/0,80 = 3,99 \text{ g/dag glycerol}$ .

**MBA (Matrix Bound Butyric Acid)**

De CZV werd bepaald voor een oplossing van MBA (Avecom, Gent, België) in gedestilleerd water. Aan de hand van deze CZV en in veronderstelling dat 1 g CZV overeenkomt met 0,4 g C, werd berekend dat er dagelijks 2,07 g MBA toegediend moet worden.

## 2.3 Inoculatie

Bij de aanvang van het experiment met acetaat en zetmeel als koolstofbron werd per reactor 1,4 l inoculum afkomstig van een intensieve tilapia-kwekerij (VitaFish, Moeskroen, België) toegediend.

Bij de aanvang van de experimenten met betaïne, MBA en glycerol als koolstofbron werd per reactor ongeveer 2/3<sup>e</sup> Coupurewater en 1/3<sup>e</sup> regenwater gebruikt.

## 2.4 Technische installatie

De reactoren staan naast elkaar en zijn van elkaar gescheiden door een tussenschot om overspatten uit de ene reactor naar de andere te vermijden.

Elke reactor werd voorzien van een regelbare thermostaat Easy clima® 25W. Hierop werd een constante temperatuur van 26°C ingesteld. De temperatuur werd dagelijks gecontroleerd.

De aëratie werd verzorgd door luchtstenen AQuality® in combinatie met luchtpompen Project blue® met een vermogen van 0,8W/L.

Een buislamp werd boven de set-up geïnstalleerd als kunstmatige simulatie van zonlicht. Er wordt belicht van 8u tot 20u om een 12/12 licht/donker regime zo goed mogelijk te benaderen.

### 3 Fysico-chemische analyses

#### 3.1 Chemische zuurstofvraag (CZV)

De chemische zuurstofvraag geeft aan hoeveel organisch materiaal chemisch kan worden geoxideerd. De bepaling van CZV steunt op de oxidatie van organische koolstofverbindingen door een overmaat aan kaliumdichromaat ( $K_2Cr_2O_7$ ) in een zuur milieu bij hoge temperatuur en in de aanwezigheid van zilversulfaat als katalysator. Kwiksulfaat wordt toegevoegd om eventuele interferentie met chloriden te vermijden. Na destructie wordt de overmaat niet gereduceerd kaliumdichromaat getitreerd met een ijzerammoniumsulfaatoplossing waarbij ferroïne als indicator gebruikt wordt. Op deze manier wordt de hoeveelheid kaliumdichromaat bepaald, waaruit dan op zijn beurt de hoeveelheid CZV afgeleid kan worden.

De titerbepaling gebeurt als volgt:

- Pipetteer 10 mL van de standaard kaliumdichromaatoplossing (0,25 N) in een erlenmeyer en leng aan met gedestilleerd water tot ongeveer 100 mL
- Voeg 20 mL geconcentreerd zwavelzuur toe en laat de oplossing afkoelen
- Voeg 0,5 mL ferroïne-indicator toe en laat de oplossing afkoelen
- Titreer met ijzerammoniumsulfaatoplossing (0,25 N) tot kleuromslag van blauwgroen naar roodbruin
- Noteer het volume n
- De titer van de ijzerammoniumsulfaatoplossing wordt gegeven door:

$$t(N) = 10 \cdot T/n$$

t = titer van de ijzerammoniumoplossing (N)

T = titer van de toegevoegde kaliumdichromaatoplossing (0,25 N)

n = volume ijzerammoniumsulfaatoplossing voor de titerbepaling

De CZV-bepaling in de blanco en de stalen gebeurde als volgt:

- Breng het gewenste volume staal (of gedestilleerd water voor de blanco) in een destructiebuis met geslepen hals en leng met gedestilleerd water aan tot 20 mL
- Voeg 0,4 g kwiksulfaat toe
- Voeg 10 mL kaliumdichromaatoplossing (0,25 N) toe
- Voeg voorzichtig 30 mL zwavelzuur-zilversulfaat oplossing toe. Plaats een luchtkoeler op de destructiebuis onder stromend kraanwater terwijl de luchtkoeler en de destructiebuis schuin worden gehouden zodat geen dampen ontsnappen
- Reflux de destructiebuis bij 150°C gedurende 120 min

- Wanneer de buizen gekoeld zijn, wordt de luchtkoeler gespoeld met een kleine hoeveelheid gedestilleerd water
- Voeg 0,5 mL ferroïne-indicator toe
- Titreer de overmaat kaliumdichromaatoplossing met de ijzerammoniumsulfaatoplossing tot kleuromslag van blauwgroen tot roodbruin
- Noteer het volume voor de blanco (A) en het staal (B)
- De chemische zuurstofvraag wordt berekend aan de hand van volgende formule:

$$\text{CZV (mg O}_2\text{/L)} = (A-B) \cdot t \cdot 8000 / V_{\text{staal}}$$

CZV = chemische zuurstofvraag (mgO<sub>2</sub>/L)

A = volume ijzerammoniumsulfaatoplossing getitreerd voor de blanco (mL)

B = volume ijzerammoniumsulfaatoplossing getitreerd voor het staal (mL)

t = titer van de ammoniumsulfaatoplossing (N)

V<sub>staal</sub> = volume van het staal (mL)

Bij de bepaling van CZV<sub>opl</sub> worden de stalen eerst gefiltreerd met behulp van 0,45 µm filterpapier.

### 3.2 Totale ammoniakale stikstof (TAN) (NH<sub>4</sub><sup>+</sup> en NH<sub>3</sub>)

De bepaling van de totale hoeveelheid ammoniumstikstof (NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-N) gebeurde met de destillatiemethode, gevolgd door een titrimetrische bepaling volgens de methode van Bremner en Keeney (1965).

Aan een staal van 10 mL in een ongeslepen destructiebuis wordt 0,4 g MgO toegediend om de pH alkalisch te maken. Hierdoor kan alle aanwezige ammoniumstikstof in een stoomdestillatietoestel (Vapodest 30 Gehrardt, Duitsland) als ammoniak overgedestilleerd worden en dan opgevangen worden in 10 mL boorzuurindicator (H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>). Het gevormde NH<sub>4</sub>BO<sub>3</sub> ondergaat hierna een pH-titratie met HCl (0,02 N) tot een pH van 5,3. De hoeveelheid TAN in het staal wordt berekend aan de hand van volgende formule:

$$\text{TAN(mg/L)} = (V_{\text{HCl}} - V_{\text{blanco}}) \cdot 280,2 / V_{\text{staal}}$$

V<sub>HCl</sub> = volume HCl dat werd toegevoegd aan het overgedestilleerde staal (mL)

V<sub>blanco</sub> = volume HCl dat werd toegevoegd aan het overgedestilleerde blanco staal (mL)

V<sub>staal</sub> = volume van het staal (mL)

### 3.3 Kjeldahl-stikstof (Kj-N)

De bepaling van de hoeveelheid Kjeldahl-stikstof werd uitgevoerd aan de hand van een standaard methode (Greenberg et al., 1992).

Aan een staal van 10 mL in een ongeslepen destructiebuis wordt een Kjeldahltablet (5 g K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> en 0,5 g CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O; Thompson & Capper, Runcorn, United Kingdom) en 10 mL geconcentreerd zwavelzuur toegevoegd. De destructiebuis wordt gedurende een uur in een

destructieblok op 400°C gebracht. Een afzuigstelsel voorkomt hierbij het ontsnappen van zure dampen.

Door deze behandeling wordt alle aanwezige stikstof omgezet in ammonium die via een stoomdestillatie in 10 mL boorzuurindicator opgelost kan worden. Voor de destillatie voegde het toestel (Vapodest 30 Gehrardt, Duitsland) een hoeveelheid NaOH (10 N) toe om het staal alkalisch te maken.

Het gevormde  $\text{NH}_4\text{BO}_3$  ondergaat pH-titratie met HCl (0,02 N) tot pH 5,3. Hiervoor werden de Titroprocessor 686 (Metrohm, Antwerpen, België) en Dosimat 665 (Metrohm, Antwerpen, België) gebruikt.

De hoeveelheid Kj-N in het staal wordt als volgt berekend:

$$\text{Kj-N(mg/L)} = (V_{\text{HCl}} - V_{\text{blanco}}) * 280,2 / V_{\text{staal}}$$

$V_{\text{HCl}}$  = volume HCl dat werd toegevoegd aan het overgedestilleerde staal (mL)

$V_{\text{blanco}}$  = volume HCl dat werd toegevoegd aan het overgedestilleerde blanco staal (mL)

$V_{\text{staal}}$  = volume van het staal (mL)

Het verschil tussen TAN en Kj-N werd gebruikt om de organische N-inhoud te berekenen. Het eiwitgehalte is gelijk aan deze organische N-inhoud vermenigvuldigd met 6,25.

### 3.4 Zwevende stoffen, vluchtige zwevende stoffen en asgehalte

Deze analyse is gebaseerd op NBN 366.01: 'wateronderzoek, afvalwaters en verontreinigde waters: zwevende stoffen- centrifugaalmethode.', 1e uitgave, maart 1956.

Een goed gehomogeniseerd staal wordt gecentrifugeerd in een SORVALL centrifuge (DuPont instruments, Wilmington, DE, USA). De bezonken pellet wordt kwantitatief in een recipiënt overgebracht en gedroogd bij 105°C. Om de vluchtige zwevende stoffen te bepalen, wordt de pellet vervolgens verast bij 600°C in een moffeloven.

Praktische uitvoering:

- Het recipiënt wordt gedurende 2 uur gedroogd bij 105°C en vervolgens in een desiccator geplaatst om af te koelen tot omgevingstemperatuur. Hierna wordt de massa bepaald ( $X_1$  in g)
- Breng 20 mL goed gemengd staal ( $V_{\text{staal}}$  in l) in een centrifugeerbuis.
- Centrifugeer 10 min bij 16411 g
- Decanteer de bovenstaande vloeistof (vermijd het weggieten van bezinksel)
- Het bezinksel wordt gewassen met gedestilleerd water om de opgeloste zouten uit het bezinksel te spoelen
- Centrifugeer opnieuw 10 min bij 16411 g
- Na decantatie van de bovenstaande vloeistof wordt het bezinksel met behulp van gedestilleerd water overgebracht in het getarreeerde recipiënt

- Het recipiënt wordt bij 105°C gedroogd tot constant gewicht (overnacht). Na afkoeling tot kamertemperatuur in een dessicator wordt de massa bepaald ( $X_2$  in g)
- Indien men ook de vluchtige zwevende stoffen wil bepalen, wordt het recipiënt gedurende 2 uur bij 600°C in de moffeloven geplaatst
- Na afkoeling tot omgevingstemperatuur in de dessicator wordt de massa bepaald ( $X_3$  in g)

Het gehalte aan zwevende stoffen (SS) wordt gegeven door de formule:

$$SS \text{ (mg/L)} = (X_2 - X_1) * 1000 / V_{\text{staal}}$$

Het gehalte aan vluchtige zwevende stoffen (VSS) wordt gegeven door de formule:

$$VSS \text{ (mg/L)} = (X_2 - X_3) * 1000 / V_{\text{staal}}$$

Het asgehalte wordt gegeven door de formule:

$$as \text{ (mg/L)} = (X_3 - X_1) * 1000 / V_{\text{staal}}$$

### 3.5 Slib volume index

Het slibvolume is het volume dat ingenomen wordt door 1,0 g slib na 30 min bezinktijd. Dit wordt bepaald door 1 L gemengde vloeistof over te gieten in een Imhoff kegel. Na 30 min wordt het volume bezonken slib afgelezen. Door dit slibvolume (mL/L) te delen door het gehalte aan zwevende stoffen (g/L), bekomt men de slib volume index (SVI; mL/g). Goed bezinkend slib heeft een SVI tussen 40 en 60 mL/g; Vanaf een SVI van 200 mL/g spreekt men van slecht bezinkbaar slib ('bulking sludge').

### 3.6 pH

De pH wordt gemeten met een pH-elektrode. Hiervoor werd een draagbare pH-meter (Consort C535, Turnhout, België) gebruikt. Onderaan de pH-elektrode bevindt zich een membraan waardoor  $H^+$  en  $OH^-$  ionen kunnen binnendringen. De spanning die hierdoor wordt gegenereerd, is recht evenredig met de concentratie aan  $H^+$  ionen en is dus recht evenredig met de pH. Op de display van de pH-meter kan de pH worden afgelezen.

### 3.7 Vetextractie

De vetten werden geëxtraheerd volgens de methode van Folch et al. (1957) met de modificaties van Ways en Hanahan (1964)

- Er wordt een hoeveelheid natte massa bio-vlokken, die overeenkomt met 100 tot 400 mg drooggewicht, afgewogen in een teflon buis. Hieraan wordt 4 mL MeOH toegevoegd waarna het staal gedurende 1 min gehomogeniseerd wordt met een mixer (Kinematica Polytron).



- Na het toevoegen van 8 mL chloroform wordt nogmaals gedurende 1 min gemixt waarna de as van de mixer gespoeld wordt met 2 mL solvent mix ( $\text{CHCl}_3:\text{MeOH} - 2:1$ ). Vervolgens wordt gedurende 15 min gecentrifugeerd aan een snelheid van 4000 tpm.
- De bovenste laag, die de vetten bevat, wordt in een glazen buis overgebracht. Aan het residu wordt 6 mL solvent mix toegevoegd en dit wordt opnieuw gecentrifugeerd gedurende 15 min aan 4000 tpm, waarna opnieuw de bovenste laag in de glazen buis wordt overgebracht.
- Er wordt 5 mL KCl (0,88%) aan het volledige extract toegevoegd. Na intens schudden wordt gedurende 5 min aan 2000 tpm gecentrifugeerd.
- De bovenste laag wordt met een pasteurpipet verwijderd en aan het residu wordt 3,75 mL  $\text{MeOH}:\text{H}_2\text{O} - 1:1$  toegevoegd. Hierna wordt opnieuw intens geschud en gedurende 5 min gecentrifugeerd aan 2000 tpm. De bovenste laag wordt nogmaals met een pasteurpipet verwijderd.
- Het overblijvende extract wordt gefiltreerd over een glassinterfilter die gevuld is met  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ . De filter wordt nagespoeld met chloroform. Het filtraat wordt opgevangen in een getarreerd peerkolfje van 50 mL ( $X_1$  g).
- De chloroform in de peerkolf wordt vervolgens verwijderd met behulp van een evaporator waarna met  $\text{N}_2$  wordt geflucht totdat de peerkolf volledig droog is. De peerkolf wordt nu opnieuw afgewogen ( $X_2$  g).
- Het aandeel vet op drogestofbasis in de vlokken kan bepaald worden aan de hand van volgende formule:

$$\text{Vetgehalte (\%)} = (X_2 - X_1) / \text{DS}_{\text{vlok}}$$

### 3.8 Opstellen van een FAME-profiel

De methylesters van de vetzuren werden bekomen aan de hand van transesterificatie voor gaschromatografie volgens Coutteau en Sorgeloos (1998) waarna ze geïdentificeerd werden met behulp van een gaschromatograaf.

- Er wordt een hoeveelheid natte massa bio-vlokken, die overeenkomt met 50 tot 100 mg drooggewicht, afgewogen in een glazen buis met teflon dop. Hieraan wordt exact 100  $\mu\text{L}$  interne standaard oplossing (4,78255 mg/mL 20:2(n-6) vetzuur in iso-octaan) toegevoegd. Daarna wordt 5 mL methanol/tolueen mengsel (3:2 v/v) toegevoegd. Vervolgens wordt 5 mL van een vers bereid acetylchloride/methanol mengsel (1:20 v/v) toegevoegd als esterificatiereagens.
- De buis wordt geflucht met  $\text{N}_2$  en nauwkeurig gesloten, waarna ze geschud wordt. De buis wordt in een kokend warmwaterbad geplaatst en regelmatig geschud.
- Na een uur wordt de buis afgekoeld, waarna 5 mL gedestilleerd water en 5 mL hexaan toegevoegd wordt en de buis nogmaals krachtig geschud wordt.

- De buis wordt gedurende 5 min gecentrifugeerd aan 2000 tpm en de bovenste laag wordt met een pasteurpipet overgebracht in een andere glazen buis. Deze extractie wordt twee maal herhaald met 3 tot 5 mL hexaan.
- Het extract wordt gefiltreerd over een glassinterfilter die gevuld is met  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ . Het filtraat wordt opgevangen in een peerkolfje van 50 mL. De hexaan in de peerkolf wordt verwijderd met behulp van een evaporator waarna de peerkolf met  $\text{N}_2$  wordt geflucht totdat ze droog is.
- De gedroogde FAME's worden opgelost in 0,5 mL iso-octaan en overgebracht in een 2 mL glazen vial. De vial wordt geflucht met  $\text{N}_2$  en gesloten met een teflon schroefdop. Dit staal kan bij  $-30^\circ\text{C}$  bewaard worden tot de injectie.
- Voor de injectie wordt een deel van het staal in een vial met crimpcap overgebracht. Waarna de analyse aan de hand van een gaschromatograaf (Chrompack CP9001 GC) kan plaatsvinden.

### 3.9 Bepaling van het vitamine C-gehalte

Voor de bepaling van het vitamine C-gehalte of de ascorbinezuurinhoud van de bio-vlokken werd gebruik gemaakt van een procedure met ion paar, reversed phase high-performance liquid chromatography die gekoppeld was aan elektrochemische detectie en kwantificatie van een interne ISO-ascorbinezuur-standaard. De extractie werd uitgevoerd volgens de modificatie van de methode van Kutnink et al. (1987).

- Voor elk staal dient een Bond Elut-C18 kolom (Varian part # 12102028) geconditioneerd te worden met achtereenvolgens 2,5 mL MeOH, 2,5 mL gedestilleerd water en 2,5 mL 10 mM SH (homocysteïne)/5 mM EDTA.
- De calibratiecurve wordt opgesteld aan de hand van een ascorbinezuur- en ISO-ascorbinezuuroplossing.
- Er wordt een hoeveelheid natte massa bio-vlokken, die overeenkomt met 40 tot 120 mg drooggewicht, afgewogen in een glazen buis met teflon dop. Hieraan wordt exact 100  $\mu\text{L}$  ISO-ascorbinezuur toegevoegd als interne standaard. Daarna wordt 2 mL 10 mM SH/5 mM EDTA toegevoegd waarna het staal gedurende 1 min gehomogeniseerd wordt met een mixer (Kinematica Polytron).
- Na het toevoegen van 2 mL 10 mM SH/5 mM EDTA wordt opnieuw gedurende 1 min gemixt waarna de as van de mixer met 1 mL 10 mM SH/5 mM EDTA wordt nagespoeld.
- Hierna wordt gedurende 10 min gecentrifugeerd bij 2000 tpm.
- Vervolgens wordt het supernatans op de C18-kolom gebracht en erdoor geduwd.
- Het filtraat wordt overgebracht in een vial met crimpcap en kan geïnjecteerd worden op de HPLC-kolom. Er werd gekozen voor detectie van het vitamine C met UV (bij 266 nm).
- Het is belangrijk dat het staal tijdens het mixen en filtreren gekoeld wordt met ijs.

### 3.10 Bepaling van het PHB-gehalte

Het gehalte aan poly- $\beta$ -hydroxybutyraat (PHB) in de biomassa in diepgevroren stalen van 10 mL bio-vlokken-suspensie werd bepaald aan de hand van zure hydrolyse van het PHB en de vorming van trans-2-buteenzuur (crotonzuur) volgens Karr et al. (1983).

- De stalen werden gedurende 10 min gecentrifugeerd bij 7000 g waarna de pellets opnieuw in 1 mL gedestilleerd water werden opgelost en overgebracht in getarreeerde eppendorftubes.
- De stalen werden gedurende 5 min bij 13 000 g gecentrifugeerd en overnacht gedroogd bij 100°C waarna ze opnieuw gewogen werden om het drooggewicht van de biomassa te bepalen.
- Aan de gedroogde pellets werd 1 mL 96% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> toegevoegd waarna ze gedurende 1u bij 100°C werden geplaatst om crotonzuur te vormen.
- Hierna werd het reactiemengsel op ijs gekoeld tot kamertemperatuur en 50 maal verdund met 0,014 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>.
- De crotonzuurconcentraties werden bepaald aan de hand van een HPLC met een Dionex ASI-100 autosampler injector (Dionex Corporation, Sunnyvale, CA, USA) en een Aminex HPX-87 H ion-uitwisseling organische zuren kolom (300 x 7.8 mm) (Bio-Rad Laboratories, Richmond, CA, USA). Als solvent werd 0,014 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> gebruikt met een debiet van 0,7 mL/min. De elutiepieken werden gemonitord bij 210 nm aan de hand van een Dionex UV detector.
- De PHB-inhoud werd berekend aan de hand van een calibratiecurve die opgesteld werd met behulp van standaarden van commercieel PHB (Goodfellow Cambridge Ltd., Huntingdon, England) die op dezelfde manier behandeld werden als de stalen. De PHB-concentratie wordt uitgedrukt als percentage van het drooggewicht van de biomassa.

## 4 Moleculaire analyses van de bio-vlokken

### 4.1 DNA-extractie

Men maakt gebruik van een opeenvolging van fysische, enzymatische en chemische lyse van de bacteriële cellen die aanwezig zijn in de stalen. De fysische lyse wordt uitgevoerd door heftig schudden met behulp van de 'bead beater' (Braun Biotech International, Melsungen, Duitsland) in aanwezigheid van glaspereels. De enzymatische lyse gebeurt aan de hand van het enzym lysozym, dat de  $\beta$ -1,4-glucosidische bindingen tussen N-acetylmuraminezuur en N-acetylglucosamine in de celwand breekt. De chemische lyse wordt uitgevoerd door het toevoegen van het surfactans natriumdodecylsulfaat (SDS).

#### Media

- Tris-HCl 10 mM (pH 9) (VWR International, Leuven, België)
- Lysozym (Roche Diagnostics, Mannheim, Duitsland) opgelost in Tris-HCl (50 mg/mL)
- SDS (natriumdodecylsulfaat) (Applichem, Darmstadt, Duitsland) opgelost in PCR-water (20%)
- CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-IAA: chloroform-isoamylalcohol (24:1 v/v) (Merck, Darmstadt, Duitsland; VWR International, Leuven, België)
- CH<sub>3</sub>COO.NH<sub>4</sub> (8 M) (VWR International, Leuven, België)
- Isopropanol 100% (VWR International, Leuven, België)
- PCR-water: DNase- en RNase-vrij gefiltersteriliseerd water (Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, Duitsland)

#### Protocol

##### Fysische lyse

- 2 g vlokken in een buisje van 12 mL (polypropyleen; Greiner Bio-One, Wemmel, België)
- 4 mL Tris-HCl 10 mM (pH 9) toevoegen en goed mengen
- 3 g glaspereels (diameter 100-110  $\mu$ m) toevoegen (Braun Biotech International, Melsungen, Duitsland)
- mechanisch schudden met de bead beater gedurende 90 s en dit drie maal herhalen met tussenpozen van telkens 10 s

##### Enzymatische lyse

- 160  $\mu$ L lysozym (50 mg/mL in Tris-HCl 10 mM (pH 9)) toevoegen
- 10 min mengen op de schudder (140 tpm)

##### Chemische lyse

- 30  $\mu$ L SDS (20%) toevoegen en traag schudden gedurende 5 min

##### Verdere extractie

- 1 mL  $\text{CH}_3\text{COO.NH}_4$  (8 M) toevoegen
- centrifugeren ( $4^\circ\text{C}$ , 7096 g, 15 min)
- supernatans overbrengen in een nieuw buisje (12 mL)
- 4 mL  $\text{CHCl}_3$ -IAA (24:1) toevoegen en manueel schudden totdat een melkachtige oplossing bekomen wordt
- centrifugeren ( $4^\circ\text{C}$ , 7096 g, 15 min)
- waterfase overpipetteren in een nieuw buisje
- een volume isopropanol (10%) toevoegen dat overeenkomt met 80% van het volume overgepipetteerde waterfase
- precipiteren bij  $-20^\circ\text{C}$  voor minimaal 1 uur
- centrifugeren ( $4^\circ\text{C}$ , 10462 g, 25 min)
- supernatans afgieten en pellet minimum 15 min laten drogen aan kamertemperatuur
- pellet oplossen in ongeveer 250  $\mu\text{L}$  PCR-water

## 4.2 DNA-opzuivering

De opzuivering van het DNA-extract is nodig wanneer het opgeloste DNA niet zuiver genoeg is of componenten bevat die de PCR kunnen verstoren. De zuivering wordt uitgevoerd aan de hand van het Wizard DNA Clean-Up System (Promega, Madison, Wisconsin). De opzuivering gebeurt volgens volgend protocol:

- Voeg 1 mL resin toe aan 50-500  $\mu\text{L}$  staal in een eppendorftube
- Meng door inversie
- Schroef een spuit op de filterkolom en pipetteer de oplossing erin over
- Duw de oplossing door de filterkolom aan de hand van de zuiger van een wegwerpspuit van 2 mL
- Maak de spuit weer los van de filterkolom en verwijder daarna de zuiger uit de spuit
- Schroef de spuit opnieuw op de filterkolom
- Voeg 2 mL van een 80% isopropanol-oplossing toe en duw dit aan de hand van de zuiger door de kolom
- Maak de spuit los van de filterkolom
- Plaats de filterkolom op een eppendorftube en centrifugeer gedurende 2 min op maximale snelheid om de resin te drogen
- Plaats de filterkolom op een nieuwe eppendorftube
- Voeg 50  $\mu\text{L}$  steriel gedestilleerd water ( $65$ - $70^\circ\text{C}$ ) toe en incubeer gedurende 1 min op kamertemperatuur
- Centrifugeer gedurende 20 s op maximale snelheid om het gebonden DNA te elueren

### 4.3 Bepaling van de DNA-concentratie

Voordat een PCR werd uitgevoerd, werd de concentratie aan DNA in het (opgezuiverde) extract bepaald aan de hand van de NanoDrop ND-1000 V3.3.0. Spectrofotometer (Isogen Life Science, Sint-Pieters-Leeuw, België).

Op basis van deze resultaten werden de extracten met Milli-Q-water verdund tot eenzelfde concentratie (+/- 200 ng/ $\mu$ L) waarna hierop PCR werd uitgevoerd.

### 4.4 Polymerase Chain Reaction (PCR)

Polymerase chain reaction of PCR is een methode om DNA in vitro te vermenigvuldigen. Het enzym DNA-polymerase zorgt voor het kopiëren van de DNA-moleculen. Omdat er bij verhoogde temperaturen gewerkt wordt, wordt een thermostabiel DNA-polymerase uit thermofiele bacteriën gebruikt. Voor de aanhechting van het polymerase aan de DNA-keten moeten primers toegevoegd worden. Dit zijn oligonucleotiden van 15 tot 30 basen die complementair zijn met de sequentie die men uiteindelijk wil amplificeren. Primers worden altijd in een overmaat toegevoegd.

Een PCR bestaat uit verschillende stappen die gekenmerkt worden door een specifiek temperatuur-tijd verloop. Na de eerste denaturatiestap (bij 92 tot 95°C) volgt er een drieledige cyclus:

- Verwarming tot 92-95°C waardoor het dubbelstrengig DNA denatureert.
- Afkoeling tot een temperatuur die ideaal is voor binding (hybridisatie of annealing) van de primers met de complementaire sequenties van het DNA. Het is afhankelijk van de gebruikte primers welke temperatuur hiervoor ideaal is.
- Verwarming tot de temperatuur waarop het DNA-polymerase actief is (de elongatietemperatuur). Nu vindt de DNA-synthese plaats: het DNA-polymerase hecht nucleotiden, die bij het begin van de PCR werden toegevoegd, aan de primer zodat een streng wordt gevormd die complementair is aan de enkele streng DNA waaraan de primer zich had gehecht.

Deze drieledige cyclus wordt 25 tot 40 maal hernomen.

De syntheseproducten van elke cyclus dienen als matrijs voor de volgende cyclus. Hierdoor is de hoeveelheid DNA na elke cyclus verdubbeld.

Na de laatste cyclus, wordt de elongatietemperatuur nog een tiental minuten behouden om het enzym de kans te geven eventuele onvolledige DNA-strengen te vervolledigen.

Op het einde van de PCR wordt de temperatuur tot 4°C verlaagd om denaturatie van het geamplificeerde DNA te voorkomen.

Het syntheseproduct wordt bij -20°C bewaard.

## Media

Om afwijkingen ten gevolge van het pipetteren van zeer kleine volumes te voorkomen, wordt een 'PCR-mastermix' gemaakt. De samenstelling hiervan is weergegeven in Tabel 2. De mastermix wordt aan het template-DNA toegevoegd in een volumeverhouding van 25/1 (24  $\mu\text{L}$  mastermix en 1  $\mu\text{L}$  template-DNA).

## Technische gegevens

Tabel 3 geeft de sequentie en specificiteit van de gebruikte primers weer. De primercombinaties en temperatuur-tijdprogramma's voor de amplificatie van specifieke microbiële groepen zijn in Tabel 3 te vinden.

In de praktijk werd voor de amplificatie van het DNA van de acetaat- en zetmeel-bio-vlokken een nested PCR uitgevoerd. Hiervoor werd eerst een PCR uitgevoerd met de primers P63f en P1378r, waarna op het product hiervan opnieuw een PCR werd uitgevoerd met de primers P338fGC en P518r. Voor de amplificatie van het DNA van de betaïne- en MBA-bio-vlokken werd de PCR direct met de primers P338fGC en P518r uitgevoerd.

**Tabel 2. Samenstelling van de PCR-mastermix voor een totaal volume van 100  $\mu\text{L}$  (PCR systems, Fermentas, Burlington, Ontario).**

Component	Volume ( $\mu\text{L}$ )
PCR-water	77,2
Taq-buffer (10x)	10
100 mM Tris-HCl (pH 8,8 bij 25°C)	
500 mM KCl	
0,8% (v/v) Nonidet P40	
MgCl <sub>2</sub> (25 mM)	6
Nucleotidenmix (10 mM elk)	2
Primer 1	2
Primer 2	2
Taq DNA-polymerase	0,5
Bovine serum albumine	0,3
BSA (160 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ )	
Totaal volume	100

**Tabel 3. Sequentie en specificiteit van de primers die werden gebruikt bij de uitvoering van PCR.**

Primer	Specificiteit	Sequentie (5'→3')
P63f	Bacteria (universeel)	CAG-GCC-TAA-CAC-ATG-CAA-GTC
P1378r	Bacteria (universeel)	CGG-TGT-GTA-CAA-GGC-CCG-GGA-ACG
P338fGC	Bacteria (universeel)	CGC-CCG-CCG-CGC-GCG-GCG-GGC-GGG-GCG-GGG-GCA-CGG-GGG-GAC-TCC-TAC-GGG-AGG-CAG-CAG
P518r	Bacteria (universeel)	ATT-ACC-GCG-GCT-GCT-GG

**Tabel 4. Primers en temperatuur-tijdprogramma's voor de PCRs. Een temperatuur-tijdprogramma bestaat uit drie stappen: 1) initiatie, 2) DNA-amplificatie (deze stap wordt een aantal keer herhaald (..x)) en 3) terminale elongatie.**

Primers	Specificiteit	Temperatuur-tijdprogramma
P63f en P1378r	bacteriën	1) 94°C, 5 min 2) 95°C, 1 min/53°C, 1 min/72°C, 2 min (35x) 3) 72°C, 10 min
P338fGC en P518r	bacteriën	1) 94°C, 5 min 2) 95°C, 1 min/53°C, 1 min/72°C, 2 min (35x) 3) 72°C, 10 min

## 4.5 Agarose gelelektroforese

Na de DNA-extractie en de PCR wordt de aanwezigheid van DNA in de oplossing geverifieerd door middel van gelelektroforese. Hierbij wordt een elektrisch veld aangelegd op een agarosegel waardoor het negatief geladen DNA migreert naar de positieve pool. De snelheid van migratie doorheen de gel wordt bepaald door de afmetingen van het DNA, de porositeit van de gel en de sterkte van het elektrisch veld. Tijdens de migratie van het DNA doorheen de gel wordt het DNA gescheiden op basis van zijn lengte. Er kan een ook basepaarladder op de gel geladen worden, deze maakt het mogelijk om de lengte van de DNA-fragmenten te bepalen. Toevoeging van ethidiumbromide aan de gel maakt het mogelijk om het DNA te visualiseren met UV-licht aangezien ethidiumbromide zich tussen de strengen van dubbelstrengig DNA wringt en fluoresceert in de aanwezigheid van UV-licht.

### Media

TAE-buffer (0,5x): Tris-acetaat 0,04 M, EDTA 0,002 M, pH 8,5 (AppliChem, Darmstadt, Duitsland)

agarosegel: 1% voor DNA-extracten/1,2 % voor PCR-producten: 1/1,2 g agarose (UltraPure Agarose, Gibco RBL) toevoegen aan 100 mL TAE-buffer (0,5x) en de oplossing opkoken



2  $\mu$ L ethidiumbromide (EtBr, 10 mg/mL, Bio-Rad, Hercules, Californië) toevoegen wanneer de oplossing afgekoeld is tot ongeveer 50°C. (Let hierbij op want EtBr is mutageen en potentieel carcinogeen.)

ladingsbuffer: 0,25% bromofenolblauw en 40% sucrose (w/v) in H<sub>2</sub>O

#### Maken en laden van de gel

- De gelsuspensie wordt in een gelhouder gegoten en er wordt een kam in geplaatst waarna men de gel minstens 20 min laat coaguleren.
- De kam wordt uit de gel verwijderd en de gel wordt in het elektroforesetoestel geplaatst waarna TAE-buffer (0,5x) wordt toegevoegd totdat de gel volledig bedekt is.
- Vervolgens wordt 5  $\mu$ L staal gemengd met 1  $\mu$ L ladingsbuffer en in de uitsparingen, die in de gel achtergebleven zijn na het verwijderen van de kam, gebracht.
- Bij het aanleggen van het elektrisch veld moet de positieve pool zich het verst van de geladen stalen bevinden zodat het negatief geladen DNA naar de positieve pool migreert.
- Het EtBr in de gel wringt zich tussen de strengen van het dubbelstrengig DNA waardoor het, na het plaatsen van de gel op een fotografische plaat, onder een UV-lamp gevisualiseerd kan worden.

### 4.6 Denaturerende Gradiënt Gelelektroforese (DGGE)

DGGE is een elektroforetische scheidingstechniek waarbij gebruik gemaakt wordt van een polyacrylamidegel. Doordat in de gel een gradiënt van denaturerende stoffen (ureum en formamide) is aangelegd, wordt het dubbelstrengige DNA aan een toenemende denaturatiegradiënt onderworpen waardoor het begint te dissociëren. Hoe meer GC-basenparen het DNA-fragment bevat, hoe verder het zal migreren voordat de dissociatie optreedt. Deze GC-basenparen zijn namelijk door drie waterstofbruggen verbonden en dissociëren bijgevolg minder makkelijk dan de AT-basenparen die door slechts twee basenparen verbonden zijn. Door het uiteengaan van de strengen neemt de DNA-molecule meer plaats in waardoor de elektroforetische mobiliteit en dus ook de migratiesnelheid sterk afneemt. Hierdoor zullen DNA-fragmenten met een verschillende DNA-sequentie op verschillende hoogtes in de gel worden aangetroffen ('genetische fingerprinting').

DGGE is dus een uitgelezen techniek om gemeenschappen te bestuderen aangezien het een profiel geeft van de diversiteit in een gemeenschap op basis van de fysische scheiding van genfragmenten van eenzelfde lengte.

## Media

Denaturerende oplossingen met verschillende percentages denaturerende agentia (0%, 45% en 60%) (zie Tabel 5)

Ammoniumpersulfaat (APS): 0,1 g in 1 mL milli-Q-water (Biorad, Hercules, Californië)

TEMED (N,N,N',N'-tetramethyleendiamine, AppliChem, Darmstadt, Duitsland)

**Tabel 5. Samenstelling van de denaturerende oplossingen met verschillende percentages denaturatie-agentia. De oplossingen worden met milli-Q-water aangelengd tot 50 mL. \*: Bio-Rad, Hercules, Californië; \*\*: AppliChem, Darmstadt, Duitsland; \*\*\*: Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, Duitsland.**

Component	0%	45%	60%
Acrylamide (40%) *	10 mL	10 mL	10 mL
BisAA (2%) *	2,5 mL	2,5 mL	2,5 mL
TAE (50x) **	1 mL	1 mL	1 mL
Ureum ***	-	9,4 g	12,5 g
Formamide **	-	9 mL	12 mL

## Protocol

### Vorbereiding

- Reinig de glasplaten en de spacers achtereenvolgens met milli-Q-water, ethanol en opnieuw met milli-Q-water. Wrijf droog met stofvrije doekjes.
- Plaats de spacers tussen de platen en breng de glasplaten met de spacer ertussen in de gelhouder. Trek vervolgens de spacer naar boven zonder de glasplaten te verplaatsen. Draai de schroeven vast en bevestig de gelkam tussen de platen.

### Bereiding van de bodemgel

- Voeg 2 mL 60% denaturatie-oplossing, 20  $\mu$ L APS (10%, vers aangemaakt) en 2  $\mu$ L TEMED (4°C) samen en schud. Pipetteer deze oplossing tussen de glasplaten door de oplossing voorzichtig langs de spacer naar beneden te laten lopen.
- Laat gedurende minstens 1u polymeriseren.

### Bereiding van de denaturerende gel

- Breng zowel van de 60% als van de 45% denaturatie-oplossing 10 mL in een afzonderlijk buisje.
- Voeg bij beide oplossingen 100  $\mu$ L APS (10%, vers bereid) en 10  $\mu$ L TEMED (4°C) en schud.

- Breng beide oplossingen in recipiënten die verbonden zijn met de pomp zodanig dat het recipiënt dat het verst van de toevoerleiding verwijderd is, de oplossing met de laagste gradiënt bevat. Verwijder de luchtbel tussen de 2 compartimenten.
- Plaats de naald tussen de glasplaten, open het verbindingsstuk tussen de twee recipiënten en schakel de pomp in.
- Schakel de pomp uit wanneer de gel tussen de glasplaten ter hoogte van de rand van de klemmen is. Verwijder de overblijvende oplossing uit de recipiënten en spoel de recipiënten en toevoerleiding met water.
- Laat gedurende minstens 2u polymeriseren terwijl de gel bedekt is en afgeschermd van licht.

#### Bereiding van de stackinggel

- Voeg 2 mL 0% denaturatie-oplossing, 20  $\mu$ L APS (10%, vers aangemaakt) en 2  $\mu$ L TEMED (4°C) samen en schud goed.
- Breng de stacking gel aan en duw de gelkam iets dieper tussen de glasplaten.
- Laat gedurende minstens 1u polymeriseren terwijl de gel bedekt is en afgeschermd van licht.

#### Laden en laten lopen van de gel

- Het DGGE-apparaat (INGENY phor U-2, Ingeny International BV, GOES, Nederland) wordt gevuld met 1x TAE-buffer en voorverwarmd tot 60°C.
- De gelkam wordt verwijderd en de uitsparingen die achterblijven in de gel worden gevisualiseerd door ze te overvloeien met 15  $\mu$ L ladingsbuffer en nadien te reinigen met 1x TAE-buffer.
- De gel wordt geladen met 10  $\mu$ L PCR-staal.
- Het DGGE-toestel wordt verbonden met de spanningsbron en men laat de gel gedurende 15u lopen bij 120 V en 60°C.

#### Ontwikkeling van de gel

Voor de ontwikkeling van een DGGE-gel wordt gebruik gemaakt van SYBR® Green nucleïnezuur gelkleuring (1/10000 verdunning, FMC BioProducts, Rockland, Maine).

- Haal de gel uit het DGGE-apparaat en draai de schroeven los.
- Verwijder de gel voorzichtig.
- Kleur de gel gedurende 20 min in 250 mL 1x TAE-buffer en 17  $\mu$ L SYBR Green.
- Plaats de gel op een fotografische plaat en fotografeer onder UV-licht.

## 4.7 Verwerking van DGGE-resultaten

Na het fotograferen van de gel onder een UV-transilluminator wordt de afbeelding digitaal opgeslagen (TIFF) en kan de analyse plaatsvinden. Hiervoor wordt de software BioNumerics (Applied Maths, Sint-Martens-Latem, België) gebruikt. De analyse vindt plaats aan de hand van volgende stappen:

- Bewerken van de foto: de grootte wordt aangepast, de lanen worden bepaald, het achtergrondsignaal (ruis) wordt verwijderd en de gel wordt genormaliseerd.
- Benoemen van de lanen: de juiste naamcodes worden toegekend aan de verschillende lanen en de referenties worden aangeduid.
- Clusteranalyse: de dendrogrammen worden aangemaakt door gebruik te maken van de groeperingsmethode volgens UPGMA.

## 4.8 Analyse van de DGGE-patronen

### 4.8.1 Moving window analyse

In een moving window analyse wordt de evolutie van de correlatiewaarden tussen twee opeenvolgende analysedata uitgezet. De correlatiewaarden verkrijgt men uit de clustering van de DGGE-patronen (Pearson correlatie coëfficiënt matrix). Men spreekt van 'moving window' omdat elk datapunt in de grafiek de correlatie tussen stalen van dag  $x$  en dag  $x$ -tijdsframe voorstelt. Het gekozen tijdsframe in dit eindwerk was variabel: van 3 dagen tot 13 dagen. In plaats van de correlatie te vergelijken met een vast datapunt, gaat men in deze analyse niet enkel het beschouwde datapunt, maar ook het datapunt waarmee men vergelijkt, verschuiven. Moving window analyse is een kwantitatieve manier om de stabiliteit van de microbiële gemeenschap te evalueren (Possemiers et al., 2004).

### 4.8.2 Pareta-Lorenz distributie curves en Gini-coëfficiënt

De Pareto-Lorenz distributie curves worden opgesteld uitgaande van de bekomen DGGE-profielen. Per DGGE laan worden de respectievelijke banden gerangschikt van hoog naar laag afhankelijk van hun graad van voorkomen. Vervolgens stelt men de grafiek op met als X-as de cumulatieve proportie van de species en als Y-as de respectievelijke cumulatieve proportie van voorkomen. Dit levert, mathematisch gezien, een convexe curve op. Hoe meer de Lorenz curve afwijkt van de theoretische vlakke lijn (de 45° diagonaal), hoe minder gelijkheid er is in structuur van de bestudeerde gemeenschap. Dit betekent dat slechts een proportioneel kleine fractie van de verschillende species dominant aanwezig is.

De Gini-coëfficiënt is een maat voor de afwijking van de Lorenzcurve met de equidistributielij (de rechte die de punten [0,0] en [1,1] verbindt). De Gini-coëfficiënt is mathematisch het dubbele van de oppervlakte tussen de Lorenzcurve en de equidistributielij.

## 5 Pathogenen en LVS3

### 5.1 Opgroeien van de pathogenen en LVS3

*Vibrio harveyi* BB120, *Vibrio campbelli* LMG21363 en LVS3 (een stam van *Aeromonas hydrophila*) werden overnacht bij 28°C opgegroeid in MB-medium.

Voor gebruik in een challenge test werden de culturen gedurende 10 min gecentrifugeerd bij 2000 g. Het supernatans werd afgegoten en de pellet werd geresuspendeerd in artificieel zeewater waarna ze opnieuw gecentrifugeerd werden, afgegoten en geresuspendeerd. De gespoelde LVS3-cultuur werd ook nog geautoclaveerd voor gebruik in de challenge test.

### 5.2 Bepaling van de celdensiteit

De celdensiteit werd bepaald aan de hand van een meting van de OD (optische densiteit) bij 545 nm met de ISIS 9000 spectrofotometer van DR Lange. Aan de hand van deze meting en volgende formule, die gebaseerd is op de McFarlandstandaard, kan de celdensiteit bepaald worden.

$$\text{kve/mL} = 1,2 \cdot 10^9 \cdot \text{OD}_{545}$$

## 6 Luminescentie- en groeitesten

De invloed van de aanwezigheid van bio-vlokken op de luminescentie en groei van *Vibrio* spp. werd onderzocht aan de hand van twee verschillende experimentele set-ups.

In de eerste set-up werd in een volume van 10 mL gewerkt, waaruit na een incubatie van 24u stalen werden genomen om de luminescentie en groei te bepalen. In de tweede set-up werd in een micro-well-plaat gewerkt, waarin gedurende 24u de luminescentie en de optische dichtheid werden gemeten.

### 6.1 Testen met de meting na 24u

Deze testen werden voor *Vibrio harveyi* BB120 in twee media uitgevoerd: mariene broth om het intestinaal kanaal van mariene organismen te simuleren en fysiologische oplossing om het waterig milieu waarin het aquatisch organisme zich bevindt, te simuleren. Aangezien er in de test met fysiologische oplossing na 24u geen *Vibrio* meer werd teruggevonden, werd de test voor *Vibrio campbellii* LMG21363 enkel in MB uitgevoerd.

Om het effect van de bio-vlokken te onderzoeken en om na te gaan welke component van de bio-vlokken het effect veroorzaakt, werden de bio-vlokken, de geautoclaveerde bio-vlokken, het gefiltersteriliseerd supernatans en het geautoclaveerd gefiltersteriliseerd supernatans als behandeling toegepast. Het gefiltersteriliseerd supernatans werd bekomen door 10 min bij 10000 g te centrifugeren en te filtreren over een 0,22  $\mu\text{m}$  Millipore filter.

In een falcon tube van 50 mL (polypropyleen: TPP, St Louis, MO, USA) werd in totaal 10 mL suspensie gebracht:

- 10  $\mu\text{L}$  van een *Vibrio*-cultuur (die overnacht werd opgekweekt)
- 1 mL behandeling
- 9 mL medium

Voor de simulatie van het intestinaal kanaal in MB werd de incubatie in het donker op een schudder (80 tpm) uitgevoerd. Voor de simulatie van het waterig milieu waarin het aquatisch organisme zich bevindt, vond de incubatie plaats op een rotor (4 tpm) onder constante belichting.

Na 24u werd de luminescentie bepaald door 200  $\mu\text{L}$  van de testsuspensie in een 96 wellplaat (zwart, met doorschijnende bodem; Nalge Nunc International, Rochester, NY, USA) over te brengen, waarna de meting werd uitgevoerd aan de hand van de Infinite M200 microplaatlezer (Tecan, Männedorf, Zwitserland).

Op hetzelfde moment als de luminescentie, werd de celdensiteit bepaald door 100  $\mu\text{L}$  van de correcte verdunning van de testsuspensie op TCBS-platen uit te platen. Het aantal kolonies op de TCBS-platen werd geteld na 1 dag incubatie bij 28°C. Volgende vergelijkingen werden

gebruikt voor de berekening van de celdensiteit (kve/mL) en de standaardafwijking (SA) op de celdensiteit van de culturen (Verstraete, 2004).

$$\text{kve/mL} = N/V$$

$$\text{SA} = N0,5/V$$

N: het aantal kolonies geteld op alle telbare platen (30 tot 300 kolonies bij strijkplaten) van het staal

V: het totaal volume staal dat op de platen wordt aangebracht

De statistische analyse van de resultaten werd uitgevoerd aan de hand van het softwarepakket S-PLUS 8.0 (TIBCO Software Inc., Palo Alto, CA, USA). Er werd een tweezijdige t-test toegepast.

## 6.2 Testen met de meting gedurende 24u

Deze testen werden in drie media uitgevoerd: mariene broth, fysiologische oplossing en artificieel zeewater.

Ook hier werden de bio-vlokken zelf, de geautoclaveerde bio-vlokken, het gefiltersteriliseerd supernatans en het geautoclaveerd, gefiltersteriliseerd supernatans beschouwd als behandelingen.

Het effect op de luminescentie en groei van *Vibrio harveyi* BB120 en *Vibrio campbellii* LMG21363 werd nagegaan.

Deze testen werden uitgevoerd in 96 well-platen waarin in totaal 200  $\mu\text{L}$  per well werd gebracht:

- 10  $\mu\text{L}$  van een *Vibrio*-cultuur (die overnacht werd opgekweekt)
- 20  $\mu\text{L}$  van de behandeling
- 170  $\mu\text{L}$  medium

De plaat werd bedekt met een film (Optical Adhesive film kit; Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) zodat er geen suspensie uit de ene well in een ander kan geraken en om verdamping tijdens de incubatie te voorkomen.

Hierna werd de plaat in de Infinite M200 microplaatlezer geplaatst, waarin gedurende 24u geïncubeerd werd bij 37°C en er ieder uur een meting van de luminescentie en optische densiteit plaatsvond. De resultaten werden verwerkt met de Tecan-i-Control software (Tecan Group, Männedorf, Zwitserland).

## 7 Experimenten met *Artemia franciscana*

De challenge testen werden op dezelfde manier uitgevoerd als door Defoirdt et al. (2006). Alle manipulaties werden uitgevoerd onder een laminaire flow om de steriliteit van de nauplii te verzekeren.

### 7.1 Hydratatie van de *Artemia* cysten

Zestig mg cysten van *Artemia franciscana* werden gesuspenderd in 18 mL gedestilleerd water in een 50 mL falcontube. De cysten werden gedurende ongeveer een uur gehydrateerd met steriele beluchting (aan de hand van een 0,22 µm-filter).

### 7.2 Decapsulatie van de cysten

De sterilisatie van de cysten werd uitgevoerd door het chorion te verwijderen, dit is de buitenste laag van de cyste waarin alle bacteriën die met de cyste geassocieerd zijn, zich bevinden.

Hiervoor werd de falcon tube met gehydrateerde cysten geëereerd, aan de hand van 0,22 µm gefilterde lucht. Er werd 660 µL NaOH (32%) en 10 mL NaOCl (50%) toegevoegd en na ongeveer 2 min werd de reactie gestopt door 14 mL Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub> (10 g/L) toe te voegen. De cysten werden gewassen over een zeef met gefiltersteriliseerd en geautoclaveerd artificieel zeewater.

### 7.3 Hatches van *Artemia*

Na decapsulatie werden de cysten aan de hand van een geautoclaveerde spatel in een falcon met ongeveer 30 mL artificieel water gebracht waarna ze op rotor geplaatst werden (4 tpm) voor voldoende zuurstof, bij 28°C en met constante belichting. De experimenten werden gestart na minstens 24u hatches.

### 7.4 Uitgevoerde experimenten

Er werden verschillende behandelingen uitgevoerd om het effect van bio-vlokken op de groei van *Artemia franciscana* en op de virulentie van *Vibrio harveyi* BB120 en *Vibrio campbelli* LMG21363 na te gaan.

Alle in dit onderdeel beschreven experimenten met *Artemia*-nauplii werden in drievoud uitgevoerd.

#### 7.4.1 Testen met de koolstofbronnen van de bio-vlokken

Deze testen werden uitgevoerd om enerzijds de toxiciteit van de koolstofbron voor de *Artemia* te bepalen en anderzijds om te achterhalen of de koolstofbron op zich een hogere overleving van de *Artemia* veroorzaakt in een challenge test met *Vibrio harveyi* BB120 of *Vibrio campbelli* LMG21363.



Hiervoor werd een concentratie aan glycerol, betaïne of MBA toegevoegd die gelijk is aan die in de reactoren met bio-vlokken net na het voeren. Er werd ook een test uitgevoerd met een van de componenten van MBA, namelijk gist.

In Tabel 6 is een overzicht te vinden van de inhoud van de testtubes bij de verschillende behandelingen.

De inhoud van de tubes werd met artificieel zeewater aangelengd tot 20 mL.

Bij de testen met de verschillende koolstofbronnen werd de overleving van de Artemia na 48u nagegaan.

**Tabel 6. Inhoud van de testtubes bij de testen met de koolstofbronnen.**

	LVS3	Artemia	actieve component	pathogeen
geen voeder	/	20	/	/
geen voeder + pathogeen	/	20	/	10 <sup>5</sup> kve/mL
LVS3	10 <sup>7</sup> kve/mL	20	/	/
LVS3 + pathogeen	10 <sup>7</sup> kve/mL	20	/	10 <sup>5</sup> kve/mL
glycerol	/	20	12,4 µL	/
glycerol + pathogeen	/	20	12,4 µL	10 <sup>5</sup> kve/mL
betaïne	10 <sup>7</sup> kve/mL	20	12,5 mg	/
betaïne + pathogeen	10 <sup>7</sup> kve/mL	20	12,5 mg	10 <sup>5</sup> kve/mL
gist	/	20	12,5 mg CZV	/
gist + pathogeen	/	20	12,5 mg CZV	10 <sup>5</sup> kve/mL
MBA	/	20	12,5 mg CZV	/
MBA + pathogeen	/	20	12,5 mg CZV	10 <sup>5</sup> kve/mL

#### 7.4.2 Voedertesten

De voedertesten werden uitgevoerd om na te gaan of en indien mogelijk in welke mate de bio-vlokken als voeder kunnen dienen voor de Artemia-nauplii in de challenge test.

Bij twee testen werd de overleving van de Artemia na 48u gecontroleerd en bij een test pas na 120u.

Een overzicht van de inhoud van de testtubes bij de test van 5 dagen is te vinden in Tabel 7 en dat van de testen van 2 dagen in Tabel 8.

De inhoud van de tubes werd met artificieel zeewater aangelengd tot 20 mL.

**Tabel 7. Inhoud van de testtubes bij de voedertest van 5 dagen.**

	LVS3	Artemia	actieve component
10 <sup>5</sup> LVS3	10 <sup>5</sup> kve/mL	20	/
10 <sup>6</sup> LVS3	10 <sup>6</sup> kve/mL	20	/
10 <sup>7</sup> LVS3	10 <sup>7</sup> kve/mL	20	/
10 <sup>8</sup> LVS3	10 <sup>8</sup> kve/mL	20	/
10 <sup>9</sup> LVS3	10 <sup>9</sup> kve/mL	20	/
glycerol-bio-vlokken1	/	20	0,086 g/L SS
glycerol-bio-vlokken2	/	20	0,172 g/L SS
glycerol-bio-vlokken4	/	20	0,343 g/L SS

**Tabel 8. Inhoud van de testtubes bij de voedertest van 2 dagen.**

	LVS3	Artemia	actieve component
geen voeding	/	20	/
10 <sup>5</sup> LVS3	10 <sup>5</sup> kve/mL	20	/
10 <sup>6</sup> LVS3	10 <sup>6</sup> kve/mL	20	/
10 <sup>7</sup> LVS3	10 <sup>7</sup> kve/mL	20	/
10 <sup>8</sup> LVS3	10 <sup>8</sup> kve/mL	20	/
10 <sup>9</sup> LVS3	10 <sup>9</sup> kve/mL	20	/
glycerol-bio-vlokken1	/	20	0,170 g/L SS
glycerol-bio-vlokken2	/	20	0,340 g/L SS
glycerol-bio-vlokken3	/	20	0,510 g/L SS

### 7.4.3 Challenge testen

Om het effect van de bio-vlokken te onderzoeken en om na te gaan welke component van de bio-vlokken het effect veroorzaakt, werd 2 mL bio-vlokken, geautoclaveerde bio-vlokken, gefiltersteriliseerd supernatans of geautoclaveerd gefiltersteriliseerd supernatans in een geautoclaveerde glazen tube gebracht. Het gefiltersteriliseerd supernatans werd bekomen door 10 min bij 10 000 g te centrifugeren en te filtreren over een 0,22 µm Millipore filter.

In de eerste challenge test met de glycerol-bio-vlokken werd de 2 mL (geautoclaveerde) bio-vlokken/supernatans enkel als behandeling gezien en werd 10<sup>7</sup> kve/mL LVS3 toegevoegd als voeder voor de Artemia. Deze experimentele set-up werd gebruikt om het effect op zowel *Vibrio harveyi* BB120 als *Vibrio campbellii* LMG21363 te onderzoeken. Een overzicht van de inhoud van de testtubes is te vinden in Tabel 9.

**Tabel 9. Overzicht van de inhoud van de testtubes bij de eerste challenge test met glycerol-bio-vlokken. Hierbij kwam de 2 mL bio-vlokken overeen met 0,265 gSS/L bij de test met *Vibrio harveyi* BB120 en met 0,130 gSS/L bij de test met *Vibrio campbellii* LMG21363.**

	LVS3	Artemia	actieve component	pathogeen
LVS3	10 <sup>7</sup> kve/mL	20	/	/
LVS3 + pathogeen	10 <sup>7</sup> kve/mL	20	/	10 <sup>5</sup> kve/mL
LVS3 + bio-vlokken	10 <sup>7</sup> kve/mL	20	2 mL	/
LVS3 + bio-vlokken + pathogeen	10 <sup>7</sup> kve/mL	20	2 mL	10 <sup>5</sup> kve/mL
LVS3 + geautoclaveerde bio-vlokken	10 <sup>7</sup> kve/mL	20	2 mL	/
LVS3 + geautoclaveerde bio-vlokken + pathogeen	10 <sup>7</sup> kve/mL	20	2 mL	10 <sup>5</sup> kve/mL
LVS3 + supernatans	10 <sup>7</sup> kve/mL	20	2 mL	/
LVS3 + supernatans + pathogeen	10 <sup>7</sup> kve/mL	20	2 mL	10 <sup>5</sup> kve/mL
LVS3 + geautoclaveerd supernatans	10 <sup>7</sup> kve/mL	20	2 mL	/
LVS3 + geautoclaveerd supernatans + pathogeen	10 <sup>7</sup> kve/mL	20	2 mL	10 <sup>5</sup> kve/mL

**Tabel 10. Overzicht van de inhoud van de testtubes bij de tweede challenge test met glycerolvlokken. Hierbij kwam de 2 mL bio-vlokken overeen met 0,811 g/L SS bij de test met *Vibrio harveyi* BB120 en met 0,489 g/L SS bij de test met *Vibrio campbellii* LMG21363.**

	LVS3	Artemia	actieve component	pathogeen
geen voeding	/	20	/	/
geen voeding + pathogeen	/	20	/	10 <sup>5</sup> kve/mL
LVS3	10 <sup>7</sup> kve/mL	20	/	/
LVS3 + pathogeen	10 <sup>7</sup> kve/mL	20	/	10 <sup>5</sup> kve/mL
bio-vlokken	/	20	2 mL	/
bio-vlokken + pathogeen	/	20	2 mL	10 <sup>5</sup> kve/mL
geautoclaveerde bio-vlokken	/	20	2 mL	/
geautoclaveerde bio-vlokken + pathogeen	/	20	2 mL	10 <sup>5</sup> kve/mL
supernatans	/	20	2 mL	/
supernatans + pathogeen	/	20	2 mL	10 <sup>5</sup> kve/mL
geautoclaveerd supernatans	/	20	2 mL	/
geautoclaveerd supernatans + pathogeen	/	20	2 mL	10 <sup>5</sup> kve/mL

In de tweede challenge test met de glycerolvlokken werd de 2 mL (geautoclaveerde) vlokken/supernatans als voldoende voeder voor de Artemia beschouwd. Deze experimentele set-up werd gebruikt om het effect op zowel *Vibrio harveyi* BB120 als *Vibrio campbellii* LMG21363 te onderzoeken. Een overzicht van de inhoud van de testtubes is te vinden in

Tabel 10.

Voor de challenge testen met de betaïne- en MBA-vlokken werd er meteen vanuit gegaan dat de 2 mL (geautoclaveerde) vlokken/supernatans als voldoende voeder voor de Artemia dienst konden doen. Opnieuw werd het effect op zowel *Vibrio harveyi* BB120 als *Vibrio campbellii* LMG21363 onderzocht. Een overzicht van de inhoud van de testtubes kan gevonden worden in Tabel 11.

**Tabel 11. Overzicht van de inhoud van de testtubes bij de challenge testen met betaïne- en MBA-vlokken met *Vibrio harveyi* BB120 en *Vibrio campbellii* LMG21363. Hierbij kwam de 2 mL betaïne-bio-vlokken overeen met 0,171 g/L SS en de 2 mL MBA-bio-vlokken met 0,045 g/L SS.**

	LVS3	Artemia	actieve component	pathogeen
LVS3	10 <sup>7</sup> kve/mL	20	/	/
LVS3 + pathogeen	10 <sup>7</sup> kve/mL	20	/	10 <sup>5</sup> kve/mL
bio-vlokken	/	20	2 mL	/
bio-vlokken + pathogeen	/	20	2 mL	10 <sup>5</sup> kve/mL
geautoclaveerde bio-vlokken	/	20	2 mL	/
geautoclaveerde bio-vlokken + pathogeen	/	20	2 mL	10 <sup>5</sup> kve/mL
supernatans	/	20	2 mL	/
supernatans + pathogeen	/	20	2 mL	10 <sup>5</sup> kve/mL
geautoclaveerd supernatans	/	20	2 mL	/
geautoclaveerd supernatans + pathogeen	/	20	2 mL	10 <sup>5</sup> kve/mL

Tot slot werd nog een challenge test uitgevoerd waarbij de bio-vlokken zodanig werden toegevoegd dat er gestreefd werd naar eenzelfde grootteorde aan zwevende stoffen van de verschillende types bio-vlokken in de tubes in de plaats van het gelijke volume bio-vlokken (2 mL) in de vorige testen. Deze experimentele set-up werd gebruikt om het effect van de (geautoclaveerde) glycerol-, betaïne- en MBA-bio-vlokken op *Vibrio harveyi* BB120 na te gaan. In Tabel 12 is een overzicht te vinden van de inhoud van de testtubes bij de verschillende behandelingen.

**Tabel 12. Overzicht van de inhoud van de testtubes bij de challenge test met de drie types bio-vlokken en *Vibrio harveyi* BB120. Hierbij kwam 1 mL glycerolvlokken overeen met 0,219 g/L SS, 2 mL betaïnevlokken met 0,221 g/L SS en 8 mL MBA-vlokken met 0,400 g/L SS.**

	LVS3	Artemia	actieve component	pathogeen
geen voeding	/	20	/	/
geen voeding + pathogeen	/	20	/	10 <sup>5</sup> kve/mL
LVS3	10 <sup>7</sup> kve/mL	20	/	/
LVS3 + pathogeen	10 <sup>7</sup> kve/mL	20	/	10 <sup>5</sup> kve/mL
glycerol-bio-vlokken	/	20	1 mL	/
glycerol-bio-vlokken + pathogeen	/	20	1 mL	10 <sup>5</sup> kve/mL
geautoclaveerde glycerol-bio-vlokken	/	20	1 mL	/
geautoclaveerde glycerol-bio-vlokken + pathogeen	/	20	1 mL	10 <sup>5</sup> kve/mL
betaïne-bio-vlokken	/	20	2 mL	/
betaïne-bio-vlokken + pathogeen	/	20	2 mL	10 <sup>5</sup> kve/mL
geautoclaveerde betaïne-bio-vlokken	/	20	2 mL	/
geautoclaveerde betaïne-bio-vlokken + pathogeen	/	20	2 mL	10 <sup>5</sup> kve/mL
MBA-bio-vlokken	/	20	8 mL	/
MBA-bio-vlokken + pathogeen	/	20	8 mL	10 <sup>5</sup> kve/mL
geautoclaveerde MBA-bio-vlokken	/	20	8 mL	/
geautoclaveerde MBA-bio-vlokken + pathogeen	/	20	8 mL	10 <sup>5</sup> kve/mL

De inhoud van de tubes werd telkens met artificieel zeewater aangelengd tot 20 mL. Bij de challenge testen werd de overleving van de Artemia na 48u nagegaan.

## 7.5 Nagaan van overleving Artemia

Op het eind van de test werd de overleving van Artemia nagegaan door het aantal zwemmende Artemia te tellen.

De statistische verwerking van de bekomen waarden werd, naargelang al dan niet aan de voorwaarden voor homoscedasticiteit en normaliteit voldaan was, met behulp van ANOVA of de niet-parametrische Kruskal-Wallis Rank test uitgevoerd. Hierna werden de significante

verschillen tussen de resultaten aan de hand van respectievelijk Tukey of Bonferroni bepaald. Deze analyses werden uitgevoerd met behulp van het softwarepakket S-PLUS 8.0.

## 7.6 Controle van de steriliteit

Bij de challenge testen werd de steriliteit gecontroleerd door 100  $\mu$ L uit te platen op MB. Dit werd uitgevoerd voor het hatches, voor het verdelen van de nauplii over de testtubes en voor het nagaan van de overleving.

## 7.7 Aanvullende analyses na het beëindigen van de challenge test

### 7.7.1 Groei van de Artemia

Na het bepalen van de overleving van de Artemia, werden de levende Artemia overgebracht in één epje per tube en gefixeerd aan de hand van lugol zodat ze later gemeten konden worden.

Het meten van de Artemia werd uitgevoerd aan de hand van een geschaald draagglas en een microscoop voorzien van een schaal aanduiding op het oculair.

De statistische verwerking van de bekomen waarden werd, naargelang al dan niet aan de voorwaarden voor homoscedasticiteit en normaliteit voldaan was, met behulp van ANOVA of de niet-parametrische Kruskal-Wallis Rank test uitgevoerd. Hierna werden de significante verschillen tussen de resultaten aan de hand van respectievelijk Tukey of Bonferroni bepaald. Deze analyses werden uitgevoerd met behulp van het softwarepakket S-PLUS 8.0.

### 7.7.2 Overleving van de Vibrio in de vloeistof en kolonisatie van het gastrointestinaal kanaal van Artemia

Bij de challenge test met de drie types bio-vlokken en *Vibrio harveyi* BB120 werden extra analyses uitgevoerd om een inschatting te kunnen maken van de overleving van vibrio's in de vloeistof en de kolonisatie van het gastrointestinaal kanaal van de Artemia door vibrio's en de bio-vlokken.

Bij de start van de challenge test (dus net na het toevoegen van de pathogeen aan de tubes), werd 200  $\mu$ L van de suspensie in een 96 well-plaat gebracht en werd aan de hand van de Infinite M200 microplaatlezer de luminescentie en de optische dichtheid gemeten. Eveneens werd 100  $\mu$ L van de gepaste verdunning uitgeplaat op TCBS en geïncubeerd gedurende 24u bij 28°C om het aantal vibrio's te bepalen.

Na het beëindigen van de challenge test, werd opnieuw 200  $\mu$ L van de suspensie in de tubes gebruikt om de luminescentie en de OD te meten en werd 100  $\mu$ L van de gepaste verdunning uitgeplaat op TCBS.

Deze testen werden uitgevoerd om een idee te krijgen van de evolutie van deze parameters in de vloeistof in de aanwezigheid van een 'gastheer' voor de vibrio's.

Er werd ook geprobeerd om een inschatting te maken van de kolonisatie van het gastro-intestinaal kanaal van de Artemia. De handelswijze voor deze analyses is gebaseerd op die van To Van Cam (2009) met enkele wijzigingen.

Er werd per behandeling een deel van de levende Artemia geoogst en overgebracht in 9 mL artificieel zeewater. De Artemia werden opgevangen op een zeef (200  $\mu\text{m}$ ) en gespoeld met 10 mL artificieel zeewater. Hierna werd de zeef aseptisch in een steriele plasticzak die 10 mL artificieel zeewater bevat, gebracht. Het staal werd gedurende 5 min gehomogeniseerd in een stomacher (Stomacher 400 Lab Blender Mixer: Seward, Worthing, UK).

Van de bekomen suspensie werd 200  $\mu\text{L}$  gebruikt voor de meting van de luminescentie en OD en werd 100  $\mu\text{L}$  uitgeplaat op TCBS om het aantal vibrio's te bepalen en 100  $\mu\text{L}$  op mariene agar om het totale aantal heterotrofe mariene bacteriën te bepalen.

Deze test werd uitgevoerd om na te gaan in hoeverre het gastro-intestinaal kanaal van de Artemia gekoloniseerd wordt door de bio-vlokken en de pathogeen.

Voor de berekening van de celdensiteit uit het aantal kolonies werd dezelfde werkwijze als in sectie 6 toegepast.

Statistische verwerking van de resultaten werd uitgevoerd aan de hand van een tweezijdige t-test met behulp van het softwarepakket S-PLUS 8.0.

Deel III  
Resultaten



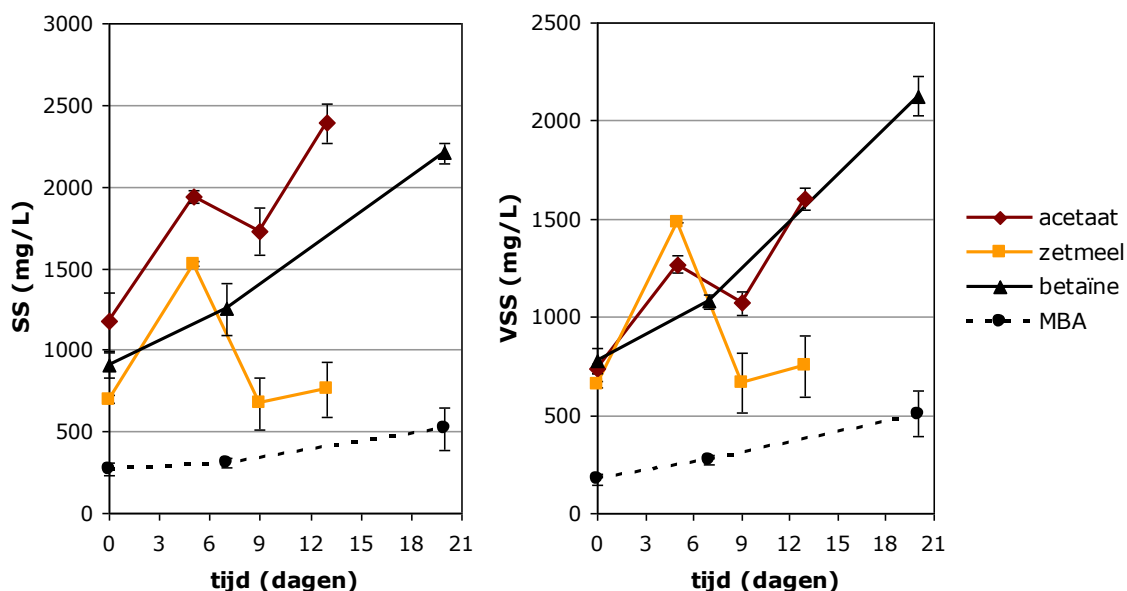
# 1 Samenstelling van de bio-vlokken

## 1.1 Zwevende en vluchtige zwevende stoffen

In Figuur 8 wordt de evolutie van de zwevende stoffen (SS) en vluchtige zwevende stoffen (VSS) in de verschillende types bio-vlokken gedurende de analyses voor de bepaling van de nutritionele eigenschappen weergegeven.

Het gehalte aan SS in de acetaat- en betaïne-bio-vlokken vertoonde globaal een stijgende trend in functie van de tijd tijdens de analyses van de bio-vlokken voor de bepaling van de nutritionele waarden. Bij de betaïne-bio-vlokken was er een verdubbeling van de SS (van 910 mg/L op de eerste analysedag tot 2 205 mg/L 20 dagen later) en zelfs bijna een verdrievoudiging van de VSS (van 780 mg/L op de eerste analysedag tot 2 125 mg/L 20 dagen later). Deze waarden voor de betaïne-bio-vlokken op de laatste analysedag waren zelfs de hoogste die werden waargenomen in deze reactors, want tijdens de daaropvolgende opvolging van deze parameters wegens het gebruik van de bio-vlokken in de challenge testen daalde het SS-gehalte weer tot een eerder constante 2 000 mg/L en het VSS-gehalte tot 1 600 mg/L.

Bij de zetmeel- en MBA-bio-vlokken werd deze stijgende trend in de SS- en VSS-gehalten echter niet waargenomen. De waarden voor SS en VSS vielen in de zetmeel-bio-vlokken na een sterke stijging tussen de eerste en de tweede analyse terug tot het beginniveau en bleven daarna ongeveer constant. Ook in de MBA-bio-vlokken bleven de SS- en VSS-concentraties nagenoeg constant.



Figuur 8: Evolutie van de gehalten aan SS en VSS in de bio-vlokken. Op elk tijdstip wordt de gemiddelde waarde van de twee reactors met hetzelfde type bio-vlokken weergegeven. De foutenvlaggen geven de standaardafwijking weer.

## 1.2 Biochemische samenstelling

De gemiddelde biochemische samenstelling van de vier types bio-vlokken tijdens de beschouwde periode en de bruto energie-inhoud wordt weergegeven in Tabel 13. De eiwitinhoud was gelijkaardig in de acetaat- en MBA-bio-vlokken (respectievelijk  $36 \pm 8\%$  en  $44 \pm 13\%$  op DS) en significant hoger in de zetmeel- en betaine-bio-vlokken (respectievelijk  $65 \pm 15\%$  en  $66 \pm 14\%$  DS). Aangezien het eiwitgehalte in de zetmeel-bio-vlokken heel wat hoger was dan verwacht, werd nagekeken of dit veroorzaakt kon worden doordat zetmeel een invloed had op de stikstofmeting. Dit bleek echter niet het geval te zijn waaruit besloten kan worden dat het hoge eiwitgehalte in de bio-vlokken wel degelijk veroorzaakt werd door de aanwezige micro-organismen. Het vetgehalte varieerde van  $4 \pm 1\%$  DS in de betaine-behandeling tot  $9 \pm 2\%$  DS in de zetmeel-behandeling. Het asgehalte was significant hoger in de acetaat-bio-vlokken in vergelijking met de andere types bio-vlokken. De koolhydraatinhoud van de vier types bio-vlokken was behoorlijk variabel. Wegens het geringe aantal analyses van het vetgehalte in de betaine- en MBA-vlokken ( $n=2$ ) is de standaardafwijking op het berekende koolhydraatgehalte echter zodanig groot dat er geen statistisch significant verschil tussen de verschillende types vlokken kon worden gevonden.

**Tabel 13. Gemiddelde nutritionele waarden van de bio-vlokken die gevoed werden met acetaat, zetmeel, betaine en MBA. De koolhydraat- en bruto-energie-inhoud werden berekend volgens Manush et al. (2005) en Tacon (1990). De waarden in dezelfde rij die gevolgd worden door een verschillende letter zijn significant verschillend ( $p < 0,05$ ). Aangezien de bruto energie werd berekend op basis van de gemiddelde nutritionele waarden, werd op deze waarden geen statistische verwerking uitgevoerd.**

	acetaat	zetmeel	betaine	MBA
eiwit (% DS)	$36 \pm 8$ a	$65 \pm 15$ b	$66 \pm 14$ b	$44 \pm 13$ a
vet (% DS)	$8 \pm 4$ a	$9 \pm 2$ a	$4 \pm 1$ a	$6 \pm 1$ a
as (% DS)	$35 \pm 4$	$3 \pm 3$ a	$10 \pm 6$ ab	$16 \pm 16$ b
koolhydraten (% DS)	$26 \pm 6$ a	$36 \pm 11$ a	$22 \pm 19$ a	$44 \pm 30$ a
bruto energie (kJ/g DS)	$15,8 \pm 0,5$	$24,4 \pm 0,9$	$20,4 \pm 1,0$	$19,9 \pm 1,4$

### 1.2.1 Vetzuurprofiel

Het vetzuurprofiel van de verschillende bio-vlokken werd bepaald aan de hand van FAME-analyse. De concentraties van 40 lange keten-vetzuren worden weergegeven in Tabel 14.

Het gehalte aan verzadigde vetzuren in de bio-vlokken bedroeg 7-10 mg/g DS en dat aan mono-onverzadigde vetzuren 8-14 mg/g DS, behalve in de MBA-bio-vlokken waar de concentratie aan verzadigde vetzuren 15 mg/g DS bedroeg en die aan mono-onverzadigde vetzuren 27 mg/g DS. Het gehalte aan verzadigde vetzuren werd hoofdzakelijk bepaald door de concentratie aan palmitinezuur (16:0) en in mindere mate door de concentratie stearinezuur (18:0). Het gehalte aan mono-onverzadigde vetzuren werd voornamelijk bepaald door de concentratie aan palmitoleïnezuur (16:1(n-7)) en in mindere mate door die aan oleïnezuur (18:1(n-9)) en vacceenzuur (18:1(n-7)).

**Tabel 14. Lange keten vetzuursamenstelling (mg/g DS) van de bio-vlokken die gevoed werden met acetaat, zetmeel, betaïne en MBA, zoals bepaald aan de hand van FAME-analyse. Waarden in dezelfde rij die gevolgd worden door een verschillende letter zijn significant verschillend ( $p < 0,05$ ).**

vetzuur	acetaat	zetmeel	betaïne	MBA
14:0	0,3 ± 0,1 a	0,7 ± 0,1	0,12 ± 0,05 a	1,0 ± 0,3
14:1(n-5)	0,5 ± 0,1 a	1,1 ± 0,1 a	0,4 ± 0,2 a	3,0 ± 0,9
15:0	0,41 ± 0,07 a	0,4 ± 0,2 a	0,10 ± 0,02	0,39 ± 0,07 a
15:1(n-5)	0,09 ± 0,03 a	0,2 ± 0,1 a	0,07 ± 0,02 a	1,3 ± 0,2
16:0	5,5 ± 0,6 a	6,9 ± 0,7 ab	4,6 ± 1,5 a	7,7 ± 2,0 b
16:1(n-7)	10 ± 2 a	8 ± 2 a	1,2 ± 0,3	10 ± 2 a
17:0	0,12 ± 0,03 a	0,18 ± 0,09 a	0,08 ± 0,03 a	0,6 ± 0,2
17:1(n-7)	0,04 ± 0,02 a	0,2 ± 0,1 b	0,06 ± 0,02 ab	0,5 ± 0,1
18:0	0,5 ± 0,1 a	1,0 ± 0,3 ab	2,2 ± 0,9 b	4 ± 1
18:1(n-9)	0,34 ± 0,08 a	1,0 ± 0,1 ab	2,3 ± 0,8 b	5 ± 2
18:1(n-7)	1,5 ± 0,2 a	2,5 ± 0,4 a	4 ± 1	6,6 ± 0,8
18:2(n-6) (LA)	0,05 ± 0,02 a	2,2 ± 0,3 a	17 ± 5	1,8 ± 0,1 a
19:0	0,01 ± 0,01	0,22 ± 0,05 a	0,11 ± 0,06 b	0,18 ± 0,04 ab
18:3(n-6)	0,03 ± 0,02 a	0,4 ± 0,1	0,06 ± 0,02 a	0,06 ± 0,02 a
19:1(n-9)	0,02 ± 0,01 a	0,04 ± 0,01 a	0,02 ± 0,01 a	0,4 ± 0,2
18:3(n-3) (ALA)	0,02 ± 0,01 a	0,16 ± 0,03 b	0,03 ± 0,01 a	0,16 ± 0,05 b
18:4(n-3)	0,02 ± 0,04 a	0,09 ± 0,05 a	0,02 ± 0,01 a	0,10 ± 0,04 a
20:0	0,09 ± 0,08 a	0,10 ± 0,07 a	0,02 ± 0,03 a	0,05 ± 0,06 a
20:1(n-9)	0,01 ± 0,01 a	0,08 ± 0,07 a	0,02 ± 0,02 a	0,18 ± 0,06
20:1(n-7)	0,1 ± 0,1 a	0,1 ± 0,1 a	-	0,08 ± 0,05 a
21:0	0,02 ± 0,01	0,07 ± 0,01 a	0,05 ± 0,02 a	0,18 ± 0,01
20:3(n-6)	0,02 ± 0,01 a	0,07 ± 0,04 a	0,02 ± 0,01 a	0,4 ± 0,1
20:4(n-6)	0,03 ± 0,01 a	0,6 ± 0,1 b	0,05 ± 0,03 a	0,6 ± 0,1 b
20:3(n-3)	0,01 ± 0,01 a	0,10 ± 0,07 ab	0,05 ± 0,03 a	0,20 ± 0,09 b
20:4(n-3)	0,01 ± 0,03 a	0,08 ± 0,01 ab	0,08 ± 0,02 ab	0,1 ± 0,1 b
22:0	0,07 ± 0,07 a	0,09 ± 0,08 a	0,21 ± 0,08 a	0,19 ± 0,05 a
20:5(n-3) (EPA)	0,14 ± 0,04 ab	0,19 ± 0,04 a	0,05 ± 0,02 b	0,14 ± 0,07 ab
22:1(n-9)	0,03 ± 0,03 a	0,04 ± 0,07 a	-	-
22:1(n-7)	0,01 ± 0,01 a	0,01 ± 0,02 a	-	0,02 ± 0,01 a
23:0	0,01 ± 0,01 a	0,01 ± 0,01 a	0,08 ± 0,01 ab	0,2 ± 0,2 b
21:5(n-3)	-	-	0,03 ± 0,01	0,06 ± 0,02
23:1(n-9)	0,01 ± 0,01	-	0,04 ± 0,01 a	0,04 ± 0,03 a
22:4(n-6)	0,01 ± 0,03 a	0,02 ± 0,01 a	0,03 ± 0,01 a	0,17 ± 0,01
22:3(n-3)	-	-	-	-
22:5(n-6)	-	0,06 ± 0,03 a	0,03 ± 0,04 a	0,4 ± 0,2
22:4(n-3)	-	-	-	-
24:0	0,02 ± 0,02 a	0,02 ± 0,03 a	0,01 ± 0,01 a	0,05 ± 0,09 a
22:5(n-3)	0,02 ± 0,01 a	0,06 ± 0,02 a	0,27 ± 0,09 b	0,20 ± 0,08 b
24:1(n-9)	0,04 ± 0,06 a	0,05 ± 0,07 a	0,01 ± 0,01 a	0,05 ± 0,01 a
22:6(n-3) (DHA)	0,13 ± 0,08 a	0,10 ± 0,06 a	0,03 ± 0,03 a	0,10 ± 0,07 a
totaal n-6	0,16 ± 0,05 a	3,3 ± 0,5 a	17 ± 5	3,7 ± 0,2 a
totaal n-3	0,3 ± 0,1 a	0,54 ± 0,04 ab	0,5 ± 0,2 ab	0,8 ± 0,3 b
n-6/n-3	0,6 ± 0,3	6 ± 1 a	34 ± 2	5 ± 2 a

Het gehalte aan n-6 vetzuren werd voornamelijk bepaald door de concentratie aan linolzuur (18:2(n-6), LA). De totale n-3 inhoud was bij alle types bio-vlokken veel lager dan de n-6 inhoud en varieerde van 0,3 tot 0,8 mg/g DS. Dit houdt dus in dat de concentraties aan linoleenzuur (18:3(n-3), ALA), eicosapentaenzuur (20:5(n-3), EPA) en docosahexaeenzuur (22:6(n-3), DHA) zeer laag waren in alle vier de types bio-vlokken. De verhouding n-6/n-3 was zeer laag in de acetaat-bio-vlokken (0,6 mg/g DS), bedroeg zo'n 5-6 mg/g DS in de zetmeel- en MBA-bio-vlokken en 17 mg/g DS in de betaïne-bio-vlokken.

### 1.2.2 Vitamines

Enkel bij de acetaat-bio-vlokken werd een betrouwbaar resultaat voor de vitamine C-bepaling bekomen, namelijk  $490 \pm 149$   $\mu\text{g/g}$  DS. Bij de andere types bio-vlokken, was de piek van de interne standaard veel te klein, wat waarschijnlijk veroorzaakt werd door een matrixeffect.

### 1.2.3 PHB

De gehalten aan PHB die teruggevonden werden in de acetaat-bio-vlokken en in de MBA-bio-vlokken zijn vergelijkbaar, namelijk respectievelijk  $6,9 \pm 1,5\%$  DS en  $6,2 \pm 1,4\%$  DS. De PHB-concentratie in de bio-vlokken die gevoed werden met zetmeel bedroeg  $0,5 \pm 0,5\%$  DS en in de betaïne-bio-vlokken  $0,2 \pm 0,2\%$  DS.

## 2 Luminescentie- en groeitesten

Om het effect van de bio-vlokken te onderzoeken en om na te gaan welke component van de bio-vlokken het effect veroorzaakt, werden de bio-vlokken, de geautoclaveerde bio-vlokken, het gefiltersteriliseerd supernatans en het geautoclaveerd gefiltersteriliseerd supernatans als behandeling toegepast.

De invloed van de aanwezigheid van bio-vlokken op de luminescentie en groei van *Vibrio harveyi* BB120 en *Vibrio campbellii* LMG21363 werd onderzocht aan de hand van twee verschillende experimentele set-ups.

### 2.1 Testen met de meting na 24u

In de eerste set-up werd in een volume van 10 mL gewerkt, waaruit na een incubatie van 24u stalen werden genomen om de luminescentie en groei te bepalen.

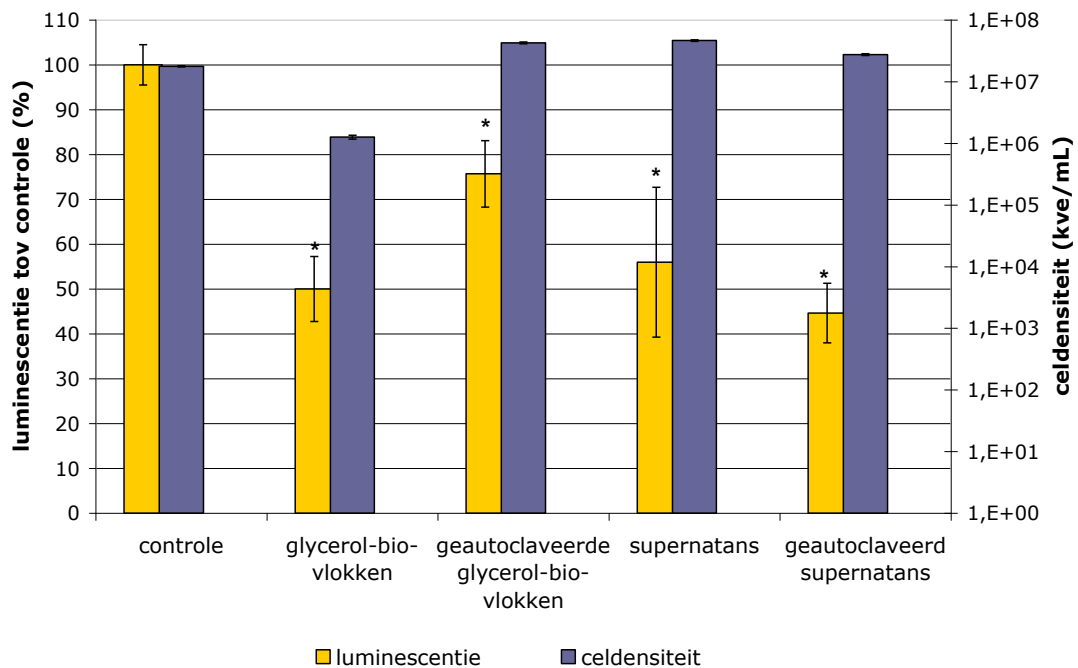
Deze testen werden enkel met de glycerol-bio-vlokken en afgeleiden uitgevoerd.

Voor *Vibrio harveyi* BB120 werden deze testen in mariene broth (MB) en fysiologische oplossing (FO) uitgevoerd om respectievelijk het intestinaal kanaal van mariene organismen en het waterig milieu waarin ze zich bevinden te simuleren.

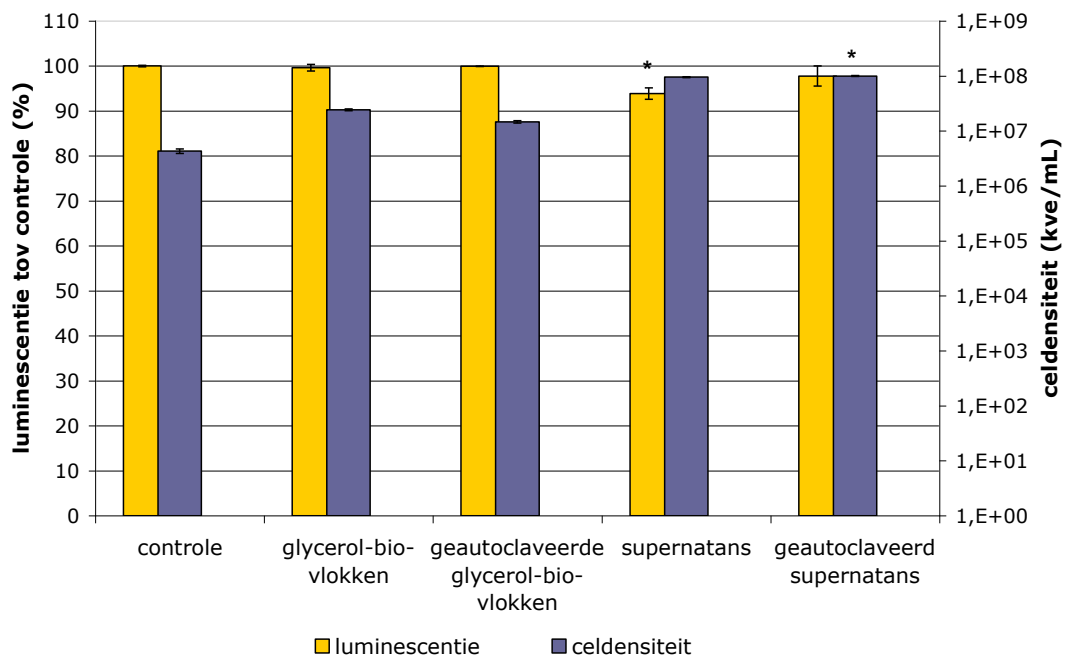
In de test met FO werd na 24u aan de hand van uitplatingen op TCBS geen *Vibrio* meer teruggevonden.

De resultaten van de luminescentiemetingen en uitplatingen op TCBS van de test met *Vibrio harveyi* in MB worden in Figuur 9 weergegeven.

Aangezien er in de test met *Vibrio harveyi* in fysiologische oplossing na 24u geen *Vibrio* meer werd teruggevonden, werd de test voor *Vibrio campbellii* enkel in MB uitgevoerd. De resultaten van de luminescentiemetingen en uitplatingen op TCBS van de test met *Vibrio campbellii* in MB worden in Figuur 10 weergegeven.



Figuur 9. Luminescentie en celdensiteit van de test met *Vibrio harveyi* in MB na 24u. Weergegeven waarden zijn gemiddelden en de foutenvlaggen geven de standaardafwijking weer, n=3. De waarden met een \* zijn significant verschillend van de respectievelijke controle (p<0,05).



Figuur 10. Luminescentie en celdensiteit van de test met *Vibrio campbellii* in MB na 24u. Weergegeven waarden zijn gemiddelden en de foutenvlaggen geven de standaardafwijking weer, n=3. De waarden met een \* zijn significant verschillend van de respectievelijke controle (p<0,05).

## 2.2 Testen met de meting gedurende 24u

In de tweede experimentele set-up werd gedurende minstens 24u de luminescentie en optische dichtheid opgevolgd van 200  $\mu$ L suspensie in een well. In deze suspensie was 10  $\mu$ L van een cultuur van *Vibrio harveyi* BB120 of *Vibrio campbellii* LMG21363 en 20  $\mu$ L bio-vlokken, geautoclaveerde bio-vlokken, supernatans of geautoclaveerd supernatans aanwezig.

Na het samenbrengen van alle componenten in de 96 well-plaat volgde een acclimatisatie van 1u bij 37°C in de Infinite M200 microplaatlezer waarna met de metingen gestart werd.

De metingen bij de glycerol- en MBA-bio-vlokken geïnoculeerd met *Vibrio harveyi* werden na 11u30 gedurende 1u onderbroken. De 96 well-plaat werd tijdens deze onderbreking in een incubator bij 37°C geplaatst. Na deze onderbreking werd opnieuw gedurende 1u geacclimatiseerd in het meettoestel waarna de metingen werden hervat.

De metingen met de glycerol- en MBA-bio-vlokken geïnoculeerd met *Vibrio campbellii* werden na 6u55 gedurende 30min onderbroken. De werkwijze tijdens en na deze onderbreking was dezelfde als die bij de glycerol- en MBA-bio-vlokken geïnoculeerd met *Vibrio harveyi*.

Van elke behandeling werden tijdens dezelfde test telkens 3 herhalingen uitgevoerd.

## 2.3 Testen in fysiologische oplossing

Bij alle drie de types bio-vlokken en in aanwezigheid van zowel *Vibrio harveyi* als *Vibrio campbellii* wezen de metingen uit dat na 1u de luminescentie bij de verschillende behandelingen en in de controle waarin enkel FO aanwezig was, gelijk was en gedurende de 24u constant bleef op iets meer dan  $10^2$  RLU.

Bij de glycerol- en betaïne-bio-vlokken was de OD<sub>610</sub>-waarde bij de eerste meting 0,00-0,05 in de welletjes waarin supernatans en geautoclaveerd supernatans aanwezig was en dit zowel bij de behandelingen die geïnoculeerd werden met *Vibrio harveyi* als met *Vibrio campbellii*. In de welletjes met betaïne-bio-vlokken was de initiële OD<sub>610</sub> eveneens 0,00 in aanwezigheid van beide pathogenen. In de aanwezigheid van glycerol-bio-vlokken daarentegen bedroeg de initiële OD<sub>610</sub> 0,45 en 0,15 bij de respectievelijke inoculatie met *Vibrio harveyi* en *Vibrio campbellii*. Bij de behandelingen met geautoclaveerde glycerol- of betaïne-bio-vlokken bedroeg de OD<sub>610</sub> bij de eerste meting 0,25-0,45.

Gedurende de 24u bleef deze OD<sub>610</sub>-waarde nagenoeg constant bij de behandelingen met glycerol- en betaïne-bio-vlokken en afgeleiden behalve in het geval van de levende bio-vlokken waar een stijging met 0,07 opgemerkt kon worden.

Bij de MBA-bio-vlokken waren de initiële OD<sub>610</sub>-waarden van de verschillende behandelingen eveneens nagenoeg gelijk wanneer geïnoculeerd werd met *Vibrio harveyi*, namelijk 0,02 voor de geautoclaveerde bio-vlokken en 0,00-0,01 voor de andere behandelingen en de controle. In aanwezigheid van *Vibrio campbellii* bedroeg de initiële OD<sub>610</sub> 0,04-0,05 voor de MBA-bio-vlokken en alle afgeleiden ervan.

In aanwezigheid van *Vibrio harveyi* bleven alle OD<sub>610</sub>-waarden constant behalve die van de levende bio-vlokken die na 5u begon toe te nemen en bij de laatste meting (na 25u30) 0,10

bedroeg (Figuur 11). In Figuur 12 kan opgemerkt worden dat in aanwezigheid van *Vibrio campbellii* de OD<sub>610</sub> initieel in alle behandelingen even veel toeneemt. Na 8u30 neemt de OD<sub>610</sub> in de behandelingen met supernatans en geautoclaveerd supernatans weer af. Na 17u30 begint de OD<sub>610</sub> ook in de controle waarin enkel *Vibrio campbellii* aanwezig is en in de behandeling met geautoclaveerde bio-blokken af te nemen. In de behandeling met de MBA-bio-vlokken blijft de OD<sub>610</sub>-waarde echter tot het einde van de metingen toenemen tot ongeveer 0,11.

## 2.4 Testen in mariene broth

### 2.4.1 *Vibrio harveyi*

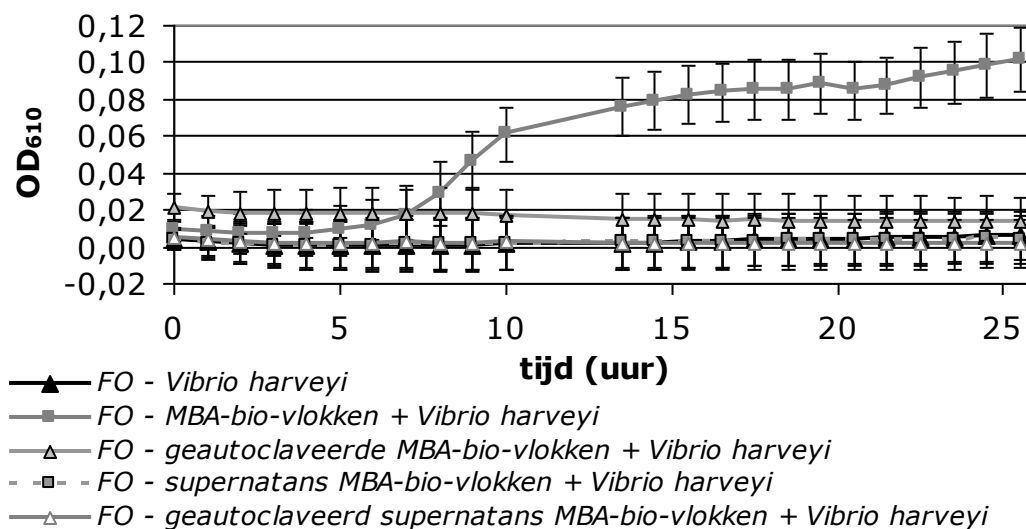
In de testen in mariene broth bedroeg de luminescentie bij de eerste meting  $10^4$ - $10^5$  RLU in alle behandelingen waarin met *Vibrio harveyi* geïnoculeerd werd bij alle drie de types bio-vlokken en afgeleiden. Gedurende de 24u daalde de luminescentie in al deze welletjes. Bij de testen met de betaïne- en MBA-bio-vlokken was de luminescentie op het eind van de metingen ongeveer gelijk aan die in de controle waarin enkel MB aanwezig was. In de test met de glycerol-bio-vlokken was de luminescentie op het eind van de metingen in de behandelingen met bio-vlokken en geautoclaveerde bio-vlokken niet tot op het niveau van de controle gezakt. Ter illustratie worden het verloop van de luminescentie van de glycerol- en MBA-bio-vlokken weergegeven in respectievelijk Figuur 13 en Figuur 14.

De initiële OD<sub>610</sub>-waarden zijn verschillend voor de verschillende behandelingen met de glycerol-bio-vlokken en afgeleiden in aanwezigheid van *Vibrio harveyi* en nemen tijdens de test allemaal geleidelijk aan toe met 0,05 tot 0,10 (Figuur 15).

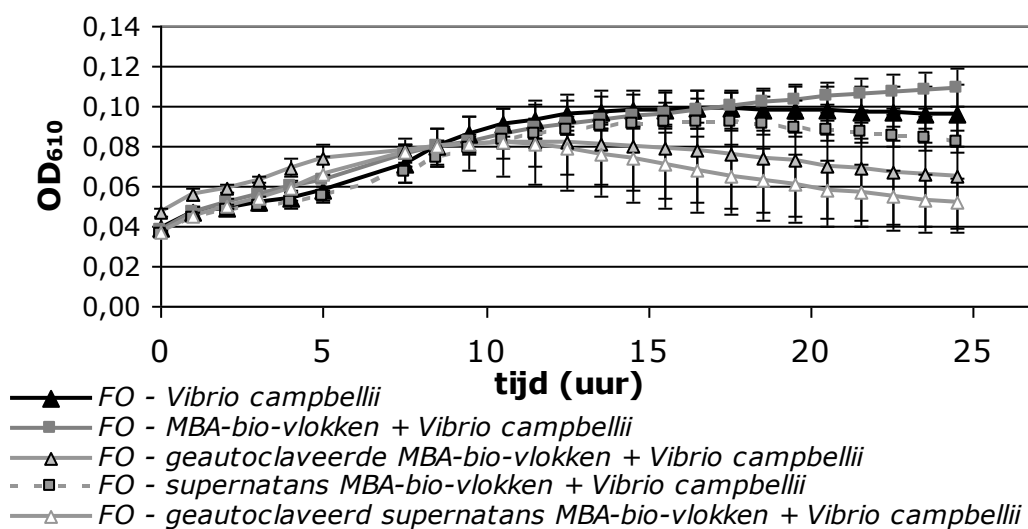
Bij de betaïne-bio-vlokken bedraagt de OD<sub>610</sub> bij de eerste meting in alle behandelingen 0,03-0,04. Gedurende 24u nemen alle waarden op dezelfde wijze toe tot 0,10-0,11.

In de testen met de MBA-bio-vlokken neemt de OD<sub>610</sub> van alle behandelingen ook met een gelijkaardige snelheid toe, totdat na 15u30 de waarde voor de behandeling met MBA-bio-vlokken in aanwezigheid van *Vibrio harveyi* sterker begint toe te nemen tot een eindwaarde van bijna 0,12 (na 25u30) (Figuur 16).

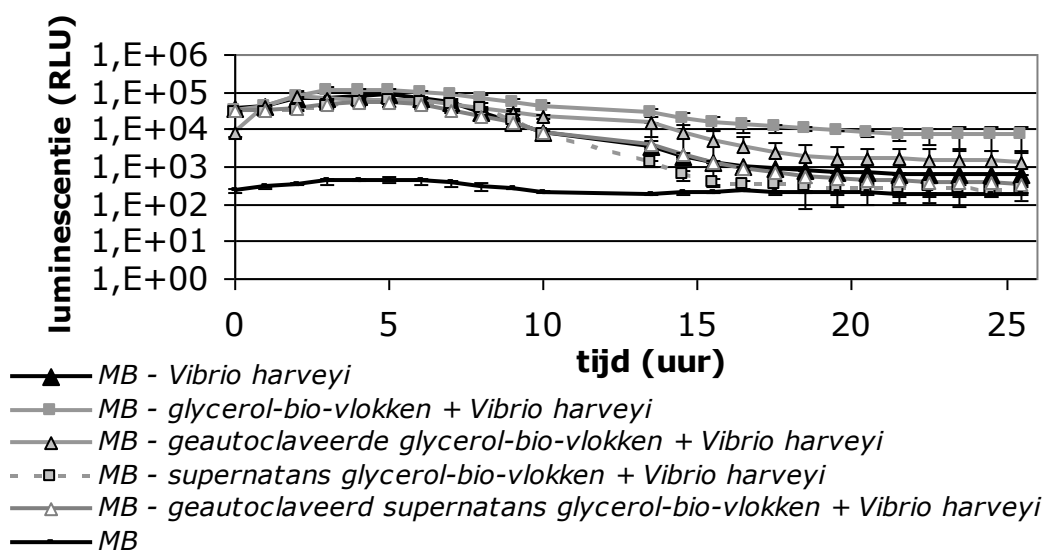




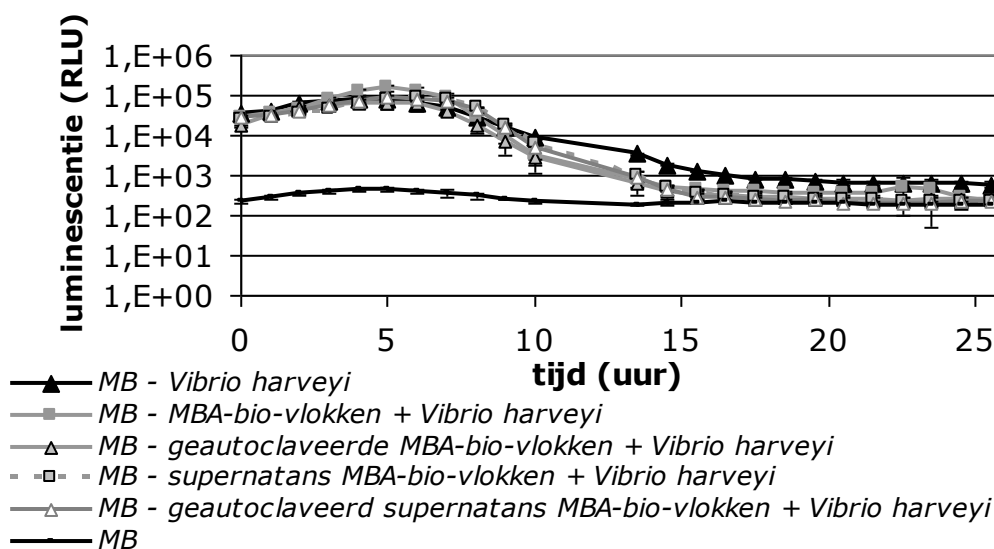
Figuur 11. Verloop van OD<sub>610</sub> in fysiologische oplossing bij toediening van MBA-bio-vlokken, geautoclaveerde bio-vlokken, supernatans of geautoclaveerd supernatans en geïnoculeerd met *Vibrio harveyi* BB120. De incubatie gebeurde bij 37°C.



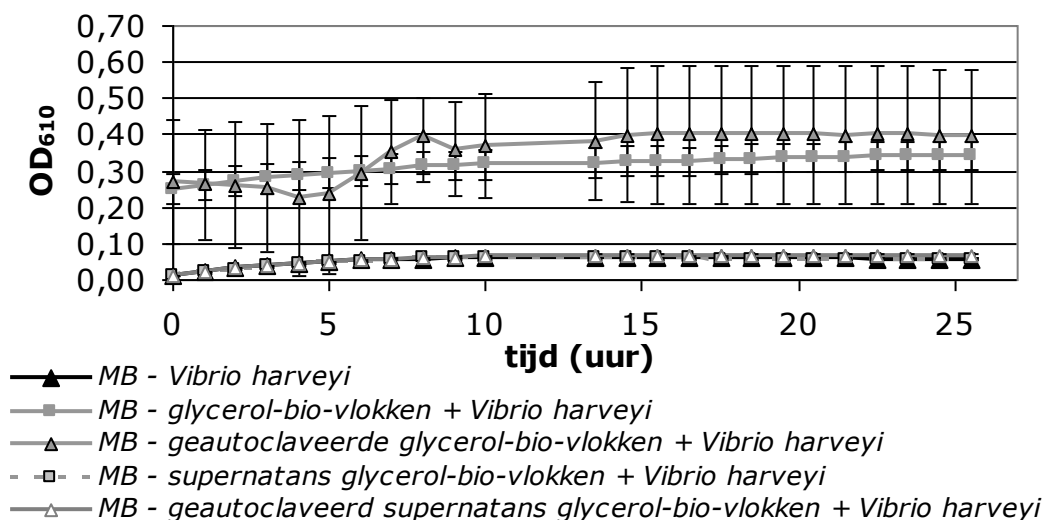
Figuur 12. Verloop van OD<sub>610</sub> in fysiologische oplossing bij toediening van MBA-bio-vlokken, geautoclaveerde bio-vlokken, supernatans of geautoclaveerd supernatans en geïnoculeerd met *Vibrio campbellii* LMG21363. De incubatie gebeurde bij 37°C.



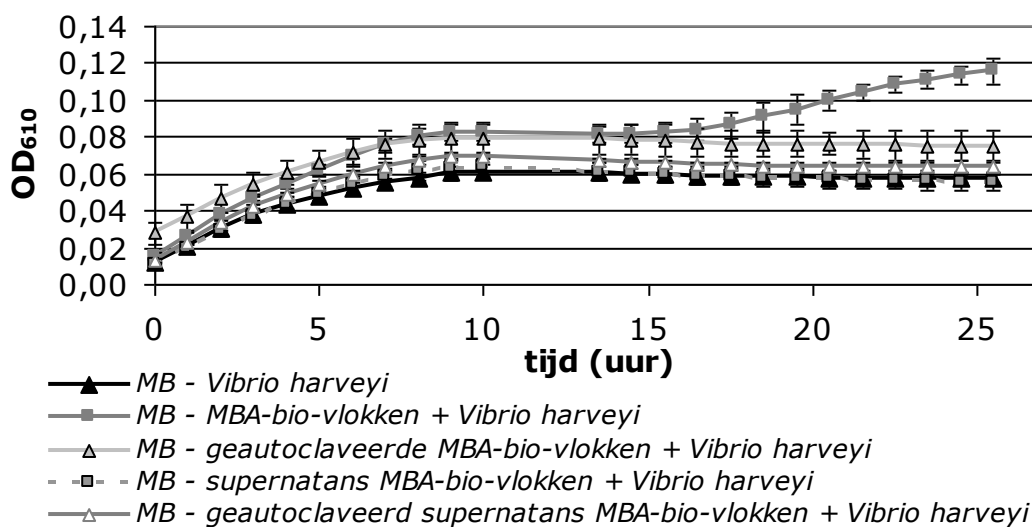
Figuur 13. Verloop van luminescentie in mariene broth bij toediening van glycerol-bio-vlokken, geautoclaveerde bio-vlokken, supernatans of geautoclaveerd supernatans en geïnoculeerd met *Vibrio harveyi* BB120. De incubatie gebeurde bij 37°C.



Figuur 14. Verloop van luminescentie in mariene broth bij toediening van MBA-bio-vlokken, geautoclaveerde bio-vlokken, supernatans of geautoclaveerd supernatans en geïnoculeerd met *Vibrio harveyi* BB120. De incubatie gebeurde bij 37°C.



Figuur 15. Verloop van OD<sub>610</sub> in mariene broth bij toediening van glycerol-bio-vlokken, geautoclaveerde bio-vlokken, supernatans of geautoclaveerd supernatans en geïnoculeerd met *Vibrio harveyi* BB120. De incubatie gebeurde bij 37°C.



Figuur 16. Verloop van OD<sub>610</sub> in mariene broth bij toediening van MBA-bio-vlokken, geautoclaveerde bio-vlokken, supernatans of geautoclaveerd supernatans en geïnoculeerd met *Vibrio harveyi* BB120. De incubatie gebeurde bij 37°C.

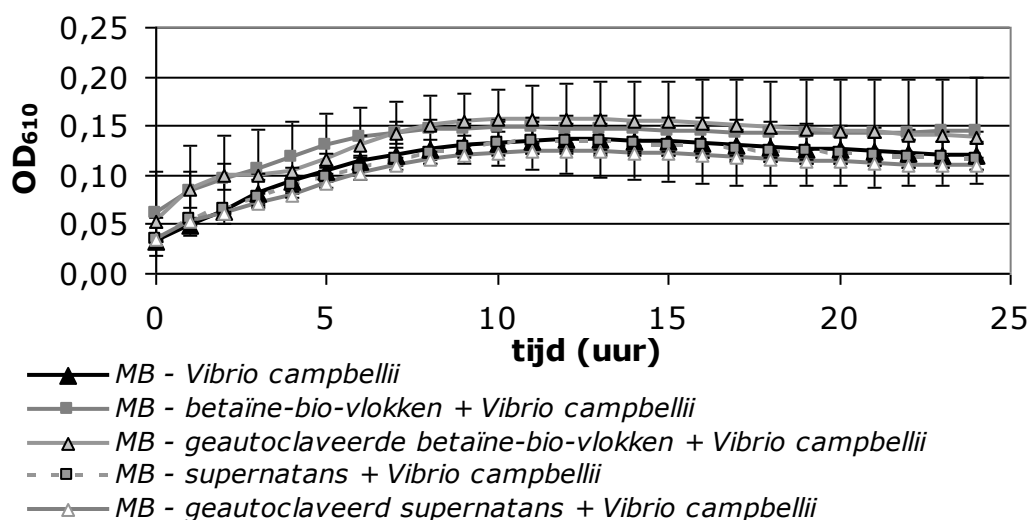
### 2.4.2 *Vibrio campbellii*

In de behandelingen die geïnoculeerd werden met *Vibrio campbellii* LMG21363 daalde de luminescentie in alle behandelingen bij alle drie de types bio-vlokken binnen 5-10u tot de waarde in de controle waarin enkel MB aanwezig was, namelijk iets meer dan  $10^2$  RLU.

Bij alle drie de beschouwde types bio-vlokken nam de  $OD_{610}$  initieel toe totdat de maximale waarde werd bereikt waarna opnieuw een lichte daling in de  $OD_{610}$ -waarde kon waargenomen worden. Bij de glycerol-bio-vlokken werd in de eerste 5u een stijging van 0,05 waargenomen in alle behandelingen en in de controle waarin enkel de pathogeen aanwezig was. Na 5u bedroeg de  $OD_{610}$  0,10 in de behandelingen met supernatans en geautoclaveerde supernatans en de controle waarin enkel de pathogeen aanwezig was; 0,15 in de behandeling met bio-vlokken en 0,32 in de behandeling met de geautoclaveerde bio-vlokken.

Bij de betaïne-bio-vlokken steeg de  $OD_{610}$  tijdens de eerste 9u met 0,10 van 0,03-0,6 tot 0,12-0,16 in zowel de controle waarin enkel *Vibrio campbellii* aanwezig was als bij de behandelingen. In de controle waarin enkel *Vibrio campbellii* aanwezig was en in de behandeling met de MBA-bio-vlokken en afgeleiden nam de  $OD_{610}$  in de eerste 7u met 0,08 toe tot ongeveer 0,12.

De evolutie van de  $OD_{610}$  bij de behandelingen met de betaïne-bio-vlokken en afgeleiden wordt ter illustratie weergegeven in Figuur 17.



**Figuur 17.** Verloop van  $OD_{610}$  in mariene broth bij toediening van betaïne-bio-vlokken, geautoclaveerde bio-vlokken, supernatans of geautoclaveerd supernatans en geïnoculeerd met *Vibrio campbellii* LMG21363. De incubatie gebeurde bij 37°C.

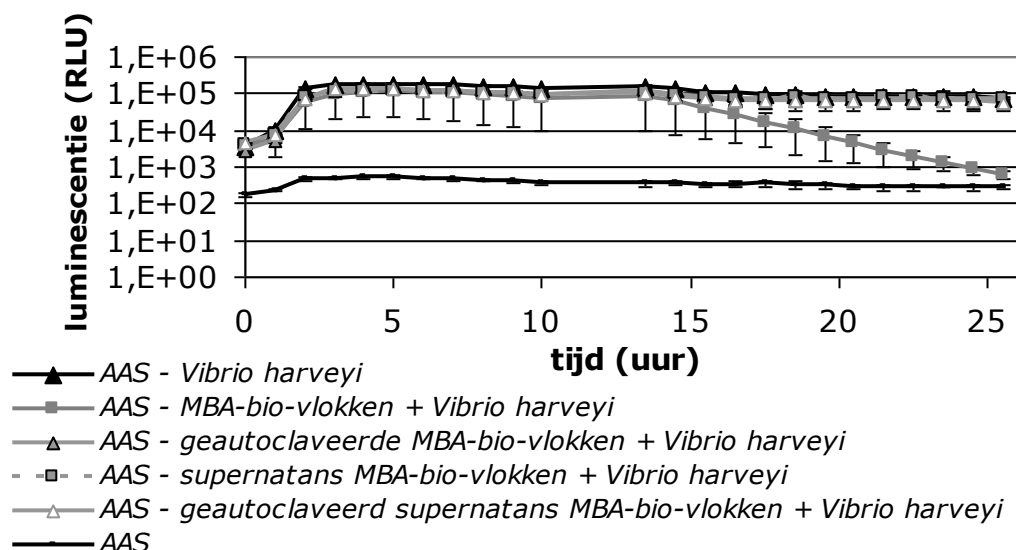
## 2.5 Artificieel zeewater

### 2.5.1 *Vibrio harveyi*

De initiële luminescentie bedroeg in de testen in artificieel zeewater met glycerol-bio-vlokken en MBA-bio-vlokken in aanwezigheid van *Vibrio harveyi*  $10^3$ - $4 \cdot 10^3$  RLU. In de test met de betaïne-bio-vlokken en *Vibrio harveyi* BB120 bedroeg de luminescentie op de eerste meting 1 logeenheid meer dan in de andere types bio-vlokken, namelijk  $10^4$ - $4 \cdot 10^4$  RLU.

Bij alle drie de types bio-vlokken is er in de eerste 3u een toename van de luminescentie tot  $10^5$  RLU in alle behandelingen die geïnoculeerd werden met *Vibrio harveyi*. Hierna blijft de luminescentie gedurende de rest van de metingen zo goed als constant, met uitzondering van een lichte daling bij de levende glycerol-bio-vlokken (na 17u) en een sterke daling bij de MBA-bio-vlokken (na 13u).

De evolutie van de luminescentie bij de behandelingen met de MBA-bio-vlokken en afgeleiden wordt weergegeven in Figuur 18.



Figuur 18. Verloop van luminescentie in artificieel zeewater bij toediening van MBA-bio-vlokken, geautoclaveerde bio-vlokken, supernatans of geautoclaveerd supernatans en geïnoculeerd met *Vibrio harveyi* BB120. De incubatie gebeurde bij 37°C.

Bij alle drie de types bio-vlokken blijft de  $OD_{610}$  gedurende de volledige test toenemen.

In de test met de glycerol-bio-vlokken neemt de  $OD_{610}$  van de behandeling met de geautoclaveerde bio-vlokken het minst toe, namelijk met 0,18 tot 0,48 bij de laatste meting. De  $OD_{610}$ -waarden in de behandelingen met supernatans en geautoclaveerd supernatans en de controle waarin enkel *Vibrio harveyi* aanwezig is nemen toe van 0,00 tot 0,20. De sterkste stijging kon waargenomen worden bij de behandeling met de levende glycerol-bio-vlokken, namelijk met 0,28 tot 0,78 bij de laatste meting.

In de test met de betaïne-bio-vlokken bedroeg de  $OD_{610}$  bij de eerste meting 0,05 voor de behandelingen met bio-vlokken, supernatans en geautoclaveerd supernatans en in de controle waarin enkel *Vibrio harveyi* aanwezig is. De  $OD_{610}$ -waarde van deze behandelingen nam

gedurende de test gelijkmatig toe tot 0,25-0,32 gedurende de test, behalve in het geval van de behandeling met bio-vlokken waar de OD<sub>610</sub> na 16u sterker begon te stijgen tot 0,35 bij de laatste meting. De initiële OD<sub>610</sub> bij de behandeling met de geautoclaveerde bio-vlokken was significant hoger dan in de andere behandelingen en bedroeg 0,30. Tijdens de test nam deze OD<sub>610</sub>-waarde met behoorlijk constante snelheid toe tot 0,40.

In de behandeling met MBA-bio-vlokken in aanwezigheid van *Vibrio harveyi* stijgt de OD<sub>610</sub> voor alle behandelingen behoorlijk gelijkmatig uit het gemeenschappelijke vertrekpunt (0,00-0,05). Na 13u30 begint de behandeling met levende MBA-bio-vlokken echter sterker toe te nemen dan de andere. Op het einde van de metingen is de OD<sub>610</sub> van de behandeling met de bio-vlokken met 0,42 toegenomen terwijl de OD<sub>610</sub> in de andere behandelingen bij de laatste meting 0,25-0,30 bedraagt.

### 2.5.2 *Vibrio campbellii*

In de testen met *Vibrio campbellii* LMG21363 in AAS is er net zoals bij die met *Vibrio harveyi* in AAS in het begin van de test een sterke toename van de luminescentie tot 10<sup>5</sup> RLU waarna de luminescentie terug afneemt.

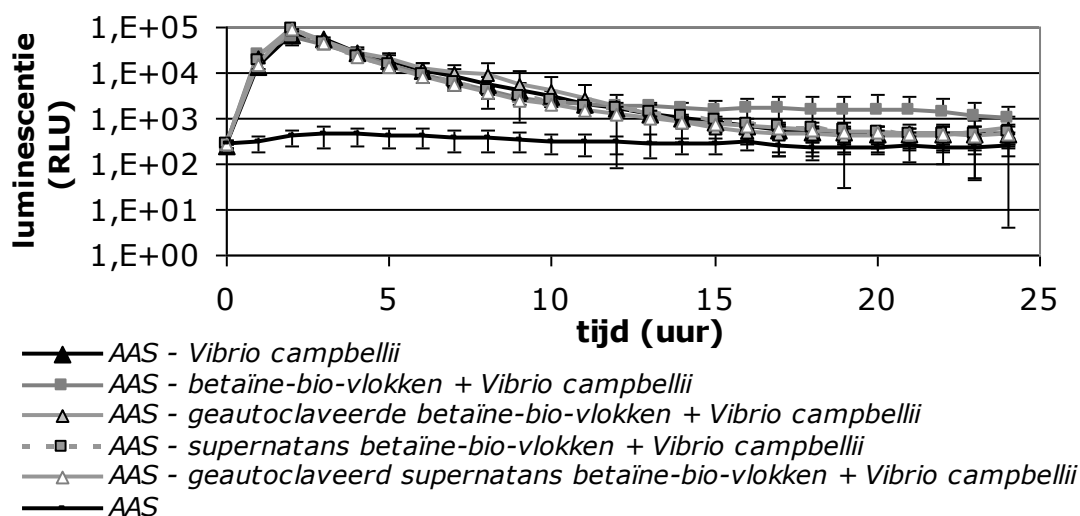
Bij de glycerol-bio-vlokken valt de luminescentie in de behandeling met de geautoclaveerde bio-vlokken terug tot het niveau van de controle waarin enkel *Vibrio campbellii* aanwezig is, namelijk 2.10<sup>2</sup> RLU. De andere waarden bevinden zich tot 1 logeenheid hoger.

In de test met de betaïne-bio-vlokken vallen op het einde de controle en de behandelingen met geautoclaveerde bio-vlokken, supernatans en geautoclaveerd supernatans nagenoeg samen met de twee controles waarin respectievelijk ofwel enkel AAS of enkel *Vibrio-campbellii* in AAS voorkomen. De luminescentie in de behandeling met de levende betaïne-bio-vlokken is tot 1 logeenheid hoger alhoewel het verschil met de andere behandelingen hier niet significant is wegens de grote standaardafwijking. Het verloop van de luminescentie in deze test met betaïne-bio-vlokken in aanwezigheid van *Vibrio campbellii* wordt weergegeven in Figuur 19.

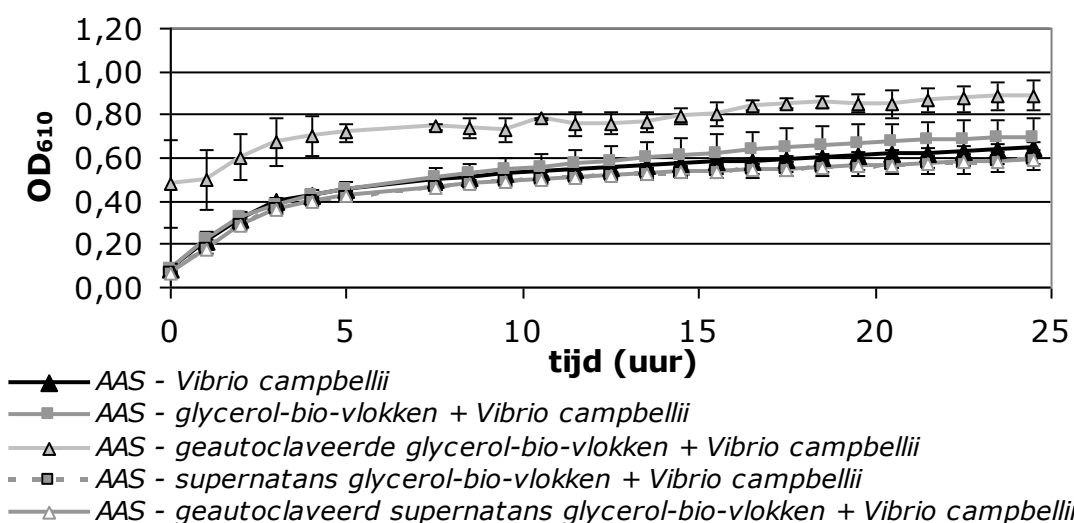
Ook bij de MBA-bio-vlokken bedraagt het verschil tussen de behandelingen waarin eenzelfde luminescentie wordt waargenomen als in de controle waarin enkel AAS aanwezig is (namelijk in die met bio-vlokken en geautoclaveerde bio-vlokken) met de overige behandelingen eveneens ongeveer tot 1 logeenheid.

In de testen met alle drie de types bio-vlokken in aanwezigheid van *Vibrio campbellii* LMG21363 nam de OD<sub>610</sub> in het begin sterk toe om daarna wat langzamer te blijven stijgen. De OD<sub>610</sub>-waarde nam telkens toe van iets minder dan 0,10 aan de start tot 0,60 op het einde van de metingen, behalve voor de behandelingen met geautoclaveerde bio-vlokken bij de glycerol- en betaïne-bio-vlokken waarin de OD<sub>610</sub> opliep tot respectievelijk 0,89 en 0,75 (vanuit een startwaarde van respectievelijk 0,48 en 0,33).

Ter illustratie wordt het verloop van de OD<sub>610</sub> in de behandeling met glycerol-bio-vlokken in de aanwezigheid van *Vibrio campbellii* weergegeven in Figuur 20.



Figuur 19. Verloop van luminescentie in artificeel zeewater bij toediening van betaïne-bio-vlokken, geautoclaveerde bio-vlokken, supernatans of geautoclaveerd supernatans en geïnoculeerd met *Vibrio campbellii* LMG21363. De incubatie gebeurde bij 37°C.



Figuur 20. Verloop van OD<sub>610</sub> in artificeel zeewater bij toediening van glycerol-bio-vlokken, geautoclaveerde bio-vlokken, supernatans of geautoclaveerd supernatans en geïnoculeerd met *Vibrio campbellii* LMG21363. De incubatie gebeurde bij 37°C.

### 3 Testen met *Artemia franciscana*

Bij de testen met *Artemia* nauplii werden twee verschillende referenties gebruikt. Enerzijds werden testtubes gebruikt waarin enkel gefilterd artificieel zeewater aanwezig was ('geen voeding'). In deze testtubes moeten de *Artemia* overleven aan de hand van de voedingsstoffen in hun dooierzak, want er is geen ander voedsel voorradig.

Anderzijds waren er testtubes waarin  $10^7$  kve/mL LVS3 in artificieel zeewater aanwezig was ('LVS3'). In deze testtubes kunnen de *Artemia* naast de voedingsstoffen uit hun dooierzak ook geautoclaveerde bacteriën als voedsel gebruiken. Deze concentratie aan LVS3 werd in het verleden onder andere door Defoirdt et al. (2008) reeds gebruikt in challenge testen van 48u.

#### 3.1 Testen met de koolstofbronnen.

De invloed van de koolstofbronnen van de bio-vlokken (glycerol, betaine en MBA) op de overleving van *Artemia* werd nagegaan. Deze testen werden uitgevoerd om te kunnen inschatten of een eventueel waargenomen invloed van de bio-vlokken op de overleving van *Artemia* te wijten is aan de bio-vlokken of aan de aanwezigheid van niet gemetaboliseerde koolstofbron in de bio-vlokken. Alle koolstofbronnen werden getest aan de maximale concentratie die voorkomt in de reactoren, namelijk de concentratie net na het toedienen van de koolstofbron. De resultaten van de experimenten met de koolstofbronnen worden weergegeven in Tabel 15 en



Tabel 16.

Tabel 15. Overleving van *Artemia* (%) na 48u in artificieel zeewater waaraan niets,  $10^7$  kve/ml LVS3 of één van de koolstofbronnen van de verschillende types bio-vlokken werd toegevoegd en die al dan niet blootgesteld werden aan *Vibrio harveyi* of *Vibrio campbellii*. De concentraties van de koolstofbronnen tijdens de test waren dezelfde als die in de reactoren van de respectievelijke bio-vlokken net na het voeren. Weergegeven waarden zijn gemiddelden  $\pm$  standaardafwijking, n=3. Waarden in dezelfde kolom die gevolgd worden door een verschillende letter zijn significant verschillend ( $p < 0,05$ ).

behandeling	experiment 1	experiment 2
geen voeding		72 $\pm$ 3 ab
geen voeding + <i>Vibrio harveyi</i>		30 $\pm$ 5 ac
LVS3	67 $\pm$ 6 ab	73 $\pm$ 20 ab
LVS3 + <i>Vibrio harveyi</i>	37 $\pm$ 10 abc	23 $\pm$ 8 ac
LVS3 + <i>Vibrio campbellii</i>	23 $\pm$ 23 ac	
glycerol (0,620 mL/L)		12 $\pm$ 13 c
glycerol (0,620 mL/L) + <i>Vibrio harveyi</i>		0 $\pm$ 0 c
betaïne (0,625 g/L)	70 $\pm$ 15 b	
betaïne (0,625 g/L) + <i>Vibrio harveyi</i>	28 $\pm$ 20 abc	
betaïne (0,625 g/L) + <i>Vibrio campbellii</i>	17 $\pm$ 8 c	
MBA (0,625 g CZV/L)		33 $\pm$ 45 ac
MBA (0,625 g CZV/L) + <i>Vibrio harveyi</i>		7 $\pm$ 8 c
gist (0,625 g CZV/L)		97 $\pm$ 6 b
gist (0,625 g CZV/L) + <i>Vibrio harveyi</i>		70 $\pm$ 5 ab

Tabel 16. Lengte van *Artemia* (mm) na 48u in artificieel zeewater waaraan niets,  $10^7$  kve/ml LVS3 of één van de koolstofbronnen van de verschillende types bio-vlokken werd toegevoegd en die al dan niet blootgesteld werden aan *Vibrio harveyi* of *Vibrio campbellii*. De concentraties van de koolstofbronnen tijdens de test waren dezelfde als die in de reactoren van de respectievelijke bio-vlokken net na het voeren. De *Artemia* van experiment 2 werden niet gemeten (NG). Weergegeven waarden zijn gemiddelden  $\pm$  standaardafwijking,  $n=10$ . Waarden in dezelfde kolom die gevolgd worden door een verschillende letter zijn significant verschillend ( $p<0,05$ ).

behandeling	experiment 1	experiment 2
geen voeding		NG
geen voeding + <i>Vibrio harveyi</i>		NG
LVS3	$0,90 \pm 0,05^a$	NG
LVS3 + <i>Vibrio harveyi</i>	$0,89 \pm 0,07^a$	NG
LVS3 + <i>Vibrio campbellii</i>	$0,96 \pm 0,04^a$	
glycerol (0,620 mL/L)		NG
glycerol (0,620 mL/L) + <i>Vibrio harveyi</i>		NG
betaïne (0,625 g/L)	$0,92 \pm 0,05^a$	
betaïne (0,625 g/L) + <i>Vibrio harveyi</i>	$0,89 \pm 0,08^a$	
betaïne (0,625 g/L) + <i>Vibrio campbellii</i>	$0,88 \pm 0,05^a$	
MBA (0,625 g CZV/L)		NG
MBA (0,625 g CZV/L) + <i>Vibrio harveyi</i>		NG
gist (0,625 g CZV/L)		NG
gist (0,625 g CZV/L) + <i>Vibrio harveyi</i>		NG

De aanwezigheid van betaïne heeft geen significant effect op de overleving of de groei van de *Artemia* ten opzichte van die in de LVS3-behandeling en dit zowel voor de *Artemia* die blootgesteld werden aan *Vibrio harveyi* of *Vibrio campbellii* als voor die in afwezigheid van een pathogeen (Tabel 15 en Tabel 16).

Bij de aanwezigheid van glycerol daarentegen is er een significant lagere overleving van de *Artemia* dan bij de niet gevoede *Artemia* of bij de *Artemia* in de LVS3-behandeling en dit zowel in aan- als afwezigheid van *Vibrio harveyi* (Tabel 15).

Om het effect van MBA op de overleving van de *Artemia* te kunnen nagaan, werd ook een test met de drager van het boterzuur, namelijk gist, uitgevoerd. Om vergelijking mogelijk te maken werd de gist toegediend in dezelfde concentratie als MBA, die werd toegediend aan de concentratie die maximaal in de reactor voorkomt.

Zowel de gist als MBA zorgde niet voor een significant verschillende overleving van de *Artemia* ten opzichte van de behandeling zonder voeding of de LVS3-behandeling en dit al dan niet blootgesteld aan *Vibrio harveyi* (Tabel 15). De behandeling met gist zorgde echter wel voor een significant betere overleving ten opzichte van de behandeling met MBA en dit zowel in de aan- als afwezigheid van *Vibrio harveyi*.

### 3.2 Voedertesten

Er werden testen uitgevoerd met verschillende concentraties aan glycerol-bio-vlokken om te onderzoeken of bio-vlokken als voedsel kunnen dienen voor de *Artemia* nauplii in de challenge test. Allereerst werd een test uitgevoerd gedurende 120u om na te gaan of bio-vlokken als voedsel kunnen dienen voor *Artemia*. Daarna werden testen uitgevoerd gedurende 48u om te onderzoeken of de bio-vlokken een invloed hebben op de overleving van de *Artemia* binnen de termijn van de challenge testen die uitgevoerd worden met de bio-vlokken.

Er werden eveneens verschillende concentraties aan LVS3 gebruikt om indien mogelijk ook de mate waarin de bio-vlokken als voeding optreden voor de *Artemia* te kunnen bepalen. Deze testen werden niet steriel uitgevoerd.

De resultaten van de voedertesten met de verschillende concentraties aan LVS3 en glycerol-bio-vlokken worden weergegeven in Tabel 17 en Tabel 18.

**Tabel 17. Overleving van *Artemia* (%) in artificieel zeewater waaraan niets, verschillende concentraties LVS3, verschillende volumes glycerol-bio-vlokken of geautoclaveerde glycerol-bio-vlokken toegevoegd werd. In experiment 3 werd de overleving van de *Artemia* nagegaan na 120u. In experiment 4 en 5 werd de overleving nagegaan na 48u. De concentratie aan bio-vlokken in de 1 mL-behandeling bedroeg tijdens experiment 3, 4 en 5 respectievelijk 0,086 g/L SS, 0,170 g/L SS en 0,179 g/L SS. Weergegeven waarden zijn gemiddelden  $\pm$  standaardafwijking, n=3. Waarden in dezelfde kolom die gevolgd worden door een verschillende letter zijn significant verschillend ( $p < 0,05$ ).**

behandeling	experiment 3	experiment 4	experiment 5
geen voeding			48 $\pm$ 19 ab
10 <sup>5</sup> kve/mL LVS3	0 $\pm$ 0 a	78 $\pm$ 8 a	52 $\pm$ 26 abc
10 <sup>6</sup> kve/mL LVS3	0 $\pm$ 0 a	70 $\pm$ 20 a	43 $\pm$ 13 a
10 <sup>7</sup> kve/mL LVS3	0 $\pm$ 0 a	78 $\pm$ 8 a	52 $\pm$ 3 abc
10 <sup>8</sup> kve/mL LVS3	15 $\pm$ 5 ab	92 $\pm$ 8 a	97 $\pm$ 3 d
10 <sup>9</sup> kve/mL LVS3	7 $\pm$ 3 a	78 $\pm$ 4 a	95 $\pm$ 5 d
1 mL glycerol-bio-vlokken	3 $\pm$ 6 a	93 $\pm$ 6 a	82 $\pm$ 10 bcd
2 mL glycerol-bio-vlokken	2 $\pm$ 3 a	92 $\pm$ 3 a	95 $\pm$ 5 d
3 mL glycerol-bio-vlokken		85 $\pm$ 10 a	92 $\pm$ 3 d
4 mL glycerol-bio-vlokken	48 $\pm$ 28 bc		
1 mL geautoclaveerde glycerol-bio-vlokken	70 $\pm$ 22 c	85 $\pm$ 13 a	85 $\pm$ 13 cd
2 mL geautoclaveerde glycerol-bio-vlokken	58 $\pm$ 6 c	75 $\pm$ 9 a	87 $\pm$ 6 cd
3 mL geautoclaveerde glycerol-bio-vlokken		73 $\pm$ 8 a	80 $\pm$ 5 bcd
4 mL geautoclaveerde glycerol-bio-vlokken	77 $\pm$ 13 c		

Tabel 18. Lengte van *Artemia* (mm) in artificieel zeewater waaraan niets, verschillende concentraties LVS3, verschillende volumes glycerol-bio-vlokken of geautoclaveerde glycerol-bio-vlokken toegevoegd werd. In experiment 3 werden de *Artemia* gemeten na 120u. In experiment 5 werden de *Artemia* na 48u gemeten. De *Artemia* van experiment 4 werden niet gemeten (NG). De concentratie aan bio-vlokken in de 1 mL-behandeling bedroeg tijdens experiment 3 en 5 respectievelijk 0,086 g/L SS en 0,179 g/L SS. Weergegeven waarden zijn gemiddelden  $\pm$  standaardafwijking, in experiment 3 werden voor iedere behandeling alle overlevende *Artemia* gemeten, in experiment 5 is n=5 voor de behandelingen  $10^5$  en  $10^6$  kve/mL LVS3, n=10 voor de behandelingen geen voeding,  $10^9$  kve/mL en de verschillende concentraties (geautoclaveerde) bio-vlokken en n=15 voor de behandelingen  $10^7$  en  $10^8$  kve/mL LVS3. Waarden in dezelfde kolom die gevolgd worden door een verschillende letter zijn significant verschillend ( $p < 0,05$ ). \*Aangezien er in experiment 3 maar 1 overlevende *Artemia* was in de behandeling met 2 mL bio-vlokken, heeft deze waarde geen standaardafwijking en werd hier ook geen statistiek op uitgevoerd.

behandeling	experiment 3	experiment 4	experiment 5
geen voeding			0,95 $\pm$ 0,05 <sup>a</sup>
$10^5$ kve/mL LVS3	-	NG	0,92 $\pm$ 0,03 <sup>a</sup>
$10^6$ kve/mL LVS3	-	NG	0,90 $\pm$ 0,05 <sup>a</sup>
$10^7$ kve/mL LVS3	-	NG	0,91 $\pm$ 0,05 <sup>a</sup>
$10^8$ kve/mL LVS3	1,19 $\pm$ 0,09 <sup>ab</sup>	NG	1,11 $\pm$ 0,09 <sup>b</sup>
$10^9$ kve/mL LVS3	1,47 $\pm$ 0,14 <sup>ac</sup>	NG	1,19 $\pm$ 0,07 <sup>bc</sup>
1 mL glycerol-bio-vlokken	0,92 $\pm$ 0,16 <sup>ab</sup>	NG	0,92 $\pm$ 0,06 <sup>a</sup>
2 mL glycerol-bio-vlokken	1,08 *	NG	0,95 $\pm$ 0,05 <sup>a</sup>
3 mL glycerol-bio-vlokken		NG	0,98 $\pm$ 0,07 <sup>a</sup>
4 mL glycerol-bio-vlokken	1,10 $\pm$ 0,08 <sup>b</sup>		
1 mL geautoclaveerde glycerol-bio-vlokken	1,39 $\pm$ 0,20 <sup>a</sup>	NG	1,15 $\pm$ 0,09 <sup>bc</sup>
2 mL geautoclaveerde glycerol-bio-vlokken	1,63 $\pm$ 0,25 <sup>c</sup>	NG	1,21 $\pm$ 0,08 <sup>bc</sup>
3 mL geautoclaveerde glycerol-bio-vlokken		NG	1,25 $\pm$ 0,15 <sup>c</sup>
4 mL geautoclaveerde glycerol-bio-vlokken	2,05 $\pm$ 0,25 <sup>d</sup>		

In Tabel 17 is te zien dat na 5 dagen de overleving in alle behandelingen met geautoclaveerde glycerol-bio-vlokken significant hoger is dan in de behandelingen met LVS3. De aanwezigheid van 4 mL bio-vlokken of 1, 2 en 4 mL geautoclaveerde bio-vlokken in de testtubes zorgde voor een significant hogere overleving dan in de testtubes met een lagere concentratie aan bio-vlokken. De overleving in de behandeling met 4 mL glycerol-bio-vlokken is significant hoger dan die in alle behandelingen met LVS3 behalve die met  $10^8$  kve/mL LVS3. In Tabel 18 is te zien dat de *Artemia* in de behandeling met 4 mL geautoclaveerde bio-vlokken significant groter zijn dan die in alle andere behandelingen. De *Artemia* in de behandeling met 2 mL geautoclaveerde bio-vlokken zijn significant groter dan die in de behandeling met 1 mL geautoclaveerde bio-vlokken en met 4 en 1 mL bio-vlokken.

In de eerste voedertest van 48u (experiment 4) is er geen significant verschil in de overleving tussen de verschillende concentraties LVS3, bio-vlokken en geautoclaveerde bio-vlokken.

In de tweede voedertest van 48u (experiment 5) zorgt de aanwezigheid van 108 of 109 kve/mL LVS3 voor een significant hogere overleving van de Artemia in vergelijking met de lagere concentraties aan LVS3 en met de behandeling waarin geen voeding aanwezig is (Tabel 17). De overleving in de behandelingen met de verschillende concentraties bio-vlokken en geautoclaveerde bio-vlokken is niet significant verschillend van die in de behandelingen met 108 en 109 kve/mL LVS3. Verder kan in Tabel 18 opgemerkt worden dat de Artemia in alle behandelingen met geautoclaveerde bio-vlokken groter zijn dan die in de behandelingen met bio-vlokken.

### 3.3 Challenge testen

In de eerste challenge testen werden de (geautoclaveerde) bio-vlokken en supernatans enkel als behandeling en niet als voeding voor de Artemia gezien. Als voeding was er 107 kve/mL LVS3 aanwezig in de testtubes. De overleving van de Artemia na 48u wordt weergegeven in Tabel 19 en de gemiddelde lengte van de Artemia op het eind van de challenge test in Tabel 20.

In experiment 6 is er een significant hogere overleving van de Artemia die blootgesteld werden aan *Vibrio harveyi* in aanwezigheid van LVS3 + bio-vlokken dan in de andere behandelingen die met *Vibrio harveyi* geïnoculeerd werden (Tabel 19). Bij de Artemia waarbij geen pathogeen aanwezig is, is er echter geen significant verschil in overleving tussen de behandeling met de bio-vlokken en de andere. Bovendien is het verschil tussen de overleving van wel en niet aan *Vibrio harveyi* blootgestelde Artemia enkel bij de behandeling met LVS3 + bio-vlokken niet significant.

De behandeling met LVS3 + geautoclaveerde bio-vlokken zorgde niet voor een significant hogere overleving van de Artemia ten opzichte van de controle met LVS3. De Artemia in deze behandeling zijn echter wel significant groter dan die in de andere behandelingen (Tabel 20). De behandeling met LVS3 + bio-vlokken daarentegen veroorzaakt geen significant effect op de lengte van de Artemia.

In de tweede challenge test waarin de glycerol-bio-vlokken enkel als actieve component beschouwd werden (experiment 7 in Tabel 19), is er geen significant hogere overleving van de aan *Vibrio campbellii* blootgestelde Artemia in aanwezigheid van LVS3 + bio-vlokken dan in de andere behandelingen. Wel is er een significant hogere overleving van de Artemia in aanwezigheid van LVS3 + geautoclaveerde bio-vlokken ten opzichte van de controle waarin enkel LVS3 aanwezig is en dit zowel in aan- als afwezigheid van *Vibrio campbellii*.

In experiment 7 waren er geen significante verschillen tussen de gemiddelde lengtes van de Artemia bij de verschillende behandelingen (Tabel 20).

Tabel 19. Overleving van *Artemia* (%) na 48u in artificieel zeewater waaraan niets, enkel  $10^7$  kve/mL LVS3 of  $10^7$  kve/mL LVS3 samen met glycerol-bio-vlokken, geautoclaveerde glycerol-bio-vlokken, supernatans van de bio-vlokken of geautoclaveerd supernatans van de bio-vlokken werd toegevoegd, waarna al dan niet *Vibrio harveyi* BB120 of *Vibrio campbellii* LMG21363 aan  $10^5$  kve/mL werd toegevoegd. De concentratie aan bio-vlokken bedroeg tijdens experiment 6 en 7 respectievelijk 0,265 g/L SS en 0,128 g/L SS. Weergegeven waarden zijn gemiddelden  $\pm$  standaardafwijking, n=3. Waarden in dezelfde kolom die gevolgd worden door een verschillende letter zijn significant verschillend ( $p < 0,05$ ).

behandeling	experiment 6	experiment 7
LVS3	88 $\pm$ 8 <sup>a</sup>	50 $\pm$ 5 <sup>ab</sup>
LVS3 + <i>Vibrio harveyi</i>	30 $\pm$ 9 <sup>b</sup>	
LVS3 + <i>Vibrio campbellii</i>		27 $\pm$ 8 <sup>a</sup>
LVS3 + glycerol-bio-vlokken	85 $\pm$ 9 <sup>a</sup>	73 $\pm$ 10 <sup>bcd</sup>
LVS3 + glycerol-bio-vlokken + <i>Vibrio harveyi</i>	95 $\pm$ 0 <sup>a</sup>	
LVS3 + glycerol-bio-vlokken + <i>Vibrio campbellii</i>		50 $\pm$ 22 <sup>abc</sup>
LVS3 + geautoclaveerde glycerol-bio-vlokken	93 $\pm$ 6 <sup>a</sup>	92 $\pm$ 8 <sup>d</sup>
LVS3 + geautoclaveerde glycerol-bio-vlokken + <i>Vibrio harveyi</i>	43 $\pm$ 8 <sup>b</sup>	
LVS3 + geautoclaveerde glycerol-bio-vlokken + <i>Vibrio campbellii</i>		72 $\pm$ 14 <sup>bd</sup>
LVS3 + supernatans	92 $\pm$ 8 <sup>a</sup>	60 $\pm$ 25 <sup>abd</sup>
LVS3 + supernatans + <i>Vibrio harveyi</i>	43 $\pm$ 3 <sup>b</sup>	
LVS3 + supernatans + <i>Vibrio campbellii</i>		23 $\pm$ 6 <sup>a</sup>
LVS3 + geautoclaveerd supernatans	88 $\pm$ 3 <sup>a</sup>	53 $\pm$ 13 <sup>acd</sup>
LVS3 + geautoclaveerd supernatans + <i>Vibrio harveyi</i>	42 $\pm$ 31 <sup>b</sup>	
LVS3 + geautoclaveerd supernatans + <i>Vibrio campbellii</i>		47 $\pm$ 15 <sup>abc</sup>

Tabel 20. Lengte van *Artemia* (mm) na 48u in artificieel zeewater waaraan niets, enkel  $10^7$  kve/mL LVS3 of  $10^7$  kve/mL LVS3 samen met glycerol-bio-vlokken, geautoclaveerde glycerol-bio-vlokken, supernatans van de bio-vlokken of geautoclaveerd supernatans van de bio-vlokken werd toegevoegd, waarna al dan niet *Vibrio harveyi* BB120 of *Vibrio campbellii* LMG21363 aan  $10^5$  kve/mL werd toegevoegd. De concentratie aan bio-vlokken bedroeg tijdens experiment 6 en 7 respectievelijk 0,265 g/L SS en 0,128 g/L SS. Weergegeven waarden zijn gemiddelden  $\pm$  standaardafwijking, n=16 in experiment 6 en n=8 in experiment 7. Waarden in dezelfde kolom die gevolgd worden door een verschillende letter zijn significant verschillend ( $p < 0,05$ ).

behandeling	experiment 6	experiment 7
LVS3	0,97 $\pm$ 0,05 ab	0,92 $\pm$ 0,04 ab
LVS3 + <i>Vibrio harveyi</i>	0,95 $\pm$ 0,08 abc	
LVS3 + <i>Vibrio campbellii</i>		0,92 $\pm$ 0,04 ab
LVS3 + glycerol-bio-vlokken	0,96 $\pm$ 0,08 ab	0,96 $\pm$ 0,10 ab
LVS3 + glycerol-bio-vlokken + <i>Vibrio harveyi</i>	0,94 $\pm$ 0,6 ac	
LVS3 + glycerol-bio-vlokken + <i>Vibrio campbellii</i>		0,97 $\pm$ 0,7 ab
LVS3 + geautoclaveerde glycerol-bio-vlokken	1,17 $\pm$ 0,07 d	0,99 $\pm$ 0,8 a
LVS3 + geautoclaveerde glycerol-bio-vlokken + <i>Vibrio harveyi</i>	0,91 $\pm$ 0,04 ac	
LVS3 + geautoclaveerde glycerol-bio-vlokken + <i>Vibrio campbellii</i>		0,93 $\pm$ 0,4 ab
LVS3 + supernatans	1,03 $\pm$ 0,07 b	0,90 $\pm$ 0,06 ab
LVS3 + supernatans + <i>Vibrio harveyi</i>	0,90 $\pm$ 0,07 ac	
LVS3 + supernatans + <i>Vibrio campbellii</i>		0,88 $\pm$ 0,7 b
LVS3 + geautoclaveerd supernatans	0,91 $\pm$ 0,07 c	0,90 $\pm$ 0,3 ab
LVS3 + geautoclaveerd supernatans + <i>Vibrio harveyi</i>	0,88 $\pm$ 0,07 ac	
LVS3 + geautoclaveerd supernatans + <i>Vibrio campbellii</i>		0,89 $\pm$ 0,04 b

In de tweede reeks testen met de glycerol-bio-vlokken werden de bio-vlokken en afgeleiden zowel als actieve component als voedsel voor de *Artemia* beschouwd. De (geautoclaveerde) bio-vlokken en supernatans waren dan ook de enige bron van voedsel die aanwezig was tijdens de challenge test. De resultaten van de drie experimenten met glycerol-bio-vlokken als actieve component en voedsel worden weergegeven in Tabel 21 en Tabel 22.

In experiment 8 was er een significant hogere overleving van de *Artemia* in aanwezigheid van glycerol-bio-vlokken en *Vibrio harveyi* dan in de met *Vibrio harveyi* geïnoculeerde testtubes zonder voeding terwijl er zonder pathogeen geen verschil was in de overleving tussen deze behandelingen (Tabel 21). De overleving in de behandeling met bio-vlokken was zowel in aanwezigheid als afwezigheid van *Vibrio harveyi* niet significant verschillend van die in de controle met LVS3.

De gemiddelde lengte van de Artemia in de behandelingen met bio-vlokken en geautoclaveerde bio-vlokken was significant groter dan in de testtubes waarin geen voedsel aanwezig was (Tabel 22). De Artemia in de behandeling met geautoclaveerde bio-vlokken waren ook significant langer dan die in de controle met LVS3. Bij de Artemia die blootgesteld werden aan *Vibrio harveyi* was er tussen geen enkele van de behandelingen een significant verschil in lengte.

In de tweede challenge test waarbij de glycerol-bio-vlokken en afgeleiden ook als voedsel voor de Artemia dienen (experiment 9 in Tabel 21), had geen enkele behandeling een significant effect op de overleving van de Artemia noch ten opzichte van de testtubes waarin geen voedsel aanwezig was, noch ten opzichte van die waarin LVS3 aanwezig was en dit zowel in de aan- als afwezigheid van *Vibrio campbellii*.

**Tabel 21. Overleving van Artemia (%) na 48u in artificieel zeewater waaraan niets, 10<sup>7</sup> kve/mL LVS3, glycerol-bio-vlokken, geautoclaveerde glycerol-bio-vlokken, supernatans van de bio-vlokken of geautoclaveerd supernatans van de bio-vlokken werd toegevoegd, waarna al dan niet *Vibrio harveyi* BB120 of *Vibrio campbellii* LMG21363 aan 10<sup>5</sup> kve/mL werd toegevoegd. De concentratie aan bio-vlokken bedroeg tijdens experiment 8, 9 en 10 respectievelijk 0,465 g/L SS, 0,489 g/L SS en 0,219 g/L SS. Weergegeven waarden zijn gemiddelden ± standaardafwijking, n=3. Waarden in dezelfde kolom die gevolgd worden door een verschillende letter zijn significant verschillend (p<0,05).**

behandeling	experiment 8	experiment 9	experiment 10
geen voeding	60 ± 33 abc	67 ± 19 ab	72 ± 3 ab
geen voeding + <i>Vibrio harveyi</i>	33 ± 25 ab		30 ± 5 acd
geen voeding + <i>Vibrio campbellii</i>		32 ± 19 acde	
LVS3	93 ± 8 c	93 ± 6 b	73 ± 20 b
LVS3 + <i>Vibrio harveyi</i>	53 ± 31 abc		23 ± 8 cd
LVS3 + <i>Vibrio campbellii</i>		30 ± 17 acde	
glycerol-bio-vlokken	93 ± 3 c	73 ± 23 b	53 ± 25 bc
glycerol-bio-vlokken + <i>Vibrio harveyi</i>	98 ± 3 c		62 ± 14 bc
glycerol-bio-vlokken + <i>Vibrio campbellii</i>		18 ± 18 cd	
geautoclaveerde glycerol-bio-vlokken	97 ± 3 c	95 ± 5 b	45 ± 23 bc
geautoclaveerde glycerol-bio-vlokken + <i>Vibrio harveyi</i>	30 ± 5 ab		0 ± 0 d
geautoclaveerde glycerol-bio-vlokken + <i>Vibrio campbellii</i>		17 ± 10 c	
supernatans	77 ± 10 ac	62 ± 12 bde	
supernatans + <i>Vibrio harveyi</i>	28 ± 20 ab		
supernatans + <i>Vibrio campbellii</i>		23 ± 8 ce	
geautoclaveerd supernatans	57 ± 16 abc	55 ± 10 bcde	
geautoclaveerd supernatans + <i>Vibrio harveyi</i>	13 ± 13 b		
geautoclaveerd supernatans + <i>Vibrio campbellii</i>		27 ± 8 ace	



Tabel 22. Lengte van *Artemia* (mm) na 48u in artificieel zeewater waaraan niets,  $10^7$  kve/mL LVS3, glycerol-bio-vlokken, geautoclaveerde glycerol-bio-vlokken, supernatans van de bio-vlokken of geautoclaveerd supernatans van de bio-vlokken werd toegevoegd, waarna al dan niet *Vibrio harveyi* BB120 of *Vibrio campbellii* LMG21363 aan  $10^5$  kve/mL werd toegevoegd. De concentratie aan bio-vlokken bedroeg tijdens experiment 8 en 9 respectievelijk 0,465 g/L SS en 0,489 g/L SS. De *Artemia* van experiment 10 werden niet gemeten (NG). Weergegeven waarden zijn gemiddelden  $\pm$  standaardafwijking,  $n=10$  indien voldoende overlevende *Artemia*. Waarden in dezelfde kolom die gevolgd worden door een verschillende letter zijn significant verschillend ( $p<0,05$ ).

behandeling	experiment 8	experiment 9	experiment 10
geen voeding	0,88 $\pm$ 0,05 <sup>a</sup>	0,90 $\pm$ 0,04 <sup>a</sup>	NG
geen voeding + <i>Vibrio harveyi</i>	0,90 $\pm$ 0,05 <sup>ab</sup>		NG
geen voeding + <i>Vibrio campbellii</i>		0,96 $\pm$ 0,05 <sup>a</sup>	
LVS3	0,91 $\pm$ 0,06 <sup>ab</sup>	0,90 $\pm$ 0,03 <sup>a</sup>	NG
LVS3 + <i>Vibrio harveyi</i>	0,90 $\pm$ 0,03 <sup>ab</sup>		NG
LVS3 + <i>Vibrio campbellii</i>		0,89 $\pm$ 0,08 <sup>a</sup>	
glycerol-bio-vlokken	0,98 $\pm$ 0,08 <sup>b</sup>	0,94 $\pm$ 0,08 <sup>a</sup>	NG
glycerol-bio-vlokken + <i>Vibrio harveyi</i>	0,94 $\pm$ 0,06 <sup>ab</sup>		NG
glycerol-bio-vlokken + <i>Vibrio campbellii</i>		0,94 $\pm$ 0,06 <sup>a</sup>	
geautoclaveerde glycerol-bio-vlokken	1,09 $\pm$ 0,09 <sup>c</sup>	1,05 $\pm$ 0,9 <sup>b</sup>	NG
geautoclaveerde glycerol-bio-vlokken + <i>Vibrio harveyi</i>	0,93 $\pm$ 0,07 <sup>ab</sup>		NG
geautoclaveerde glycerol-bio-vlokken + <i>Vibrio campbellii</i>		0,92 $\pm$ 0,05 <sup>a</sup>	
supernatans	0,89 $\pm$ 0,05 <sup>ab</sup>	0,93 $\pm$ 0,05 <sup>a</sup>	
supernatans + <i>Vibrio harveyi</i>	0,89 $\pm$ 0,05 <sup>ab</sup>		
supernatans + <i>Vibrio campbellii</i>		0,92 $\pm$ 0,04 <sup>a</sup>	
geautoclaveerd supernatans	0,89 $\pm$ 0,06 <sup>ab</sup>	0,93 $\pm$ 0,03 <sup>a</sup>	
geautoclaveerd supernatans + <i>Vibrio harveyi</i>	0,91 $\pm$ 0,08 <sup>ab</sup>		
geautoclaveerd supernatans + <i>Vibrio campbellii</i>		0,90 $\pm$ 0,05 <sup>a</sup>	

De *Artemia* in de testtubes met geautoclaveerde bio-vlokken waarin geen pathogeen aanwezig was, waren wel significant groter dan die in alle andere behandelingen (Tabel 22).

In de derde challenge test met de glycerol-bio-vlokken is de overleving van de aan *Vibrio harveyi* blootgestelde *Artemia* in de behandeling met geautoclaveerde bio-vlokken significant lager dan die in de behandeling met bio-vlokken (experiment 10 in Tabel 21).

De challenge testen met de betaïne-bio-vlokken werden meteen uitgevoerd in de veronderstelling dat de bio-vlokken en afgeleiden tijdens de challenge test naast hun functie als actieve component ook als voeding voor de *Artemia* kunnen dienen. De overleving en

gemiddelde lengte van de Artemia tijdens de twee herhalingen van deze challenge testen met betaïne-bio-vlokken worden weergegeven in respectievelijk Tabel 23 en Tabel 24.

In de eerste challenge test met de betaïne-bio-vlokken is de overleving van Artemia die blootgesteld werden aan *Vibrio harveyi* hoger in de behandeling met bio-vlokken dan in alle andere met *Vibrio harveyi* geïnoculeerde behandelingen (experiment 11 in Tabel 23). Dit verschil is significant ten opzichte van de behandelingen met de geautoclaveerde bio-vlokken, het supernatans en het geautoclaveerd supernatans. Bij de Artemia die blootgesteld werden aan *Vibrio campbellii* is er echter geen significant verschil in overleving tussen de verschillende behandelingen.

De Artemia in de testtubes met geautoclaveerde bio-vlokken in de afwezigheid van een van de pathogenen zijn significant groter dan die in de testtubes met LVS3 en bio-vlokken (Tabel 24).

**Tabel 23. Overleving van *Artemia* (%) na 48u in artificieel zeewater waaraan niets,  $10^7$  kve/mL LVS3, betaïne-bio-vlokken, geautoclaveerde betaïne-bio-vlokken, supernatans van de betaïne-bio-vlokken of geautoclaveerd supernatans van de betaïne-bio-vlokken werd toegevoegd, waarna al dan niet *Vibrio harveyi* BB120 of *Vibrio campbellii* LMG21363 aan  $10^5$  kve/mL werd toegevoegd. De concentratie aan bio-vlokken bedroeg tijdens experiment 11 en 12 respectievelijk 0,171 g/L SS en 0,221 g/L SS. Weergegeven waarden zijn gemiddelden  $\pm$  standaardafwijking, n=3. Waarden in dezelfde kolom die gevolgd worden door een verschillende letter zijn significant verschillend ( $p < 0,05$ ).**

behandeling	experiment 11	experiment 12
geen voeding		72 $\pm$ 3 <sup>a</sup>
geen voeding + <i>Vibrio harveyi</i>		30 $\pm$ 5 <sup>b</sup>
LVS3	87 $\pm$ 13 <sup>ab</sup>	73 $\pm$ 20 <sup>a</sup>
LVS3 + <i>Vibrio harveyi</i>	62 $\pm$ 20 <sup>abc</sup>	23 $\pm$ 8 <sup>b</sup>
LVS3 + <i>Vibrio campbellii</i>	38 $\pm$ 8 <sup>acd</sup>	
betaïne-bio-vlokken	65 $\pm$ 13 <sup>ace</sup>	78 $\pm$ 10 <sup>a</sup>
betaïne-bio-vlokken + <i>Vibrio harveyi</i>	93 $\pm$ 3 <sup>be</sup>	77 $\pm$ 21 <sup>a</sup>
betaïne-bio-vlokken + <i>Vibrio campbellii</i>	20 $\pm$ 0 <sup>cd</sup>	
geautoclaveerde betaïne-bio-vlokken	80 $\pm$ 22 <sup>abef</sup>	78 $\pm$ 3 <sup>a</sup>
geautoclaveerde betaïne-bio-vlokken + <i>Vibrio harveyi</i>	20 $\pm$ 17 <sup>cd</sup>	25 $\pm$ 17 <sup>b</sup>
geautoclaveerde betaïne-bio-vlokken + <i>Vibrio campbellii</i>	18 $\pm$ 10 <sup>cd</sup>	
supernatans	35 $\pm$ 20 <sup>cdf</sup>	
supernatans + <i>Vibrio harveyi</i>	20 $\pm$ 18 <sup>cd</sup>	
supernatans + <i>Vibrio campbellii</i>	17 $\pm$ 18 <sup>cd</sup>	
geautoclaveerd supernatans	55 $\pm$ 17 <sup>abcde</sup>	
geautoclaveerd supernatans + <i>Vibrio harveyi</i>	35 $\pm$ 25 <sup>cdf</sup>	
geautoclaveerd supernatans + <i>Vibrio campbellii</i>	10 $\pm$ 17 <sup>d</sup>	

In de tweede challenge test met de betaïne-bio-vlokken (experiment 12 in Tabel 23) is de overleving van de Artemia in de behandeling met bio-vlokken in de aanwezigheid van *Vibrio harveyi* significant hoger dan die in de behandelingen met geautoclaveerde bio-vlokken, LVS3 en in de behandeling zonder voedsel. De overleving in de testtubes met geautoclaveerde bio-vlokken en *Vibrio harveyi* is niet significant verschillend van die in de controles met LVS3 en geen voeding. Zonder inoculatie met *Vibrio harveyi* is de overleving in geen enkele van de behandelingen significant verschillend.

De challenge testen met de MBA-bio-vlokken werden, net zoals die met de betaïne-bio-vlokken, onmiddellijk uitgevoerd in de veronderstelling dat de bio-vlokken en afgeleiden ook als voedselbron voor de Artemia nauplii kunnen dienen. De resultaten van de twee herhalingen van deze challenge testen worden weergegeven in Tabel 25 en Tabel 26.

Uit de resultaten van de eerste herhaling van de challenge test met de MBA-bio-vlokken (experiment 13) blijkt dat indien de Artemia blootgesteld worden aan *Vibrio harveyi*, er significant meer overleving is bij de behandelingen met LVS3 en bio-vlokken dan bij de behandelingen met geautoclaveerde bio-vlokken en geautoclaveerd supernatans (Tabel 25). Indien er echter *Vibrio campbellii* aanwezig is in de testtube, is er tussen geen enkele van de behandelingen een significant verschil in overleving. Zonder inoculatie met *Vibrio campbellii* is er eveneens geen verschil in overleving tussen de behandelingen. Wel zijn de Artemia in de behandeling met bio-vlokken zonder pathogeen significant groter dan in de andere behandelingen waarin geen pathogeen aanwezig is (Tabel 26). Binnen een behandeling is er nooit een significant verschil in lengte tussen de Artemia waarbij de pathogeen aan- en afwezig is.

In de tweede challenge test met de MBA-bio-vlokken (experiment 14) is de overleving in de behandeling met bio-vlokken in de aanwezigheid van *Vibrio harveyi* significant hoger dan in alle andere met *Vibrio harveyi* geïnoculeerde behandelingen (Tabel 25). Tussen de behandelingen zonder pathogeen is er geen significant verschil in overleving.

Tabel 24. Lengte van *Artemia* (mm) na 48u in artificieel zeewater waaraan niets,  $10^7$  kve/mL LVS3, betaïne-bio-vlokken, geautoclaveerde betaïne-bio-vlokken, supernatans van de betaïne-bio-vlokken of geautoclaveerd supernatans van de betaïne-bio-vlokken werd toegevoegd, waarna al dan niet *Vibrio harveyi* BB120 of *Vibrio campbellii* LMG21363 aan  $10^5$  kve/mL werd toegevoegd. Tijdens experiment 11 bedroeg de concentratie aan bio-vlokken 0,171 g/L SS. De *Artemia* van de supernatans- en geautoclaveerd supernatans-behandelingen in experiment 11 en de *Artemia* in experiment 12 werden niet gemeten (NG). Weergegeven waarden zijn gemiddelden  $\pm$  standaardafwijking, n=10 indien voldoende overlevende *Artemia*. Waarden in dezelfde kolom die gevolgd worden door een verschillende letter zijn significant verschillend ( $p < 0,05$ ).

behandeling	experiment 11	experiment 12
geen voeding		NG
geen voeding + <i>Vibrio harveyi</i>		NG
LVS3	$0,92 \pm 0,05$ ab	NG
LVS3 + <i>Vibrio harveyi</i>	$0,92 \pm 0,05$ ab	NG
LVS3 + <i>Vibrio campbellii</i>	$0,87 \pm 0,07$ a	
betaïne-bio-vlokken	$0,89 \pm 0,06$ a	NG
betaïne-bio-vlokken + <i>Vibrio harveyi</i>	$0,96 \pm 0,08$ ab	NG
betaïne-bio-vlokken + <i>Vibrio campbellii</i>	$0,88 \pm 0,06$ a	
geautoclaveerde betaïne-bio-vlokken	$1,08 \pm 0,07$ c	NG
geautoclaveerde betaïne-bio-vlokken + <i>Vibrio harveyi</i>	$1,00 \pm 0,03$ bc	NG
geautoclaveerde betaïne-bio-vlokken + <i>Vibrio campbellii</i>	$0,94 \pm 0,08$ ab	
supernatans	NG	
supernatans + <i>Vibrio harveyi</i>	NG	
supernatans + <i>Vibrio campbellii</i>	NG	
geautoclaveerd supernatans	NG	
geautoclaveerd supernatans + <i>Vibrio harveyi</i>	NG	
geautoclaveerd supernatans + <i>Vibrio campbellii</i>	NG	

Tabel 25. Overleving van *Artemia* (%) na 48u in artificieel zeewater waaraan niets,  $10^7$  kve/mL LVS3, MBA-bio-vlokken, geautoclaveerde MBA-bio-vlokken, supernatans van de MBA-bio-vlokken of geautoclaveerd supernatans van de MBA-bio-vlokken werd toegevoegd, waarna al dan niet *Vibrio harveyi* BB120 of *Vibrio campbellii* LMG21363 aan  $10^5$  kve/mL werd toegevoegd. De concentratie aan bio-vlokken bedroeg tijdens experiment 13 en 14 respectievelijk 0,045 g/L SS en 0,200 g/L SS. Weergegeven waarden zijn gemiddelden  $\pm$  standaardafwijking, n=3. Waarden in dezelfde kolom die gevolgd worden door een verschillende letter zijn significant verschillend ( $p < 0,05$ ).

behandeling	experiment 13	experiment 14
geen voeding		72 $\pm$ 3 <sup>a</sup>
geen voeding + <i>Vibrio harveyi</i>		30 $\pm$ 5 <sup>b</sup>
geen voeding + <i>Vibrio campbellii</i>		
LVS3	97 $\pm$ 6 <sup>a</sup>	73 $\pm$ 20 <sup>a</sup>
LVS3 + <i>Vibrio harveyi</i>	63 $\pm$ 6 <sup>abc</sup>	23 $\pm$ 8 <sup>b</sup>
LVS3 + <i>Vibrio campbellii</i>	35 $\pm$ 5 <sup>bcde</sup>	
MBA-bio-vlokken	83 $\pm$ 18 <sup>ad</sup>	90 $\pm$ 5 <sup>a</sup>
MBA-bio-vlokken + <i>Vibrio harveyi</i>	68 $\pm$ 16 <sup>ab</sup>	98 $\pm$ 3 <sup>a</sup>
MBA-bio-vlokken + <i>Vibrio campbellii</i>	22 $\pm$ 18 <sup>ce</sup>	
geautoclaveerde MBA-bio-vlokken	95 $\pm$ 7 <sup>a</sup>	88 $\pm$ 6 <sup>a</sup>
geautoclaveerde MBA-bio-vlokken + <i>Vibrio harveyi</i>	17 $\pm$ 21 <sup>ef</sup>	23 $\pm$ 18 <sup>b</sup>
geautoclaveerde MBA-bio-vlokken + <i>Vibrio campbellii</i>	42 $\pm$ 23 <sup>bcdeg</sup>	
supernatans	55 $\pm$ 20 <sup>abcf</sup>	
supernatans + <i>Vibrio harveyi</i>	37 $\pm$ 15 <sup>bceg</sup>	
supernatans + <i>Vibrio campbellii</i>	25 $\pm$ 23 <sup>bcde</sup>	
geautoclaveerd supernatans	73 $\pm$ 10 <sup>ag</sup>	
geautoclaveerd supernatans + <i>Vibrio harveyi</i>	8 $\pm$ 6 <sup>e</sup>	
geautoclaveerd supernatans + <i>Vibrio campbellii</i>	8 $\pm$ 8 <sup>e</sup>	

Tabel 26. Lengte van *Artemia* (mm) na 48u in artificieel zeewater waaraan niets,  $10^7$  kve/mL LVS3, MBA-bio-vlokken, geautoclaveerde MBA-bio-vlokken, supernatans van de MBA-bio-vlokken of geautoclaveerd supernatans van de MBA-bio-vlokken werd toegevoegd, waarna al dan niet *Vibrio harveyi* BB120 of *Vibrio campbellii* LMG21363 aan  $10^5$  kve/mL werd toegevoegd. Tijdens experiment 13 bedroeg de concentratie aan bio-vlokken 0,045 g/L SS. De *Artemia* in experiment 14 werden niet gemeten (NG). Weergegeven waarden zijn gemiddelden  $\pm$  standaardafwijking, n=10 indien voldoende overlevende *Artemia*. Waarden in dezelfde kolom die gevolgd worden door een verschillende letter zijn significant verschillend ( $p < 0,05$ ).

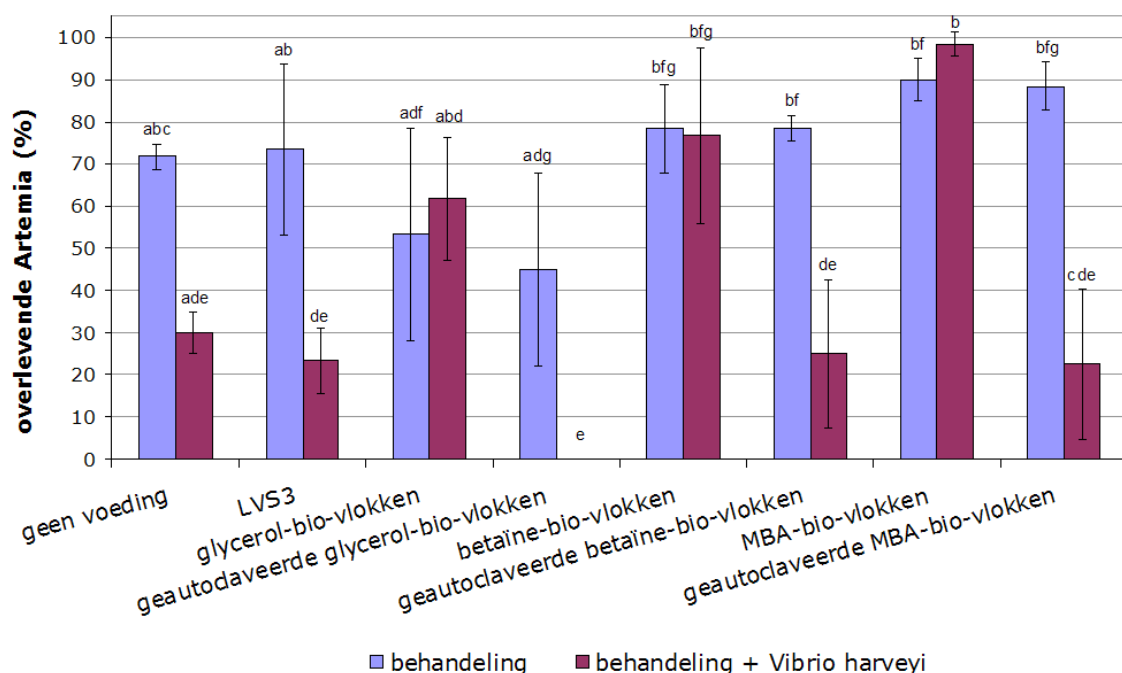
behandeling	experiment 13	experiment 14
geen voeding		NG
geen voeding + <i>Vibrio harveyi</i>		NG
geen voeding + <i>Vibrio campbellii</i>		
LVS3	0,91 $\pm$ 0,06 <sup>abc</sup>	NG
LVS3 + <i>Vibrio harveyi</i>	0,89 $\pm$ 0,05 <sup>ab</sup>	NG
LVS3 + <i>Vibrio campbellii</i>	0,91 $\pm$ 0,04 <sup>abc</sup>	
MBA-bio-vlokken	1,05 $\pm$ 0,07 <sup>d</sup>	NG
MBA-bio-vlokken + <i>Vibrio harveyi</i>	0,97 $\pm$ 0,06 <sup>ad</sup>	NG
MBA-bio-vlokken + <i>Vibrio campbellii</i>	1,00 $\pm$ 0,09 <sup>cd</sup>	
geautoclaveerde MBA-bio-vlokken	0,93 $\pm$ 0,06 <sup>abc</sup>	NG
geautoclaveerde MBA-bio-vlokken + <i>Vibrio harveyi</i>	0,87 $\pm$ 0,04 <sup>b</sup>	NG
geautoclaveerde MBA-bio-vlokken + <i>Vibrio campbellii</i>	0,87 $\pm$ 0,08 <sup>b</sup>	
supernatans	0,93 $\pm$ 0,07 <sup>abc</sup>	
supernatans + <i>Vibrio harveyi</i>	0,88 $\pm$ 0,06 <sup>ab</sup>	
supernatans + <i>Vibrio campbellii</i>	0,89 $\pm$ 0,07 <sup>ab</sup>	
geautoclaveerd supernatans	0,91 $\pm$ 0,03 <sup>abc</sup>	
geautoclaveerd supernatans + <i>Vibrio harveyi</i>	0,97 $\pm$ 0,07 <sup>abd</sup>	
geautoclaveerd supernatans + <i>Vibrio campbellii</i>	0,88 $\pm$ 0,05 <sup>ab</sup>	

De resultaten van de challenge test waarbij de glycerol-, betaine- en MBA-bio-vlokken tegelijk getest werden, werden reeds weergegeven bij de respectievelijke behandelingen (experimenten 10, 12 en 14).

Aangezien in deze test verschillende volumes van de verschillende types bio-vlokken werden gebruikt om een vergelijkbare concentratie aan SS te verkrijgen in de testtubes, bieden deze resultaten ook de mogelijkheid om het effect van de verschillende types bio-vlokken te vergelijken. Daarom wordt de overleving van de *Artemia* in de behandelingen met de verschillende types (geautoclaveerde) bio-vlokken voor de drie types tegelijk weergegeven in Figuur 21.

De resultaten van de challenge test met de drie types bio-vlokken wijzen uit dat er geen significant verschillende overleving is tussen de *Artemia* in de behandelingen met glycerol-, betaine- en MBA-bio-vlokken en dit zowel in aan- als afwezigheid van *Vibrio harveyi* (Figuur 21). Eveneens is er geen significant verschil tussen de overleving van de aan *Vibrio harveyi* blootgestelde *Artemia* bij de behandelingen met de drie types geautoclaveerde bio-vlokken.

Bij elk type bio-vlokken is er geen significant verschil tussen de overleving bij de behandeling met bio-vlokken in de aan- en afwezigheid van de pathogeen. Bij de geautoclaveerde bio-vlokken daarentegen is er bij elk type bio-vlokken wel een significant verschil in de overleving tussen de *Artemia* waarbij al dan niet met *Vibrio harveyi* geïnoculeerd werd.



**Figuur 21.** Overleving van *Artemia* (%) na 48u in artificieel zeewater waaraan bij de controles niets of  $10^7$  kve/mL LVS3 werd toegevoegd en bij de behandelingen bio-vlokken of geautoclaveerde bio-vlokken, waarna al dan *Vibrio harveyi* BB120 werd toegevoegd aan  $10^5$  kve/mL. De concentratie aan glycerol-, betaine- en MBA-bio-vlokken bedroeg respectievelijk 0,219 g/L SS, 0,221 g/L SS en 0,200 g/L SS. Weergegeven waarden zijn gemiddelden en de foutenvlaggen geven de standaardafwijking weer,  $n=3$ . Waarden met een verschillende letter zijn significant verschillend ( $p < 0,05$ ).

### 3.4 Aanvullende analyses bij de laatste challenge test

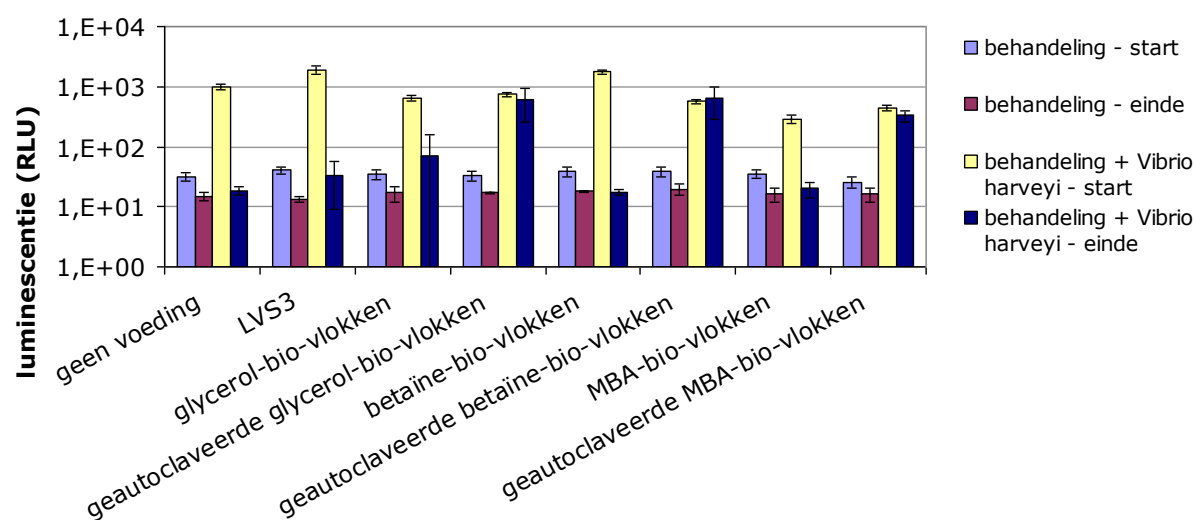
Bij de challenge test met de drie types bio-vlokken en *Vibrio harveyi* BB120 werden extra analyses uitgevoerd om een inschatting te kunnen maken van de overleving van *Vibrio harveyi* in de suspensie in de testtubes en de kolonisatie van het gastrointestinaal kanaal van de *Artemia* door *Vibrio harveyi* en de bio-vlokken tijdens de 48u van de challenge test.

#### 3.4.1 Suspensie

Om de overleving en activiteit van *Vibrio harveyi* in de vloeistof tijdens de challenge test en in aanwezigheid van een gastheer op te volgen, werd aan de start en aan het einde van de challenge test de optische densiteit en de luminescentie in de suspensie in de testtubes gemeten.

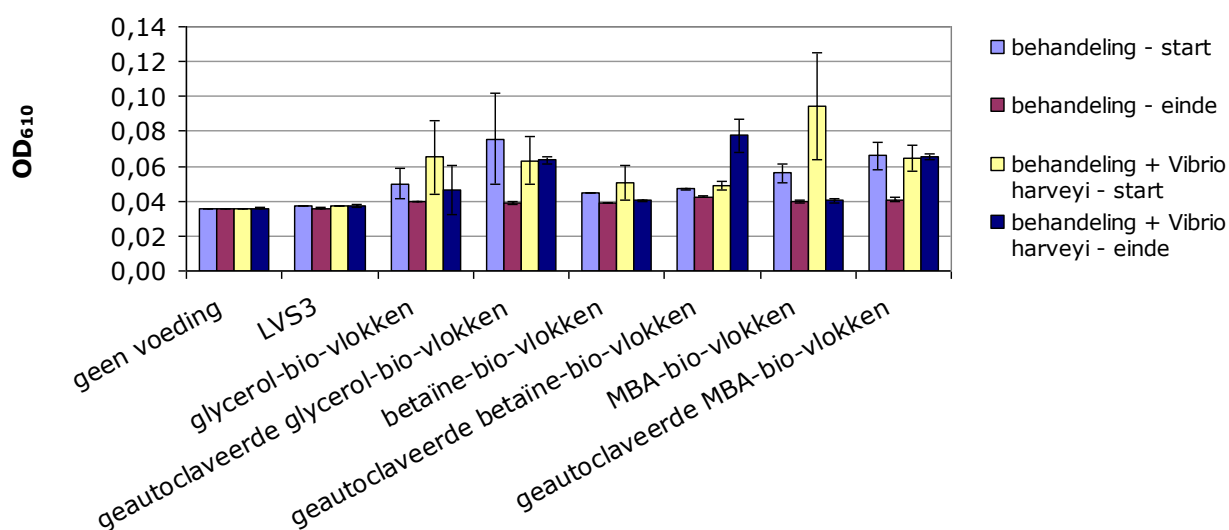
In Figuur 22 worden de resultaten van de luminescentie-metingen in de verschillende behandelingen aan de start en het einde van de challenge test weergegeven en in Figuur 23 de OD610-waarden van de suspensie op dezelfde ogenblikken.

De p-waarden van de statistische verwerking van de luminescentie- en OD610-metingen in de suspensie worden gegeven in Tabel 27, 28, 29 en 30.



**Figuur 22.** Luminescentie van de suspensie aan de start en het einde van de challenge test met drie types bio-vlokken. Weergegeven waarden zijn gemiddelden (n=1 voor de behandelingen zonder pathogeen en n=3 voor de behandelingen met pathogeen), de foutenvlaggen geven de standaardafwijking weer.





**Figuur 23.** Optische densiteit van de suspensie aan de start en het einde van de challenge test met drie types bio-vlokken. Weergegeven waarden zijn gemiddelden (n=1 voor de behandelingen zonder pathogeen en n=3 voor de behandelingen met pathogeen), de foutenvlaggen geven de standaardafwijking weer.

**Tabel 27.** De p-waarden bekomen door het vergelijken van het gemiddelde van de luminescentie in de suspensie bij de behandeling in aanwezigheid van *Vibrio harveyi* ten opzichte van dezelfde behandeling zonder de pathogeen op hetzelfde moment (start of einde van de challenge test). Statistische analyse werd uitgevoerd aan de hand van een tweezijdige t-test voor 2 onafhankelijke steekproeven. Bij de waarden gevolgd door \* is het verschil tussen de gemiddelden statistisch significant (p<0,05).

luminescentie	START	EINDE
geen voeding + <i>Vibrio harveyi</i>	0,00 *	0,07
LVS3 + <i>Vibrio harveyi</i>	0,00 *	0,13
glycerol-bio-vlokken + <i>Vibrio harveyi</i>	0,00 *	0,24
geautoclaveerde glycerol-bio-vlokken + <i>Vibrio harveyi</i>	0,00 *	0,01 *
betaïne-bio-vlokken + <i>Vibrio harveyi</i>	0,00 *	0,73
geautoclaveerde betaïne-bio-vlokken + <i>Vibrio harveyi</i>	0,00 *	0,00 *
MBA-bio-vlokken + <i>Vibrio harveyi</i>	0,00 *	0,27
geautoclaveerde MBA-bio-vlokken + <i>Vibrio harveyi</i>	0,00 *	0,00 *

Tabel 28. De p-waarden bekomen door het vergelijken van het gemiddelde van de luminescentie in de suspensie bij een behandeling op het einde en aan de start van de challenge test. Statistische analyse werd uitgevoerd aan de hand van een gepaarde tweezijdige t-test. Bij de waarden gevolgd door \* is het verschil tussen de gemiddelden statistisch significant ( $p < 0,05$ ).

luminescentie	zonder <i>Vibrio harveyi</i>	met <i>Vibrio harveyi</i>
geen voeding	0,01 *	0,00 *
LVS3	0,00 *	0,00 *
glycerol-bio-vlokken	0,01 *	0,00 *
geautoclaveerde glycerol-bio-vlokken	0,01 *	0,22
betaïne-bio-vlokken	0,00 *	0,00 *
geautoclaveerde betaïne-bio-vlokken	0,00 *	0,50
MBA-bio-vlokken	0,00 *	0,00 *
geautoclaveerde MBA-bio-vlokken	0,13	0,00 *

Tabel 29. De p-waarden bekomen door het vergelijken van het gemiddelde van de OD<sub>610</sub> in de suspensie bij de behandeling die geïnoculeerd werd met *Vibrio harveyi* ten opzichte van dezelfde behandeling zonder de pathogeen op hetzelfde moment (start of einde van de challenge test). Statistische analyse werd uitgevoerd aan de hand van een tweezijdige t-test voor 2 onafhankelijke steekproeven. Bij de waarden gevolgd door \* is het verschil tussen de gemiddelden statistisch significant ( $p < 0,05$ ).

OD <sub>610</sub>	START	EINDE
geen voeding + <i>Vibrio harveyi</i>	0,00 *	0,16
LVS3 + <i>Vibrio harveyi</i>	0,00 *	0,00 *
glycerol-bio-vlokken + <i>Vibrio harveyi</i>	0,19	0,38
geautoclaveerde glycerol-bio-vlokken + <i>Vibrio harveyi</i>	0,22	0,00 *
betaïne-bio-vlokken + <i>Vibrio harveyi</i>	0,43	0,00 *
geautoclaveerde betaïne-bio-vlokken + <i>Vibrio harveyi</i>	0,20	0,00 *
MBA-bio-vlokken + <i>Vibrio harveyi</i>	0,03	0,39
geautoclaveerde MBA-bio-vlokken + <i>Vibrio harveyi</i>	0,78	0,00 *

Tabel 30. De p-waarden bekomen door het vergelijken van het gemiddelde van de OD<sub>610</sub> in de suspensie bij een behandeling op het einde en aan de start van de challenge test. Statistische analyse werd uitgevoerd aan de hand van een gepaarde tweezijdige t-test. Bij de waarden gevolgd door \* is het verschil tussen de gemiddelden statistisch significant ( $p < 0,05$ ).

OD <sub>610</sub>	zonder <i>Vibrio harveyi</i>	met <i>Vibrio harveyi</i>
geen voeding	0,03 *	0,31
LVS3	0,00 *	0,88
glycerol-bio-vlokken	0,09	0,00 *
geautoclaveerde glycerol-bio-vlokken	0,07	0,91
betaïne-bio-vlokken	0,00 *	0,00 *
geautoclaveerd betaïne-bio-vlokken	0,00 *	0,00 *
MBA-bio-vlokken	0,01 *	0,00 *
geautoclaveerde MBA-bio-vlokken	0,01 *	0,74

Bij de start van de challenge test is de luminescentie in de testtubes waarin *Vibrio harveyi* aanwezig is significant groter dan in die waarin de pathogeen niet aanwezig is (Tabel 27). Op het einde van de challenge test is de luminescentie bij de controles (geen voeding en LVS3) en de behandelingen met glycerol-, betaïne- en MBA-bio-vlokken in aanwezigheid van *Vibrio harveyi* gedaald tot de achtergrondwaarde (Figuur 22). De luminescentie in de met *Vibrio harveyi* geïnoculeerde behandelingen met de drie types geautoclaveerde bio-vlokken is op het eind van de challenge test significant hoger dan die in de overeenkomstige behandelingen zonder pathogeen (Tabel 27). Bij de geautoclaveerde glycerol- en betaïne-bio-vlokken was de luminescentie in deze met pathogeen geïnoculeerde testtubes zelfs niet significant verschillend ten opzichte van de beginsituatie (Tabel 28)

Tabel 28).

Uit de resultaten in Figuur 23 kan afgeleid worden dat de OD<sub>610</sub> op het eind van de challenge test hoger is in de behandelingen met de geautoclaveerde bio-vlokken (van alle drie de types bio-vlokken) in aanwezigheid van *Vibrio harveyi* dan in alle andere behandelingen, zowel in aan- als afwezigheid van de pathogeen, waar de OD<sub>610</sub> is teruggevallen tot de achtergrondwaarde. Statistische analyse wees uit dat op het eind van de challenge test voor de drie types bio-vlokken het verschil tussen de OD<sub>610</sub> in de behandeling met geautoclaveerde bio-vlokken en pathogeen significant verschillend was van de OD<sub>610</sub> in dezelfde behandeling zonder pathogeen (Tabel 29). Voor de niet geautoclaveerde bio-vlokken was dit verschil enkel significant bij de betaïne-bio-vlokken.

### 3.4.2 Artemia

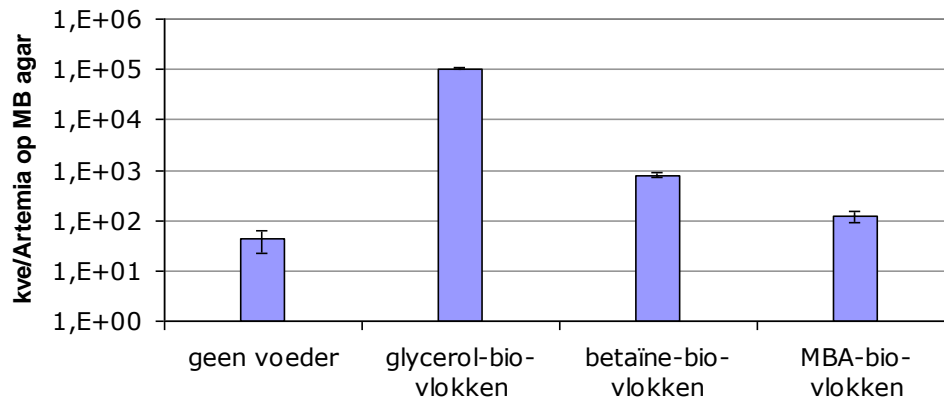
Er werd getracht om na te gaan in hoeverre het gastrointestinaal kanaal van de *Artemia* tijdens de challenge test gekoloniseerd wordt door de bio-vlokken en de pathogeen.

Hiervoor werd op het einde van de challenge test per behandeling een deel van de levende *Artemia* geogst en gespoeld met artificieel zeewater waarna ze gehomogeniseerd werden in een stomacher. Van de bekomen suspensie werd 200 µL gebruikt voor de meting van de luminescentie en OD<sub>610</sub> en werd 100 µL uitgeplaat op TCBS om het aantal *Vibrio* te bepalen en 100 µL op mariene agar om het totale aantal heterotrofe mariene bacteriën te bepalen.

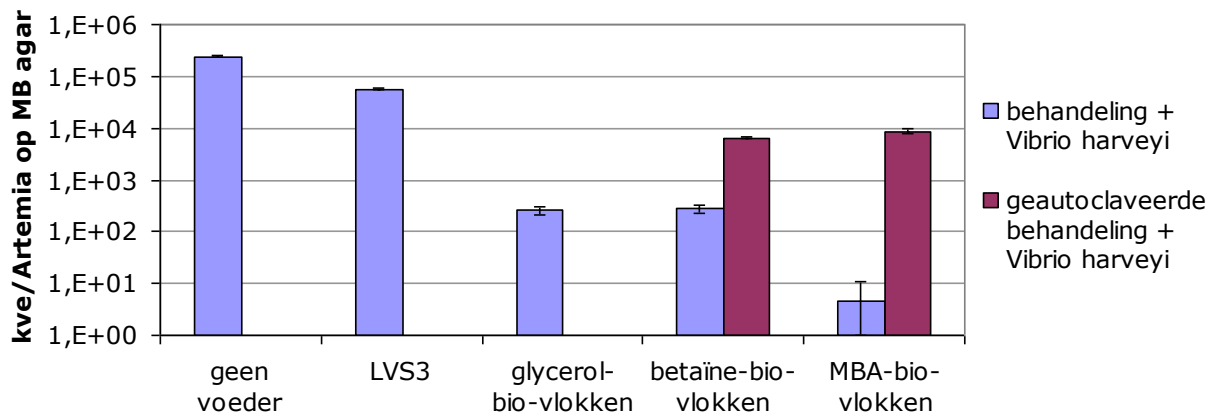
De in de homogenisaten waargenomen OD<sub>610</sub>-waarden en luminescentiemetingen waren niet verschillend tussen de behandelingen met en zonder pathogeen of tussen de controles en de behandelingen met bio-vlokken (resultaten niet weergegeven).

De resultaten van de uitplantingen op mariene agar worden weergegeven in Figuur 24. Deze waarden zijn een maat voor de kolonisatie van het GIT van de *Artemia* door de bio-vlokken na 48u. Er werd geen statistiek toegepast op de weergegeven waarden vermits ze afkomstig zijn van de uitplantingen van het homogenisaat van één testtube waardoor de resultaten van de statistische analyse niet betrouwbaar zouden zijn.

De resultaten van de uitplantingen op TCBS worden weergegeven in Figuur 25. Deze waarden zijn een maat voor de kolonisatie van het GIT van de *Artemia* door *Vibrio* na 48u. Er werd geen statistiek toegepast op de weergegeven waarden vermits ze afkomstig zijn van de uitplantingen van het homogenisaat van één testtube waardoor de resultaten van de statistische analyse niet betrouwbaar zouden zijn.



Figuur 24. Celdensiteit van heterotrofe mariene bacteriën per *Artemia* in de afwezigheid van de pathoogen, bepaald aan de hand van uitplantingen op mariene agar. Weergegeven waarden zijn gemiddelden van de verschillende verdunningen van hetzelfde homogenisaat, de foutenvlaggen geven de standaardafwijking weer.



Figuur 25. Celdensiteit van vibrio's per *Artemia* in de aanwezigheid van de pathoogen, bepaald aan de hand van uitplantingen op TCBS. Weergegeven waarden zijn gemiddelden van de verschillende verdunningen van hetzelfde homogenisaat, de foutenvlaggen geven de standaardafwijking weer. Voor de geautoclaveerde behandeling werden enkel analyses uitgevoerd op *Artemia* uit de behandelingen met geautoclaveerde betaïne-bio-vlokken en MBA-bio-vlokken.

# Deel IV

## Discussie

## 1 Inleiding

Bio-vlokken-technologie wordt gebruikt om het water in aquacultuursystemen te zuiveren door het stikstofafval in het water om te zetten in microbiële biomassa. Door de C/N verhouding in het water te manipuleren worden de heterotrofe bacteriën gestimuleerd (Avnimelech, 1999). De opbrengst aan microbiële biomassa per eenheid substraat is bij heterotrofe bacteriën tien maal hoger dan bij nitrificerende bacteriën. Hierdoor wordt het stikstofafval sneller verwijderd indien het door heterotrofe bacteriën in biomassa omgezet wordt dan wanneer het door nitrificerende bacteriën tot nitraat wordt omgezet. Bovendien zorgen de heterotrofe bacteriën, in tegenstelling tot de nitrificerende bacteriën, niet voor de generatie van stikstofmetabolieten die toxisch zijn voor de aquacultuurdieren. De omzetting van stikstofafval in microbiëel eiwit zorgt er eveneens voor dat een afvalproduct wordt omgezet in een meer waardevolle stikstofvorm aangezien dit eiwit als additioneel voeder voor het gekweekte aquacultuurdier kan dienen.

Er zijn ook aanwijzingen dat de aanwezigheid van bio-vlokken in de aquacultuureenheid ervoor zou kunnen zorgen dat er minder ziektes optreden bij de gekweekte dieren (Serfling, 2000; Michaud et al., 2006; Sinha et al., 2008). Tot nu toe is niet geweten of dit effect veroorzaakt wordt doordat de bio-vlokken de gekweekte dieren minder vatbaar maken voor infectie of doordat ze op de pathogenen inwerken (of een combinatie van beide). Het feit dat bio-vlokken ziektes bij de aquacultuurdieren voorkomen zou naast de zuivering van het water en de generatie van een extra eiwitbron voor het aquacultuurdier nog een extra voordeel van de toepassing van BFT kunnen zijn.

Het verhogen van de C/N in het water gebeurt aan de hand van het gebruik van voeder met een lager eiwitgehalte of door naast het gewone voeder een extra koolstofbron toe te dienen. De keuze van de extra koolstofbron is afhankelijk van de kostprijs en de geschiktheid van de koolstofbron. Algemeen kan gesteld worden dat alcoholen en suikers makkelijk afbreekbaar zijn en dat de decompositie van complexere koolhydraten trager verloopt. Het is echter niet omdat de koolstofbron minder gemakkelijk afbreekbaar is dat hij niet geschikt zou zijn als koolstofbron voor bio-vlokken, want dit zorgt ervoor dat er een structuur aanwezig is in het water waaraan de bacteriën zich kunnen vasthechten, wat de vlokvorming kan stimuleren. Verder is het zo dat indien de decompositie van een component traag verloopt, dit meestal wil zeggen dat er een reeks enzymen opeenvolgend op de component moeten inwerken. De aanwezigheid van deze enzymen in de bio-vlokken kan hun vertering bevorderen wanneer ze opgegeten worden door het aquacultuurdier (Chamberlain et al., 2001a). Vezelig materiaal wordt meestal niet gebruikt als extra koolstofbron aangezien het behoorlijk resistent is tegen decompositie, wel kan het langdurig zorgen voor een structuur waaraan de bacteriën zich kunnen vasthechten.

Zowel op labo-schaal als in commerciële toepassingen van BFT werden reeds verschillende koolstofbronnen gebruikt. Als makkelijk verteerbare koolstofbron werden onder andere suiker (Avnimelech, 1999; Crab et al., 2009b), glycerol (De Schryver en Verstraete, 2009; Crab et al., 2009b) en acetaat (De Schryver en Verstraete, 2009; Crab et al., 2009b) gebruikt. Complexere koolhydraten die als koolstofbron voor de bio-vlokken gebruikt werden zijn onder andere melasse (Burford et al., 2003), tapioca-zetmeel (Avnimelech, 1999; Hari et al., 2006), tarwe-zetmeel

(Avnimelech, 2007; Crab et al., 2009a) en voederpellets op basis van sojabonen, tarwe en maïs (Burford et al., 2004).

In dit onderzoek werden bio-vlokken gevoed met de makkelijk verteerbare koolstofbronnen acetaat en glycerol en met de complexere koolstofbron maïszetmeel. Van de acetaat- en zetmeel-bio-vlokken werd de biochemische samenstelling bepaald. De glycerol-bio-vlokken werden enkel gebruikt bij het onderzoek naar de invloed van bio-vlokken op *Vibrio* spp.

In de melasse van suikerbiet werd de component betaïne aangetroffen. Betaïne is een niet-toxisch aminozuur dat de stressweerstand van bacteriën verhoogt doordat het als een osmoliet optreedt. Ook bij vissen zorgt betaïne voor een vermindering van de gevolgen van osmotische stress (Castro et al., 1998).

In het lichaam treedt betaïne op als methyl donor voor de synthese van moleculen die een belangrijke rol spelen in het eiwit- en energiemetabolisme (El-Husseiny et al., 2008). Er werd in katvis aangetoond dat indien er onvoldoende methionine aanwezig is in het dieet, choline en betaïne een deel van de vraag naar methionine kunnen invullen (Wright et al., 2003).

Bovendien wordt betaïne bij verschillende vissoorten als een stimulans voor de voederopname gezien (Papatryphon en Soares, 2000). Daarom wordt het momenteel al toegevoegd aan sommige commerciële voeders. De toepassing van betaïne als koolstofbron voor bio-vlokken zou er misschien voor kunnen zorgen dat de overblijvende gehalten aan betaïne (of de metaboliëten ervan) die aanwezig zijn in de bio-vlokken de aquacultuurdieren zullen aansporen om meer bio-vlokken te eten. Dit kan van belang zijn bij vissoorten die eerder weigerachtig staan tegenover de consumptie van bio-vlokken.

Zowel in het onderzoek naar de nutritionele kwaliteiten van bio-vlokken als in het onderzoek naar het effect van bio-vlokken op *Vibrio* spp. werden de betaïne-bio-vlokken gebruikt.

Als laatste koolstofbron in dit onderzoek werd MBA gebruikt. Er werd aangetoond dat korte ketenvetzuren zoals boterzuur een beschermend effect hebben bij een infectie met *Vibrio*. Het gebruik van MBA, dat boterzuur bevat, als koolstofbron voor bio-vlokken zou er misschien voor kunnen zorgen dat deze beschermende eigenschappen van het korte ketenvetzuur behouden blijven. Bovendien bevat MBA bakkersgist, wat op zijn beurt een bron is van  $\beta$ -glucanen (Soltanian et al., 2007). Deze  $\beta$ -glucanen kunnen het immuunsysteem van het gekweekte aquatisch dier stimuleren waardoor gist als probioticum zou kunnen optreden. De toepassing van MBA als koolstofbron voor de bio-vlokken zou er misschien voor kunnen zorgen dat deze immunostimulatorische eigenschap behouden blijft.

De MBA-bio-vlokken werden eveneens zowel in het onderzoek naar de nutritionele kwaliteiten van de bio-vlokken als in het onderzoek naar het effect op *Vibrio* spp. gebruikt.



## 2 Samenstelling van de bio-vlokken

### 2.1 Zwevende en vluchtige zwevende stoffen

De waargenomen toenames van de concentraties aan SS en VSS in de acetaat- en betaïne-bio-vlokken kunnen verklaard worden doordat de eerste analyse mogelijks uitgevoerd werd toen de bio-vlokken-culturen nog niet matuur waren en doordat er tijdens de analyses geen oogst van de bio-vlokken plaatsvond. Wanneer BFT in een aquacultuursysteem wordt toegepast, consumeren de gekweekte dieren een deel van de bio-vlokken waardoor de concentratie aan SS niet zo hoog kan oplopen. Bij de toepassing van BFT in aanwezigheid van tilapia of garnalen werden SS-gehalten van 200-600 mg/L gerapporteerd (Azim en Little, 2008; Izquierdo et al., 2006; Tacon et al., 2002).

Er dient echter ook opgemerkt te worden dat in de in dit onderzoek toegepaste reactors een hoge SS als het ware een zichzelf versterkend fenomeen is aangezien grote bio-vlokken met een hoge SS-waarde geassocieerd zijn. Deze grote bio-vlokken spoelen minder makkelijk uit dan kleinere bio-vlokken waardoor de SS nog verder zal toenemen. Dit fenomeen kan ook meegespeeld hebben in het feit dat de SS- en VSS-waarden van de acetaat- en betaïne-bio-vlokken sterker toenames in vergelijking met die bij de andere types bio-vlokken aangezien hun SS-waarden bij de start van de analyses reeds groter waren dan die van de andere types bio-vlokken.

Deze stijgende trend in de SS- en VSS-waarden werd niet waargenomen bij de zetmeel- en MBA-bio-vlokken. Bovendien zijn de SS en VSS bij deze types bio-vlokken lager dan bij de acetaat- en betaïne-bio-vlokken. Dit kan er op wijzen dat de groei van de zetmeel- en MBA-bio-vlokken geremd werd door een factor die minder of geen invloed had op de acetaat- en betaïne-bio-vlokken. Gezien de identieke omgevingscondities bij de cultuur van de vier types bio-vlokken is de meest voor de hand liggende factor de gebruikte koolstofbron. Deze resultaten lijken er dus op te wijzen dat zetmeel en MBA voor een lagere opbrengst aan bio-vlokken zorgen dan acetaat en betaïne wanneer alle koolstofbronnen toegediend worden opdat eenzelfde C/N zou gelden. Deze bewering kan echter niet hard gemaakt worden aangezien er geen testen voor de bepaling van de opbrengst werden uitgevoerd.

### 2.2 Biochemische samenstelling en nutritionele waarde

In dit onderzoek blijkt het eiwitgehalte in de bio-vlokken sterk te variëren naargelang de gebruikte koolstofbron, van  $36 \pm 8\%$  op DS in de acetaat-bio-vlokken tot  $66 \pm 14\%$  DS bij de betaïne-bio-vlokken. Ook het asgehalte is variabel bij de verschillende types bio-vlokken ( $3 \pm 3\%$  DS tot  $35 \pm 4\%$  DS). Het vetgehalte is niet significant verschillend bij de vier types bio-vlokken. Deze resultaten wijzen erop dat de koolstofbron een belangrijke invloed heeft op de biochemische samenstelling van de bio-vlokken.

De biochemische samenstelling van de acetaat-bio-vlokken in dit onderzoek kan vergeleken worden met deze die door Crab et al. (2009b) aangetroffen werd in acetaat-bio-vlokken die afkomstig waren uit een opstelling analoog aan deze in dit onderzoek. De waarden voor het eiwitgehalte en de koolhydraatinhoud van de bio-vlokken waren gelijkaardig in beide onderzoeken, namelijk  $36 \pm 8\%$  DS eiwit en  $26 \pm 6\%$  DS koolhydraten in dit onderzoek en

$42 \pm 8\%$  DS eiwit en  $29 \pm 14\%$  DS koolhydraten bij Crab et al. (2009b). Het vetgehalte was bij Crab et al. (2009b) met  $2,3 \pm 0,4\%$  DS lager dan de  $8 \pm 4\%$  DS in de acetaat-bio-vlokken in dit onderzoek. Het asgehalte was eveneens lager dan dat in de bio-vlokken in dit onderzoek (respectievelijk  $27 \pm 7\%$  DS en  $35 \pm 4\%$  DS).

De biochemische samenstelling van de bio-vlokken is bepalend voor de nutritionele waarde die ze hebben wanneer ze geconsumeerd worden door het gekweekte aquacultuurdier.

In het algemeen bevat visvoeder gemiddeld 32-38% eiwit en 15% vetten (Craig en Helfrich, 2002). In het geval van tilapia is de eiwitvereiste in het voeder afhankelijk van het groeistadium waarin de dieren zich bevinden, gaande van 28 tot 50% eiwit op droge stof basis (Webster en Lim, 2002). Tijdens het uitgroei-stadium van tilapia worden voeders met 25-35% eiwit en 6-8% vetten toegepast zoals geïllustreerd wordt door de analyseresultaten van enkele commerciële voeders in Tabel 31.

Wanneer de samenstelling van deze voeders vergeleken wordt met die van de bio-vlokken in dit onderzoek blijkt dat het eiwitgehalte in de bio-vlokken voldoende hoog is. In de zetmeel- en betaïne-bio-vlokken ligt het zelfs veel hoger. Het vetgehalte in de bio-vlokken lijkt ook te volstaan indien de bio-vlokken door tilapia geconsumeerd worden. Indien ze echter als extra voeder voor garnalen dienen, kan het nodig zijn om over te schakelen op voeder met een iets hoger vetgehalte om het lagere gehalte aan vetten in bepaalde types bio-vlokken te compenseren. Het asgehalte in de acetaat-bio-vlokken is heel wat hoger dan in de beschouwde voeders. Dit is ongewenst wanneer de bio-vlokken als extra voeder gebruikt worden aangezien de asfractie niet bruikbaar is voor de dieren.

Koolhydraten vormen geen essentieel onderdeel van het voeder in aquacultuur, maar worden toegevoegd omdat ze door de dieren ook gebruikt kunnen worden voor de energieproductie en goedkoper zijn dan eiwitten. De bruto energie-inhoud van de acetaat-bio-vlokken is iets lager dan in de beschouwde tilapia-voeders. De andere drie types bio-vlokken bevatten even veel of zelfs iets meer energie dan de beschouwde commerciële voeders.

Op basis van deze analyseresultaten lijken de bio-vlokken met de vier verschillende koolstofbronnen bruikbaar als voeder in aquacultuur mits aanvulling van het dieet met commercieel voeder om eventuele tekorten (bijvoorbeeld vet) te compenseren.

Azim en Little (2008) merkten op dat de bio-vlokken uit hun systeem betere eigenschappen hadden wanneer er geen vis aanwezig was. Dit wijst er dus op dat de consumptie van de bio-vlokken door het gekweekte dier een effect zou kunnen hebben op de biochemische compositie van de bio-vlokken. Ter vergelijking met de in dit onderzoek gevonden nutritionele samenstelling, worden in Tabel 32 analyseresultaten weergegeven uit de literatuur over bio-vlokken in systemen waarin dieren aanwezig zijn. Gezien de grote variabiliteit in biochemische eigenschappen tussen de verschillende types bio-vlokken in dit onderzoek enerzijds en tussen de waarden die in de literatuur werden teruggevonden anderzijds, valt bij vergelijking niet onmiddellijk een duidelijk verschil op tussen de nutritionele waarden van de bio-vlokken in dit onderzoek en die van bio-vlokken in systemen waarin dieren gekweekt worden.

**Tabel 31. Nutritionele eigenschappen van voeders die in de praktijk in aquacultuur gebruikt worden.**

gekweekt organisme	tilapia	tilapia	garnalen	garnalen	garnalen
type voeder	35% eiwit	24% eiwit	32% eiwit	25% eiwit	
eiwit (% DS)	35	23,9	31,5	24,5	34
vet (% DS)	6,2	6,6	9	9	9
as (% DS)	5,2	3,8	7,5	6	25
koolhydraten (% DS)					32
bruto energie (kJ/g DS)	19,6	19,1			15,4
	(Azim en Little, 2008)	(Azim en Little, 2008)	(McIntosh, 2000)	(McIntosh, 2000)	(Hossain en Paul, 2007)

**Tabel 32. Nutritionele waarden van bio-vlokken in systemen waarin dieren gekweekt worden.**

gekweekt organisme	tilapia	tilapia	garnalen	garnalen	garnalen	garnalen	garnalen
eiwitgehalte in voeder	35%	24%	31,5%	22,5%		33-39%	
eiwit (% DS)	38 ± 2	38 ± 4	51	35	33	33	32
vet (% DS)	3,2 ± 0,3	3,2 ± 0,2	10	15	0,6	2,8	1,9
as (% DS)	13 ± 1	11,8 ± 0,8	21	32	30	30	40
bruto-energie (kJ/g DS)	18,6 ± 0,4	19,0 ± 0,2			12,6	12,8	
	(Azim en Little, 2008)	(Azim en Little, 2008)	(McIntosh, 2000)	(McIntosh, 2000)	(Tacon, 2000)	(Tacon et al., 2002)	(Ju et al., 2008)

De eiwitten in het voedsel zijn voor het gekweekte dier de enige bron van de 10 essentiële aminozuren methionine, arginine, threonine, tryptofaan, histidine, isoleucine, lysine, leucine, valine en fenylalanine. Indien er andere, niet-essentiële, aminozuren aanwezig zijn in het voedsel, zorgt dit ervoor dat de dieren ze niet meer zelf moeten aanmaken uit de essentiële aminozuren, wat er dus voor zorgt dat de vraag naar dat essentiële aminozuur afneemt (Webster en Lim, 2002). Een voorbeeld hiervan is methionine dat gebruikt wordt voor de synthese van onder andere cysteïne en homocysteïne. Typisch zijn methionine en lysine de eerste limiterende aminozuren. Bovendien is het gehalte aan methionine lager wanneer plantaardig eiwit gebruikt wordt in het voeder (Craig en Helfrich, 2002). Daarom zou het nuttig kunnen zijn om na te gaan wat de concentratie aan essentiële aminozuren in de bio-vlokken is. In dit onderzoek werden deze concentraties niet bepaald, maar in Tabel 33 zijn wel enkele resultaten uit de literatuur van dergelijke analyses op bio-vlokken uit aquacultuursystemen met penaeide garnalen te vinden. Bij McIntosh (2000) werden twee voeders met een verschillend eiwitgehalte onderzocht (31,5% en

22,5% eiwit op DS). Daarnaast werden ook nog voederpellets op basis van tarwe, maïs en soja (C/N=20) als extra koolstofbron toegediend. De waarden die worden weergegeven bij Tacon et al. (2002) zijn gemiddelden van de analysesresultaten van bio-vlokken in verschillende tanks met penaeïde garnalen die met voeder met een verschillend eiwitgehalte werden gevoed. Er werd geen extra koolstofbron gebruikt voor de bio-vlokken in de onderzoeken van Tacon (2000), Tacon et al. (2002) en Ju et al. (2008).

**Tabel 33. Resultaten van aminozuurbepalingen op bio-vlokken uit zero-exchange cultuursystemen met penaeïde garnalen. Waarden worden weergegeven in g/kg DS.**

essentiële aminozuren				114	135
methionine	6,1	3,5	10,6	5	8
niet-essentiële aminozuren				140	121
totaal aminozuren				254	256
	voeder met 31,5% eiwit (McIntosh, 2000)	voeder met 22,5% eiwit (McIntosh, 2000)	(Tacon, 2000)	(Tacon et al., 2002)	(Ju et al., 2008)

McIntosh (2000) bepaalde eveneens het methioninegehalte in de gebruikte voeders. In het 31,5% eiwit-voeder bedroeg het methioninegehalte 6,5 g/kg DS, in het 22,5% eiwit-voeder 3,5 g/kg DS en in het op granen gebaseerde voeder 3 g/kg DS. Wanneer de resultaten van deze analyses van voeders vergeleken worden met de methionine-inhoud van de bio-vlokken, dan lijken de bio-vlokken, met uitzondering van die in de tank waaraan voeder met 22,5% eiwit toegediend wordt bij McIntosh(2000), een gelijkaardig gehalte aan methionine te bevatten als de gebruikte voeders. Dit dient bevestigd te worden aan de hand van analyses op andere types bio-vlokken en andere commerciële voeders voor zowel garnalen als tilapia.

### 2.2.1 Vetzuurprofiel

Naast de vetinhoud werd ook het vetzuurprofiel van de bio-vlokken bepaald. Uit de resultaten van dit onderzoek blijkt dat de koolstofbron een effect heeft op zowel het vetgehalte als op het vetzuurprofiel. Zo was de concentratie aan linolzuur in de betaïne-bio-vlokken veel hoger dan in de drie andere types bio-vlokken (namelijk zo'n 15 mg/g DS meer) en werd in de MBA-bio-vlokken een hogere concentratie aan myristoleïnezuur (14:1(n-5)) teruggevonden.

Het vetzuurprofiel is vooral van belang wanneer de bio-vlokken als voedsel dienen voor het aquacultuurdier. Dieren kunnen namelijk bepaalde vetzuren niet produceren waardoor het essentieel is dat ze er voldoende opnemen aan de hand van hun dieet.

Typisch wordt bij essentiële vetzuren gedacht aan n-3 en n-6 poly-onverzadigde vetzuren (PUFA'S). De verhouding waarin deze vetzuren in het voeder aanwezig moeten zijn, is afhankelijk van het gekweekte dier. Algemeen kan gesteld worden dat koudwatervissen meer n-3 PUFA'S vereisen en warmwatervissen, zoals tilapia, meer n-6 PUFA'S. Andere soorten, zoals

bijvoorbeeld karper, vereisen zowel n-3 als n-6 PUFA'S (Webster en Lim, 2002). Een typisch voorbeeld van n-3 PUFA'S is  $\alpha$ -linoleenzuur (18:3(n-3), ALA) en van de n-6 PUFA'S linolzuur (18:2(n-6) (LA)). Zowel LA als ALA zijn voor de meeste aquatische dieren essentiële PUFA'S (Craig en Halfrich, 2002; Izquierdo et al., 2006).

EPA en DHA zijn de belangrijkste essentiële n-3 sterk onverzadigde vetzuren (HUFA'S). Het is echter niet steeds nodig om ze in het voeder te voorzien, want bijvoorbeeld zoetwatervissen beschikken over enzymen om C18 PUFA'S in langere n-3 HUFA'S om te zetten. Indien dit mogelijk is zijn de C18 PUFA'S, zoals ALA, natuurlijk noodzakelijk in het voeder. Zo bevat het voeder voor zoetwatervissen vaak 0,5-1,5% ALA op DS (Craig en Helfrich, 2002). Mariene vissen kunnen deze omzetting tot n-3 HUFA'S echter niet uitvoeren en penaeide garnalen slechts in beperkte mate waardoor EPA en DHA essentieel zijn in hun voeder (Craig en Helfrich, 2002; Teshima, 1998). In het voeder voor mariene vissen zijn typisch 0,5-2,0% n-3 HUFA'S op DS aanwezig (Craig en Helfrich, 2002). Hiervoor kan bijvoorbeeld visolie toegediend worden aan het voeder. Mariene visolie is rijk aan DHA en EPA doordat de n-3 HUFA'S die geproduceerd worden door mariene micro-algen via de voedselketen accumuleren in de vissoorten die gebruikt worden om de visolie te produceren. Er wordt echter ook EPA en DHA toegevoegd aan het voeder van dieren die deze vetzuren zelf kunnen aanmaken uit C18 PUFA'S omdat de dieren dan geen energie dienen te gebruiken voor deze omzettingen. Hierbij dient opgemerkt te worden dat Izquierdo et al. (2006) op basis van hun onderzoeksresultaten de hypothese opstelden dat de ratio EPA/DHA belangrijk is in de weefsels van het bestudeerde species *Penaeus monodon* waardoor ook de verhouding van de concentraties aan EPA en DHA in het voeder belangrijk is. Het zou dus niet voldoende zijn om voeder met een hoge concentratie van enkel DHA of EPA toe te dienen om een betere groei te bekomen.

Arachidonzuur (20:4(n-6)) is een essentieel n-6 HUFA voor verschillende vissoorten maar wegens elkaar tegensprekende onderzoeksresultaten is het nog niet duidelijk of ARA ook voor de penaeide garnalen essentieel is (Izquierdo et al., 2006).

Wanneer bio-vlokken deel uitmaken van het dieet van de aquacultuurdieren, moet er minder voeder toegediend worden aan het systeem. Izquierdo et al. (2006) stelden aan de hand van de gehalten aan bepaalde vetzuren in de bio-vlokken enerzijds en in het weefsel van penaeide garnalen anderzijds vast dat onder andere n-3 vetzuren uit de bio-vlokken door de garnalen opgenomen kunnen worden. Bio-vlokken kunnen dus voor de aanvoer van vetzuren zorgen voor het gekweekte aquacultuurdier. Het is dus belangrijk dat de kweker bij de toepassing van BFT weet welke essentiële vetzuren voldoende voorkomen in de bio-vlokken en welke bijgedoseerd moeten worden via het toegediende voeder om deficiënties te voorkomen.

In dit onderzoek was de concentratie aan ALA, EPA en DHA in de vier beschouwde types bio-vlokken zeer laag. De concentratie aan LA bedroeg in de betaïne-bio-vlokken gemiddeld  $17 \pm 5$  mg/g DS terwijl ze in de zetmeel- en MBA-bio-vlokken respectievelijk slechts 2,2 en 1,8 mg/g DS bedroeg. De bio-vlokken die in dit onderzoek bestudeerd werden, kunnen dus niet volledig voldoen aan de vraag aan essentiële vetzuren van het aquacultuurdier.

In het verleden werden reeds vetzuurprofielen van bio-vlokken bepaald door onder andere Izquierdo et al. (2006), Azim en Little (2008) en Crab et al. (2009b). Izquierdo et al. (2006)

onderzochten bio-vlokken uit zero water-exchange-systemen met penaeïde garnalen waaraan een voeder met ofwel visolie ofwel olijfolie werd toegediend. Azim en Little (2008) bestudeerden bio-vlokken uit tilapiasystemen waarin een voeder met ofwel 35% eiwit ofwel 24% eiwit werd toegepast. De nutritionele eigenschappen van deze bio-vlokken werden reeds besproken in 1.2. Zowel bij Izquierdo et al. (2006) als bij Azim en Little (2008) werd er geen extra koolstofbron voor de bio-vlokken toegevoegd. Crab et al. (2009b) bepaalden het vetzuurprofiel in bio-vlokken afkomstig uit reactors met een analoge opstelling en omstandigheden als de reactors in dit onderzoek. In deze reactors werd acetaat, glycerol of glucose als koolstofbron voor de bio-vlokken gebruikt. Eveneens werd een reactor waaraan glycerol werd toegediend als koolstofbron, geïnoculeerd met *Bacillus* ('glycerol+Bacillus-bio-vlokken'). Hierna volgt een vergelijking tussen de vetzuurprofielen van de bio-vlokken in de hiervoor beschreven onderzoeken en die die in dit onderzoek teruggevonden werden.

Azim en Little (2008) vonden in de bio-vlokken uit een tilapiasysteem gelijkaardige concentraties aan palmitinezuur (16:0) terug als in dit onderzoek, namelijk 6 mg/g DS. Bij Izquierdo et al. (2006) en bij Crab et al. (2009b) waren de palmitinezuurconcentraties in de bio-vlokken heel wat hoger (15-26 mg/g DS) dan in dit onderzoek, behalve in de acetaat-bio-vlokken waarin de concentratie bij Crab et al. (2009b) lager was dan in de acetaat-bio-vlokken in dit onderzoek (namelijk 2,2 ten opzichte van 5,5 mg/g DS).

Izquierdo et al. (2006) vonden in beide types bio-vlokken gehalten palmitoleïnezuur (16:1(n-7)) terug die gelijkaardig zijn aan de concentraties in de acetaat-, zetmeel- en MBA-bio-vlokken in dit onderzoek (respectievelijk 7-9 en 8-10 mg/g DS). Bij Crab et al. (2009b) lagen de concentraties aan palmitoleïnezuur lager (3-5 mg/g DS) dan bij deze drie types vlokken.

De concentratie aan stearinezuur (18:0) in de acetaat-bio-vlokken bij Crab et al. (2009b) was dezelfde als die in dit onderzoek, namelijk 0,5 mg/g DS. De concentraties in de glycerol-, glycerol+Bacillus- en glucose-bio-vlokken waren iets hoger dan die in de andere drie types bio-vlokken in dit onderzoek (4-7 mg/g DS ten opzichte van 1-4 mg/g DS).

In de bio-vlokken uit het systeem waaraan olijfolie werd toegediend bij Izquierdo et al. (2006) werd een gelijkaardige concentratie aan oleïnezuur (18:1(n-9)) teruggevonden als in dit onderzoek (4 mg/g DS). De waarden in de bio-vlokken uit het andere systeem bij Izquierdo et al. (2006) en die in de bio-vlokken bij Crab et al. (2009b) waren hoger (in de glucose+Bacillus-bio-vlokken bij Crab et al. (2009) zelfs tot 25 mg/g DS hoger).

Het gehalte aan linolzuur in de bio-vlokken uit het systeem waaraan olijfolie werd toegevoegd (Izquierdo et al., 2006) was ongeveer gelijk aan het gehalte in de zetmeel- en MBA-bio-vlokken in dit onderzoek (2 mg/g DS). De concentratie in de bio-vlokken uit het systeem waaraan visolie werd toegevoegd (Izquierdo et al., 2006) was ongeveer gelijk aan de concentratie aan linolzuur in de bio-vlokken uit beide systemen bij Azim en Little (2008) en in de acetaat-bio-vlokken bij Crab et al. (2009b), namelijk 5-6 mg/g DS. Crab et al. (2009b) vonden in de andere drie types bio-vlokken echter gehalten aan linolzuur terug die eerder vergelijkbaar zijn met die in de betaïne-bio-vlokken in dit onderzoek (11-28 mg/g DS).

Het feit dat de gehalten aan specifieke vetzuren zoals palmitinezuur en palmitoleïnezuur in de bio-vlokken in een reactor (zoals in dit onderzoek en bij Crab et al. (2009b)) en in een aquacultuursysteem waar de bio-vlokken zich tussen de gekweekte dieren bevinden (zoals bij Izquierdo et al. (2006) en Azim en Little (2008)) gelijkaardig zijn lijkt te indiceren dat de in situ consumptie van bio-vlokken geen grote invloed heeft op het vetzuurprofiel van de vetten in de bio-vlokken.

De n-6/n-3 vetzuurverhouding in de glycerol- en glycerol+Bacillus-bio-vlokken bij Crab et al. (2009b), namelijk 39, was gelijkaardig aan die in de betaïne-bio-vlokken in dit onderzoek, namelijk 34, en veel hoger dan in de andere types bio-vlokken in zowel dit onderzoek als dat van Crab et al. (2009b). Deze grotere n-6/n-3 wordt veroorzaakt door een hogere concentratie aan linolzuur in deze types bio-vlokken. Het is mogelijk dat de verklaring voor dit verschil tussen de types bio-vlokken in de gebruikte koolstofbron kan gevonden worden.

De n-6/n-3 verhouding in de acetaat-bio-vlokken was bij Crab et al. (2009b) veel hoger dan in dit onderzoek, respectievelijk 18 en 0,6. De n-6/n-3 verhouding in de acetaat- en glucose-bio-vlokken bij Crab et al. (2009b) is ongeveer gelijk aan die in de twee types bio-vlokken bij Azim en Little (2008), respectievelijk 18 en 12-19.

### 2.2.2 Vitamines

Er zijn twee grote groepen van vitamines, namelijk de wateroplosbare en de vetoplosbare. Ascorbinezuur behoort tot de wateroplosbare vitamines en is een anti-oxidant die tevens belangrijk zou zijn voor het immuunsysteem van de vis (Craig en Helfrich, 2002).

De vitamine C-inhoud van de acetaat-bio-vlokken die in dit onderzoek teruggevonden werd is groter dan de concentraties die door Crab et al. (2009b) bekomen werden in eenzelfde opstelling onder analoge condities. Bij de start van de test bevatten de acetaat-bio-vlokken toen 6 µg/g DW ascorbinezuur, de glycerol-bio-vlokken 54 µg/g DW, de glycerol+Bacillus-bio-vlokken 54 µg/g DW en de glucose-bio-vlokken 0 µg/g DW.

Aangezien zo goed als geen enkele vis over het laatste enzym van de biosynthese-pathway van vitamine C beschikken, dient vitamine C via het dieet ter beschikking gesteld te worden.

Er werd door Shiao en Jan (1992) vastgesteld dat een concentratie van 80 µg ascorbinezuur/g voeder noodzakelijk is voor een maximale groei van tilapia. Voor garnalen werden vereisten van 100-430 µg/g voeder voorgesteld (McVey, 1993).

Aangezien in de acetaat-bio-vlokken in dit onderzoek  $490 \pm 149$  µg/g DS ascorbinezuur teruggevonden werd, zouden deze bio-vlokken dus kunnen voldoen aan de vitamine C-behoefte van de vermelde dieren wanneer deze in een aquacultuursysteem met BFT gekweekt worden.

Het gehalte aan vitamine C dat door Crab et al. (2009b) in de glycerol-bio-vlokken werd teruggevonden (54 µg/g DS) zou ook voor een deel in de vitamine C-behoefte van deze diersoorten kunnen voorzien.

In de literatuur zijn er aanwijzingen te vinden dat betaïne, doordat het een methyl donor is, de productie van vitamine B12 door bepaalde micro-organismen stimuleert. Dit wordt in de praktijk

toegepast voor de industriële productie van vitamine B12 aan de hand van fermentatie (Li et al., 2008).

Vitamine B12 is een water-oplosbare vitamine die niet aangemaakt kan worden door planten of dieren. Hierdoor zijn dieren afhankelijk van micro-organismen die vitamine B12 aanmaken om in hun vraag te voorzien.

Vitamine B12 speelt een rol in de vorming van erythrocyten, in het metabolisme van vetzuren met een oneven aantal koolstofatomen en het is een methyl donor.

Er werden testen uitgevoerd om te bepalen of *Penaeus monodon* naast zijn dieet nog een extra nood aan vitamine B12 heeft, maar dit bleek niet zo te zijn (Mc Vey, 1993). Ook bij tilapia werd aangetoond dat er geen vitamine B12 voorzien dient te worden in het voeder. Dit kan verklaard worden doordat er in het gastrointestinaal kanaal van tilapia een bacteriële synthese van vitamine B12 plaatsvindt.

### 2.2.3 PHB

Poly- $\beta$ -hydroxybutyraat (PHB) is een intracellulair biodegradeerbaar polymeer dat door een grote verscheidenheid aan micro-organismen geproduceerd wordt en dat betrokken is in de bacteriële koolstof- en energie-opslag (Defoirdt et al., 2007). Het zou nuttig kunnen zijn om deze parameter te betrekken in de bepaling van de kwaliteit van bio-vlokken aangezien aangetoond werd dat deze molecule als preventief of curatief beschermer van *Artemia franciscana* tegen infecties door vibrio kan optreden (Defoirdt et al., 2007). Er wordt verondersteld dat dit beschermend effect veroorzaakt wordt doordat aan de hand van PHB korte ketenvetzuren in het gastrointestinaal kanaal van de *Artemia* terechtkomen waar ze dan hun bacteriostatische of bactericidale activiteit kunnen uitvoeren (Defoirdt et al., 2007; Rieke, 2003).

De PHB-concentratie in de acetaat-bio-vlokken is echter lager dan de concentratie die werd teruggevonden door De Schryver en Verstraete (2009) in bio-vlokken in een SBR waardoor gesimuleerd aquacultuur-water werd gestuurd en waaraan acetaat werd toegediend zodat C/N=10 (24-26°C). In de glycerol-bio-vlokken werd toen 0,9% PHB op DS teruggevonden en in de acetaat-bio-vlokken 13% DS.

De hogere inhoud van de acetaat-bio-vlokken werd door De Schryver en Verstraete (2009) gerelateerd aan het feit dat acetaat een precursor is van PHB (Salehizadeh en Van Loosdrecht, 2004). Alhoewel de PHB-concentratie in de acetaat-bio-vlokken in dit onderzoek lager is dan die bij De Schryver en Verstraete (2009), lijken de resultaten wel te bevestigen dat het gehalte aan PHB groter is wanneer acetaat als C-bron voor de bio-vlokken gebruikt wordt dan indien er een andere C-bron gebruikt wordt die geen precursor is voor PHB. Deze resultaten ondersteunen ook de stelling van De Schryver en Verstraete (2009) dat het mogelijk is om via bio-vlokken een substantiële hoeveelheid PHB aan het gekweekte aquacultuurdier te leveren.

## 2.3 Moleculaire analyses van de bio-vlokken

De DNA-extractie, DNA-opzuivering en PCR werden uitgevoerd, maar wegens praktische problemen werden geen bruikbare DGGE-resultaten bekomen.



**Tabel 34. Winst/verlies bij het gebruik van verschillende koolstofbronnen voor BFT.**

C-bron	C-inhoud (%)	hoeveelheid (kg/kg vis)	kostprijs* (€/kg)	kostprijs (€/kg vis)	winst/verlies (€/kg vis)	*: bron
acetaat	29	1,773	0,57	1,01	-0,24	ICIS Pricing - Europa (08/2008)
			0,31	0,56	0,21	Indian Chemicals (08/2008)
zetmeel	44	1,169	0,24	0,28	0,50	Indian Chemicals (08/2008)
betaïne	39	1,319	1,32	1,74	-0,97	Chinese producenten (07/2009)
suiker	42	1,224	0,22	0,27	0,50	International Sugar Organisation (09/2008)
glycerol	31	1,659	0,15	0,25	0,52	Proviron - België (09/2008)
			0,08	0,14	0,63	The Jacobson - USA (01/2009)

## 2.4 Financiële impact van de toepassing van BFT in een aquacultuursysteem

Naast het gebruik van BFT voor de zuivering van water in het aquacultuursysteem, blijkt uit de biochemische analyses dat de bio-vlokken ook geschikt zijn om als voedsel voor het aquacultuurdier te dienen. De toepassing van BFT voor de generatie van voedsel voor de dieren heeft ook financiële gevolgen aangezien hierdoor minder voeder aangekocht moet worden. Daarom werd er getracht om de financiële impact van de toepassing van BFT op de operatiekosten in de aquacultuur van tilapia in te schatten.

Hiervoor werd uitgegaan van de veronderstellingen dat de FCR 3 bedraagt (worst case van de gemiddelde FCR van 1-3 (Naylor et al., 2000)) en dat 25% van het voeder wordt omgezet in oogstbaar product (Avnimelech en Ritvo, 2003). Verder werd ook verondersteld dat eiwit 25% van de massa vis of bio-vlokken uitmaakt en dat het stikstofgehalte in eiwit 16% bedraagt (Craig en Helfrich, 2002). Op basis van deze veronderstellingen werd berekend dat de FCR bij toepassing van BFT 1,7 bedraagt. Deze besparing van 1,3 kg voeder/kg vis (conventioneel voeder met een kostprijs van 0,6 €/kg in België) werd vergeleken met de kostprijs voor het gebruik van een extra koolstofbron. Er werd verondersteld dat de koolstofbron werd toegediend zodat in het systeem een C/N van 10 geldt waardoor theoretisch gezien al het stikstofafval in microbiële biomassa omgezet kan worden aangezien de C/N van bacteriën 5 is (Eding et al., 2006) en de opbrengst 0,5 g biomassa/g substraat is (Verstraete et al., 2007). De kostprijs van de verschillende koolstofbronnen en de respectievelijke winst/verliessaldo's worden weergegeven in Tabel 34. Deze berekeningen wijzen uit dat de meeste beschouwde koolstofbronnen bruikbaar zijn om op een economisch haalbare manier aan BFT te doen. In het geval van betaïne kan overwogen

worden om slechts een fractie van de extra koolstofbron in de vorm van het duurdere betaine toe te dienen.

Het is wenselijk om indien mogelijk afvalstromen uit lokale industrieën te gebruiken aangezien dit goedkope en steeds voorradige koolstofbronnen zijn. Het gebruik van een afvalproduct in de plaats van een grondstof is ook wenselijk uit ecologisch oogpunt.

## 2.5 Morfologie en taxonomische samenstelling van de bio-vlokken

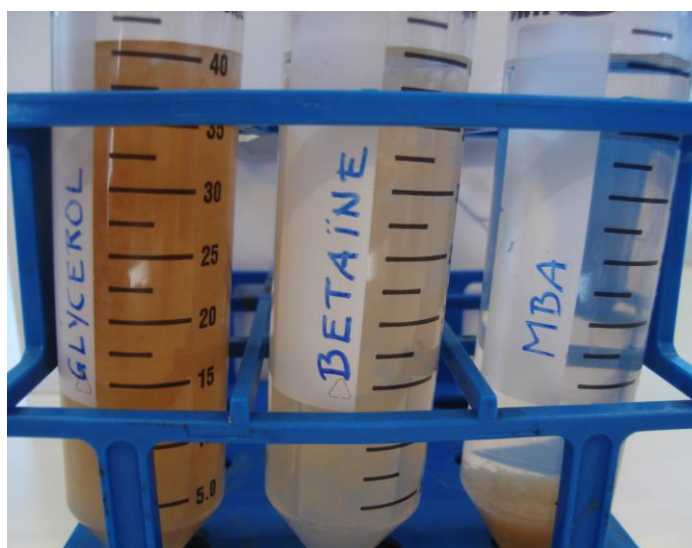
Het is gekend dat de culturomstandigheden die in een systeem toegepast worden (C/N, temperatuur, agitatie,...) selecteren voor bepaalde micro-organismen. Een voorbeeld hiervan is de selectie voor anaërobe of thermofiele micro-organismen. In dit onderzoek bevonden de verschillende types bio-vlokken zich echter in reactors met vergelijkbare culturomstandigheden, waardoor de waargenomen verschillen tussen de bio-vlokken aan het gebruik van de verschillende koolstofbronnen kunnen worden toegeschreven.

De biochemische analyses tonen aan dat de koolstofbron een belangrijke invloed heeft op het eiwitgehalte en aldus op de nutritionele eigenschappen van de bio-vlokken (Tabel 13). Dit verschil in eiwitgehalte tussen de verschillende types bio-vlokken kan niet enkel door het inoculum verklaard worden aangezien voor respectievelijk de acetaat- en zetmeel-bio-vlokken en de betaine- en MBA-bio-vlokken hetzelfde inoculum werd gebruikt. Verder is er ook een verschil in het gehalte aan SS en VSS in de verschillende types bio-vlokken (Figuur 8). Deze verschillen kunnen veroorzaakt worden door ofwel de selectie van verschillende microbiële species met een verschillende celopbrengst door het gebruik van verschillende koolstofbronnen ofwel doordat de gebruikte koolstofbron bij dezelfde aanwezige microbiële gemeenschap een lagere of hogere celopbrengst veroorzaakt naargelang ze moeilijker of makkelijker te metaboliseren is.

Dat niet enkel de koolstofbron bepalend is voor de selectie van de micro-organismen blijkt uit de SVI-waarden van de bio-vlokken die in Tabel 35 per reactor weergegeven worden. Tussen de verschillende types bio-vlokken is er een groot verschil in SVI. Het is echter duidelijk te zien dat er ook tussen de reactors van hetzelfde type bio-vlokken verschillen optreden in de SVI. Aangezien het hier gaat om reactors waaraan dezelfde koolstofbron wordt toegediend, moet er een andere factor zijn die deze verschillen veroorzaakt. De SVI wordt berekend aan de hand van het slibvolume en de SS van de bio-vlokken. Ter illustratie van het verschil in slibvolume tussen de verschillende types bio-vlokken wordt een foto van falcontubes met acetaat-, MBA- en glycerol-bio-vlokken na 20 minuten bezinken, weergegeven in Figuur 26. Het dient echter opgemerkt te worden dat het slibvolume niet constant was gedurende de ganse periode dat de reactors onderhouden werden. Zo daalde het slibvolume van de glycerol-bio-vlokken plots heel sterk na het beëindigen van de analyses voor de nutritionele eigenschappen. Dit duidt erop dat er een kwalitatieve wijziging heeft plaatsgevonden in de glycerol-bio-vlokken. De in Tabel 35 waarneembare fluctuaties in de SVI worden voornamelijk bepaald door wijzigingen in het slibvolume.

**Tabel 35. SVI-waarden van de bio-vlokken in de verschillende reactors tijdens de periode dat de nutritionele eigenschappen werden opgevolgd. De waarden worden weergegeven in mL/g.**

dag	acetaat1	acetaat2	zetmeel1	zetmeel2	betaine1	betaine2	MBA1	MBA2
0	115	138	368	280	1007	1032	185	267
5	112	120	594	260				
7					733	881	152	140
9	148	120	1146	446				
13	130	101	406	286				
20					444	463	180	188

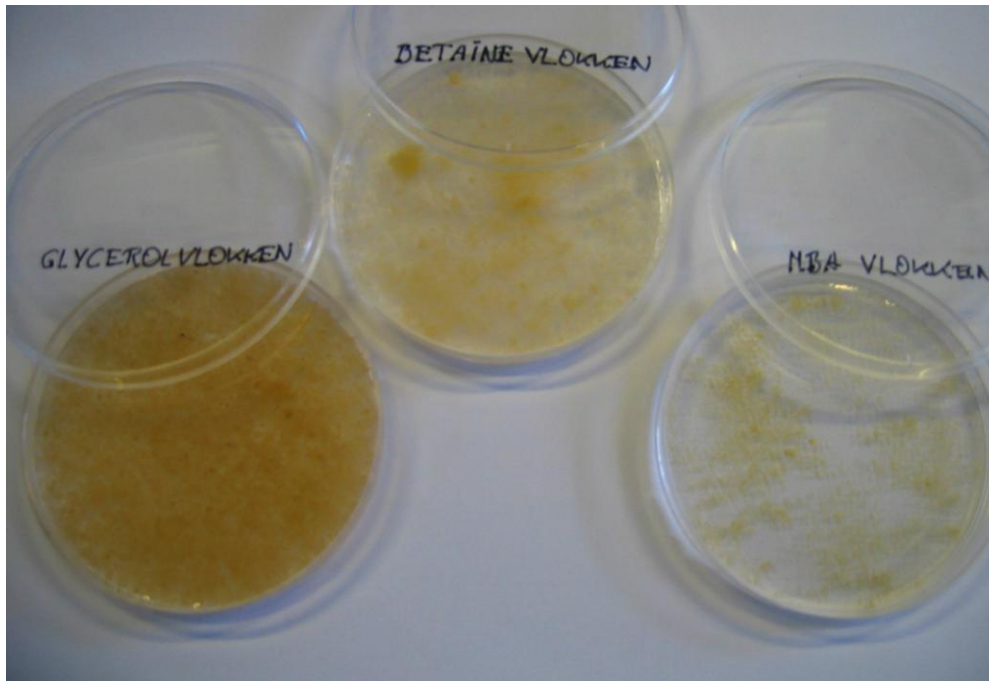


**Figuur 26: Falcontubes met glycerol-, acetaat- en MBA-bio-vlokken na 20 minuten sedimentatie.**

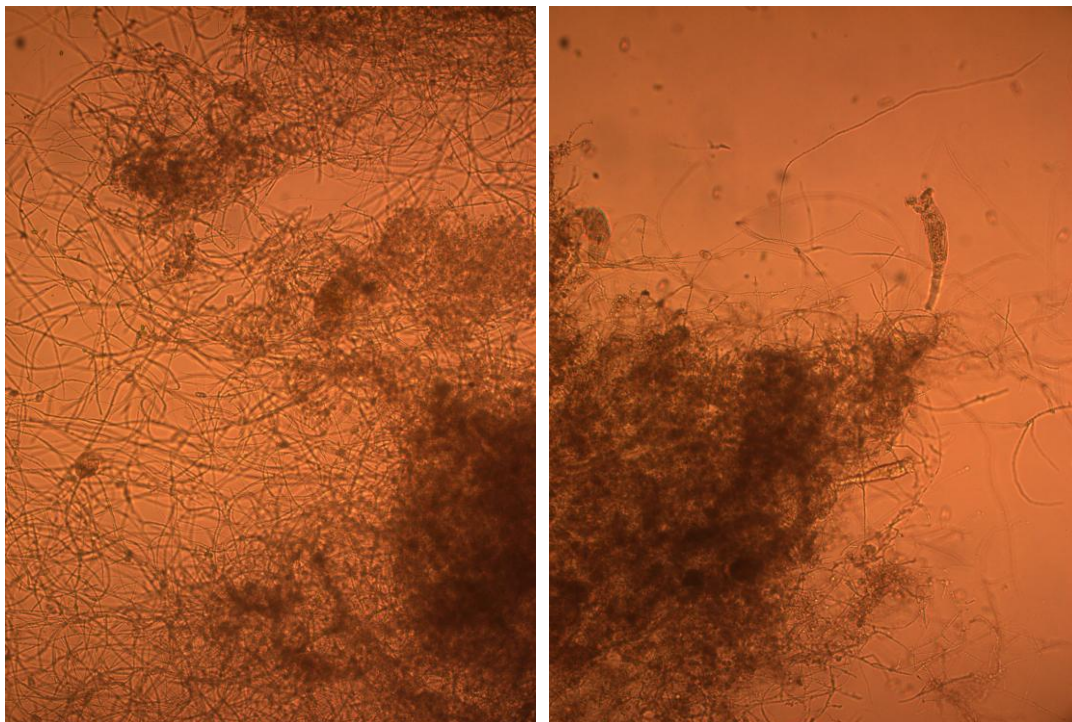
Ebeling et al. (2006) stelden de VSS gelijk aan de biomassa in de bio-vlokken. Wanneer deze interpretatie wordt gebruikt, kan gesteld worden dat het gebruik van acetaat of betaine als koolstofbron voor een hogere productiviteit per toegevoegde CZV zorgt dan het gebruik van zetmeel of MBA. Een mogelijke verklaring hiervoor is dat acetaat en betaine minder complexe koolstofbronnen zijn dan zetmeel en MBA.

Doordat de analyses voor de bepaling van de nutritionele waarde van de bio-vlokken aantoonde dat het eiwitgehalte in de betaine-bio-vlokken significant hoger is dan dat in de acetaat-bio-vlokken terwijl het gehalte aan VSS gelijkaardig is, kan geconcludeerd worden dat de micro-organismen in de betaine-bio-vlokken relatief gezien ten opzichte van de totale productiviteit meer eiwit vormen dan die in de acetaat-bio-vlokken. Deze hogere relatieve productie van eiwit zou bijvoorbeeld verklaard kunnen worden door de productie van een hoger gehalte aan extracellulaire eiwitten in de betaine-bio-vlokken. Op de foto's van de bio-vlokken met behulp van een lichtmicroscop (Figuur 28, 12 en 13) is duidelijk te zien dat er meer filamenteuze micro-organismen aanwezig zijn in de betaine-bio-vlokken dan in de MBA- en glycerol-bio-vlokken.

Een andere duidelijke aanwijzing voor het verschil tussen de microbiële gemeenschappen in de verschillende types bio-vlokken is het verschil in grootte en kleur. Dit wordt in Figuur 27 geïllustreerd voor de glycerol-, betaïne- en MBA-bio-vlokken.

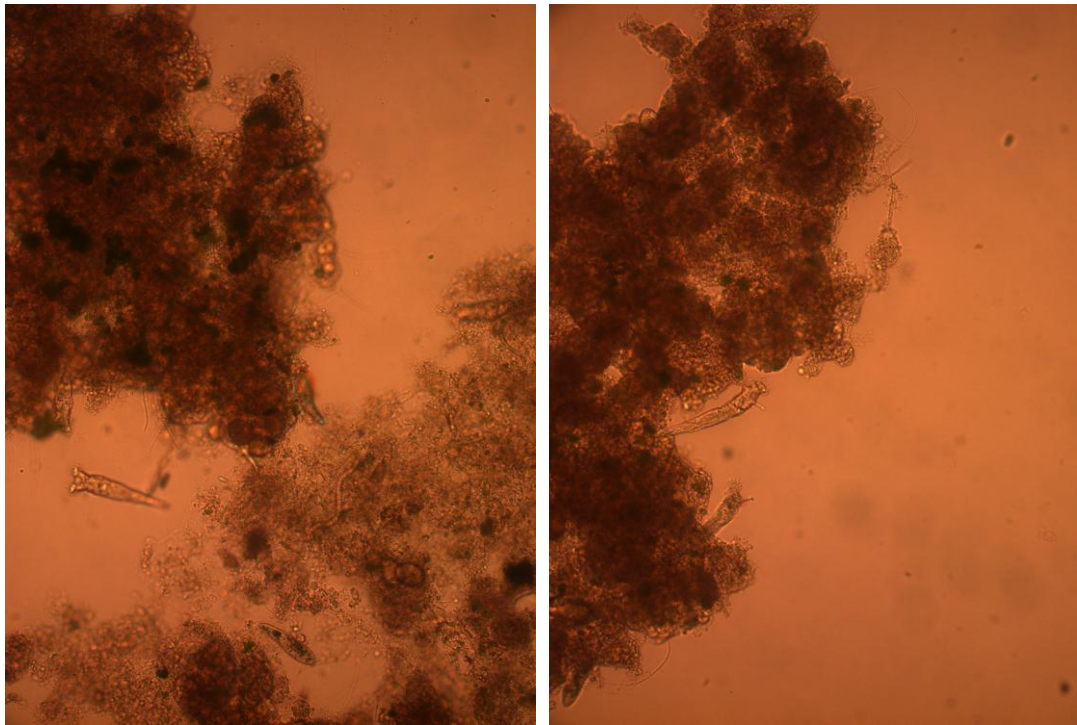


Figuur 27. Foto van de glycerol-, betaïne- en MBA-bio-vlokken. Het verschil in kleur en vlogrootte van de verschillende types bio-vlokken is duidelijk te zien.

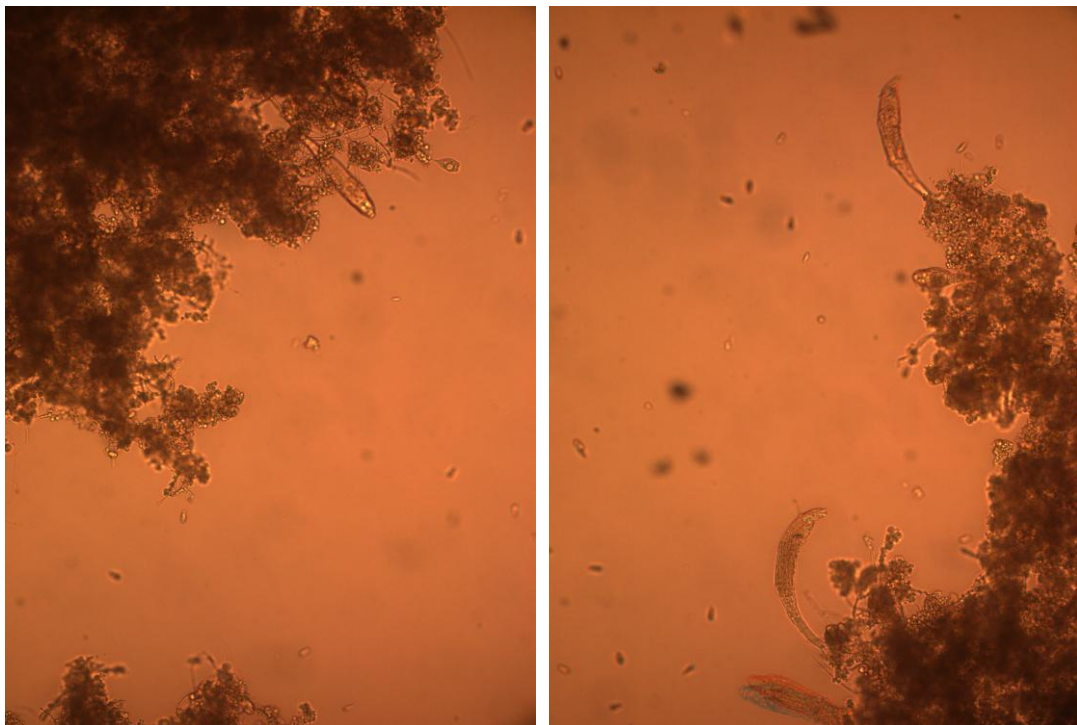


Figuur 28. Foto's van de betaïne-bio-vlokken aan de hand van een lichtmicroscop (Zeiss Axioskop 2 Plus), 10x vergroot.





**Figuur 29.** Foto's van de MBA-bio-vlokken aan de hand van een lichtmicroscop (Zeiss Axioskop 2 Plus), 10x vergroot.



**Figuur 30.** Foto's van de glycerol-bio-vlokken aan de hand van een lichtmicroscop (Zeiss Axioskop 2 Plus), 10x vergroot.

Er werden geen analyses uitgevoerd om te bepalen welke organismen juist in welk type bio-vlokken voorkomen, maar op basis van de reeds besproken analyseresultaten, de foto's aan de

hand van de microscoop en gegevens uit de literatuur kunnen toch enkele voorzichtige uitspraken gedaan worden.

Zo suggereert de aanwezigheid van hoge concentraties van de vetzuren 16:0, 16:1(n-7) en 18:1(n-7) volgens Izquierdo et al. (2006) dat er microbiële gemeenschappen uit slib aanwezig zijn in de bio-vlokken. Ook hier zijn deze vetzuren in aanzienlijke concentraties aanwezig in de verschillende types bio-vlokken.

Jorand et al. (1995) definieerden microbiële vlokken als een heterogeen mengsel van vlokvormende en filamenteuze micro-organismen, partikels, colloïden, organische polymeren, kationen en dode cellen.

Op de microscopiefoto's van de betaïne-bio-vlokken (Figuur 28) is duidelijk te zien dat er naast de vlokvormende micro-organismen ook veel filamenteuze micro-organismen aanwezig zijn en dit zowel in de vlok als aan de periferie van de vlok. Deze waarneming wordt ondersteund door de hoge SVI-waarde van de betaïne-bio-vlokken aangezien filamenteuze bacteriën ervoor zorgen dat de bio-vlokken zeer poreus zijn waardoor het vlokvolume groter is.

In Figuur 26 is te zien dat de glycerol-bio-vlokken ook een groot vlokvolume hebben, maar op de microscopiefoto's in Figuur 30 kan vastgesteld worden dat er veel minder filamenteuze bacteriën aanwezig zijn dan in de bio-vlokken die met betaïne gevoed worden. Het is echter duidelijk zichtbaar op de foto in Figuur 27 dat de glycerol- en betaïne-bio-vlokken omvangrijker zijn dan de MBA-bio-vlokken waardoor verondersteld kan worden dat de grootte van de bio-vlokken ook een belangrijke rol speelt in het slibvolume.

Naast het feit dat de MBA-bio-vlokken veel kleiner zijn dan de andere types bio-vlokken en dat ze heel snel bezinken, is het opvallend dat er groene deeltjes in zichtbaar zijn (zie Figuur 29), waarschijnlijk zijn dit algen. Bij het bekijken onder de microscoop van bio-vlokken die net uit de reactors kwamen, konden opmerkelijk meer rotiferen waargenomen worden in de MBA-bio-vlokken dan in de betaïne- en glycerol-bio-vlokken. Deze rotiferen voeden zich met de bacteriën in de oplossing en in de bio-vlokken.

In alle drie de types bio-vlokken die onder de microscoop bekeken werden, waren protozoa aanwezig. Ook de protozoa voeden zich met de micro-organismen in de bio-vlokken. Volgens Young (2006) is de bescherming tegen predatie door protozoa één van de redenen waarom micro-organismen zich aggregeren aangezien dan slechts de micro-organismen aan de periferie toegankelijk zijn voor de protozoa.

In de MBA-bio-vlokken konden ook oligochaeta opgemerkt worden (zie Figuur 29).

Azim en Little (2008) bepaalden de taxonomische compositie van organismen in de bio-vlokken in hun onderzoek. Bij de rotiferen werden de genera *Lecane*, *Trichocerca*, *Polyarthra* en *Asplancha* teruggevonden. Bij de protozoa domineerden de genera *Paramecium*, *Tetrahymena* en *Petalomonas*. Ook werd een oligochaete, namelijk *Tubifex*, teruggevonden.

## 2.6 Conclusie

Er werd vastgesteld dat de acetaat-, zetmeel-, betaine- en MBA-bio-vlokken de TAN voldoende uit het water verwijderden, waardoor verondersteld kan worden dat deze types bio-vlokken in een commercieel aquacultuursysteem voor voldoende zuivering van het water en het onderhoud van een goede waterkwaliteit zouden kunnen zorgen.

De biochemische analyses van de bio-vlokken wezen uit dat alle vier de beschouwde types bio-vlokken mogelijk bruikbaar zijn als voedsel in aquacultuur indien aan de hand van commercieel voeder de eventuele tekorten aan bijvoorbeeld vet gecompenseerd worden. De analyses wezen duidelijk aan dat de bio-vlokken een belangrijke bron van eiwit voor de aquacultuurdieren kunnen zijn. De geschiktheid als voedsel van de verschillende types bio-vlokken dient aan de hand van aquatische organismen bevestigd te worden.

De analyses van de specifiekere componenten die essentieel zijn in het dieet van een aquacultuurdier wezen uit dat geen enkele van de beschouwde types bio-vlokken volledig aan de vraag aan essentiële vetzuren kon voldoen en dat enkel de acetaat-bio-vlokken voldoende vitamine C bevatten. De aanvoer van deze componenten dient dus eerder via het commerciële voeder dan aan de hand van de productie van bio-vlokken verzekerd te worden.

Voor al de beschouwde types bio-vlokken, behalve die met betaine als koolstofbron, lijkt de toepassing, afhankelijk van de geografische ligging, in de praktijk economisch haalbaar. Het gebruik van betaine als koolstofbron zou echter als bijkomend voordeel kunnen hebben dat het de bio-vlokken attractiever maakt voor consumptie door het aquacultuurdier. Daarom kan het interessant zijn om betaine slechts voor een klein deel van de vraag naar koolstofbron van de bio-vlokken te laten instaan en voor de rest een goedkopere component te gebruiken, waardoor deze bio-vlokken wel op een economisch haalbare manier toepasbaar zouden kunnen zijn. Van deze bio-vlokken kan dan aan de hand van voedertesten nagegaan te worden of ze attractiever zijn voor consumptie door het aquacultuurdier dan bio-vlokken waar geen betaine aan werd toegevoegd. Indien betaine er inderdaad voor zorgt dat bio-vlokken attractiever zijn voor consumptie, dan kan dit de mogelijkheid bieden om BFT toe te passen in de aquacultuur van diersoorten waarvoor dit momenteel nog niet mogelijk is wegens het eetgedrag van de gekweekte diersoort.

Het gebruik van glycerol als koolstofbron voor de bio-vlokken is dan weer aan te moedigen omdat het een nevenproduct is van een andere industrie, namelijk de productie van bio-diesel. Hierdoor is een constante, goedkope aanvoer van de koolstofbron waarschijnlijk, wat kan bijdragen tot de economische haalbaarheid van BFT in een bepaalde regio.

De afbraak van zetmeel is complexer dan die van bijvoorbeeld suiker, waardoor de micro-organismen in de bio-vlokken meer verschillende enzymen dienen te produceren om zetmeel als koolstofbron te kunnen gebruiken. Hierdoor is het mogelijk dat er in de bio-vlokken enzymen aanwezig zijn die, wanneer de bio-vlokken geconsumeerd worden door het aquacultuurdier, voor een betere digestie van het voeder en de bio-vlokken zorgen. Gezien de korte verblijftijd in het gastrointestinaal kanaal van aquacultuurdieren en de bijhorende onvolledige vertering, kan dit ervoor zorgen dat de efficiëntie van de vertering toeneemt waardoor minder commercieel

voeder toegediend moet worden. Dit dient eveneens aan de hand van voedertesten geverifieerd te worden.

Bij het gebruik van een complexe koolstofbron is de toepassing van een tweede koolstofbron, in analogie met wat gesuggereerd werd bij het gebruik van betaine, niet aan te bevelen. Er kan namelijk verwacht worden dat, indien er twee koolstofbronnen aanwezig zijn waarvan de ene makkelijker afbreekbaar is dan de andere, het zeer waarschijnlijk is dat de bacteriën die de makkelijk afbreekbare koolstofbron gebruiken de bacteriën die dit niet doen, zullen overgroeien wegens een snellere groei en hogere celopbrengst.



### 3 Luminescentie- en groeitesten

#### 3.1 Testen met de meting na 24u

Bij de eerste reeks testen met *Vibrio harveyi* werd ook de aanwezigheid van *Vibrio* spp. in de bio-vlokken nagegaan door een verdunningsreeks uit te platen op TCBS. Er werden geen kolonies gedetecteerd en *Vibrio* lijkt dus afwezig of is in kleine, niet meetbare/cultiveerbare aantallen aanwezig. In de volgende reeksen testen werd ervan uitgegaan dat dit niet wijzigt en werd deze test niet herhaald.

Bij de testen met *Vibrio harveyi* BB120 bleek de groei/overleving van *Vibrio harveyi* niet significant verschillend wanneer er al dan niet (geautoclaveerde) bio-vlokken of supernatans werden toegevoegd aan het medium.

De bioluminescentie daarentegen is significant verschillend tussen de controle en alle behandelingen.

Aangezien het toevoegen van geautoclaveerde bio-vlokken na 24u een effect heeft op de bioluminescentie en niet op de groei van de pathogeen *Vibrio harveyi* BB120, wijst dit erop dat iets in de structuur van de bio-vlokken het effect veroorzaakt en niet zozeer het competitie-element voor de aanwezige nutriënten van de levende vlokken. Een voorbeeld van een stof die zo'n effect kan veroorzaken, zijn de extracellulaire polysacchariden (EPS) van micro-organismen die gesitueerd zijn aan de buitenkant van de celwand of gesecreteerd worden in de vloeistof.

Dat ook het toevoegen van supernatans na 24u een effect heeft op de bioluminescentie van *Vibrio harveyi* is een indicatie dat de invloed op de pathogeen wordt veroorzaakt door een product dat in de oplossing wordt geëxcreteerd door de micro-organismen in de bio-vlokken of door een product dat op een andere wijze in de oplossing terecht kwam. Een voorbeeld van een stof die zo'n effect kan veroorzaken is een extracellulair enzym.

Vermits ook het geautoclaveerde supernatans een statistisch significant effect heeft op de bioluminescentie van *Vibrio harveyi* zijn de componenten die het effect veroorzaken hittestabiel aangezien bij autoclaveren gedurende 20min een temperatuur van 121°C wordt gehandhaafd. De component die het effect op de bioluminescentie veroorzaakt is dus hoogstwaarschijnlijk geen extracellulair enzym aangezien de meeste enzymen hittelabel zijn ( $Q_{10}$ -waarde), doch dit is niet uitgesloten.

Het waargenomen effect op de bioluminescentie is van belang omdat bioluminescentie pas optreedt wanneer er voldoende individuen van dezelfde soort aanwezig zijn en het dus gereguleerd wordt aan de hand van het quorum sensing-mechanisme. De bio-vlokken lijken dus een effect te hebben op de quorum sensing van de *Vibrio harveyi*.

Bij de testen met *Vibrio campbelli* is er enkel een significant verschil in bioluminescentie tussen de controle en de behandeling waarbij supernatans wordt toegevoegd. Er wordt echter verwacht dat wanneer er een effect is van het supernatans, er zeker ook een effect is bij toevoeging van de bio-vlokken aangezien alle componenten die in het supernatans aanwezig zijn ook aanwezig zouden moeten zijn in de vloeistof met bio-vlokken. De resultaten wijzen echter niet op een significant

effect van de bio-vlokken op zich, waardoor dit resultaat voor het supernatans als een gevolg van het geringe aantal metingen beschouwd wordt.

Analoog wordt het significante verschil in de celdensiteit tussen de controle en de behandeling waarbij geautoclaveerd supernatans wordt toegevoegd ook toegeschreven aan het geringe aantal metingen.

## 3.2 Testen met de meting gedurende 24u

### 3.2.1 Fysiologische oplossing

In de testen in FO wordt bij inoculatie met *Vibrio harveyi* of *Vibrio campbellii* dezelfde trend teruggevonden in de luminescentiemetingen. De luminescentie valt namelijk steeds binnen de 2u terug tot de waarde die wordt waargenomen in de welletjes waarin medium zonder pathogeen aanwezig is. Hieruit kan geconcludeerd worden dat de *Vibrio harveyi* en *Vibrio campbellii* niet luminescent zijn bij incubatie in fysiologische oplossing volgens de huidige proefopzet en dat dit onafhankelijk is van de aan- dan wel afwezigheid van bio-vlokken of afgeleiden.

De OD<sub>610</sub>-metingen in de testen met *Vibrio harveyi* in FO tonen een toename bij de behandelingen met glycerol-, betaïne- en MBA-bio-vlokken. Terwijl bij de behandelingen met de afgeleiden van de bio-vlokken en in de controle waarin enkel *Vibrio harveyi* aanwezig is in FO, de OD<sub>610</sub>-waarde nagenoeg constant blijft. Dit wijst er dus op dat er bacteriële groei is in de welletjes die bio-vlokken bevatten. Hoogstwaarschijnlijk zijn het bacteriën uit de bio-vlokken die groeien en aldus de toename in OD<sub>610</sub> veroorzaken en gaat dit niet om groei van *Vibrio harveyi*.

In de testen met *Vibrio campbellii* is er eveneens een toename van de OD<sub>610</sub>-waarde in de behandelingen met de drie types bio-vlokken. Er is echter in alle drie de gevallen ook een toename van de OD<sub>610</sub> in de controle waarin enkel *Vibrio campbellii* aanwezig is in FO. Bovendien is het zo dat de OD<sub>610</sub> bij de behandelingen met de afgeleiden in dezelfde mate toeneemt als in de controle met *Vibrio campbellii*. Aangezien er een OD<sub>610</sub>-toename wordt waargenomen in suspensies waarin de toegevoegde cultuur van *Vibrio campbellii* de enige niet steriele component is, kan geconcludeerd worden dat de OD<sub>610</sub>-toename door groei van *Vibrio campbellii* veroorzaakt wordt.

Bij de behandelingen met betaïne- en MBA-bio-vlokken in FO en in aanwezigheid van *Vibrio campbellii* neemt de OD<sub>610</sub> echter sterker en langduriger toe dan in de behandelingen met de afgeleiden of de controle, waardoor geconcludeerd kan worden dat de OD<sub>610</sub>-toename in deze suspensies minstens ten dele door de groei van bacteriën uit de bio-vlokken veroorzaakt wordt. Aan de hand van deze data kan niet uitgemaakt worden of deze waargenomen OD<sub>610</sub>-toename veroorzaakt wordt door de groei van bacteriën uit de bio-vlokken op zich of in combinatie met groei van *Vibrio campbellii*.

### 3.2.2 Mariene broth

In de testen met *Vibrio harveyi* is er bij de behandelingen met de glycerol- en MBA-bio-vlokken en afgeleiden en in de controles waarin enkel de pathogeen aanwezig is in het begin een toename van de luminescentie. Hierna valt de luminescentie, net zoals in de behandelingen met de betaïne-bio-vlokken en afgeleiden, terug tot een waarde die maximum 1 logeenheid groter is dan

de waarde die wordt waargenomen in de controle waarin enkel MB aanwezig is. Uitzondering hierop is de luminescentie bij de behandeling met de glycerol-bio-vlokken die op het eind van de metingen nog 2 logeenheden groter was dan die in de controle.

In de testen met *Vibrio campbellii* valt de luminescentie in alle behandelingen met bio-vlokken en afgeleiden en in de controle waarin enkel *Vibrio campbellii* aanwezig is in MB, binnen 5-8u terug tot de waarde die waargenomen wordt in de controle waarin enkel MB aanwezig is.

Aangezien de luminescentie in de controle waarin enkel *Vibrio harveyi* of *Vibrio campbellii* aanwezig is even sterk afneemt als in de behandelingen met de bio-vlokken en afgeleiden, kan geconcludeerd worden dat de aanwezigheid van bio-vlokken of afgeleiden geen significant effect heeft op de luminescentie van *Vibrio harveyi* en *Vibrio campbellii* in MB volgens de toegepaste proefopzet.

In testen met *Vibrio harveyi* of *Vibrio campbellii* is er een gelijke toename van de OD<sub>610</sub>-waarde in de behandelingen met de bio-vlokken en zijn afgeleiden per type bio-vlokken en in de controle waarin enkel de pathogeen in MB aanwezig is. Aangezien deze stijging onder andere wordt waargenomen in welletjes waarin de toegevoegde cultuur van de pathogeen de enige niet steriele component is, kan geconcludeerd worden dat de OD<sub>610</sub>-toename door groei van *Vibrio harveyi* of *Vibrio campbellii* wordt veroorzaakt.

Het is ook mogelijk dat de toename in de behandelingen met de bio-vlokken veroorzaakt wordt door de groei van bacteriën uit de bio-vlokken en dat de toename in alle andere behandelingen veroorzaakt wordt door de groei van de pathogeen.

Bij de behandeling met de MBA-bio-vlokken in aanwezigheid van *Vibrio campbellii* vindt er na 15u, wanneer de maximale OD<sub>610</sub> bereikt werd in de andere behandelingen, een additionele toename van de OD<sub>610</sub> plaats. Deze toename wordt hoogstwaarschijnlijk veroorzaakt door de groei van bacteriën uit de MBA-bio-vlokken. Het is echter onmogelijk om dit met zekerheid te stellen aangezien er op basis van OD<sub>610</sub>-metingen geen onderscheid gemaakt kan worden tussen de groei van verschillende bacteriële species.

### 3.2.3 Artificieel zeewater

In de testen met *Vibrio harveyi* neemt in de controle, waarin enkel *Vibrio harveyi* aanwezig is, en bij alle behandelingen met de verschillende types bio-vlokken en hun afgeleiden, in aanwezigheid van *Vibrio harveyi*, de luminescentie tijdens de eerste 2u met bijna 2 logeenheden toe, waarna ze nagenoeg constant blijft op 10<sup>5</sup> RLU. De luminescentie bij de behandeling met MBA-bio-vlokken daalt sterk na 13u en die bij de behandeling met glycerol-bio-vlokken daalt licht na 17u.

Aangezien de luminescentie in geen enkele behandeling, behalve die met MBA-bio-vlokken, significant lager is dan in de controle met *Vibrio harveyi* in AAS, kan gesteld worden dat de bio-vlokken en afgeleiden geen significant effect hebben op de luminescentie van *Vibrio harveyi*.

De lichte daling van de luminescentie-waarden in de behandelingen met glycerol- en MBA-bio-vlokken vindt pas plaats na minimum 13u, dit wijst erop dat indien deze bio-vlokken een effect hebben op de luminescentie van *Vibrio harveyi*, dit effect ofwel niet onmiddellijk na het

samenvoegen van de componenten gold ofwel dat het effect niet onmiddellijk weerspiegeld werd in de luminescentiemetingen.

Ook in de testen met *Vibrio campbellii* is er initieel een sterke stijging van de luminescentie bij alle behandelingen met bio-vlokken en hun afgeleiden en bij de controles waarin enkel *Vibrio campbellii* aanwezig was. Na het bereiken van  $10^5$  RLU start de afname van de luminescentie onmiddellijk in alle behandelingen en controles. Bij sommige behandelingen daalt de luminescentie tot het niveau van de controle waarin enkel AAS aanwezig is, terwijl ze bij andere behandelingen op het eind van de metingen nog 1 logeenheid groter dan bij de controle.

Aangezien er echter bij geen enkele van de drie types bio-vlokken een behandeling voorkomt waarbij de luminescentie lager is dan die in de controle waarin *Vibrio campbellii* aanwezig is in AAS, kan net zoals bij de testen met *Vibrio harveyi* in AAS geconcludeerd worden dat de bio-vlokken en afgeleiden geen invloed hebben op de luminescentie van *Vibrio campbellii*.

De OD<sub>610</sub>-waarden in de testen met *Vibrio harveyi* in AAS nemen toe in alle behandelingen met bio-vlokken en afgeleiden en in de controle waarin enkel *Vibrio harveyi* aanwezig is. De toename is echter bij alle drie de types bio-vlokken groter in de behandeling met bio-vlokken dan in de behandelingen met afgeleiden van de bio-vlokken of in de controle.

In de testen met *Vibrio campbellii* neemt de OD<sub>610</sub>-waarde in alle behandelingen met bio-vlokken en afgeleiden en in de controle waarin enkel *Vibrio harveyi* aanwezig is, op gelijkmatige wijze toe, behalve in de behandeling met levende glycerol-bio-vlokken waar de toename iets groter is. Door de grote standaard afwijking kan echter niet gezegd worden of deze grotere toename significant verschillend is van die in de behandelingen met de afgeleiden van de glycerol-bio-vlokken.

Dit wijst erop dat er in alle welletjes bacteriële groei plaatsvindt en aangezien de OD<sub>610</sub> ook toeneemt in behandelingen waarin de toegevoegde cultuur van *Vibrio harveyi* of *Vibrio campbellii* de enige niet steriele component is, kan geconcludeerd worden dat de toename van de OD<sub>610</sub>-waarde veroorzaakt wordt door groei van *Vibrio harveyi* of *Vibrio campbellii* in AAS.

Uit de significant grotere toename van de OD<sub>610</sub> in de testen met *Vibrio harveyi* bij de behandelingen met de levende bio-vlokken dan bij de andere behandelingen, kan geconcludeerd worden dat bacteriën uit de bio-vlokken groeien in AAS en zo ten minste een deel van de waargenomen OD<sub>610</sub>-stijging veroorzaken.

Het is echter ook mogelijk dat de toename in de behandelingen met de bio-vlokken veroorzaakt wordt door de groei van bacteriën uit de bio-vlokken en dat de toename in alle andere behandelingen veroorzaakt wordt door de groei van de pathogeen.

### 3.2.4 Vergelijking van de resultaten bekomen aan de hand van de twee proefopzetten

In fysiologische oplossing werden bij uitplating na 24u geen kolonies gedetecteerd waardoor *Vibrio harveyi* afwezig lijkt of in kleine, niet meetbare/cultiveerbare aantallen aanwezig is.

In de test waar gedurende 24u metingen uitgevoerd worden, zijn er op basis van de luminescentie- en OD<sub>610</sub>-waarden geen aanwijzingen dat *Vibrio harveyi* of *Vibrio campbellii* groeit in fysiologische oplossing. Deze testen bevestigen dus de resultaten die bekomen werden in de eerste proefopzet.

In MB werd bij de test met glycerol-bio-vlokken waarbij na 24u metingen worden uitgevoerd een significant effect van de bio-vlokken en afgeleiden op de luminescentie van *Vibrio harveyi* vastgesteld, terwijl er geen significant effect was op de luminescentie van *Vibrio campbellii*.

Uit de resultaten van de testen waarbij gedurende 24u metingen werden uitgevoerd, werd geconcludeerd dat geen enkele van de beschouwde types bio-vlokken of hun afgeleiden een significant effect hadden op de luminescentie van *Vibrio harveyi* of *Vibrio campbellii* in MB.

Deze resultaten uit de verschillende proefopzetten spreken elkaar dus tegen wat de beïnvloeding van bio-vlokken op de luminescentie van *Vibrio harveyi* betreft.

Dit verschil in de resultaten kan mogelijks verklaard worden door de verschillende verhoudingen tussen de componenten in de twee proefopzetten. In de eerste proefopzet worden 10 µL *Vibrio*-cultuur en 1 mL actieve component samengevoegd, terwijl in de tweede proefopzet respectievelijk 10 µL en 20 µL wordt samengevoegd. Het is dus mogelijk dat er onvoldoende bio-vlokken aanwezig waren in de welletjes tijdens de tweede proefopzet om een effect te kunnen veroorzaken op de luminescentie van *Vibrio harveyi*.

Bovendien zijn in een kleiner testvolume de waarden onderhevig aan een iets grotere foutenmarge waardoor de resultaten minder betrouwbaar kunnen zijn. Ook dit kan van belang zijn bij het verschil tussen de resultaten bekomen aan de hand van deze twee proefopzetten.

In de testen met metingen gedurende 24u werden behoorlijk gelijklopende toenames van de OD<sub>610</sub> waargenomen voor de behandelingen met de bio-vlokken en hun afgeleiden en de controle waarin *Vibrio harveyi* of *Vibrio campbellii* aanwezig was. Dit komt overeen met de resultaten uit de eerste proefopzet waar tussen de verschillende behandelingen en de controle geen significant verschil in celdensiteit werd waargenomen.

### 3.3 Conclusie

Tijdens de incubatie in fysiologische oplossing bleken *Vibrio harveyi* en *Vibrio campbellii* niet luminescent. In FO werd er geen groei van *Vibrio harveyi* waargenomen, terwijl er wel groei van *Vibrio campbellii* en bacteriën uit de bio-vlokken werd waargenomen.

De drie types bio-vlokken en hun afgeleiden bleken geen significant effect te hebben op de luminescentie van *Vibrio harveyi* en *Vibrio campbellii* bij incubatie in MB.

In MB werd er een OD<sub>610</sub>-toename waargenomen die ofwel door de groei van *Vibrio harveyi* of *Vibrio campbellii* ofwel door de groei van bacteriën uit de bio-vlokken veroorzaakt wordt.

De bio-vlokken en afgeleiden bleken geen significant effect te hebben op de luminescentie van *Vibrio harveyi* of *Vibrio campbellii* in AAS.

Zowel *Vibrio harveyi* en *Vibrio campbellii* als bacteriën uit de bio-vlokken bleken te groeien in AAS.

De conclusies in verband met de beïnvloeding van de luminescentie van *Vibrio harveyi* door bio-vlokken bleken verschillend bij de twee proefopzetten. Dit wordt waarschijnlijk veroorzaakt door het verschil in de verhouding van de bio-vlokken (of afgeleiden) en de pathogeen en het totale volume van de suspensie.

Bio-vlokken en afgeleiden zouden een significant effect op de luminescentie van *Vibrio harveyi* BB120 kunnen hebben. Indien dit effect op de luminescentie niet gepaard gaat met een verandering van de celdensiteit van *Vibrio harveyi*, zoals in de resultaten van test met metingen na 24u het geval was, dan is het mogelijk dat dit effect op de luminescentie veroorzaakt wordt doordat de bio-vlokken de quorum sensing van *Vibrio harveyi* verstoren.

De verhouding tussen de celdensiteit aan *Vibrio harveyi* en de concentratie aan bio-vlokken zou echter een belangrijke factor kunnen zijn in de effectiviteit van de bio-vlokken en afgeleiden ten aanzien van het verstoren van de luminescentie en activiteit van *Vibrio harveyi*.

## 4 Testen met *Artemia franciscana*

Om het effect van bio-vlokken op *Vibrio harveyi* BB120 en *Vibrio campbellii* LMG21363 na te gaan werden naast de luminescentie- en groeitesten ook testen met *Artemia franciscana* uitgevoerd. Het doel van deze testen is om de invloed van de bio-vlokken op de virulentie van de beschouwde pathogenen na te gaan. In deze testen worden de *Artemia franciscana* nauplii als modelorganisme gebruikt. *Artemia* zijn kreeftachtige filtervoeders, die zich continu en niet-selectief voeden. Ze zijn ook in staat om kleine partikels op te nemen.

Voordat het effect van de bio-vlokken onderzocht kon worden, diende eerst nagegaan te worden of de component, die als koolstofbron voor de bio-vlokken gebruikt wordt (glycerol, betaïne of MBA), een invloed heeft op het modelorganisme.

Daarna werd in de voedertesten onderzocht of de bio-vlokken als voeding konden dienen voor *Artemia* nauplii. Waarna aan de hand van challenge testen met gnotobiotische *Artemia* de invloed van de bio-vlokken op de incidentie van ziekte van de *Artemia* veroorzaakt door *Vibrio harveyi* of *Vibrio campbellii* werd onderzocht.

### 4.1 Testen met de koolstofbronnen

Aangezien de aanwezigheid van betaïne geen significant effect heeft op de overleving of de groei van de *Artemia* ten opzichte van die in de LVS3-behandeling, kan verondersteld worden dat de aanwezigheid van de koolstofbron in de betaïne-bio-vlokken geen significant effect zal hebben op de resultaten tijdens de challenge testen met de betaïne-bio-vlokken.

Bij de aanwezigheid van glycerol daarentegen is er een significant lagere overleving van de *Artemia* dan bij de niet gevoede *Artemia* of bij de *Artemia* in de LVS3-behandeling. Aangezien de niet gevoede *Artemia* een significant betere overleving hebben na 48u, kan de lage overleving van de *Artemia* in de testtubes met glycerol niet verklaard worden door een gebrek aan voeding en moet glycerol een ander effect veroorzaken. Er kan geconcludeerd worden dat de aanwezigheid van de koolstofbron in de glycerol-bio-vlokken dus een significant negatief effect zou kunnen hebben op de resultaten tijdens de challenge testen met de glycerol-bio-vlokken.

Bij het nagaan van het effect van MBA op de overleving van de *Artemia* werd ook een test uitgevoerd met de gist die als drager van het boterzuur gebruikt wordt in MBA. Dit is van belang omdat gist in het verleden reeds gebruikt werd als voedsel voor *Artemia* nauplii in een challenge test door onder andere Marques et al. (2004). Het vergelijken van de overleving van de *Artemia* in de behandeling met MBA met de overleving in de controle met LVS3 zou daarom door een voedereffect niet correct kunnen zijn. Er werd gehoopt dat door de overleving in de testtubes met gist te vergelijken met die in de testtubes met MBA het werkelijk effect van het product MBA ging blijken ten opzichte van dat van de gist. Zowel de gist als MBA bleken niet voor een significant verschillende overleving van de *Artemia* ten opzichte van de behandeling zonder voeding of de LVS3-behandeling te zorgen. De behandeling met gist zorgde echter wel voor een significant betere overleving ten opzichte van de behandeling met MBA en dit zowel in de aanwezigheid als afwezigheid van *Vibrio harveyi*. Het effect van gist op de overleving van *Artemia* lijkt dus

verloren te zijn gegaan bij de verwerking van de gist in MBA. Alhoewel het verschil met de controles niet significant is, blijkt uit de resultaten dat de aanwezigheid van de koolstofbron in de MBA-bio-vlokken een negatief effect zou kunnen hebben op de resultaten tijdens de challenge testen met de bio-vlokken.

## 4.2 Voedertesten

De resultaten van de voedertest van 5 dagen tonen aan dat de overleving in alle behandelingen met geautoclaveerde glycerol-bio-vlokken significant hoger is dan in de behandelingen met LVS3 (experiment 3 in Tabel 17). Eveneens is de overleving in de behandeling met 4 mL glycerol-bio-vlokken significant hoger dan die in alle behandelingen met LVS3, behalve die met  $10^8$  kve/mL LVS3. Deze waarnemingen tonen aan dat bio-vlokken en geautoclaveerde bio-vlokken bruikbaar zijn als voedsel voor *Artemia*.

Uit de significant hogere overleving bij de 1 en 2 mL geautoclaveerde bio-vlokken dan bij de overeenkomstige concentraties aan bio-vlokken blijkt dat de geautoclaveerde bio-vlokken een betere voedselbron zijn dan de levende bio-vlokken. Dit wordt ondersteund doordat de *Artemia* in de behandeling met 1 mL geautoclaveerde bio-vlokken significant groter zijn dan die in de behandeling met 4 mL bio-vlokken (Tabel 18



Tabel 18). Een mogelijke verklaring voor deze vaststelling is dat bij het autoclavieren van de bio-vlokken de celwanden kapot gemaakt worden waardoor de nutriënten makkelijker beschikbaar zijn voor de *Artemia*.

In de tweede voedertest van 2 dagen (experiment 5 in Tabel 17) is de overleving in de behandelingen met de verschillende concentraties bio-vlokken en geautoclaveerde bio-vlokken niet significant verschillend van die in de behandelingen met  $10^8$  en  $10^9$  kve/mL LVS3. De challenge testen met de bio-vlokken worden echter uitgevoerd met een behandeling waarin  $10^7$  kve/mL LVS3 aanwezig is als controle. Verder kan in Tabel 18 opgemerkt worden dat de *Artemia* in alle behandelingen met geautoclaveerde bio-vlokken groter zijn dan die in de behandelingen met bio-vlokken. Op basis van deze resultaten kan dus gesteld worden dat de aanwezigheid van glycerol-bio-vlokken aan een concentratie van 0,358 of 0,537 g/L SS voor een voedereffect bij de *Artemia* kan zorgen waardoor er een significant hogere overleving van de *Artemia* in de challenge test zou kunnen optreden.

Ook was er een duidelijk verschil in de activiteit van de *Artemia* op het einde van de tweede voedertest. De *Artemia* in de behandelingen met  $10^5$  tot  $10^7$  kve/mL LVS3 waren weinig actief, die in de behandelingen met  $10^8$  en  $10^9$  kve/mL LVS3 en de verschillende concentraties aan bio-vlokken waren actief en de *Artemia* in de behandelingen met geautoclaveerde bio-vlokken waren duidelijk de actiefste. Deze waarnemingen zijn opnieuw een indicatie dat geautoclaveerde glycerol-bio-vlokken geschikter zijn als voeder voor de *Artemia* nauplii dan de niet geautoclaveerde glycerol-bio-vlokken.

## 4.3 Challenge testen

### 4.3.1 Glycerol-bio-vlokken

De eerste challenge testen werden uitgevoerd in de veronderstelling dat de bio-vlokken en afgeleiden enkel als actieve component fungeerden. In deze experimenten was in alle testtubes  $10^7$  kve/mL LVS3 aanwezig als voeding voor de *Artemia*.

In de eerste challenge test met de glycerol-bio-vlokken (experiment 6 Tabel 19) was er een significant hogere overleving van de aan *Vibrio harveyi* blootgestelde *Artemia* in de testtubes die LVS3 + bio-vlokken bevatten dan in die die enkel LVS3 bevatten. Dit resultaat lijkt dus aan te wijzen dat de bio-vlokken de *Artemia* beschermen tegen *Vibrio harveyi*.

In de tweede challenge test met de glycerol-bio-vlokken (experiment 7 in Tabel 19) was de overleving van de *Artemia* in aanwezigheid van *Vibrio campbellii* in de behandeling met LVS3 + bio-vlokken niet significant verschillend van die in de controle waarin enkel LVS3 aanwezig was. De overleving van de aan *Vibrio campbellii* blootgestelde *Artemia* was echter wel significant hoger in de behandeling met LVS3 + geautoclaveerde bio-vlokken ten opzichte van de controle. Bovendien waren in experiment 6 de *Artemia* in de behandeling met LVS3 + geautoclaveerde bio-vlokken significant groter dan die in de andere behandelingen (Tabel 20). Ook waren deze *Artemia* op het einde van de challenge test veel actiever dan die in de controle met LVS3 (waarnemingen niet weergegeven bij resultaten). In experiment 7 was er een significant hogere overleving van de *Artemia* in de niet met *Vibrio campbellii* geïnoculeerde behandelingen met LVS3 + geautoclaveerde bio-vlokken dan in de controle. Deze resultaten wijzen erop dat de

geautoclaveerde bio-vlokken in beide experimenten voor een voedereffect zorgen bij de *Artemia*. Daarom kan niet uitgesloten worden dat de waargenomen hogere overleving van de aan *Vibrio campbellii* blootgestelde *Artemia* in de behandeling met LVS3 + geautoclaveerde bio-vlokken in experiment 7 te wijten zijn aan dit voedereffect en niet aan een beschermend effect.

Bij de tweede reeks challenge testen werd ervan uitgegaan dat de bio-vlokken naast hun werking als actieve component ook als voedsel kunnen optreden voor de bio-vlokken. Bij deze testen werden twee verschillende referenties gebruikt. Enerzijds werden testtubes gebruikt waarin enkel gefilterd artificieel zeewater aanwezig was ('geen voeding'). In deze testtubes moeten de *Artemia* overleven aan de hand van de voedingsstoffen in hun dooierzak aangezien er geen ander voedsel beschikbaar is. Anderzijds waren er testtubes waarin  $10^7$  kve/mL LVS3 in artificieel zeewater aanwezig was ('LVS3'). In deze testtubes kunnen de *Artemia* naast de voedingsstoffen uit hun dooierzak ook geautoclaveerde bacteriën als voedsel gebruiken.

In de eerste challenge test waarin de glycerol-bio-vlokken ook als voedsel voor de *Artemia* dienen (experiment 8 in Tabel 21) is de overleving van de aan *Vibrio harveyi* blootgestelde *Artemia* significant hoger in de behandeling met bio-vlokken dan in de controle waarin geen voeding aanwezig is. In zowel experiment 8 als 10 in Tabel 21 is de overleving van de *Artemia* in de met *Vibrio harveyi* geïnoculeerde behandeling met glycerol-bio-vlokken hoger dan in die met geautoclaveerde bio-vlokken. Er werd echter in de voedertesten reeds aangetoond dat de geautoclaveerde glycerol-bio-vlokken beter zijn als voedsel voor de *Artemia* tijdens de challenge test dan de niet geautoclaveerde glycerol-bio-vlokken. Hieruit kan geconcludeerd worden dat er duidelijke aanwijzingen zijn dat de hogere overleving van *Artemia* in de met *Vibrio harveyi* geïnoculeerde behandeling met bio-vlokken niet veroorzaakt wordt door een voedereffect. Om een beschermend effect tegen *Vibrio harveyi* waar te nemen lijkt het essentieel dat de levende glycerol-bio-vlokken aanwezig zijn in de testtubes aangezien de aanwezigheid van louter de structuur van de bio-vlokken, zoals bij de geautoclaveerde bio-vlokken, onvoldoende blijkt om het beschermende effect te veroorzaken.

In de challenge test met glycerol-bio-vlokken en *Vibrio campbellii* (experiment 9 in Tabel 21) heeft geen enkele behandeling een significant effect op de overleving van de *Artemia* en dit zowel in de aan- als afwezigheid van de pathogeen. De glycerol-bio-vlokken lijken de *Artemia* dus niet te beschermen tegen *Vibrio campbellii* LMG21363.

Het feit dat de niet aan *Vibrio campbellii* blootgestelde *Artemia* in de behandeling met geautoclaveerde bio-vlokken in deze test significant groter waren dan alle andere, toont wel opnieuw aan dat geautoclaveerde bio-vlokken geschikter zijn als voedsel voor *Artemia* nauplii dan levende bio-vlokken.

#### 4.3.2 Betaine-bio-vlokken

De challenge testen met de betaine-bio-vlokken werden meteen uitgevoerd in de veronderstelling dat de bio-vlokken en afgeleiden tijdens de challenge test naast hun functie als actieve component ook als voeding voor de *Artemia* kunnen dienen.

Aangezien de *Artemia* in de behandeling met geautoclaveerde bio-vlokken significant groter zijn dan die in de andere behandelingen (Tabel 24), kan verondersteld worden dat ook voor de

betaïne-bio-vlokken de geautoclaveerde bio-vlokken geschikter zijn als voedsel voor de *Artemia* nauplii dan de levende bio-vlokken.

In de eerste challenge test met de betaïne-bio-vlokken (experiment 11 in Tabel 23) is de overleving van de aan *Vibrio harveyi* blootgestelde *Artemia* significant hoger in de behandeling met bio-vlokken dan in die met geautoclaveerde bio-vlokken, supernatans en geautoclaveerd supernatans van de bio-vlokken. In experiment 12 in Tabel 23 is de overleving van de *Artemia* in aanwezigheid van *Vibrio harveyi* significant hoger in de behandeling met bio-vlokken dan in de behandeling met geautoclaveerde bio-vlokken en dan in beide controles (geen voeding en LVS3) terwijl er in de afwezigheid van de pathogeen geen significant verschil is tussen de survival in deze behandelingen. Dit wijst erop dat het effect op de overleving dat waargenomen wordt in de behandeling met bio-vlokken in aanwezigheid van *Vibrio harveyi* niet veroorzaakt wordt door een voedereffect. De betaïne-bio-vlokken bieden de *Artemia* dus, net zoals de glycerol-bio-vlokken, een beschermend effect ten opzichte van *Vibrio harveyi*. Opnieuw is dit effect beperkt tot de levende bio-vlokken aangezien bij de behandelingen met geautoclaveerde bio-vlokken geen significant effect op de overleving ten opzichte van de controles werd waargenomen.

Uit de resultaten van de challenge test met betaïne-bio-vlokken en *Vibrio campbellii* (experiment 11 in Tabel 23) blijkt dat, net zoals bij de glycerol-bio-vlokken, de betaïne-bio-vlokken geen bescherming bieden tegen *Vibrio campbellii*.

### 4.3.3 MBA-bio-vlokken

De challenge testen met de MBA-bio-vlokken werden, net zoals die met de betaïne-bio-vlokken, onmiddellijk uitgevoerd in de veronderstelling dat de bio-vlokken en afgeleiden ook als voedselbron voor de *Artemia* nauplii kunnen dienen.

In tegenstelling tot bij de andere types bio-vlokken zijn de *Artemia* in de behandeling met geautoclaveerde bio-vlokken niet groter dan die in de controles of de behandeling met bio-vlokken (Tabel 26). Bij de MBA-bio-vlokken kan op basis van deze gegevens dus niet gesteld worden dat de geautoclaveerde bio-vlokken beter geschikt zijn als voedsel dan de niet geautoclaveerde bio-vlokken. De lengte van de niet aan *Vibrio harveyi* of *Vibrio campbellii* blootgestelde *Artemia* op het eind van de testen met MBA-bio-vlokken is bij de behandeling met bio-vlokken echter wel significant groter dan bij de andere behandelingen. Dit suggereert dus dat er bij de MBA-bio-vlokken wel een voedereffect optreedt tijdens de challenge test en dat dit effect beperkt is tot de levende bio-vlokken. Dit lijkt echter niet te worden ondersteund door de waargenomen overleving in de challenge test aangezien er zowel in experiment 13 als 14 in Tabel 25 geen significant verschil is tussen de overleving van *Artemia* in afwezigheid van een pathogeen in de behandelingen met MBA-bio-vlokken en geautoclaveerde bio-vlokken, wat dus wil zeggen dat een voedereffect eerder voor zowel de geautoclaveerde als de niet geautoclaveerde bio-vlokken zou moeten gelden.

In de eerste challenge test met MBA-bio-vlokken (experiment 13 in Tabel 25) was de overleving van *Artemia* in de met *Vibrio harveyi* geïnoculeerde behandeling met geautoclaveerde bio-vlokken significant lager dan in de overeenkomstige behandelingen met bio-vlokken en LVS3. In experiment 14 in Tabel 25 was de overleving van de aan *Vibrio harveyi* blootgestelde *Artemia*

significant hoger in de behandeling met de bio-vlokken ten opzichte van die waarin geen voeding, LVS3 of geautoclaveerde bio-vlokken aanwezig waren. Alhoewel er geen significant verschil is tussen de overleving van de niet aan een pathogeen blootgestelde *Artemia* bij de verschillende behandelingen in de twee experimenten, kan het, zoals hiervoor reeds besproken werd, niet uitgesloten worden dat het effect op de overleving dat waargenomen werd in de testtubes met bio-vlokken veroorzaakt wordt door een voedereffect. Indien dit echter niet zo is, dan is ook bij dit type bio-vlokken het beschermend effect beperkt tot de levende bio-vlokken aangezien de aanwezigheid van de structuur bij de geautoclaveerde bio-vlokken onvoldoende blijkt om een hogere overleving van de *Artemia* te veroorzaken.

Opnieuw is er geen significant effect opmerkelijk op de overleving of lengte van de *Artemia* bij de verschillende met *Vibrio campbellii* geïnoculeerde behandelingen (Tabel 25 en Tabel 26). De MBA-bio-vlokken blijken dus, net zoals de glycerol- en betaïne-bio-vlokken, de *Artemia* niet te beschermen tegen *Vibrio campbellii*.

#### 4.3.4 Test met de drie types bio-vlokken

Deze test werd eveneens uitgevoerd in de veronderstelling dat de drie types bio-vlokken ook voor voedsel voor de *Artemia* konden zorgen. De resultaten voor de afzonderlijke types bio-vlokken werden reeds bij de respectievelijke types bio-vlokken besproken (experimenten 10, 12 en 14). Aangezien in deze test de concentratie aan SS in de testtubes met de verschillende types bio-vlokken vergelijkbaar was, bieden deze resultaten de mogelijkheid om het effect van de verschillende types bio-vlokken te vergelijken.

Aangezien er geen significant verschillende overleving is tussen de niet aan *Vibrio harveyi* blootgestelde *Artemia* in de aanwezigheid van glycerol-, betaïne- of MBA-bio-vlokken (Figuur 21), kan verondersteld worden dat er tussen deze types bio-vlokken geen significant verschil is in de geschiktheid als voedsel voor de *Artemia*.

Er was geen statistisch significant verschil waarneembaar tussen de overleving van de *Artemia* in de met *Vibrio harveyi* geïnoculeerde behandelingen met de drie types geautoclaveerde bio-vlokken. Bovendien is er bij elk type bio-vlokken geen significant verschil tussen de overleving bij de behandeling met bio-vlokken in de aan- en afwezigheid van de pathogeen terwijl er bij de geautoclaveerde bio-vlokken wel een significant verschil is in de overleving tussen de wel en niet aan *Vibrio harveyi* blootgestelde *Artemia*. Opnieuw is dit een indicatie dat bij alle drie de types bio-vlokken een beschermend effect optreedt tegen *Vibrio harveyi* en dat dit effect beperkt is tot de levende bio-vlokken.

#### 4.4 Aanvullende analyses bij de laatste challenge test

Bij de challenge test met de drie types bio-vlokken en *Vibrio harveyi* BB120 werden extra analyses uitgevoerd om een inschatting te kunnen maken van de overleving van *Vibrio* in de vloeistof en de kolonisatie van het gastrointestinaal kanaal van de *Artemia* door *Vibrio* en de bio-vlokken.

#### 4.4.1 Suspensie

De optische dichtheid en luminescentie van de suspensie in de testtubes van de challenge test werd aan het begin en aan het eind van de challenge test gemeten om de overleving en activiteit van *Vibrio harveyi* tijdens de challenge test op te volgen.

Op het eind van de challenge test was de OD<sub>610</sub> in de testtubes waarin zowel geautoclaveerde bio-vlokken als *Vibrio harveyi* aanwezig waren significant hoger dan in de testtubes waarin enkel de geautoclaveerde bio-vlokken als behandeling aanwezig waren. De luminescentie in al de andere testtubes (controles en behandelingen zowel in aan- als afwezigheid van de *Vibrio harveyi*) was teruggevallen tot de achtergrondwaarde.

Aangezien in de testtubes, waarin de behandeling met geautoclaveerde bio-vlokken getest wordt, enkel de toegevoegde cultuur van *Vibrio harveyi* niet steriel is, dient geconcludeerd te worden dat deze hogere OD<sub>610</sub>-waarde veroorzaakt wordt door de dichtheid aan *Vibrio harveyi* in de suspensie.

Hierbij dient opgemerkt te worden dat een hoge OD<sub>610</sub>-waarde ook veroorzaakt kan worden doordat er een grote vlok aanwezig is in een welletje waardoor de meting verstoord wordt. Bij het vullen van de welletjes werd dit echter zo veel mogelijk vermeden waardoor gesteld kan worden dat de waargenomen hogere OD<sub>610</sub>-waarden hier niet door veroorzaakt worden.

De luminescentie blijkt in de testtubes waarin zowel geautoclaveerde bio-vlokken als *Vibrio harveyi* aanwezig zijn eveneens tijdens de challenge test anders geëvolueerd te zijn dan in de andere testtubes. In alle behandelingen met bio-vlokken en *Vibrio harveyi* is de luminescentie tijdens de challenge test significant gedaald ( $p < 0,05$ ) terwijl het verschil tussen de begin- en eindsituatie zeer klein is bij de behandelingen met geautoclaveerde bio-vlokken en *Vibrio harveyi* en zelfs niet significant bij de geautoclaveerde glycerol- en MBA-bio-vlokken.

Aangezien luminescentie als een maat voor de activiteit gezien kan worden, wijzen deze waarnemingen in de suspensie erop dat op het eind van de challenge test de *Vibrio harveyi* in de behandelingen met geautoclaveerde bio-vlokken nog steeds actief zijn terwijl in de controles en de behandelingen met de levende bio-vlokken de luminescentie en dus waarschijnlijk ook de activiteit van de *Vibrio* afgenomen is.

Deze waarnemingen van de OD<sub>610</sub> en de luminescentie in de suspensie lijken dus de stelling dat de aanwezigheid van de geautoclaveerde bio-vlokken onvoldoende is om de *Artemia* te beschermen tegen *Vibrio harveyi*, te ondersteunen. Bovendien tonen ze aan dat het effect van de levende bio-vlokken niet enkel te wijten is aan een voedereffect, maar dat ze wel degelijk een effect hebben op de activiteit van de pathogenen.

#### 4.4.2 Artemia

Alhoewel er kolonies werden waargenomen op de uitplatingen van het homogenisaat van de controle zonder voeding terwijl hier eigenlijk geen bacteriën zouden mogen teruggevonden worden, kunnen er toch conclusies getrokken worden uit de resultaten in Figuur 24. Bij de controle van de steriliteit van deze behandeling op mariene agar werden namelijk geen kolonies

aangetroffen waardoor verondersteld kan worden dat de bacteriën waarschijnlijk in het homogeenisaat terechtgekomen zijn tijdens het spoelen of homogeniseren van de *Artemia*.

In Figuur 24 kan opgemerkt worden dat er in de behandelingen met bio-vlokken meer heterotrofe mariene bacteriën teruggevonden werden dan in de controle. Aangezien de *Artemia* gespoeld werden voor het homogeniseren, is het waarschijnlijk dat deze bacteriën zich in het gastrointestinaal kanaal van de *Artemia* bevonden. Deze resultaten zijn dus een duidelijke indicatie dat de bacteriën uit de bio-vlokken in het gastrointestinaal kanaal van de *Artemia* aanwezig waren. Dit is opnieuw een bevestiging dat de *Artemia* de bio-vlokken kunnen opnemen en als voedsel kunnen gebruiken. Dit werd eveneens bevestigd door microscopische waarnemingen van vlokdeeltjes in het gastrointestinaal kanaal van *Artemia* afkomstig uit testtubes die bio-vlokken of geautoclaveerde bio-vlokken bevatten.

Uit de resultaten die in Figuur 25 weergegeven worden, kan afgeleid worden dat er minder *Vibrio* teruggevonden wordt in het gastrointestinaal kanaal van de *Artemia* indien er bio-vlokken of geautoclaveerde bio-vlokken aanwezig zijn in de suspensie dan indien er niets of LVS3 aanwezig is. Het effect lijkt duidelijker voor de bio-vlokken dan voor de geautoclaveerde bio-vlokken. Dit is opnieuw een indicatie dat de levende bio-vlokken essentieel zijn voor het beschermend effect voor *Artemia* ten opzichte van *Vibrio harveyi*.

## 4.5 Conclusies

Allereerst dient opgemerkt te worden dat de conclusies die uit de resultaten van de besproken challenge testen getrokken konden worden, niet steeds even rechtlijnig waren bij de verschillende herhalingen.

Bovendien waren er vaak statistisch niet significante verschillen opmerkelijk tussen twee behandelingen. Het feit dat deze verschillen statistisch niet significant waren, werd voornamelijk veroorzaakt doordat de standaardafwijkingen bij sommige resultaten heel groot waren. Om deze standaardafwijkingen te laten afnemen, en bijgevolg met een grotere zekerheid conclusies te kunnen trekken, kunnen meer herhalingen per test uitgevoerd worden (hier 3) of kan een groter aantal *Artemia* in de testtubes gebracht worden (hier 20).

Anderzijds is het natuurlijk ook zo dat enige variatie in de resultaten inherent is aan het uitvoeren van testen met dieren. Zo is bijvoorbeeld de kwaliteit van *Artemia* bij iedere hatching verschillend wegens minieme verschillen in de omgevingscondities tijdens het hatching. Het is dus niet mogelijk om alle variatie in de resultaten uit te sluiten bij dit type testen.

Verder kan ook opgemerkt worden dat in dit onderzoek de trends, zelfs indien ze niet steeds statistisch significant zijn, wel duidelijk zichtbaar zijn in de verschillende experimenten.

Uit de resultaten van de voeder- en challenge testen blijkt dat zowel de bio-vlokken als de geautoclaveerde bio-vlokken geschikt zijn als voedsel voor *Artemia* nauplii in een challenge test van 48u.

In dit onderzoek werden de voedertesten echter enkel uitgevoerd met de glycerol-bio-vlokken terwijl de verschillende biochemische compositie van bio-vlokken met een verschillende koolstofbron ervoor zorgt dat ze een verschillende nutritionele waarde hebben. Dit verschil in

nutritionele eigenschappen kan van belang zijn voor de geschiktheid van een bepaald type bio-vlokken als voedsel voor de *Artemia* in een challenge test. Zo kan de nutritionele samenstelling een effect hebben op de groeisnelheid van de *Artemia* en bijgevolg dus ook op de lengte van de *Artemia* op het eind van de challenge test.

Het is niet mogelijk om in te schatten of de nutritionele kwaliteiten van de glycerol-bio-vlokken beter dan wel slechter waren dan die van de betaïne- en MBA-bio-vlokken aangezien de biochemische samenstelling van de glycerol-bio-vlokken in dit onderzoek niet bepaald werden. Evenmin kan het verschil in nutritionele kwaliteiten onrechtstreeks via de resultaten van de challenge testen worden ingeschat omdat resultaten van challenge testen enkel vergeleken mogen worden indien ze tot dezelfde test behoorden. Hierdoor komt enkel de laatste challenge test, waarin de drie types bio-vlokken tegelijk werden gebruikt, in aanmerking om de kwaliteiten van de drie types bio-vlokken te vergelijken, maar dit is niet mogelijk aangezien de *Artemia* van deze test niet werden opgemeten.

Aangezien *Vibrio harveyi* en *Vibrio campbellii* opportunistische pathogenen zijn is het moeilijk om conclusies te trekken uit de resultaten van deze challenge testen. Soltanian et al. (2007) merkten reeds op dat het resultaat van een challenge test met *Vibrio campbellii* sterk afhankelijk was van de conditie van de *Artemia*. Het type en de hoeveelheid voedsel die de *Artemia* toegediend kregen, bleek een invloed te spelen op de overleving van de *Artemia*. Hier is de kwaliteit van LVS3 en bio-vlokken als voedsel voor de *Artemia* hoogstwaarschijnlijk ook verschillend waardoor de vergelijkingen van deze resultaten genuanceerd geïnterpreteerd moeten worden. De alternatieve vergelijking tussen de overleving van de *Artemia* in de behandelingen met bio-vlokken en afgeleiden en de overleving in de controle zonder voeding zorgt er eveneens voor dat er een voederelement meespeelt. Deze vergelijking biedt echter als voordeel dat een waargenomen effect zeker aan de bio-vlokken toegeschreven kan worden terwijl bij een vergelijking ten opzichte van de behandeling met LVS3 ook het voedingseffect van LVS3 een rol speelt.

Uit de resultaten van de challenge testen met de glycerol-, betaïne- en MBA-bio-vlokken blijkt dat wanneer er bio-vlokken aanwezig zijn in het artificieel zeewater waarin de *Artemia* zich bevinden, de bio-vlokken de *Artemia* beschermen tegen *Vibrio harveyi* BB120 en niet tegen *Vibrio campbellii* LMG21363. Verder lijkt het ook essentieel dat de bio-vlokken 'levend' zijn aangezien de geautoclaveerde bio-vlokken geen bescherming lijken te bieden tegen *Vibrio harveyi*.

Er werd geen statistisch significant verschil waargenomen in de overleving van *Artemia* tussen de drie bestudeerde types bio-vlokken (glycerol-, betaïne- en MBA-bio-vlokken). De bio-vlokken zorgen dus voor een gelijkaardig beschermend effect onafhankelijk van de gebruikte koolstofbron.

De aanvullende analyses bij de laatste challenge test lijken te bevestigen dat de aanwezigheid van de geautoclaveerde bio-vlokken onvoldoende is voor een effect op *Vibrio harveyi* terwijl de levende bio-vlokken wel voor een significant effect op *Vibrio harveyi* (bijvoorbeeld luminescentie) kunnen zorgen.

Tot de mogelijke mechanismen waarmee de virulentie bij een pathogeen verstoord kan worden, behoren onder andere de productie van een inhiberende component, de competitie voor

componenten, de competitie voor adhesieplaatsen, de werking als een immunostimulator, het ter beschikking stellen van essentiële nutriënten en het verstoren van de quorum sensing (Verschuere et al., 2000; Defoirdt et al., 2008).

De wijze waarop de bio-vlokken de *Artemia* tijdens de challenge test beschermen tegen *Vibrio harveyi* werd echter niet opgehelderd aan de hand van de in deze masterproef uitgevoerde testen.

Zo is het mogelijk dat de micro-organismen in de bio-vlokken een component produceren die *Vibrio harveyi* wel inhibeert en *Vibrio campbellii* niet.

Ook is het mogelijk dat de bio-vlokken als probioticum optreden door het bezetten van de adhesieplaatsen in het gastrointestinaal kanaal. Indien beide pathogenen via het gastrointestinaal kanaal voor infectie zorgen, houdt deze hypothese dus in dat ze dat op een andere manier doen aangezien de bio-vlokken wel voor een effect zorgen ten aanzien van *Vibrio harveyi* en niet ten aanzien van *Vibrio campbellii*. De resultaten van de extra analyses bij de laatste challenge test tonen aan dat er inderdaad bacteriën uit de bio-vlokken aanwezig waren in de nauplii, maar of deze ook vastgehecht waren ter hoogte van de adhesieplaatsen kon op deze wijze niet bepaald worden.

Het verstoren van de quorum sensing van *Vibrio harveyi* behoort ook tot de mogelijke mechanismen. De luminescentiemetingen na 24u wijzen erop dat het mogelijk zou kunnen zijn dat de bio-vlokken op het quorum sensing-systeem van *Vibrio harveyi* inwerken. De luminescentie- en OD<sub>610</sub>-metingen die werden uitgevoerd bij de laatste challenge test spreken dit echter tegen aangezien de bio-vlokken voor een daling van zowel de luminescentie als de OD<sub>610</sub> zorgden. De invloed van bio-vlokken op quorum sensing bij *Vibrio harveyi* kan dus niet eenduidig bevestigd of ontkend worden op basis van deze resultaten.

Het is eveneens mogelijk dat het om een combinatie van een effect op de groei van het kweekdier en een effect op de virulentie of quorum sensing van de pathogeen gaat.

Voor de opheldering van de manier waarop bio-vlokken *Vibrio harveyi* BB120 beïnvloeden, is verder onderzoek nodig.



## 5 Conclusies

In deze masterproef werden verscheidene eigenschappen van bio-vlokken onderzocht. Voor het genereren van de bio-vlokken werden verschillende koolstofbronnen gebruikt, namelijk acetaat, zetmeel, betaïne, MBA en glycerol.

De beschouwde bio-vlokken voldeden aan de primaire vereiste voor toepassing van bio-vlokkentechnologie in een aquacultuursysteem, namelijk de verwijdering van TAN uit het water waardoor de waterkwaliteit in het systeem behouden blijft.

De bio-vlokken bevinden zich in de aquacultuureenheid en zijn dus beschikbaar voor consumptie door het gekweekte aquatisch organisme. De acetaat-, zetmeel-, betaïne- en MBA-bio-vlokken bleken voldoende eiwit te bevatten om een significante eiwitbron te kunnen vormen in het dieet van het gekweekte dier. Ze kunnen evenwel het gebruik van commercieel voeder niet volledig vervangen vermits er via het aangekochte voeder voor gezorgd moet worden dat het dieet voldoende essentiële vetzuren, vitamines, ... bevat aangezien de bio-vlokken, afhankelijk van de toegepaste koolstofbron, niet steeds voldoen in de vraag van het aquatisch dier naar dergelijke essentiële componenten.

Een derde aspect van de toepassing van de bio-vlokkentechnologie is het effect dat de bio-vlokken hebben op pathogenen die schade veroorzaken in de aquacultuur. De invloed van de bio-vlokken op de opportunistische pathogenen *Vibrio harveyi* BB120 en *Vibrio campbellii* LMG21363 werd onderzocht aan de hand van luminescentiemetingen en challenge testen met gnotobiotische *Artemia*.

De luminescentietesten leverden geen eenduidig resultaat op, maar indiceerden wel dat bio-vlokken op het quorum sensing-systeem van *Vibrio harveyi* BB120 zouden kunnen inwerken. Over een mogelijk effect van bio-vlokken op *Vibrio campbellii* LMG2163 werd tijdens de luminescentietesten geen aanwijzingen gevonden.

Uit de challenge testen bleek dat de bio-vlokken de *Artemia* beschermen tegen *Vibrio harveyi* BB120. Tegen *Vibrio campbellii* LMG21363 boden ze echter geen bescherming. De drie types bio-vlokken die betrokken werden in de challenge testen, namelijk de glycerol-, betaïne- en MBA-bio-vlokken, boden allen bescherming aan *Artemia* nauplii tegen *Vibrio harveyi* BB120. Verder werd aan de hand van de challenge testen ook aangetoond dat het enkel de levende, volledige bio-vlokken zijn die voor de bescherming tegen *Vibrio harveyi* BB120 zorgen. Wanneer de bio-vlokgemeenschap werd afgedood door autoclaveren was er namelijk niet langer sprake van een beschermend effect.

Tijdens de challenge testen werd in de aanwezigheid van een gastheer voor *Vibrio harveyi* BB120 de luminescentie en OD<sub>610</sub> opgevolgd. In de nabijheid van een gastheer voor de pathogeen werd bevestigd dat bio-vlokken de luminescentie van *Vibrio harveyi* BB120 doen dalen.

Het werkingsmechanisme achter het beschermend effect kon niet eenduidig ontrafeld worden. Het is mogelijk dat er sprake is van een gecombineerd effect op de groei van het kweekdier en de virulentie of quorum sensing van de pathogeen.

De resultaten in verband met het effect van bio-vlokken op *Vibrio harveyi* BB120 ondersteunen de vermoedens en waarnemingen in de praktijk dat bij de toepassing van bio-vlokkentechnologie minder vibriose voorkomt (Serfling, 2000; Sinha et al., 2008).

Er werd aangetoond dat de component die als koolstofbron gebruikt wordt voor de bio-vlokken een significant effect heeft op de biochemische samenstelling van de bio-vlokken, maar niet op de beïnvloeding van de virulentie van *Vibrio harveyi* BB120. De keuze van de koolstofbron voor de toepassing van bio-vlokkentechnologie in een aquacultuursysteem is echter niet enkel afhankelijk van deze factoren. Er dient ook rekening gehouden te worden met onder andere de kostprijs van de koolstofbron aangezien deze belangrijk is voor de economische haalbaarheid van het toepassen van bio-vlokkentechnologie. Daarnaast zijn ook de geschiktheid van de koolstofbron voor decompositie door de bio-vlokken, de celopbrengst per eenheid substraat en de SVI van de bio-vlokken van belang aangezien deze factoren de beschikbaarheid van de bio-vlokken voor het aquatisch organisme beïnvloeden. Bovendien kan de koolstofbron ook een invloed hebben op de smaak en de aantrekkelijkheid van de bio-vlokken voor het aquatisch organisme, wat van belang is indien de bio-vlokken als extra voedsel dienst moeten doen.

Toekomstig onderzoek met betrekking tot bio-vlokken kan zich richten op het bepalen en opvolgen van de microbiële gemeenschap in de (verschillende types) bio-vlokken, het gebruik van andere koolstofbronnen en de nutritionele eigenschappen van de bijhorende bio-vlokken, het ontmaskeren van het mechanisme achter het beschermende effect tegen *Vibrio harveyi* BB120 en het testen of de bio-vlokken ook tegen andere pathogenen beschermen, ...

Het gebruik van BFT draagt bij tot duurzame aquacultuur. Het is een economische, makkelijk implementeerbare technologie die bijdraagt tot een reductie van de voederkost en een verbetering van de waterkwaliteit. Bovendien is het mogelijk dat BFT bescherming biedt tegen pathogenen voor het gekweekte organisme. Deze techniek staat dus toe om de aquatische productie verder op te drijven zonder zware investeringen of ingrijpende gevolgen voor de omgeving van het aquacultuursysteem.

# Bibliografie

Alcaide E., Blasco M. en Esteve C. (2005); Occurrence of drug-resistant bacteria in two European eel farms. *Applied and Environmental Microbiology* 71: 3348-3350.

Alsina M. en Blanch A. (1994); A set of keys for biochemical identification of environmental *Vibrio* species. *Journal of Applied Bacteriology* 76: 79-85.

Amaya E., Davis D. en Rouse D. (2006); Replacement of fish meal in practical diets for the Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) reared under pond conditions. *Aquaculture* 262: 393-401.

Asaduzzaman M., Wahab M., Verdegem M., Huque S., Salam M. en Azim M. (2008); C/N ratio control and substrate addition for periphyton development jointly enhance freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii* production in ponds. *Aquaculture* 280: 117-123

Austin B. en Zhang X-H. (2006); *Vibrio harveyi*: a significant pathogen of marine vertebrates and invertebrates. *Letters in Applied Microbiology* 43: 119-124

Avnimelech Y. (1999); Carbon/nitrogen ratio as a control element in aquaculture systems. *Aquaculture* 176: 227-235

Avnimelech Y. en Ritvo G. (2003); Shrimp and fish pond soils: processes and management. *Aquaculture* 220: 549-567

Avnimelech Y. (2005); Tilapia Harvest Microbial Flocs In Active Suspension Research Pond. *Global Aquaculture Advocate* October

Avnimelech Y. (2006); Bio-filters: the need for an new comprehensive approach. *Aquacultural engineering* 34: 172-178.

Avnimelech Y. (2007); Feeding with microbial flocs by tilapia in minimal discharge bio-flocs technology ponds. *Aquaculture* 264: 140-147

Avnimelech Y en Kochba M. (2009); Evaluation of nitrogen uptake and excretion by tilapia in bio floc tanks, using  $^{15}\text{N}$  tracing. *Aquaculture* 287: 163-168

Azim M., Beveridge M., van Dam A. en Verdegem M. (2005); Periphyton and aquatic production: an introduction. In: Azim M., Verdegem M., van Dam A. en Beveridge M. (Eds.); *Periphyton - Ecology, Exploitation and Management*. CABI Publishing, Wallingford, 1-13.

Azim M. en Asaeda T. (2005); Periphyton structure, diversity and colonization. In: Azim M., Verdegem, M., van Dam A. en Beveridge M. (Eds.); Periphyton - Ecology, Exploitation and Management. CABI Publishing, Wallingford, 15-33.

Azim M. en Little D. (2008); The biofloc technology (BFT) in indoor tanks: Water quality, biofloc composition, and growth and welfare of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Aquaculture* 283: 29-35

Bairagi A., Sarkar Ghosh K., Sen S. en Ray A. (2004); Evaluation of the nutritive value of *Leucaena leucocephala* leaf meal, inoculated with fish intestinal bacteria *Bacillus subtilis* and *Bacillus circulans* in formulated diets for rohu, *Labeo rohita* (Hamilton) fingerlings. *Aquaculture research* 35: 436-446.

Bassler B., Wright M., Showalter R. en Silverman M. (1993). Intercellular signalling in *Vibrio harveyi*: sequence and function of genes regulating expression of luminescence. *Molecular Microbiology* 9: 773-86.

Bender J., Lee R., Sheppard M., Brinkley K., Philips P., Yeboah Y. en Wah, R. (2004); A waste effluent treatment system based on microbial mats for black sea bass *Centropristis striata* recycled water mariculture. *Aquacultural Engineering* 31: 73-82.

Biofloc Workgroup, <http://floc.aesweb.org>, (geraadpleegd op 21/01/2009)

Boyd C.(2001); Inland shrimp farming and the environment. *World Aquaculture* 10-12.

Bremner J. en Keeney D. (1965); Steam distillation methods for determination of ammonium, nitrate, and nitrite. *Analytica Chimica Acta* 32: 485-95.

Bruinsma J. (2003); An FAO perspective. FAO Economic and Social Development Department, *World aquaculture fisheries: 2015-2030*.

Brune D., Schwartz G., Eversole A., Collier J. en Schwedler T. (2003); Intensification of pond aquaculture and high rate photosynthetic systems. *Aquacultural Engineering* 28: 65-86.

Bruno M. en Montville T. (1993); Common mechanistic action of bacteriocins from lactic acid bacteria. *Applied and Environmental Microbiology* 59: 3003-3010.

Burford M., Thompson P, McIntosh R., Bauman R. en Pearson D. (2003); Nutrient and microbial dynamics in high-intensity, zero-exchange shrimp ponds in Belize. *Aquaculture* 219: 393- 411.

Burford M., Preston N., Minh T., Hoa T., Bunn S. en Fry V. (2004a); Dominant sources of dietary carbon and nitrogen for shrimp reared in extensive rice-shrimp ponds. *Aquaculture Research*: 35,194-203.

Burford M., Thompson P, McIntosh R., Bauman R. en Pearson D. (2004b); The contribution of flocculated material to shrimp (*Litopenaeus vannamei*) nutrition in a high-intensity, zero-exchange system. *Aquaculture* 232 525-537

Casal C. (2006); Global documentation of fish introductions: the growing crisis and recommendations for action. *Biological Invasions* 8: 3-11

Castro H., Battaglia J. en Virtanen E. (1998); Effect of FinnStim on growth and sea water adaptation of coho salmon. *Aquaculture* 168: 423-429.

Center for a world in balance, <http://www.worldinbalance.net/agreements/1987-brundtland.php>, (geraadpleegd op 01/03/2009)

Chamberlain G., Avnimelech Y., McIntosh R. en Velasco M. (2001a); Advantages of Aerated Microbial Reuse Systems With Balanced C:N - I: Nutrient Transformation And Water Quality Benefits. *The Advocate* April.

Chamberlain G., Avnimelech Y., McIntosh R. en Velasco M. (2001b); Advantages of Aerated Microbial Reuse Systems With Balanced C:N - II: Composition and Nutritional Value Of Organic Detritus. *The Advocate* June.

Chamberlain G., Avnimelech Y., McIntosh R. en Velasco M. (2001c); Advantages of Aerated Microbial Reuse Systems With Balanced C:N - III: Practical Applications. *The Advocate* October.

Chen X., Schauder S., Potier N., Van Dorsselaer A., Pelczer I., Bassler B. en Hughson F. (2002) Structural identification of a bacterial quorum-sensing signal containing boron. *Nature* 415: 545-549.

Choi S. en Greenberg E. (1992); Genetic dissection of DNA binding and luminescence gene activation by the *Vibrio fischeri* LuxR protein. *Journal of Bacteriology* 174: 4064-69.

Coutteau P. en Sorgeloos P. (1988); Intercalibration exercise on the qualitative and quantitative analysis of fatty acids in *Artemia* and marine samples used in mariculture. ICES Cooperative Research Report 211: 30pp.

Cressey D., (2009); Future fish. *Nature* 458: 398-400.

Crab R., Avnimelech Y., Defoirdt T., Bossier P. en Verstraete W. (2007); Nitrogen removal techniques in aquaculture for a sustainable production. *Aquaculture* 270: 1-14.

Crab R., Kochva M., Verstraete W. en Avnimelech Y. (2009a); Bio-flocs technology application in over-wintering of tilapia. *Aquacultural Engineering* 40: 105-112.

Crab R., Chielens B., Wille M., Bossier P. en Verstraete W. (2009b); The effect of different carbon sources on the nutritional value of bioflocs, a feed for *Macrobrachium rosenbergii* postlarvae. *Aquaculture Research*, Published Online: 3 Aug 2009.

Craig S. en Helfrich L. (2002); *Understanding Fish Nutrition, Feeds, and Feeding*. Virginia Cooperative Extension, Publication 420-256

Cruz-Suárez L., Nieto-López M., Guajardo-Barbosa C., Tapia-Salazar M., Scholz U. en Ricque-Marie D. (2007); Replacement of fish meal with poultry by-product meal in practical diets for *Litopenaeus vannamei*, and digestibility of the tested ingredients and diets. *Aquaculture* 272: 466-476

Cuzon G., Lawrence A., Gaxiola G., Rosas C. en Guillaume J. (2004); Nutrition of *Litopenaeus vannamei* reared in tanks or in ponds. *Aquaculture* 235: 513-551.

Defoirdt T., Halet D., Sorgeloos P., Bossier P. en Verstraete W. (2006); Short-chain fatty acids protect gnotobiotic *Artemia franciscana* from pathogenic *Vibrio campbellii*. *Aquaculture* 261: 804-808.

Defoirdt T., Boon N., Sorgeloos P., Verstraete W. en Bossier P. (2007); Alternatives to antibiotics to control bacterial infections: luminescent vibriosis in aquaculture as an example. *Trends in Biotechnology* Vol.25 No.10

Defoirdt T., Halet D., Vervaeren H., Boon N., Van de Wiele T., Sorgeloos P., Bossier P. en Verstraete, W. (2007); The bacterial storage compound poly-bhydroxybutyrate protects

*Artemia franciscana* from pathogenic *Vibrio campbellii*. *Environmental Microbiology* 9: 445-452.

Defoirdt T., Verstraete W. en Bossier P. (2008); Luminescence, virulence and quorum sensing signal production by pathogenic *Vibrio campbellii* and *Vibrio harveyi* isolates. *Journal of Applied Microbiology* 104: 1480-1487.

Defoirdt T., Boon N., Sorgeloos P., Verstraete W. en Bossier P. (2008); Quorum sensing and quorum quenching in *Vibrio harveyi*: lessons learned from in vivo work. *The ISME Journal* 2: 19-26.

de Kievit T. en Iglewski B. (2000); Bacterial quorum sensing in pathogenic relationships. *Infection and Immunity* 68: 4839-49.

De Schryver P., Crab R., Defoirdt T., Boon N. en Verstraete W. (2008); The basics of bio-flocs technology: The added value for aquaculture. *Aquaculture* 227: 125-137.

De Schryver P. en Verstraete W. (2009); Nitrogen removal from aquaculture pond water by heterotrophic nitrogen assimilation in lab-scale sequencing batch reactors. *Bioresource Technology* 100: 1162-1167

Diab S., Kochba M., Mires D. en Avnimelech Y. (1992) ; Combined intensive-extensive (CIE) pond system A : inorganic nitrogen transformations.

*Aquaculture* 101: 33-39.

Directorate of Fisheries Norway, <http://www.fisheries.no/aquaculture>, (geraadpleegd op 15/02/2009).

Dong Y., Xu J., Li X. en Zhang L. (2000); AiiA, an enzyme that inactivates the acylhomoserine lactone quorum-sensing signal and attenuates the virulence of *Erwinia carotovora*. *Proceedings of the national academy of sciences of the United States of America* 97: 3526-3531.

[Ebeling JM](#), [Timmons MB](#) en [Bisogni JJ](#) (2006); Engineering analysis of the stoichiometry of photoautotrophic, autotrophic, and heterotrophic removal of ammonia-nitrogen in aquaculture systems. *Aquaculture* Volume: 257 Issue: 1-4 Pages: 346-358.

Ebeling J. en Timmons M. (2008); Carbon: Nitrogen Balance Impacts Nitrogen Removal Processes in Microbial-Based Aquaculture Systems.



Global Aquaculture Advocate July/August.

Eding E., Kamstra A., Verreth J., Huisman E. en Klapwijk A. (2006); Design and operation of nitrifying trickling filters in recirculating aquaculture: a review. *Aquacultural Engineering* 34: 234-260.

Edwards P.; Key issues in the safe use of wastewater and excreta in aquaculture. Third edition of the guidelines for the safe use of wastewater, excreta and greywater in agriculture and aquaculture.

El-Husseiny O., El Din G., Abdul-Aziz M. en Mabroke R. (2008); Effect of mixed protein schedules combined with choline and betaine on the growth performance of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Aquaculture Research* 39: 291-300.

Emerson C. (1999); *Aquaculture Impacts on the Environment*. Cambridge Scientific Abstracts December.

FAO (2007), *The state of world fisheries and aquaculture (2006)*, FAO, Rome.

FAO (2009a), *The state of world fisheries and aquaculture (2008)*, FAO, Rome.

FAO (2009b), <ftp://ftp.fao.org/fi/stat/summary/default.htm>, (geraadpleegd op 06/02/2009).

Farmer J., Janda J., Brenner F., Cameron D. and Birkhead K. (2005); Genus 1. *Vibrio* Pacini 1854, 411AL. In *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, 2<sup>nd</sup> edn, Vol. 2. The Proteobacteria Part B The Gammaproteobacteria ed. Brenner, D.J., Krieg, N.R. and Staley, J.T. pp. 494-546. New York: Springer.

Folch J., Lees M. en Stanley G. (1957); A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *Journal of Biological Chemistry* 226: 497-509.

Fontenot Q., Bonvillain C., Kilgen M. en Boopathy R. (2007); Effects of temperature, salinity, and carbon: nitrogen ratio on sequencing batch reactor treating shrimp aquaculture wastewater. *Bioresource Technology* 98: 1700-1703

Fuqua W., Winans S. en Greenberg E. (1994); Quorum sensing in bacteria: the LuxR-LuxI family of cell density responsive transcriptional regulators. *Journal of Bacteriology* 176: 269-275.

Goda A., Wafa M., El-Haroun E. en Chowdhury M. (2007); Growth performance and feed utilization of Nile tilapia *Oreochromis niloticus* (Linnaeus, 1758) and tilapia galilae *Sarotherodon galilaeus* (Linnaeus, 1758) fingerlings fed plant protein-based diets. *Aquaculture research* 827-837.

Gomez-Gil B., Soto-Rodríguez S., García-Gasca A., Roque A., Vazquez-Juarez R., Thompson F. en Jean Swings(2004); Molecular identification of *Vibrio harveyi*-related isolates associated with diseased aquatic organisms. *Microbiology* 150: 1769-1777.

Gray K., Passador L., Iglewski B. en Greenberg E. (1994); Interchangeability and specificity of components from the quorum-sensing regulatory systems of *Vibrio fischeri* and *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Bacteriology* 176: 3076-80.

Greenberg A., Clesceri L., Eaton A. (1992); Standard methods for the examination of waste and wastewater. American Public Health Society, Washington.

Grossman A. (1995); Genetic networks controlling the initiation of sporulation and the development of genetic competence in *Bacillus subtilis*. *Annual Review of Genetics* 29: 477-508

Hargreaves J. (2006); Photosynthetic suspended-growth systems in aquaculture. *Aquacultural Engineering* 34: 344-363.

Hari B., Kurup B., Varghese J., Schrama J. en Verdegem M. (2006); The effect of carbohydrate addition on water quality and the nitrogen budget in extensive shrimp culture systems. *Aquaculture* 252: 248- 263.

Holt J., Krieg N., Sneath P., Staley T. en Williams S. (1994); *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, 9th edn. Baltimore, MD: Williams & Wilkins.

Hooshangi S. en Bentley W. (2008); From unicellular properties to multicellular behavior: bacteria quorum sensing circuitry and applications.

*Current Opinion in Biotechnology* 19: 550-555.

Hough C. en Bueno P. (2003); Producer Associations and Farmer Societies: Support to Sustainable Development and Management of Aquaculture. In: Subasinghe R. en McGladdery S. (eds.); Review of the state of the world aquaculture. FAO Fisheries circular No. 886 Rev.2: 75-95 .

Irianto A. en Austin B. (2002); Review: Probiotics in aquaculture. *Journal of Fish Diseases* 25: 633-642.

Izquierdo M., Forster I., Divakaran S., Conquest L., Decamp O. en Tacon A. (2006); Effect of green and clear water and lipid source on survival, growth and biochemical composition of Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture Nutrition* 12: 192-202.

Jorand F., Zartarian F., Thomas F., Block J., Bottero J., Villemin G., Urbain V. en Manem J. (1995); Chemical and structural (2d) linkage between bacteria within activated-sludge flocs. *Water research* 29: 1639-1647.

Ju Z., Forster I., Conquest L. en Dominy W. (2008); Enhanced growth effects on shrimp (*Litopenaeus vannamei*) from inclusion of whole shrimp floc or floc fractions to a formulated diet. *Aquaculture Nutrition* 14: 533-543.

Karunasagar I., Pai R., Malathi G. en Karunasagar I. (1994); Mass mortality of *Penaeus monodon* larvae due to antibiotic-resistant *Vibrio harveyi* infection. *Aquaculture* 128: 203-209.

Karr, D., Waters, J. en Emerich, D. (1983); Analysis of poly-b-hydroxybutyrate in *Rhizobium japonicum* bacteroids by ion-exclusion high-pressure liquid chromatography and UV detection. *Applied and Environmental Microbiology* 46: 1339-1344.

Kautsky N., Rönnbäck P., Tedengren M. en Troell M. (2000); Ecosystem perspectives on management of disease in shrimp pond farming. *Aquaculture* 191: 145-161.

Kesarcodi-Watson A., Kaspar H., Lategan M. en Gibson L. (2008); Probiotics in aquaculture: The need, principles and mechanisms of action and screening processes. *Aquaculture* 274: 1-14.

Kim S., Lee S., Kim Y., Kim J., Ryu P., Chung S en Rhee J. (2000); Virulence regulatory role of luxS quorum sensing system in *Vibrio vulnificus*. Presented at ASM General Meeting

Kleerebezem M., Quadri L., Kuipers O. en de Vos W. (1997); Quorum sensing by peptide pheromones and twocomponent signal-transduction systems in Gram-positive bacteria. *Molecular Microbiology* 24: 895-904.

Kuhn D., Boardman G., Craig S., Flick G. en McLean J. (2008); Use of Microbial Floes Generated from Tilapia Effluent as a Nutritional Supplement for Shrimp, *Litopenaeus vannamei*, in Recirculating Aquaculture Systems. *Journal of the World Aquaculture Society* Vol. 39, No. 1 February.

Kutnink M.A., Hawkes W., Schaus E. en Omaye S. (1987); An internal standard method for the unattended high performance liquid analysis of ascorbic acid in blood components. *Analytical Biochemistry* 166: 424-430.

Lillehaug A. (1989); A cost-effectiveness study of three different methods of vaccination against vibriosis in salmonids. *Aquaculture*, 227-236.

Lim, C. en Webster, C., (2006); *Tilapia: biology, culture, and nutrition*.  
The Haworth Press, Inc, The United States, 678 pp.

Li K., Liu D., Chu J., Wang Y., Zhuang Y. en Zhang S. (2008); An effective and simplified pH-stat control strategy for the industrial fermentation of vitamin B-12 by *Pseudomonas denitrificans*  
*Bioprocess and biosystems engineering* 31: 605-610.

Little D., Murray F., Azim E., Leschen W., Boyd K., Watterson A. and Young J. (2008); Options for producing a warmwater fish in the UK: limits to "Green Growth"? *Trends in Food Science & Technology* 19: 255-264.

Lyon W., Madden J., Stein J. en Caparon M. (2001); Mutation of *luxS* affects growth and virulence factor expression in *Streptococcus pyogenes*. *Molecular Microbiology* 42: 145-157.

Mäe A., Montesano M., Koiv V. en Palva E. (2001); Transgenic plants producing the bacterial pheromone N-acyl-homoserine lactone exhibit enhanced resistance to the bacterial phytopathogen *Erwinia carotovora*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 14: 1035-1042.

Manush S., Pal A., Das T. en Mukherjee S. (2005); Dietary high protein and vitamin C mitigate stress due to chelate claw ablation in *Macrobrachium rosenbergii* males. *Comparative Biochemistry and Physiology* A 142: 10-18.

Marques A., François J-M., Dhont J., Bossier P. en Sorgeloos P. (2004); Influence of yeast quality on performance of gnotobiotically grown *Artemia*. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 310: 247-264.

Marques A., Thanh T., Verstraete W., Dhont J., Sorgeloos P. en Bossier P. (2006); Use of selected bacteria and yeast to protect gnotobiotic *Artemia* against different pathogens. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 334: 20-30.

Marques A., Dhont J., Sorgeloos P. en Bossier P. (2006); Immunostimulatory nature of beta-glucans and baker's yeast in gnotobiotic *Artemia* challenge tests. *Fish & Shellfish Immunology* 20: 682-692.

Marzorati M., Wittebolle L., Boon N., Daffonchio D. and Verstraete W. (2008); How to get more out of molecular fingerprints: practical tools for microbial ecology. *Environmental Microbiology* 10(6): 1571-81

McIntosh R. (2000); Changing Paradigms in Sahrmp Farming: Low Protein Feeds and Feeding Strategies. *The Advocate*, April.

McIntosh R. (2001); Changing Paradigms in Sahrmp Farming: Establishment of Heterotrophic Bacterial Communities. *The Advocate*, February.

McVey J. (1993); *CRC Handbook of Mariculture, Volume I: Crustacean Aquaculture, Second Edition*. Published by: CRC Press .

Mekalanos J. (1992); Environmental Signals Controlling Expression of Virulence Determinants in Bacteria. *Journal of Bacteriology*, January: 1-7.

MesalhyAly S., Mohamed M. & John G. (2008); Effect of probiotics on the survival, growth and challenge infection in *Tilapia nilotica* (*Oreochromis niloticus*). *Aquaculture Research* 39: 647-656.

Michaud L., Blancheton J., Bruni V. en Piedrahita R. (2006); Effect of particulate organic carbon on heterotrophic bacterial populations and nitrification efficiency in biological filters. *Aquacultural engineering* 34: 224 -233.

Michels J., Allain E., Borchardt S. en McCoy W. (2000); Degradation pathway of homoserine lactone bacterial signal molecules by halogen antimicrobials identified by liquid chromatography with photodiode array and mass spectrometric detection. *Journal of Chromatography A* 898: 153-165.

Miller M. en Bassler B. (2001); Quorum Sensing in Bacteria. *Annual Reviews of Microbiology* 55:165-99.

Montero A. en Austin B. (1999); Characterization of extracellular products from an isolate of *Vibrio harveyi* recovered from diseased post-larval *Penaeus vannamei* (Bonne). *Journal of Fish Diseases* 22: 377-386.

Moriarty D. (1998); Control of luminous *Vibrio* species in penaeid aquaculture ponds. *Aquaculture* 164: 351-358.

Moriarty D., Decamp O. en Lavens P. (2005); Probiotics in aquaculture. *Aquaculture AsiaPacificMagazine* September/October, 14-16.

Moss S., Pruder G., Leber K. en Wyban J. (1992); The relative enhancement of *Penaeus vannamei* growth by selected fractions of shrimp pond water. *Aquaculture* 101: 229-239.

Moss S., Leamaster B. en Sweeney J. (2000); Relative Abundance and Species Composition of Gram-Negative, Aerobic Bacteria Associated with the Gut of Juvenile White Shrimp *Litopenaeus vannamei* Reared in Oligotrophic Well Water and Eutrophic Pond Water. *Journal of The World Aquacultural Society*, Vol. 31, No. 2 June.

Moss S., Divakaran S. en Kim B. (2001); Stimulating effects of pond water on digestive enzyme activity in the Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei* (Boone). *Aquaculture Research* 32: 125-131.

Moss S. (2002); Marine Shrimp Farming in the Western Hemisphere: Past Problems, Present Solutions, and Future Visions. *Reviews in fisheries science* 10: 601-620.

Nakayama T., Nomura N. en Matsamura M. (2005); Analysis of the relationship between luminescence and toxicity of *Vibrio carchariae* pathogenic to shrimp. *Fisheries Science* 75: 1236-1242.

Nakayama T., Nomura N. en Matsamura M. (2006); Study on the relationship of protease production and luminescence in *Vibrio harveyi*. *Journal of Applied Microbiology* 101: 200-205.

Naylor R., Goldburg R., Primavera J., Kautsky N., Beveridge M., Clay J., Folke C., Lubchenco J., Mooney H. en Troell M. (2000); Effect of aquaculture on world fish supplies. *Nature* 405: 1017-1024.

NBN 366.01: 'wateronderzoek, afvalwaters en verontreinigde waters: zwevende stoffen-centrifugaalmethode.', 1e uitgave, maart 1956.

Nealson K. en Hastings J. (1979). Bacterial bioluminescence: its control and ecological significance. *Microbiological Reviews* 43: 496-518.

Koji N. (2005); Prevention of infections by probiotics. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 100: 583-592.

Owens L., Austin D. en Austin B. (1996); Effect of strain origin on siderophore production in *Vibrio harveyi* isolates. *Diseases of aquatic organisms* 27: 157-160.

Patnaik S., Samocha T., Davis D., Bullis R. en Browdy C., (2006); The use of HUFA-rich algal meals in diets for *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture nutrition* 395-401.

Papatryphon E. en Soares J. (2000); Identification of feeding stimulants for striped bass, *Morone saxatilis*. *Aquaculture* 185: 339-352.

Phuoc L., Defoirdt T., Sorgeloos P. en Bossier P. (2009); Virulence of luminescent and non-luminescent isogenic vibrios towards gnotobiotic *Artemia franciscana* larvae and specific pathogen-free *Litopenaeus vannamei* shrimp. *Journal of Applied Microbiology* 106: 1388-1396.

Pillay T. (2004); *Aquaculture and the environment*. Second edition, Blackwell Publishing.

Prasad S., Morris P., Hansen R., Meaden P. en Austin B. (2005); A novel bacteriocin-like substance (BLIS) from a pathogenic strain of *Vibrio harveyi*. *Microbiology* 151: 3051-3058.

Proctor L. en Gunsalus R. (2000); Anaerobic respiratory growth of *Vibrio harveyi*, *Vibrio fischeri* and *Photobacterium leiognathi* with trimethylamine N-oxide, nitrate and fumarate: ecological implications. *Environmental Microbiology* 2: 399-406.

Pruder G. (2004); Biosecurity: application in aquaculture. *Aquacultural Engineering* 32: 3-10.

Pybus V., Loutit M., Lamont I. en Tagg J. (1994); Growth inhibition of the salmon pathogen *Vibrio ordalii* by a siderophore produced by *Vibrio anguillarum* strain VL4335. *Journal of Fish Diseases* 17: 311-324.

Redfield R. (2002); Is quorum sensing a side effect of diffusion sensing?  
Trends in Microbiology Vol.10: 365-370.

Reverchon S., Chantegrel B., Deshayes C., Doutheau A. en Cotte-Pattat N. (2002); New synthetic analogues of N-acyl homoserine lactones as agonists or antagonists of transcriptional regulators involved in bacterial quorum sensing. Bioorganic and medicinal chemistry letters 12 : 1153-1157.

Ricke S. (2003); Perspectives on the use of organic acids and short chain fatty acids as antimicrobials. Poultry Science 82: 632-639.

Ringø E., Myklebust R., Mayhew T.M en Olsen, R. (2007); Bacterial translocation and pathogenesis in the digestive tract of larvae and fry. Aquaculture 268: 251-264.

Rodríguez-Ramos T., Espinosa G., Hernández-López J., Gollas-Galván T., Marrero J., Borrell Y., Alonso M., Bécquer U. en Alonso M. (2008); Effects of Echerichia coli lipopolysaccharides and dissolved ammonia on immune response in southern white shrimp Litopenaeus schmitti. Aquaculture 274: 118-125.

Rowley A. en Powell A. (2007); Invertebrate Immune Systems—Specific, Quasi-Specific, or Nonspecific? The Journal of Immunology 179: 7209-7214.

Sakai M. (1999); Current research status of fish immunostimulants. Aquaculture 172: 63-92.

Salehizadeh H. en Van Loosdrecht M. (2004); Production of polyhydroxyalkanoates by mixed culture: recent trends and biotechnological importance. Biotechnology Advances 22: 261-279.

Schauder S. en Bassler B. (2001); The languages of bacteria. Genes & Development 15: 1468-1480.

Schertzer J., Boulette M. en Whiteley M. (2009); More than a signal: non-signaling properties of quorum sensing molecules. Trends in Microbiology Vol.17: 189-195.

Schneider O., Sereti V., Machiels M., Eding E. en Verreth J. (2006); The potential of producing heterotrophic bacteria biomass on aquaculture waste. Waterresearch 40: 2684 – 2694.



Schneider O., Chabrillon-Popelka M., Smidt H., Haenen O., Sereti V., Eding E. en Verreth J. (2007); HRT and nutrients affect bacterial communities grown on recirculation-aquaculture system effluents. *FEMS Microbiol Ecol* 60: 207-219.

Serfling S. (2000); Closed-Cycle, Controlled Environment Systems: The Solar Aquafarms Story. *The Advocate*, June.

Serfling S. (2006); Microbial Flocs: Natural Treatment Method Supports Fresh-Water, Marine Species in Recirculating Systems. *Global Aquaculture Advocate*, June.

Shiau S. en Jan F. (1992); Dietary ascorbic acid requirement of juvenile tilapia *Oreochromis niloticus* × *O. aureus*. *Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries* 58: 671-675.

Shiau S., Lung C. (1993); No dietary vitamin B<sub>12</sub> required for juvenile tilapia *Oreochromis niloticus* × *O. aureus*. *Comparative biochemistry and physiology. A. Comparative physiology*, 105: 147-150.

Sinha A., Baruah K en Bossier P. (2008); Horizon scanning: the potential use of biofloc as an anti-infective strategy in aquaculture - an overview. *Aquaculture health international*, June.

Smith, V., Brown J. en Hauton C. (2003); Immunostimulation in crustaceans: does it really protect against infection? *Fish Shellfish Immunol.* 15: 71-90.

Soltanian S., Dhont J., Sorgeloos P. en Bossier P. (2007); Influence of different yeast cell-wall mutants on performance and protection against pathogenic bacteria (*Vibrio campbellii*) in gnotobiotically-grown *Artemia*. *Fish & Shellfish Immunology* 23: 141-153.

Soltanian S., Thai T., Dhont J., Sorgeloos P en Bossier P. (2007); The protective effect against *Vibrio campbellii* in *Artemia nauplii* by pure  $\beta$ -glucan and isogenic yeast cells differing in  $\beta$ -glucan and chitin content operated with a source-dependent time lag. *Fish & Shellfish Immunology* 23: 1003-1014.

Soltanian S., François JM., Dhont J., Arnouts S., Sorgeloos P. En Bossier P. (2007); Enhanced disease resistance in *Artemia* by application of commercial  $\beta$ -glucans sources and chitin in a gnotobiotic *Artemia* challenge test. [Fish & Shellfish Immunology Volume 23, Issue 6, December, Pages 1304-1314.](#)

Soto-Rodriguez S., Roque A., Lizarraga-Partida M., Guerra-Flores A. en Gomez-Gil B. (2003); Virulence of luminous vibrios to *Artemia franciscana nauplii*. *Diseases of Aquatic Organisms* Vol. 53: 231-240, 2003.

Sperandio V., Mellies J., Nguyen W., Shin S. en Kaper J. (1999); Quorum sensing controls expression of the type III secretion gene transcription and protein secretion in enterohemorrhagic and enteropathogenic *Escherichia coli*. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 96: 15: 196-201.

Stickney R. (2005); *Aquaculture: an introductory text*. CABI Publishing, Cambridge, USA.

Subasinghe R. (1997); *Fish Health and Quarantine*.

In: Shehadeh Z. en Maclean J. (eds.), *Review of the state of the world aquaculture*. FAO Fisheries Circular No. 886 Rev.1: 45-49.

Subasinghe R., Curry D., McGladdery S. en Bartley D. (2003); *Recent Technological Innovations in Aquaculture*.

In: Subasinghe R. en McGladdery S. (eds.). *Review of the state of the world aquaculture*. FAO Fisheries circular No. 886 Rev.2: 69-74.

Sun J., Daniel R., Wagner-Döbler I. en Zeng AP. (2004); Is autoinducer-2 a universal signal for interspecies communication: a comparative genomic and phylogenetic analysis of the synthesis and signal transduction pathways. *BMC Evolutionary Biology*, 4: 36.

Swain P., Nayak S., Nanda P., Dash S. (2008); Biological effects of bacterial lipopolysaccharide (endotoxin) in fish: A review. *Fish & Shellfish Immunology* 25: 191-201.

Tacon A. (1990); *Standard Methods for the Nutrition and Feeding of Farmed Fish and Shrimp*. Argent Laboratories Press, Washington, DC, USA.

Tacon A. (2000); *Shrimp Feeds and Feeding Regimes in Zero-Exchange Outdoor Tanks*. The Advocate, April

Tacon A., Cody J., Conquest L., Divakaran S., Forster I. en Decamp O. (2002); Effect of culture system on the nutrition and growth performance of Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* (Boone) fed different diets. *Aquaculture Nutrition* 8: 121-137.

Tacon A. (2003); *Review of the state of the world aquaculture*. FAO Fisheries circular No. 886 Rev.2: 5-29 (2003).

In: Subasinghe R. en McGladdery S. (eds.), *Aquaculture Production Trends Analysis*.

Taw N. (2005); Shrimp Farming in Indonesia: Evolving Industry Responds to Varied Issues. Global Aquaculture Advocate August.

Taw N. (2008); Partial harvest/bio-floc system promising for pacific white shrimp. Global aquaculture advocate September/October.

Tendencia E. en de la Peña L (2001); Antibiotic resistance of bacteria from shrimp ponds. Aquaculture 195: 193-204.

Teshima S. (1998); Nutrition of *Penaeus japonicus*. Reviews in Fisheries Science, 6: 97-111.

The Economist (2003); The promise of a blue revolution.

Thorarinsson R. en David B. Powell D. (2006); Effects of disease risk, vaccine efficacy, and market price on the economics of fish vaccination. Aquaculture 256: 42-49.

Tidwell J. en Allan G. (2001); Fish as food: aquaculture's contribution. EMBO reports 2 : 958-963.

Tinh N., [Dierckens K](#), [Sorgeloos P](#) en [Bossier P](#) (2008); A review of the functionality of probiotics in the larviculture food chain. Marine Biotechnology, Volume 10: 1-12.

D. Van Cam T. (2009); The use of homoserine lactone-degrading and poly- $\beta$ -hydroxybutyrate-accumulating bacteria in crustacean and fish larviculture. PhD-thesis, Universiteit Gent, Gent, België.

Turovskiy Y., Kashtanov D., Paskhover B. en Chikindas M. (2007); Quorum Sensing: Fact, Fiction, and Everything in Between. Advances in Applied Microbiology 62: 191-234.

United Nations Population Division (2009), <http://esa.un.org/unup>, (geraadpleegd op 22/02/2009).

Vadstein O. (1997); The use of immunostimulation in marine larviculture: possibilities and challenges. Aquaculture 155: 401-417.

Van Hai N., Fotedar R. en Buller N. (2007); Selection of probiotics by various inhibition test methods for use in the culture of western king prawns, *Penaeus latisulcatus* (Kishinouye). *Aquaculture* 272: 231-239.

Verschuere L., Dhont J., Sorgeloos P. en Verstraete W. (1997); Monitoring Biolog patterns and r/K-strategists in the intensive culture of *Artemia* juveniles. *Journal of Applied Microbiology* 83: 603-612.

Verschuere L., Rombaut G., Huys G., Dhont J., Sorgeloos P. en Verstraete W. (1999); Microbial Control of the Culture of *Artemia* Juveniles through Preemptive Colonization by Selected Bacterial Strains. *Applied and Environmental Microbiology*, Vol. 65, No. 6 June, p. 2527-2533.

Verschuere L., Rombaut G., Sorgeloos P. en Verstraete W. (2000); Probiotic Bacteria as Biological Control Agents in Aquaculture. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, Dec, p. 655-671.

Verstraete W., Boon N. en Van de Wiele T. (2007); Microbial technology for re-use, cursus, Faculteit Bio-ingenieurswetenschappen, Universiteit Gent.

Vine N., Leukes W., Kaiser H., Daya S., Baxter J. en Hecht T. (2004); Competition for attachment of aquaculture candidate probiotic and pathogenic bacteria on fish intestinal mucus. *Journal of fish diseases* 27: 319-326.

Vitousek P., Mooney H., Lubchenco J. en Melillo J (1997); Human Domination of Earth's Ecosystems. *Science* Vol. 277: 494-499.

Wang Y-B., Li J-R. en Lin J. (2008); Probiotics in aquaculture: Challenges and outlook. *Aquaculture* 281: 1-4.

Wasielesky W. Jr., Atwood H., Stokes A. en Browdy C. (2006); Effect of natural production in a zero exchange suspended microbial floc based super-intensive culture system for white shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture* 258: 396-403.

Waters C. en Bassler B. (2005); Quorum sensing: cell-to-cell communication in bacteria. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* 21: 319-346.

Ways P. & Hanahan D. (1964); Characterization and quantification of red cell lipids in normal man. *Journal of Lipid Research* 5: 318-328.

Webster C. en Lim C. (2002); Nutrient requirements and feeding of finfish for aquaculture. CABI; 1 edition (April 4): 273-291.

Westerdahl, A., Olsson, J., Kjelleberg, S. en Conway, P. (1991); Isolation and characterization of turbot (*Scophthalmus maximus*) associated bacteria with inhibitory effects against *Vibrio anguillarum*. *Applied and Environmental Microbiology* 57: 2223-2228.

Wright R., Davis D., Chappell J., McFarland S. en Wu G. (2003); Interrelationship among methionine, choline, and betaine in channel catfish, *ictalurus punctatus*. M.Sc. thesis Submitted to the Graduate Faculty of Auburn University, Auburn, Alabama, USA.

Yeong Y. (2008); Protection of *Artemia* from vibriosis by heat shock and heat shock proteins. PhD thesis, Universiteit Gent, Gent, België.

Young K. (2006); The selective value of bacterial shape. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 70: 660-703.

Zhang X. en Austin B. (2000); Pathogenicity of *Vibrio harveyi* to salmonids. *Journal of Fish Diseases* 23: 93-102.