

2014•2015
FACULTEIT INDUSTRIËLE INGENIEURSWETENSCHAPPEN
master in de industriële wetenschappen: biochemie

Masterproef

Groefactoren uit varkensmest en hun invloed op de groei van Spirulina

Promotor :
ing. Liesbet PAULS

Promotor :
dr. EUGÈNE BOSMANS

Copromotor :
ing. BART THEWISSEN

Gezamenlijke opleiding Universiteit Hasselt en KU Leuven

Sarah Hendrickx

Scriptie ingediend tot het behalen van de graad van master in de industriële wetenschappen: biochemie

2014•2015
Faculteit Industriële
ingenieurswetenschappen
master in de industriële wetenschappen: biochemie

Masterproef

Groefactoren uit varkensmest en hun invloed op de groei
van Spirulina

Promotor :
ing. Liesbet PAULS

Promotor :
dr. EUGÈNE BOSMANS

Copromotor :
ing. BART THEWISSEN

Sarah Hendrickx

*Scriptie ingediend tot het behalen van de graad van master in de industriële
wetenschappen: biochemie*

Woord vooraf

Toen ik afstudeerde aan de middelbare school had ik nooit verwacht om - zoveel jaar later - een masteropleiding industrieel ingenieur in de biochemie af te ronden. Toen lagen mijn interesses bij talen, geschiedenis, psychologie. Maar de wetenschap heeft me gebeten en labowerk, van het routinematige tot het baanbrekende, heeft allebei zijn charmes. Ik ga de toekomst tegemoet met een stevige dosis nieuwsgierigheid.

Ik wil graag mijn externe promotor dhr. Eugene Bosmans bedanken. Zowel voor het nalezen van mijn werk als voor de enkele maanden die ik naast mijn stage heb mogen doorbrengen op het bedrijf. Het was niet enkel een nuttige maar ook een leuke ervaring, met veel variatie.

Mijn interne promotor Ing. Liesbet Pauls wil ik eveneens bedanken voor het grondig nalezen van mijn teksten, haar goede begeleiding en ook haar aanmoedigende woorden wanneer mijn algenculturen niet deden wat ik hoopte.

Ing. Bart Thewissen, wil ik ook extra bedanken voor alle hulp en advies die hij tijdens mijn stageperiode heeft gegeven. Ik wil ook mevr. Aïcha Sarr bedanken voor het gebruik van haar algenculturen.

Tot slot wil ik ook nog mijn ouders en vrienden bedanken voor hun steun tijdens de hele opleiding, met in het bijzonder Cindy Liebens voor haar grafisch talent en advies bij het ontwerp van mijn poster.

Inhoudsopgave

WOORD VOORAF	1
LIJST VAN TABELLEN	5
LIJST VAN FIGUREN	7
ABSTRACT	9
ABSTRACT IN ENGLISH	11
1 INLEIDING	13
1.1 SITUERING	13
1.2 PROBLEEMSTELLING	14
1.3 VARKENSMEST.....	15
1.3.1 Mestverwerking.....	15
1.3.2 Samenstelling varkensdrijfmest.....	15
1.3.3 Indool-3-azijnzuur.....	16
1.4 ALGEN	18
1.4.1 Cyanobacteriën.....	18
1.4.2 Algenbloei en cyanotoxines.....	21
1.4.3 Bepaling van toxiciteit van commerciële algenpreparaten	23
1.5 SPIRULINA	24
1.5.1 Voedingswaarde en geneeskundige toepassingen van Spirulina	24
1.5.2 Concentratiebepaling.....	25
1.5.3 Teelt en groeiparameters.....	26
1.5.4 Spirulina en indool-3-azijnzuur	27
2 MATERIAAL EN METHODEN	29
2.1 GROEI BIJ VERSCHILLENDE CONCENTRATIES IAA.....	29
2.1.1 Microscopische algenconcentratiebepaling via Makler	29
2.1.2 Medium.....	30
2.1.3 Groeiparameters.....	31
2.2 CONCENTRATIEBEPALING VIA <i>IN VIVO</i> FYCOCYANINE	31
2.2.1 Fluorescentiemeting via Victor™ X4 Multilabel Plate Reader	32
2.2.2 Cavitatie via SONOPULS (Bandelin)	32
2.2.3 Bepaling van de regressievergelijking en het 95% betrouwbaarheidsinterval	33
2.2.4 Bepaling van de aantoonbaarheidsgrens, reproduceerbaarheid en meetonzekerheid.....	33
3 RESULTATEN EN DISCUSSIE	35
3.1 INVLOED VAN INDOOL-3-AZIJNZUUR OP DE GROEI VAN SPIRULINA	35
3.1.1 Generatietijd	38
3.1.2 Celmorfologie	45
3.2 CONCENTRATIEBEPALING VIA FYCOCYANINE FLUORESCENTIE	46
3.2.1 Protocol A: geen celdestructie.....	46
3.2.2 Protocol B: celdestructie via SONOPULS (Bandelin)	49
3.2.3 Vergelijking van beide methodes.....	52
4 BESLUIT	55
LITERATUURLIJST	57

BIJLAGEN	61
BIJLAGE A1: BEREKENING AANTONBAARHEIDSGRENS PROTOCOL A	62
BIJLAGE A2: BEREKENING REPRODUCEERBAARHEID PROTOCOL A	64
BIJLAGE B1: BEREKENING AANTONBAARHEIDSGRENS PROTOCOL B	66
BIJLAGE B2: BEREKENING REPRODUCEERBAARHEID PROTOCOL B	67
BIJLAGE C: VOORBEELDBEREKENING 95% BETROUWBAARHEIDSINTERVAL	68
<i>Protocol A</i>	68
<i>Protocol B</i>	68

Lijst van tabellen

Tabel 1: Gemiddelde samenstelling varkens- en zeugendrijfmest	16
Tabel 2: Samenstelling Zarrouk medium	26
Tabel 3: Samenstelling Spirulinamedium	30
Tabel 4: Samenstelling NPK meststof	30
Tabel 5: Instellingen VICTOR™ X4 Multilabel Plate Reader (fycocyaninemeting)	32
Tabel 6: Concentratie IAA per kweekfles	35
Tabel 7: Overzicht resultaten groei Spirulina bij verschillende IAA-concentraties (0 µg/ml t.e.m. 10 µg/ml)	36
Tabel 8: Overzicht resultaten groei Spirulina bij verschillende IAA-concentraties (12 µg/ml t.e.m. 18 µg/ml)	37
Tabel 9: Significantieberekening groei	38
Tabel 10: Verdubbelingstijd IAA-experiment.....	39
Tabel 11: Significantiebepaling ($\alpha = 0,05$) van lengte Spirulina.....	46
Tabel 12: Resultaten regressieanalyse (protocol A)	48
Tabel 13: Meetonzekerheid (protocol A)	48
Tabel 14: Resultaat reproduceerbaarheid (protocol A)	49
Tabel 15: Resultaten regressieanalyse (protocol B)	51
Tabel 16: Resultaat reproduceerbaarheid (protocol B)	51
Tabel 17: Meetonzekerheid (protocol B)	51
Tabel 18: Samenvatting protocol A en B	52

Lijst van figuren

Figuur 1: Visueel overzicht kringloop	13
Figuur 2: Enzymatisch gekatalyseerde pathways van tryptofaan naar IAA	17
Figuur 3: Relatieve absorptie van plantepigmenten	19
Figuur 4: Emissiespectrum van fycocyanine	19
Figuur 5: Energietransfersysteem bij cyanobacteriën: recuperatie van lichtenergie.	20
Figuur 6: Fycocyanobiline, het chromofoor in fycocyanine.	20
Figuur 7: Structuur van fycocyanine.....	21
Figuur 8: Secchischijf.	22
Figuur 9: Elektronenmicroscopische beelden van <i>Spirulina platensis</i>	24
Figuur 10: Microscopische beelden van Spirulina	25
Figuur 11: IAA-productie door Spirulina bij verschillende tryptofaanconcentraties	27
Figuur 12: Voorbeeld telling van aantal lussen per alg	30
Figuur 13: Principe van cavitatie via ultrasone puls.....	33
Figuur 14: Formule standaardafwijking.....	34
Figuur 15: Formule reproduceerbaarheid.....	34
Figuur 16: Formule meetonzekerheid.....	34
Figuur 17: Formules gepaarde T-toets.....	38
Figuur 18: Formule berekening verdubbelingstijd	39
Figuur 19: Procentuele groei in functie van de tijd (0 µg IAA/ml)	39
Figuur 20: Procentuele groei in functie van de tijd (2 µg IAA/ml)	40
Figuur 21: Procentuele groei in functie van de tijd (4 µg IAA/ml)	40
Figuur 22: Procentuele groei in functie van de tijd (6 µg IAA/ml)	41
Figuur 23: Procentuele groei in functie van de tijd (8 µg IAA/ml)	41
Figuur 24: Procentuele groei in functie van de tijd (10 µg IAA/ml)	42
Figuur 25: Procentuele groei in functie van de tijd (12 µg IAA/ml)	42
Figuur 26: Procentuele groei in functie van de tijd (14 µg IAA/ml)	43
Figuur 27: Procentuele groei in functie van de tijd (16 µg IAA/ml)	43
Figuur 28: Procentuele groei in functie van de tijd (18 µg IAA/ml)	44
Figuur 29: Verdubbelingstijden (overzicht)	44
Figuur 30: Correctiefactor in functie van de tijd	45
Figuur 31: Data (protocol A)	47
Figuur 32: Residuanalyse (protocol A)	47
Figuur 33: Ijklijn fycocyanine (protocol A: zonder voorafgaande celdestructie)	49
Figuur 34: Datapunten (protocol B).....	50
Figuur 35: Residuanalyse (protocol B)	50
Figuur 36: Ijklijn fycocyanine (protocol B: voorafgaande celdestructie via ultrasoon). 52	
Figuur 37: Vergelijking betrouwbaarheidsintervallen protocol A en B	53

Abstract

De microalg Spirulina is in staat te groeien op varkensdrijfmest. Varkensdrijfmest bevat sporen van de plantengroefactor indool-3-azijnzuur (IAA), geproduceerd door micro-organismen aanwezig in de darmen van varkens. Uit eerder onderzoek blijkt dat IAA de nutriëntopname van Spirulina promoot en zo diens voedingswaarde verhoogt.

In dit onderzoek werd de invloed van IAA op de groei van Spirulina onderzocht. Daarnaast werd een protocol uitgewerkt om de concentratie aan Spirulina te bepalen via fluorescentiemeting van fycocyanine, een pigment dat Spirulina in vivo aanmaakt. Fluorescentiemeting is immers sneller en objectiever dan de microscopische concentratiebepaling via een telkamer.

Spirulinacultuur werd opgekweekt op een medium waaraan IAA werd toegevoegd. De eindconcentratie IAA in elke cultuurfles varieerde van 0 tot 18 μg IAA/ml. De groei van deze culturen werd microscopisch opgevolgd.

Uit de resultaten blijkt dat IAA de groeisnelheid van Spirulina bevordert. Een concentratie van 2 tot 8 μg IAA/ml verkortte de verdubbelingstijd. Met het oog op de verwerking van varkensdrijfmest wordt aangeraden om 2 μg IAA/ml aan het medium toe te voegen.

De concentratie aan Spirulina is te benaderen via meting van fycocyanine dat een lineair model volgt. Onderzoek bewijst tevens dat de aantoonbaarheidsgrens verbetert als de stalen eerst een celdestructie via een ultrasone probe ondergaan. Desondanks is deze meting nog niet geoptimaliseerd en dus voorlopig enkel bruikbaar om een indicatie te krijgen van de Spirulinaconcentratie.

Abstract in English

The microalgae *Spirulina* is able to grow on liquid pig manure. This manure contains trace amounts of the plant hormone Indole-3-Acetic Acid (IAA), produced by microorganisms in the pig bowel. IAA promotes nutrient uptake in *Spirulina*, accelerating growth and increasing its nutritive value.

This paper looks further into the influence of IAA on *Spirulina* growth. In addition a protocol will be formulated to measure the *Spirulina* concentration using the fluorescence of phycocyanin, to replace the more time-consuming microscopic method. Phycocyanin is a pigment that *Spirulina* produces naturally in detectable quantities.

Spirulina is cultivated in alkaline, IAA-free culture medium. IAA is then added in concentrations ranging from 0 to 18 μg IAA/ml. These cultures are quantified daily using the microscopic method to ascertain the *Spirulina* concentration.

IAA accelerates the growth of *Spirulina*. Concentrations of 2 to 8 μg IAA/ml led to a shorter generation time compared to the culture without IAA. A dose of 2 μg IAA/ml is recommended for use in the validation of liquid pig manure as *Spirulina* culture medium.

A linear model can approximate the *Spirulina* concentration in function of the phycocyanin fluorescence. An ultrasonic destruction of the algae cells prior to the measurement lowers the detection limit. This protocol is as yet however insufficient for use as more than a rough approximation of the *Spirulina* concentration.

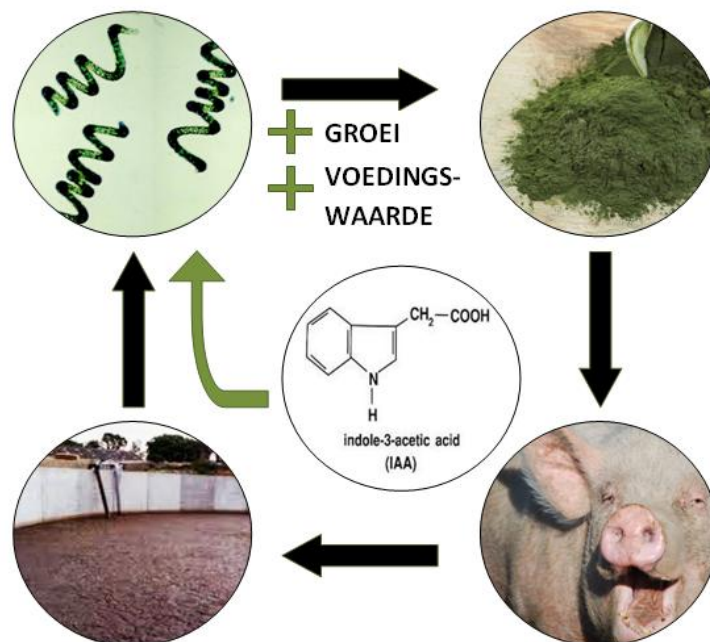
1 Inleiding

Epsilon Biotech BVBA is een bedrijf te Zonhoven dat gespecialiseerd is in verschillende biotechnologische onderzoeken en analyses. Een van hun onderzoekslijnen is de groei van de microalg Spirulina (hoofdstukken 1.4 en 1.5). Het uiteindelijke doel is deze op grote schaal te cultiveren met varkensdrijfmest (hoofdstuk 1.3) als groeimedium. Deze Spirulina kan vervolgens gebruikt worden als voedingssupplement of nuttige moleculen zoals fycocyanine kunnen eruit geëxtraheerd worden.

1.1 Situering

De microalg Spirulina is in staat te groeien op varkensdrijfmest. De gegroeide algen kunnen vervolgens gebruikt worden als voedingssupplement voor het varken. Op deze manier wordt varkensdrijfmest gevaloriseerd en wordt de kringloop gesloten. Varkensdrijfmest heeft een complexe samenstelling en bevat sporen van indool-3-azijnzuur (IAA), geproduceerd door de micro-organismen aanwezig in de darmen van het varken. Epsilon Biotech bvba wilt onderzoeken wat de invloed is van IAA op de groei van Spirulina. Ook wordt een methode ontwikkeld om de concentratie aan Spirulina te bepalen via fluorescentie. Fluorescentiemeting is immers sneller en objectiever dan de microscopische concentratiebepaling via een telkamer.

Eerdere onderzoeken van Mohammed (2011) suggereren dat IAA de groei en nutriëntopname van Spirulina promoot en alzo diens voedingswaarde verhoogt. Figuur 1 vat dit visueel samen. (Kosuge, 1966) (Karkos, 2011) (Mohammed, 2011)



Figuur 1: Visueel overzicht kringloop (Afbeldingsbronnen: Spirulina: www.esa.int (2015), Varken: s0.geograph.org.uk (2015), Spirulinapoeder: Spirulinapowder-review.com (2015), Drijfmest: www.veevoedingsadviesbureau.nl (2015), IAA: deshengchemical.en.alibaba.com (2015).)

Spirulina opkweken op een medium met IAA en varkensdrijfmest heeft twee voordelen. Ten eerste, de varkensmest wordt behandeld tot het geschikt is om geloosd te worden in het milieu. Ten tweede, de groei van Spirulina wordt geboost door zowel de nutriënten in de mest als door IAA, aanwezig in varkensmest of afzonderlijk toegevoegd.

1.2 Probleemstelling

Uit de literatuur blijkt dat een groeimedium dat IAA bevat inderdaad een interessante invloed op de groei en morfologie van Spirulina uitoefent. Het medium dat Mohammed en Mohd gebruiken is Zarrouks medium. Dit is echter een relatief duur medium om op grote schaal te implementeren. (Mohammed, 2011)

De uiteindelijke doelstelling van Epsilon Biotech is een medium samen te stellen op basis van varkensdrijfmest. Maar aangezien mest reeds een onbekende hoeveelheid IAA bevat kan dit niet gebruikt worden om de invloed van IAA op de algengroei te onderzoeken. Er wordt gebruik gemaakt van een alkalisch medium zonder varkensmest om Spirulina in te laten groeien.

De groei is correct op te volgen door de concentratie aan Spirulina te bepalen. Aangezien Spirulina een spiraalvormige structuur heeft waarvan de lengte sterk kan variëren, moet een detectiemethode gekozen worden die rekening houdt met de lengte. Microscopische concentratiebepaling via een telkamer is een mogelijkheid, waarbij de lengte in rekening wordt gebracht door het telresultaat (algen/ml) te vermenigvuldigen met een correctiefactor. Deze is gebaseerd op de gemiddelde lengte uitgedrukt in gemiddeld aantal lussen per alg. Microscopische telling is echter zeer arbeidsintensief.

Cyanobacteriën, waartoe Spirulina behoort, produceren *in vivo* pigmenten zoals fycocyanine. Fycocyanine heeft een absorptiemaximum bij 620 nm. Het kan geëxciteerd worden door licht met een golflengte van 630 nm en emitteert vervolgens licht met een golflengte van 660 nm. Enkel cyanobacteriën produceren fycocyanine. Andere mogelijke contaminanten in de algensuspensie, zoals *Chlorella vulgaris* of zoöplankton, produceren deze molecule niet. (Kasinak, 2015) (Smith, 2014)

Het is dus mogelijk om de concentratie aan Spirulina te bepalen via het meten van fycocyanine. Hiervoor wordt een protocol uitgewerkt.

Na het samenstellen van het medium en het opstellen van een methode om de concentratie van Spirulina te bepalen, kan het eigenlijke onderzoek beginnen, namelijk de invloed van verschillende concentraties van indool-3-azijnzuur op de groeisnelheid en de morfologie van Spirulina nagaan. Eerder onderzoek vermeldt een grotere groeisnelheid en een langere celstructuur. We verwachten dat de groeisnelheid recht evenredig met de concentratie stijgt, maar dat de maximale groei onafhankelijk blijft van de concentratie IAA. De maximale groei is immers voornamelijk beperkt door uitputting van nutriënten. (Mohammed, 2011)

1.3 Varkensmest

Bij de varkenskweek worden grote hoeveelheden mest geproduceerd en afgevoerd als drijfmest. Deze mest bevat hoge gehalten stikstof en fosfor, nuttige nutriënten voor de plantengroei maar nefast in grote hoeveelheden. Niet alle geproduceerde mest mag worden gebruikt om akkers te bemesten. De akkers nemen immers slechts een percentage ervan op en er is een grote afvloeï naar grondwater en oppervlaktewateren. Deze vermisting leidt onder andere tot een kleinere biodiversiteit, vervuiling van drinkwater en eutrofiëring van oppervlaktewateren. Daarom controleert de Mestbank in Vlaanderen de veehouders. Incorrecte verwerking van het mestoverschot wordt dan ook streng gesanctioneerd. (VLM, 2015) (MIRA, 2015)

1.3.1 Mestverwerking

In het voortgangsrapport van 2013 schrijft de Mestbank dat de meest toegepaste techniek om mest te verwerken het actief-slib systeem is. Deze wordt ook toegepast in de klassieke rioolwaterzuiveringsinstallaties, waarbij het vloeibare afvalwater een aerobe nitrificatie en een anaerobe denitrificatie ondergaat, zodat ammoniak en nitraat worden omgezet naar inert stikstofgas. (Mestbank, 2013) (VCM, 2015)

Dit biologisch systeem heeft echter beperkingen. Er blijft immers een slibfractie over die verder verwerkt moet worden. Bovendien nemen de installaties veel ruimte in beslag, en het enige wat ze opleveren is, in het beste geval, energie uit slibverbranding of biogas. Een installatie die tegelijkertijd mestoverschot verwerkt en een nuttig product oplevert, is dan ook een valabeler alternatief. (Solovchenko, 2013)

1.3.2 Samenstelling varkensdrijfmest

Varkensdrijfmest is een donkerbruine nutriëntrijke vloeistof. De samenstelling is variabel en afhankelijk van meerdere factoren, onder andere het rantsoen en de opslagduur. De gemiddelde samenstelling zoals weergegeven in Tabel 1 geeft dus enkel een indicatie, want de werkelijke samenstelling kan hiervan afwijken. (Coppens, 2009)

Naast deze macronutriënten bevat varkensdrijfmest tevens sporenelementen zoals zink en koper. Ook biomoleculen afkomstig uit het metabolisme van micro-organismen komen in de drijfmest voor. Ze kunnen zowel geproduceerd zijn in het verteringsstelsel als tijdens de opslag in de drijfmesttank. Een van deze biomoleculen die voorkomen in varkensdrijfmest is indool-3-azijnzuur (IAA). (Koehler, 2013)

Tabel 1: Gemiddelde samenstelling varkens- en zeugendrijfmest (Koch Eurolab, 2015)

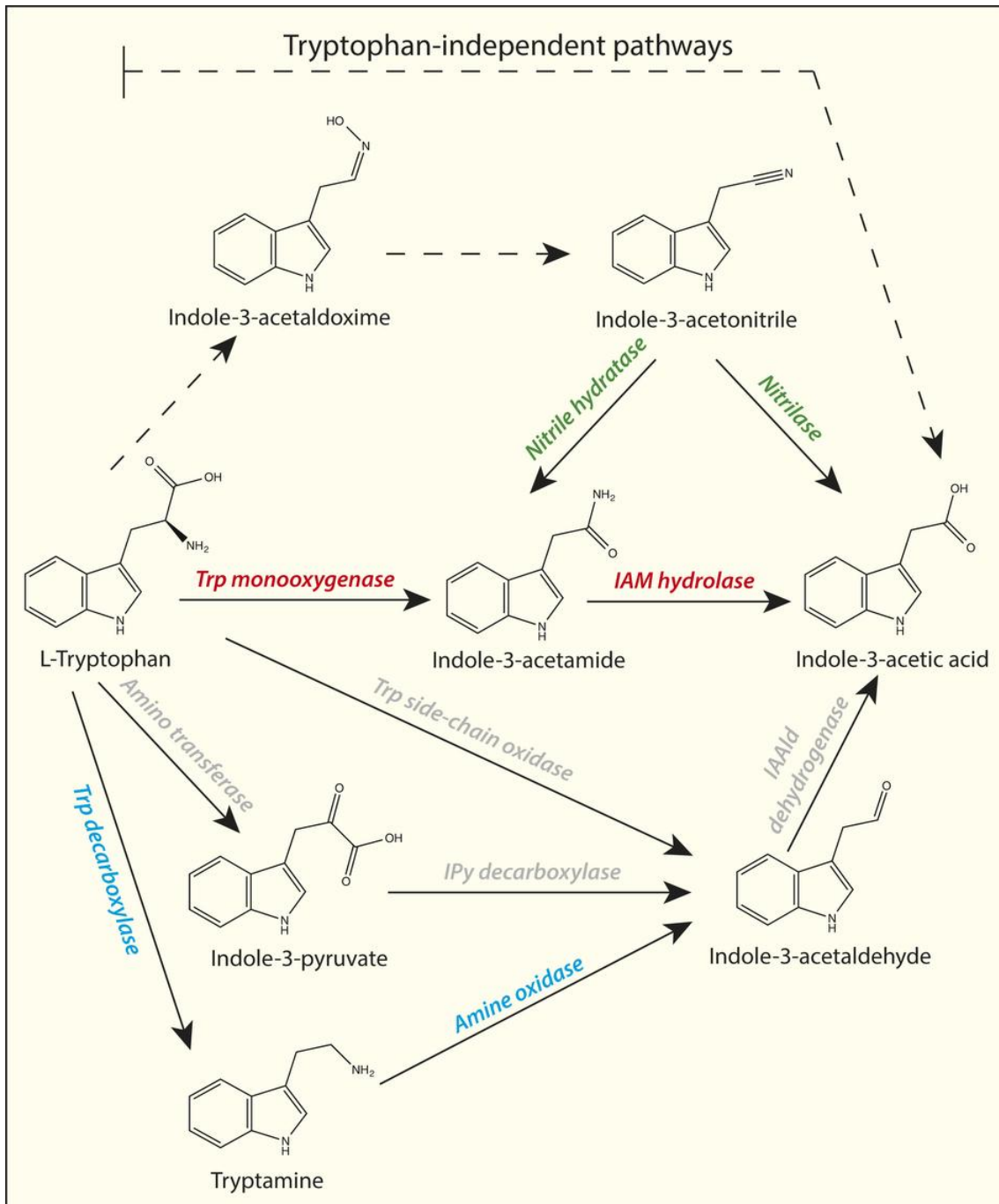
		Vleesvarkensdrijfmest	Zeugendrijfmest
Soortelijk gewicht		1,040	1,000
Droge stof %		9,0	5,5
Organische stof %		6,0	3,5
Gehaltes in kg/ton mest	Stikstof N-totaal	7,2	4,2
	Fosfor als P ₂ O ₅	4,2	3,0
	Kalium als K ₂ O	7,2	4,3
	Magnesium als MgO	1,8	1,1
	Natrium als Na ₂ O	0,9	0,6
	Zwavel (S)	0,6	0,4

1.3.3 Indool-3-azijnzuur

Indool-3-azijnzuur (IAA) komt als groeifactor van nature voor in plantencellen. IAA veroorzaakt onder andere elongatie van de stengel. Echter ook andere levende wezens zoals dieren en micro-organismen produceren IAA, als een syntheseproduct van de tryptofaanpathway. IAA heeft een LD50 bij muizen na injectie van 150 mg per kilogram lichaamsgewicht. (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes, 2015) (Sheldrake, 1973) (Green Plantchem, 2009)

Er zijn meerdere pathways mogelijk om IAA te bekommen uit tryptofaan. Deze worden samengevat in Figuur 2. (Spaepen, 2013)

Tryptofaan is de precursor van een scala aan biologisch actieve stoffen, onder andere het hormoon melatonine en de neurotransmitter serotonine. (Campbell, 2008)



Figuur 2: Enzymatisch gekatalyseerde pathways van tryptofaan naar IAA (nature.com, 2015)

1.4 Algen

De studie van algen en wieren wordt aangeduid met de term fycologie. Algen zijn een diverse groep organismen en onder deze noemer vallen zowel eukaryoten als prokaryoten. De definitie van algen, zoals omschreven door Lee, R.E. (2008), is de volgende:

The algae are thallophytes (plants lacking roots, stems, and leaves) that have *chlorophyll a* as their primary photosynthetic pigment and lack a sterile covering of cells around the reproductive cells. This definition encompasses a number of plant forms that are not necessarily closely related, for example, the cyanobacteria which are closer in evolution to the bacteria than to the rest of the algae. (Lee, 2008)

Algen zijn thallofyten (planten zonder wortel, stengel en bladeren) die *chlorofyl a* bezitten als primair pigment voor de fotosynthese en die geen steriele mantel van cellen rondom de voortplantingscellen hebben. Deze classificatie omvat een aantal planten die niet nauw verwant zijn, zoals bijvoorbeeld de cyanobacteriën die evolutionair dichter bij de bacteriën staan dan bij de rest van de algen. (Lee, 2008, vertaald)

De meeste algensoorten komen voor in waterige milieus. Ook in extremere omstandigheden worden algen gevonden: in sneeuwlandschappen, woestijnen, op rotsen en in heetwaterbronnen. (Lee, 2008)

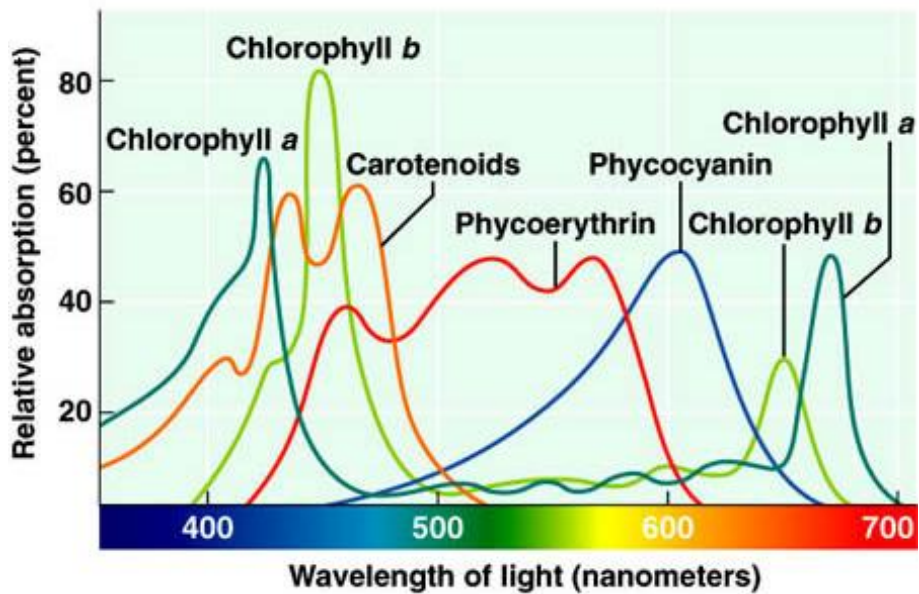
De alg *Spirulina* behoort tot de cyanobacteriën.

1.4.1 Cyanobacteriën

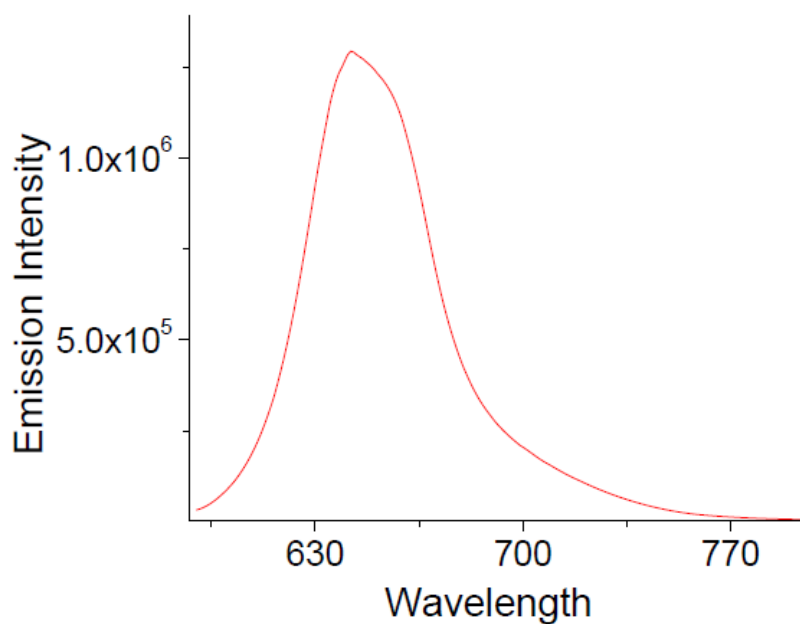
Cyanobacteriën zijn **prokaryoot** en **fototroof**. Hun celwand is vergelijkbaar met die van Gramnegatieve bacteriën, met een dunne peptidoglycaanlaag buiten hun cytoplasmamembraan. De meeste cyanobacteriën bezitten bovendien een **kapsel** of **EPS** (*extracellulair polymeric substances*) van een polysaccharide 'slijmstof' (*mucilage*) en cellulose. Dit kapsel beschermt de cellen tegen uitdroging en heeft vaak een kleur. Algen uit zure milieus bezitten meestal een rood kapsel; in basische milieus is het kapsel blauw; milieus met een hoog zoutgehalte leidt tot bruine of gele kapsels. Bij een tekort aan CO₂ verliest de alg haar kapsel. (Lee, 2008)

Behalve chlorofyl, noodzakelijk voor hun fotosynthese, bevatten cyanobacteriën **fycobiliproteïnen**. Dit zijn aggregaten van wateroplosbare chromoproteïnen. Twee fycobiliproteïnen die in alle cyanobacteriën voorkomen zijn C-fycocyanine en allofycocyanine. De twee overige fycobiliproteïnen, namelijk C-fyco-erythrine en fyco-erythrocyanine, komen enkel in bepaalde soorten voor, waaronder ook *Spirulina*. De concentratie aan fycobiliproteïnen is afhankelijk van de groeiomstandigheden, voornamelijk de lichtkwaliteit. Zo wordt bijvoorbeeld de fycocyanineproductie geïnhibeerd door groen licht. (Lee, 2008)

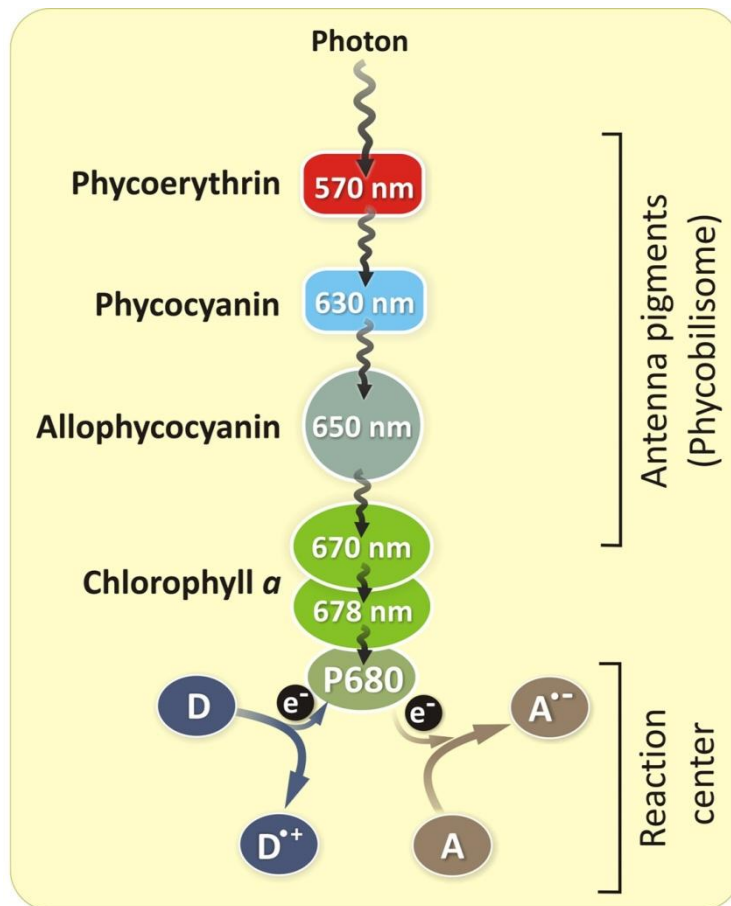
Zoals weergegeven in Figuur 3 hebben pigmenten zoals fycoerythrine en fycocyanine absorptiemaxima op golflengtes waarbij chlorofyl niet absorbeert. Het geabsorbeerde licht wordt vervolgens geëmitteerd op een hogere golflengte. In het geval van fycocyanine ligt het absorptiemaximum rond 600 nm en de emissiegolflengte ligt rond 640 nm (Figuur 4), waarbij chlorofyl de lichtenergie opnieuw kan opnemen. Fycocyanine en fycoerythrine spelen zodoende een rol in de recuperatie van lichtenergie uit golflengtes die voor chlorofyl zelf onbruikbaar zijn (Figuur 5). (Su, 1992) (Govindjee, 2011)



Figuur 3: Relatieve absorptie van plantepigmenten (ottawahigh.com, 2015)



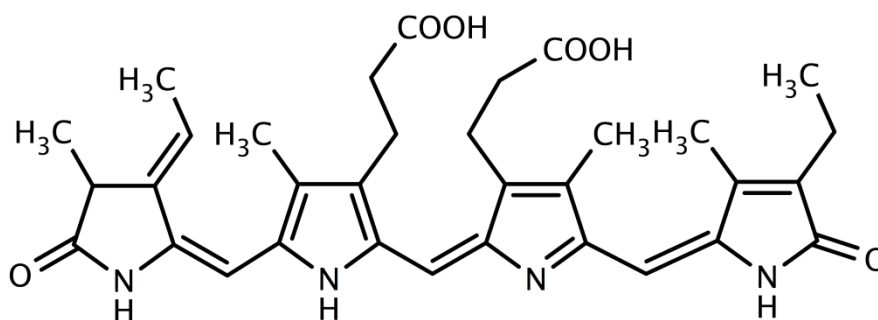
Figuur 4: Emissiespectrum van fycocyanine (Suresh, 2009)



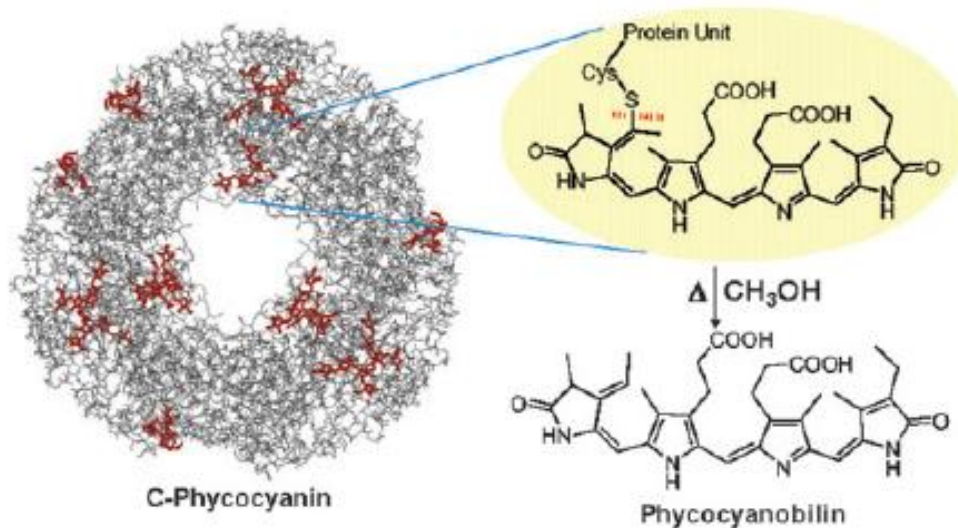
Figuur 5: Energietransfersysteem bij cyanobacteriën: recuperatie van lichtenergie. Het emissielicht van het ene molecule is van de geschikte golflengte om het volgende molecule te exciteren. (Govindjee, 2011)

Fycocyanine wordt in het laboratorium reeds toegepast als fluorescent label, onder andere bij Fluorescence Activated Cell Sorting (FACS) en Fluorescence Resonance Energy Transfer (FRET) assays. (Phyco Biotech, 2013)

Het chromofoor in fycocyanine is fycocyanobiline (Figuur 6). Dit biline is covalent gebonden aan S van cysteine in eiwitten van het apofycocyanine (Figuur 7).



Figuur 6: Fycocyanobiline, het chromofoor in fycocyanine.



Figuur 7: Structuur van fycocyanine en fycocyanobiline (Suresh, 2009)

Fycocyanine mag niet verward worden met **cyanofycine**. Dit eerste is een pigment, terwijl cyanofycine voornamelijk als stikstofreserve functioneert. (Kolodny, 2006)

Alle huidig bekende cyanobacteriën zijn **diazotroop**. Dit betekent dat ze in staat zijn om stikstofgas uit de atmosfeer te fixeren onder de vorm van ammonium. Dit proces wordt gekatalyseerd door het enzym nitrogenase en vereist veel energie. Nitrogenase wordt geïnactiveerd door zuurstof. Aangezien bij de lichtreactie van de fotosynthese zuurstof vrijkomt, kon dit problemen opleveren. Cyanobacteriën vermijden deze inactivatie op diverse manieren, al naargelang de soort. Sommige cyanobacteriën bevatten heterocysten waarin de stikstoffixatie doorgaat. Dit zijn blaasjes omgeven door een glycolipide membraan dat ondoordringbaar is voor zuurstof. Andere cyanobacteriën, waaronder Spirulina, laten de stikstoffixatie enkel 's nachts doorgaan, wanneer de lichtreactie van het fotosynthesesysteem inactief is en er dus geen zuurstof geproduceerd wordt die kan storen. (Lee, 2008)

Cyanobacteriën stellen een aanzienlijke hoeveelheid stikstofbevattende en organische metabolieten vrij in het medium. Dit komt door hun gebrek aan efficiënte **feedbackregulatie**. Amino-zuren worden geproduceerd zodat er voldoende aanwezig zijn voor de reguliere genexpressie, maar cyanobacteriën hebben geen mechanisme dat de productie van een amino-zuur dat in overmaat aanwezig is, stillegt. Dit benadeelt cyanobacteriën ten opzichte van organismen die wel feedbackregulatie bezitten en die zodoende geen energie verspillen met onnodige amino-zuursynthese. Dat verklaart waarom cyanobacteriën vooral in grote aantallen voorkomen in milieus waar weinig of geen competitie met andere micro-organismen is. (Lee, 2008)

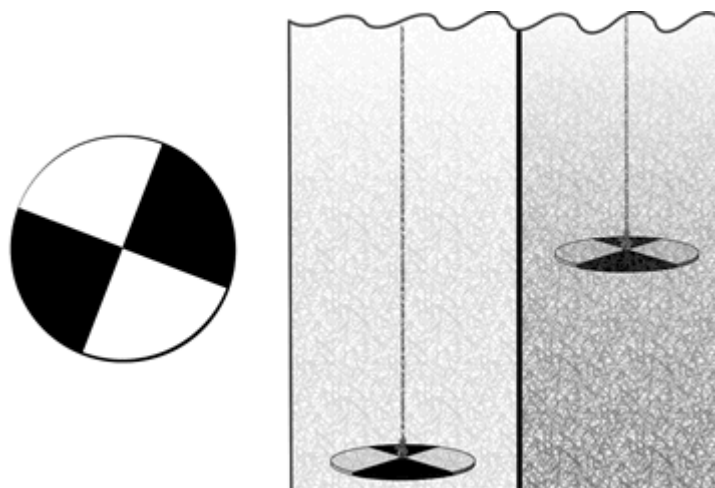
1.4.2 Algenbloei en cyanotoxines

Algenbloei, waarbij algen in zodanige hoeveelheid voorkomen dat ze een zuurstoftekort (*hypoxie*) veroorzaken in het water door de donkerreactie van de fotosynthese, is een wereldwijd probleem in oppervlaktewateren. Dit verschijnsel wordt veroorzaakt door

teveel nutriënten in het water, voornamelijk stikstof en fosfaat, in combinatie met hogere temperaturen. (Kwaliteit Zwemwater, 2015) (Campbell, 2008)

Bepaalde cyanobacteriën stellen bovendien toxines vrij, namelijk **cyanotoxines**. In mens en dier beïnvloeden deze neurotoxines en hepatotoxines respectievelijk de hersenen en de lever. Hun aanwezigheid in drinkwater kan zelfs tot sterfte leiden. (Kasinak, 2015) (Lee, 2008)

Monitoring van de cyanobacteriepopulatie is dus een belangrijk topic. De Wereldgezondheidsorganisatie (WHO) heeft dan ook richtwaarden opgesteld voor het gehalte cyanobacteriën in recreatiewater, en Korea heeft sinds 1997 drie waarschuwniveaus vastgelegd in verband met cyanobacteriën in drinkwater: *Caution* (500 cellen/ml), *Warning* (5000 cellen/ml) en tenslotte *Outbreak* (1 000 000 cellen/ml). Deze concentratiebepaling gebeurt echter vaak via subjectieve methodes zoals microscopische telling en de Secchischijf (Figuur 8). Een objectievere methode, namelijk chlorofylbepaling, geeft een slechte correlatie tussen het chlorofylgehalte en de concentratie cyanobacteriën, zeker in water met een mengcultuur. (Ahn, 2007)



Figuur 8: Secchischijf (<http://www.lmvp.org/>, 2004) Deze platte schijf wordt in het water gelaten tot een waarnemer de schijf niet meer kan onderscheiden. De diepte waarop de schijf nog net zichtbaar is, is een maat voor de turbiditeit en dus voor de concentratie aan algen.

Een fluorometrische detectiemethode van fycocyanine biedt hier mogelijk de uitkomst. Ahn et.al. (2007) vond namelijk een correlatie tussen *in vivo* fluorescentie van fycocyanine en het aantal algencellen per ml. Kasinak et. al. (2015) weerlegt dit echter, en stelt vast dat de correlatie sterker is tussen *in vivo* fluorescentie van fycocyanine en het biovolume cyanobacteriën. Cyanobacteriën hebben immers een diverse morfologie, van cilindervormig tot sferisch tot filamenteus, en in een mengcultuur zullen de grotere soorten een hoger fycocyaninesignaal geven bij dezelfde concentratie. (Ahn, 2007) (Lee, 2008) (Kasinak, 2015)

In Vlaamse wateren komen overwegend cyanobacteriën voor die het hepatotoxine **microcystine** produceren. De Vlaamse Milieumaatschappij controleert zwemvijvers op de aanwezigheid van cyanobacteriën en indien het gehalte microcystine hoger is dan 20

microgram per liter moet de zwembijver onmiddellijk gesloten worden. Hierbij wordt wel verondersteld dat de aanwezige cyanobacteriën geen ander toxine produceren dan microcystine. (Kwaliteit Zwemwater, 2015)

1.4.3 Bepaling van toxiciteit van commerciële algenpreparaten

Er zijn twee methoden om een staal te testen op toxiciteit. Ofwel zijn de toxines gekend en wordt specifiek op hun aanwezigheid en concentratie getest, ofwel wordt een meer globale test uitgevoerd.

Het gehalte aan microcystine kan bijvoorbeeld bepaald worden door een extractie uit te voeren met 50% methanol en de resulterende waterige fase te analyseren via High-performance liquid chromatography in combinatie met massaspectrometrie (HPLC-MS). (Cyanosite, 2015)

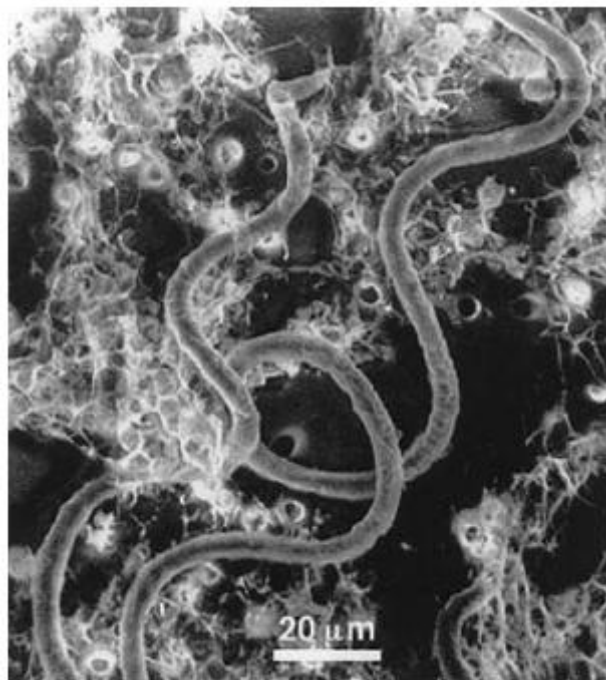
De volgende, meer globale, methode kan zowel *in vitro* of *in vivo* uitgevoerd worden.

In vitro houdt in dat er opeenvolgende extracties van het algenstaal plaatsvinden (met hexaan, chloroform, methanol en water) en de vier resulterende fracties worden toegevoegd aan celmedium. Vervolgens wordt dit medium met bepaalde kankercellen geïncubeerd en wordt de celviabiliteit opgevolgd. Bij het testen van commerciële Spirulina preparaten worden bijvoorbeeld HepG2-cellen gebruikt, *human hepatocellular carcinoma cells*. Zo wordt niet enkel op microcystine gecontroleerd maar op alle hepatotoxines. (Yang, 2011)

De *in vivo* methode betekent dat het algenpreparaat aan proefdieren wordt toegediend gedurende een bepaalde periode en het gedrag en de gezondheid van de proefdieren wordt onderzocht. Het voordeel van deze methode is dat de invloed van het preparaat op alle organen bestudeerd kan worden, en niet enkel de invloed op de lever. Zo wordt ook de aanwezigheid van andere toxines opgespoord. (Yang, 2011)

1.5 Spirulina

Spirulina is een veelgebruikte benaming voor culturen van *Arthrospira platensis* (Figuur 9) en *Arthrospira maxima*. Deze cyanobacteriën hebben, zoals de naam reeds doet vermoeden, een helix- of spiraalvormige structuur. Deze spiralen bestaan uit meerdere cellen omhuld door een blauwgroen kapsel. Een rij van aaneengesloten cellen wordt een trichoom genoemd. Trichomen kunnen in lengte variëren met een gemiddelde lengte tussen 100 en 200 μm . De grootte van de cellen is ook variabel, van 1 μm tot 10 μm . Bij de lichtmicroscopische telling van Spirulina zijn de eigenlijke cellen niet van elkaar te onderscheiden: daarom wordt het aantal trichomen geteld ongeacht de lengte, en wordt dit uitgedrukt als Spirulina 'cellen' per ml. (Karkos, 2011) (Food and Agriculture Organisation of the United Nations, 2015) (Lee, 2008)



Figuur 9: Elektronenmicroscopische beelden van *Spirulina platensis* (Lee, 2008)

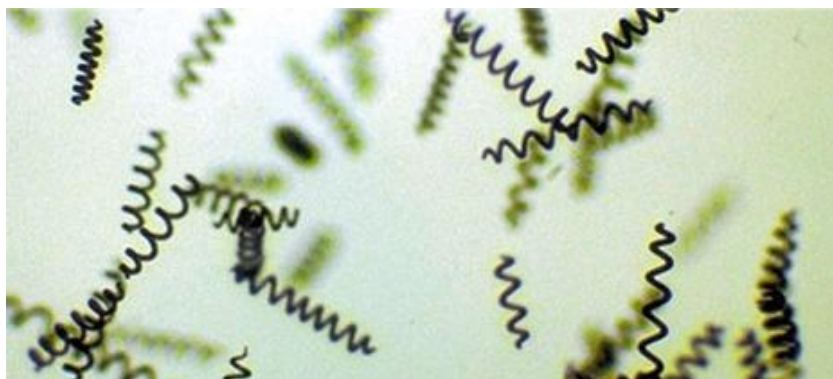
1.5.1 Voedingswaarde en geneeskundige toepassingen van Spirulina

In 1996 waren wereldwijd meer dan negentig producenten van gedroogde Spirulina. Dit is een gekend voedingssupplement waar vele gunstige effecten aan toegeschreven worden. NASA stelt de voedingswaarde van één kilogram Spirulina gelijk met de voedingswaarde van duizend kilogram fruit en groenten. Spirulina heeft namelijk een hoog proteïnegehalte en bevat bovendien eiwitten waarin alle voor mensen essentiële aminozuren zijn ingebouwd, onder andere lysine, tryptofaan en fenylalanine. Deze aminozuren kan het volwassen menselijk lichaam niet zelf maken en moeten dus via de voeding opgenomen worden. (Lee, 2008) (Ravi, 2010)

Het toedienen van Spirulina speelt mogelijk een rol in de behandeling en/of het voorkomen van diabetes mellitus en kanker; bezit antivirale, immuunstimulerende, cholesterolverlagende en antioxidante eigenschappen; en biedt bovendien bescherming tegen de ongewenste gevolgen van bestralingstherapie. Momenteel zijn deze toepassingen nog in de onderzoeksfase, al wordt Spirulina wel reeds toegepast als voedingssupplement. Mogelijke neveneffecten van inname van Spirulina zijn onder andere spierpijn en hoofdpijn. Door onzorgvuldige teeltomstandigheden kunnen echter andere, eventueel toxineproducerende cyanobacteriën in het medium aanwezig zijn. Indien het Spirulina-preparaat meer dan 1 µg/g cyanotoxines bevat, mag het niet als voedingssupplement verkocht worden. Dit wordt gecontroleerd via methodes beschreven in 1.4.3. (Ravi, 2010)

1.5.2 Concentratiebepaling

Zoals besproken in punt 1.4.2 bestaan meerdere methodes om het gehalte aan cyanobacteriën te bepalen. In het geval van Spirulina is er het bijkomend probleem dat de lengte van Spirulina sterk varieert (Figuur 10). Kwekers verkiezen een cultuur met lange Spirulina boven een cultuur met enkel korte fragmenten, aangezien ze een grotere neiging tot flocculeren hebben en dus makkelijker te oogsten zijn. (Jourdan, 2001)



Figuur 10: Microscopische beelden van Spirulina: de lengte is sterk variabel. (smartmicrofarms.com, 2015)

Courante concentratiebepalingmethoden in de teelt van Spirulina zijn drogestofbepaling, de Secchischijf, en microscopische telling. Ook turbidimetrie en spectrofotometrie worden soms toegepast. (Ahn, 2007) (Jourdan, 2001) (Danesi, 2011)

In het geval van een cultuur waarin de enige cyanobacterie Spirulina is, vervalt het bezwaar van Kasinak et. al. (2015) uit paragraaf 1.4.2 en kan wel een duidelijk verband gevonden worden tussen de celconcentratie en de *in vivo* fycocyanine fluorescentie. Dit heeft als bijkomend voordeel dat een cultuur met een identieke hoeveelheid cellen per ml maar waarbij de Spirulina-eenheden langer zijn, een hoger signaal geeft. Nadeel is dat niet dezelfde ijklijn gebruikt kan worden voor een cultuur met lange Spirulina als voor een cultuur met korte Spirulina. (Beutler, 2001) (Kasinak, 2015)

Een lineair verband zoeken tussen het drooggewicht van de algencultuur en de fluorescentie van fycocyanine is een andere optie, met als nadeel dat onzuiverheden en contaminaties in de cultuur dit verband kunnen verstoren.

Een mogelijke oplossing is een factor in te calculeren die rekening houdt met de lengte. Het aantal eigenlijke cellen per trichoom is niet te onderscheiden, maar de helixvormige structuur heeft een constante kromming. Hierdoor kan de lengte uitgedrukt worden in het aantal 'lussen' die microscopisch zichtbaar zijn. Indien deze factor vermenigvuldigd wordt met het aantal trichomen wordt gecorrigeerd voor de variatie in lengte. Deze methode wordt verder uitgewerkt in het praktijkgedeelte van deze masterproef.

1.5.3 Teelt en groeiparameters

Spirulina komt in de natuur voor in tropische, alkalische meren (pH > 10) met een hoog gehalte aan natriumchloride en bicarbonaten. In onderzoek wordt vaak gebruik gemaakt van Zarrouk medium zoals weergegeven in Tabel 2. In de commerciële teelt van Spirulina is dit medium echter economisch niet rendabel. Er wordt onderzoek gedaan naar diverse mogelijke groeimedia, waaronder afvalwater van verschillende bronnen, zoals van ontziltingsinstallaties of uit de agriculturele sector. Volkmann (2008) gebruikte bijvoorbeeld afvalwater van een ontziltingsinstallatie en concludeerde onder andere dat zoutstress in Spirulina leidt tot een verminderde proteïnesynthese en dus tot een lagere waarde als voedingssupplement. (Volkmann, 2008) (Jourdan, 2001) (Gantar, 1991) (Solovchenko, 2013) (Gami, 2011)

Tabel 2: Samenstelling Zarrouk medium (Belay, 2008)

Zarrouk Medium	
Component	Concentratie (g/l)
NaHCO ₃	18,000
NaNO ₃	2,500
K ₂ SO ₄	1,000
NaCl	1,000
K ₂ HPO ₄	0,500
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,200
Na ₂ EDTA	0,080
CaCl ₂	0,040
FeSO ₄ .7H ₂ O	0,010
Buffer TE (micro-element oplossing)	1000 ml

Buffer TE	g/l
H ₃ BO ₃	2,860
MnCl ₂ .4H ₂ O	1,800
ZnSO ₄ .7H ₂ O	0,220
Cu ₂ SO ₄	0,080
(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ .4H ₂ O	0,020
Vitamin B12	5*10 ⁻⁶

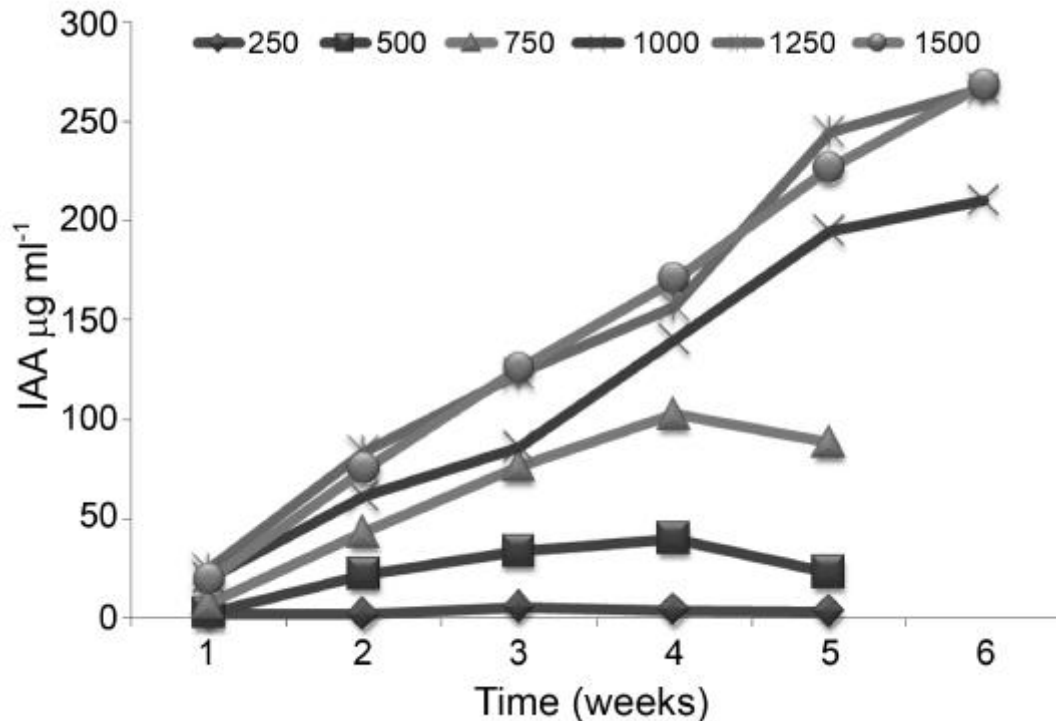
Spirulina vertoont optimale groei bij 30 ± 2 °C en pH 10,3. Gami et.al. (2011) raadt een dag-nacht ritme van 12 uren licht (4500 lux) en 12 uren duisternis aan, waarbij de

cultuur driemaal per dag manueel geschud wordt. Deze laboratoriumcondities zijn echter niet op te schalen naar grotere, economisch rendabele installaties. Vooral in tropische landen wordt *Spirulina* geteeld in openlucht kweekbaden, waardoor het klimaat dan ook zorgt voor de nodige temperatuur en lichtblootstelling. (Jourdan, 2001) (Gami, 2011)

1.5.4 *Spirulina* en indool-3-azijnzuur

IAA promoot in *Spirulina* de elongatie van de algencellen en de vorming van fenolische componenten. Deze fenolische componenten hebben een antioxidantwerking en verhogen zodoende de waarde van *Spirulina* als voedingsadditief. Mohammed (2011) onderzocht dit door *Spirulina* te cultiveren in Zarrouk medium waaraan verschillende concentraties IAA werden toegevoegd, namelijk 1 µg IAA/ml tot en met 10 µg IAA/ml. Hij vond de grootste concentratie aan fenolische componenten bij IAA-concentraties van 1 tot en met 6 µg/ml. Bij hogere concentraties werd de biosynthese van deze componenten geïnhibeerd. (Mohammed, 2011)

Spirulina kan ook zelf IAA produceren maar vereist hiervoor tryptofaan als precursor. De hoeveelheid IAA die wordt vrijgegeven aan het medium is afhankelijk van de incubatietijd en de concentratie tryptofaan. Figuur 11 geeft weer hoeveel IAA door *Spirulina* geproduceerd wordt, afhankelijk van de tryptofaanconcentratie in het medium. (Mehboob, 2010)



Figuur 11: IAA-productie door *Spirulina* bij verschillende tryptofaanconcentraties (µg L-tryptophan/l) (Mehboob, 2010)

2 Materiaal en methoden

Eerst wordt het experiment uiteengezet waarmee de invloed van indool-3-azijnzuur op de groei van *Spirulina* wordt bepaald (2.1). Tot slot wordt de aanpak uitgelegd om de *Spirulina*concentratie te benaderen via fluorometrische detectie van fycocyanine (2.2).

2.1 Groei bij verschillende concentraties IAA

Uit de literatuur, in het bijzonder het experiment van Mohammed et.al. (2011), blijkt dat een groeimedium dat IAA bevat de groei en morfologie van *Spirulina* gunstig beïnvloedt. Het medium dat Mohammed en Mohd gebruiken is Zarrouks medium. Dit is echter een relatief duur medium om op grote schaal te implementeren. (Mohammed, 2011)

De uiteindelijke doelstelling van Epsilon Biotech is een medium samen te stellen op basis van varkensdrijfmest. Maar aangezien mest reeds een onbekende hoeveelheid IAA bevat kan dit niet gebruikt worden om de invloed van IAA op de algengroei te onderzoeken. Er wordt gebruik gemaakt van een zelf samengesteld medium dat geen IAA bevat.

2.1.1 Microscopische algconcentratiebepaling via Makler

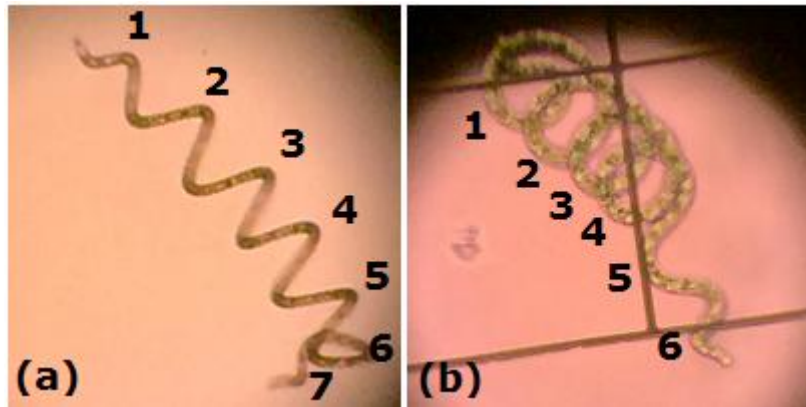
De Makler telkamer bestaat uit een raster van 100 kleine vierkanten, afmetingen 0,1 x 0,1 mm met een diepte van 10 μm .

50 μl staal wordt overgebracht naar de telkamer en het aantal *Spirulina* per raster van 100 vakken wordt geteld. Vervolgens worden het aantal lussen van elke *Spirulina* geteld. Dit wordt twintig keer herhaald.

Er wordt een gemiddelde gemaakt van het aantal *Spirulina* per 100 vakken. Dit getal wordt vermenigvuldigd met 10^5 om het aantal algen/ml te bekomen. De Makler telkamer heeft immers een oppervlakte van 1 mm^2 (totale oppervlakte van 100 vakken) en een diepte van 10 μm . (Sefi Medical Instruments LTD, 2003)

Om ook rekening te houden met de lengte wordt het aantal algen/ml vermenigvuldigd met een correctiefactor, namelijk het gemiddeld aantal lussen/alg. Figuur 12 demonstreert hoe geteld wordt. Dit is echter een relatief subjectieve manier van tellen en indien dit door verschillende laboranten wordt uitgevoerd is een grote variatie op de resultaten onvermijdelijk.

Een mogelijk oplossing hiervoor wordt toegelicht in paragraaf 2.2.



Figuur 12: Voorbeeld telling van aantal lussen per alg (a) 7 lussen/alg (b) 6 lussen/alg

2.1.2 Medium

De samenstelling van het gebruikte medium om algen op te kweken wordt weergegeven in Tabel 3.

Tabel 3: Samenstelling Spirulinamedium	
Component	Concentratie
NaHCO ₃	6,0 gram/liter
Na ₂ CO ₃	1,0 gram/liter
NaCl	1,0 gram/liter
NPK mestkorrels	0,5 gram/liter
Aanlengen met regenwater	

De samenstelling van de gebruikte NPK-mestkorrels (EG-meststof, s.a. Rosier N.V.) wordt samengevat in Tabel 4.

Tabel 4: Samenstelling NPK meststof (s.a. Rosier N.V.)		
NPK meststof chloorarm (s.a. Rosier N.V.)		
Stikstof totaal		9,0%
	waarvan nitraat	4,3%
	waarvan ammoniak	4,7%
Fosforzuuranhydride (P₂O₅)		
	oplosbaar in H ₂ O en citraat	7,0%
	oplosbaar H ₂ O	4,9%
K₂O		14,0%
MgO		3,0%
SO₃		
	totaal	22,0%
	wateroplosbaar (H ₂ SO ₄)	10,0%

De pH wordt gemeten via universeel indicatorpapier van VWR en ligt tussen 9 en 10. Het medium wordt vervolgens geautoclaveerd.

Het inoculum is eveneens opgekweekt op het medium uit Tabel 3. Er wordt die hoeveelheid inoculum toegevoegd aan het medium zodat de beginconcentratie $\geq 3 \times 10^5$ algen/mL is.

Aan elke kweekfles wordt onder steriele omstandigheden een andere concentratie IAA toegevoegd, variërend van 0 $\mu\text{g/L}$ tot 18 $\mu\text{g/L}$.

2.1.3 Groeiparameters

De Spirulinaculturen worden geïncubeerd in een CO₂-incubator op 30 °C, met 7,0 % CO₂. Een lichtcyclus van 12 uren licht en 12 uren duisternis wordt tijdens de volledige groeiperiode gerespecteerd. Eenmaal per dag worden de kweekflessen manueel geschud.

De culturen worden opgevolgd gedurende 8 dagen.

2.2 Concentratiebepaling via *in vivo* fycocyanine

De groei is op te volgen door de concentratie aan Spirulina te bepalen. Aangezien Spirulina een spiraalvormige structuur heeft waarvan de lengte sterk varieert, wordt een detectiemethode gekozen die rekening houdt met de lengte.

Cyanobacteriën zoals Spirulina produceren *in vivo* pigmenten zoals fycocyanine. Fycocyanine heeft een absorptiemaximum bij 620 nm. Het emitteert vervolgens licht met een golflengte van 642 nm. Enkel cyanobacteriën produceren fycocyanine. Andere mogelijke contaminanten in de algensuspensie, zoals *Chlorella vulgaris* of zoöplankton, produceren deze molecuule niet. (Kasinak, 2015) (Smith, 2014)

Het is dus mogelijk om de concentratie aan Spirulina te bepalen via het meten van fycocyanine. Volgend experiment controleert of een voorafgaande celdestructie via ultrasone golven het signaal doet verhogen. De hypothese is immers dat celdestructie fycocyanine in het medium vrijstelt.

Op eenzelfde Spirulinastaal worden twee protocols uitgevoerd. Van elk wordt de aantoonbaarheidsgrens, de reproduceerbaarheid, de meetonzekerheid, de regressievergelijking en het 95% betrouwbaarheidsinterval bepaald.

De twee geanalyseerde protocols zijn de volgende:

- Protocol A: zonder voorafgaande celdestructie
Breng 100 μl staal over naar een zwarte wellplaat en analyseer met VICTOR™ X4 Multilabel Plate Reader volgens het phycocyanine-protocol (Tabel 5).
- Protocol B: met celdestructie via ultrasone golven

Breng 15 ml staal over naar een centrifugeertube. Voer een celdestructie uit via de probe SONOPULS van Bandelin (programma: 8x10% cycle, 100% power, 1 minuut). Breng vervolgens 100 µl staal over naar een zwarte wellplaat en analyseer met VICTOR™ X4 Multilabel Plate Reader volgens het phycocyanine-protocol (Tabel 5).

Tabel 5: Instellingen VICTOR™ X4 Multilabel Plate Reader (fycocyaninemeting)

Protocol name	Phycocyanin	Name of the label	Phycocyanin 10000
Protocol number	N/A	Label technology	Prompt fluorometry
Name of the plate type	OptiPlate 96	CW-lamp filter name	600/8
Number of wells in the plate	8 X 12	CW-lamp filter slot	A8
Height of the plate	14.6 mm	Emission filter name	D642
Offset of the wells	11.240 mm, 14.380 mm	Emission filter slot	A2
Distance between wells	9.000 mm, 9.000 mm	Measurement time	0.1 s
Number of repeats	3	Emission aperture	Normal
Delay between repeats	600 s	CW-lamp energy	10000
Measurement height	13.00 mm	Second measurement CW-lamp energy .	0
Protocol notes		Emission side	Above
Shaking duration	1.0 s	CW-Lamp Control	Stabilized Energy
Shaking speed	Fast	Excitation Aperture	N/A
Shaking diameter	0.10 mm		
Shaking type	Double orbit		
Repeated operation	No		

2.2.1 Fluorescentiemeting via Victor™ X4 Multilabel Plate Reader

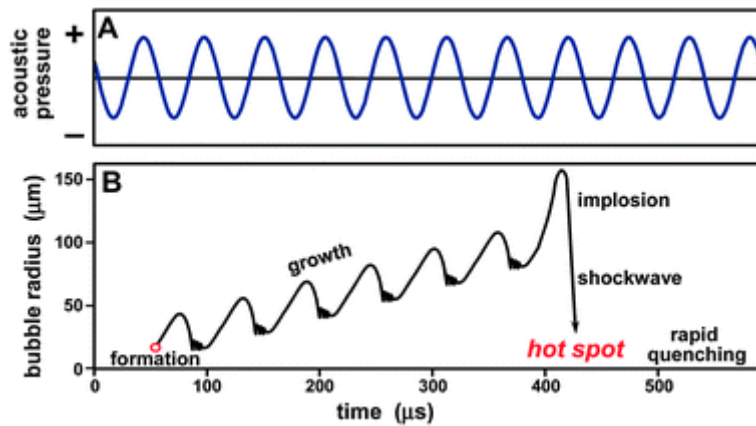
Fluorescentie spectrofotometrie is gebaseerd op het principe dat moleculen met een fluorescente groep licht uitstralen bij een bepaalde golflengte, indien ze geëxciteerd worden door licht van een kortere (energierijkere) golflengte. Het licht dat geëmitteerd wordt gaat naar een sensor en wordt vertaald naar een fluorescent signaal.

100 µl van de gehomogeniseerde algensuspensie wordt in een zwarte wellplaat (OptiPlate™-96F Black, 96-well, Pinch bar design van PerkinElmer) gepipetteerd. Het emissielicht van de algensuspensie wordt vervolgens gemeten in de VICTOR™ X4 Multilabel Plate Reader van PerkinElmer bij een excitatiegolflengte van 600 nm. De gebruikte emissiefilter meet bij 642 nm.

De gebruikte VICTOR™ X4 Multilabel Plate Reader bezit geen excitatiefilter van 620 nm. Fycocyanine kan echter ook geëxciteerd worden door licht van 600 nm.

2.2.2 Cavitatie via SONOPULS (Bandelin)

Het staal wordt blootgesteld aan geluidsgolven uit het ultrasone gebied. Deze veroorzaken **cavitatie**, waardoor de algencellen openbreken en de celinhouden vrijkomen. Het principe achter cavitatie wordt weergegeven in Figuur 13.



Figuur 13: Principe van cavitatie via ultrasone puls (Xu, 2013)

2.2.3 Bepaling van de regressievergelijking en het 95% betrouwbaarheidsinterval

De meting wordt uitgevoerd met een serieel verdunde algencultuur. Het 95% betrouwbaarheidsinterval wordt bepaald door de via regressie berekende concentratie \pm (standaardfout en de T-waarde (0,05; n-2)) uit te rekenen en grafisch weer te geven. De T-waarde kan worden teruggevonden in daartoe beschikbare tabellen of berekend via Microsoft Excel.

2.2.4 Bepaling van de aantoonbaarheidsgrens, reproduceerbaarheid en meetonzekerheid

Een algensuspensie met hoge concentratie, vooraf microscopisch bepaald via Makler telkamer, wordt verdund met niet-geïnoculeerd medium. Er wordt een seriële verdunningsreeks van elf concentraties gemaakt. De fluorescentie wordt gemeten via het protocol samengevat in Tabel 5. De concentratie-fluorescentie resultaten worden grafisch uitgezet.

Uit deze grafische weergave kan visueel geschat worden of het lineaire model toepasbaar is op de bekomen data. Deze schatting wordt vervolgens gecontroleerd via controle op residuen. Als het lineaire model correct is, zijn deze residuen willekeurig geschikt rond de nullijn.

Vervolgens wordt de aantoonbaarheidsgrens bepaald. Een algensuspensie wordt verdund met medium tot een concentratie in de buurt van de ondergrens van het lineaire gebied van de regressielijn. Er kan ook een blanco (niet-geïnoculeerd medium) gebruikt worden. Deze verdunning en/of blanco wordt meermaals herhaald en van deze stalen wordt de fluorescentie gemeten. Deze wordt via de regressievergelijking omgerekend naar een concentratie. Vervolgens wordt hiervan de standaardafwijking berekend. De aantoonbaarheidsgrens komt overeen met driemaal de standaardafwijking (Figuur 14). De aantoonbaarheidsgrens is liefst zo klein mogelijk.

$$s = \sqrt{\frac{1}{n-1} \sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}$$

Figuur 14: Formule standaardafwijking (Klaessens, 2010). s is de standaardafwijking, n is de grootte van de steekproef, x_i zijn de afzonderlijke meetresultaten (fycocyaninesignaal omgerekend naar Spirulinaconcentratie) en \bar{x} is het gemiddelde van de meetresultaten.

De reproduceerbaarheid wordt bepaald door n verschillende stalen ($n \geq 8$) te analyseren, in duplo, onder reproduceerbaarheidsomstandigheden (Figuur 15). Hoe kleiner de s_{Rw} , hoe groter de reproduceerbaarheid.

$$s_{Rw} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_{i1} - x_{i2})^2}{2n}}$$

Figuur 15: Formule reproduceerbaarheid (Klaessens, 2010) $s_{r,w}$ is de standaardafwijking onder reproduceerbaarheidscondities, n is de grootte van de steekproef en x_{i1} en x_{i2} zijn de meetresultaten (fycocyaninesignaal) in duplo.

De meetonzekerheid tenslotte wordt berekend via n keer herhaalde analyse van hetzelfde monster onder reproduceerbaarheidsomstandigheden (Figuur 16). Hoe kleiner de CV_{Rw} hoe kleiner de meetonzekerheid.

$$CV_{Rw} = \sqrt{\frac{1}{n-1} * \sum \left(\frac{y_i - \bar{y}}{\bar{y}} \right)^2}$$

Figuur 16: Formule meetonzekerheid (Klaessens, 2010) $CV_{r,w}$ is de variatiecoëfficiënt onder reproduceerbaarheidsomstandigheden, n is de grootte van de steekproef, y_i is het meetresultaat (fycocyaninesignaal) en \bar{y} is het gemiddelde van de meetresultaten.

3 Resultaten en discussie

De resultaten worden samengevat in paragrafen 3.1 en 3.2.

3.1 Invloed van indool-3-azijnzuur op de groei van *Spirulina*

Er worden tien kweekflessen met medium uit Tabel 3 geënt met algensuspensie. Het totaalvolume in elke fles is 450 ml. De beginconcentratie *Spirulina* wordt microscopisch bepaald. Vervolgens wordt aan elke fles een gekende hoeveelheid IAA-oplossing toegevoegd zodat de concentratie IAA in elke kweekfles overeenkomt met deze in Tabel 6.

ID	µg IAA per ml	µg IAA per 450 ml
Fles A	0,0	0
Fles B	2,0	900
Fles C	4,0	1800
Fles D	6,0	2699
Fles E	8,0	3598
Fles F	10,0	4497
Fles G	12,0	5396
Fles H	14,0	6294
Fles I	16,0	7192
Fles J	18,0	8090

Zoals besproken in paragraaf 2.1.1 worden zowel het aantal trichomen als het aantal lussen per trichoom geteld en herrekend. Het aantal trichomen wordt uitgedrukt als algen/ml. Het gemiddeld aantal lussen per alg wordt de correctiefactor genoemd en is een indicatie voor de lengte van elk trichoom. Het product van de correctiefactor en het aantal algen/ml wordt hieronder aangegeven als *Spirulina*/ml.

De resultaten worden samengevat in Tabel 7 en Tabel 8.

Tabel 7: Overzicht resultaten groei Spirulina bij verschillende IAA-concentraties (0 µg/ml t.e.m. 10 µg/ml)

Incubatielijd (uren)	0 µg IAA/ml			2 µg IAA /ml			4 µg IAA /ml		
	algen/ml	Correctiefactor	Spirulina/ml	algen/ml	Correctiefactor	Spirulina/ml	algen/ml	Correctiefactor	Spirulina/ml
0	75000	5,5	415000	92143	5,7	1235000	81429	5,9	1130000
23,5	110000	5,3	580000	145000	5,9	855000	110000	5,5	605000
44	135000	6,1	820000	135000	6,1	825000	160000	5,9	950000
68	115000	5,7	660000	170000	6,0	1020000	130000	6,0	775000
93	210000	5,8	1210000	155000	5,7	885000	185000	5,7	1055000
116	150000	5,4	815000	165000	5,6	930000	195000	5,4	1060000
139,5	160000	5,5	885000	215000	5,7	1230000	260000	5,6	1455000
164,5	155000	6,0	935000	185000	5,7	1060000	315000	5,5	1730000
188,5	195000	5,5	1080000	245000	5,6	1370000	255000	5,4	1365000

Incubatielijd (uren)	6 µg IAA/ml			8 µg IAA /ml			10 µg IAA /ml		
	algen/ml	Correctiefactor	Spirulina/ml	algen/ml	Correctiefactor	Spirulina/ml	algen/ml	Correctiefactor	Spirulina/ml
0	143571	5,2	743571	87857	5,1	447857	120000	5,3	640714
23,5	90000	5,7	515000	115000	6,2	715000	145000	4,2	615000
44	165000	5,9	975000	135000	7,0	940000	150000	3,7	555000
68	130000	5,6	725000	190000	5,6	1065000	155000	4,2	650000
93	150000	5,2	780000	185000	5,7	1050000	170000	3,8	650000
116	185000	5,4	1000000	180000	5,6	1005000	160000	3,8	610000
139,5	265000	5,0	1330000	180000	5,6	1015000	195000	3,8	745000
164,5	160000	5,3	845000	295000	5,1	1490000	225000	3,7	825000
188,5	350000	5,3	1870000	270000	5,4	1460000	285000	3,9	1105000

Tabel 8: Overzicht resultaten groei Spirulina bij verschillende IAA-concentraties (12 µg/ml t.e.m. 18 µg/ml)

Incubatietid (uren)	12 µg IAA/ml			14 µg IAA /ml			16 µg IAA /ml		
	algen/ml	Correctiefactor	Spirulina/ml	algen/ml	Correctiefactor	Spirulina/ml	algen/ml	Correctiefactor	Spirulina/ml
0	83571	5,8	486429	124286	5,7	702857	77143	5,9	456429
23,5	100000	5,7	565000	110000	5,9	645000	105000	5,0	520000
44	115000	5,9	675000	115000	6,2	710000	90000	6,1	550000
68	115000	6,5	745000	130000	6,3	820000	155000	5,9	915000
93	110000	4,6	510000	135000	5,6	760000	180000	5,8	1050000
116	185000	5,5	1020000	190000	5,4	1030000	190000	5,8	1105000
139,5	215000	5,6	1200000	265000	5,4	1425000	135000	6,1	830000
164,5	175000	5,8	1010000	250000	5,5	1370000	370000	5,3	1975000
188,5	265000	5,3	1410000	220000	5,3	1155000	265000	5,5	1445000

Incubatietid (uren)	18 µg IAA/ml		
	algen/ml	Correctiefactor	Spirulina/ml
0	96429	6,9	668571
23,5	130000	5,2	670000
44	90000	7,7	690000
68	100000	7,1	705000
93	135000	5,8	780000
116	200000	5,8	1150000
139,5	185000	5,2	960000
164,5	320000	5,2	1660000
188,5	325000	5,3	1735000

3.1.1 Generatietijd

De generatietijd werd bepaald door de procentuele groei uit te zetten in functie van de incubatietijd. De procentuele groei is gelijk aan het aantal Spirulina/ml gedeeld door het aantal Spirulina/ml op tijdstip 0.

Via een gepaarde T-toets wordt nagegaan of er een significant verschil is in groei tussen de stalen met IAA en de blanco. Dit gebeurt via de formules in Figuur 17.

$$T = \frac{\frac{1}{n} * \sum_{i=1}^n d_i}{\frac{s_d}{\sqrt{n}}}$$

$$d_i = x_{i1} - x_{i2}$$

Niet significant als: $-T(\alpha, n - 1) < T < T(\alpha, n - 1)$

Figuur 17: Formules gepaarde T-toets (Klaessens, 2010) d_i is het verschil tussen de procentuele groei van staal (x_{i2}) en blanco (x_{i1}), voor elk tijdstip van staalname. s_d is de standaardafwijking van d_i . n is het aantal tijdstippen die vergeleken worden. $T(\alpha, n-1)$ voor significantieniveau 0,05 en 9 tijdstippen is 2,306.

Deze berekeningen worden samengevat in Tabel 9.

Tabel 9: Significantieberekening op verschil tussen procentuele groei van blanco-staal										
Incubatie-tijd (uren)	2 µg IAA/ml	4 µg IAA/ml	6 µg IAA/ml	8 µg IAA/ml	10 µg IAA/ml	12 µg IAA/ml	14 µg IAA/ml	16 µg IAA/ml	18 µg IAA/ml	
d_i	0	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	
	23,5	-68%	-21%	51%	-66%	16%	-10%	22%	-7%	11%
	44	-3%	-55%	29%	-72%	86%	19%	68%	43%	65%
	68	-89%	-47%	34%	-147%	29%	-38%	9%	-99%	23%
	93	77%	11%	157%	-10%	161%	157%	153%	-4%	142%
	116	-30%	-85%	23%	-92%	74%	-73%	8%	-115%	-25%
	139,5	-86%	-173%	-17%	-78%	64%	-104%	-47%	-21%	29%
	164,5	-32%	-234%	79%	-202%	60%	-42%	-25%	-331%	-94%
	188,5	-73%	-102%	-63%	-159%	39%	-112%	49%	-147%	-73%
som d_i		-303%	-705%	293%	-826%	528%	-203%	235%	-680%	77%
n		9	9	9	9	9	9	9	9	9
s_d		53%	81%	62%	67%	48%	81%	59%	115%	71%
T		-1,90	-2,89	1,58	-4,10	3,71	-0,83	1,33	-1,98	0,37
T($\alpha, n-1$)		2,306	2,306	2,306	2,306	2,306	2,306	2,306	2,306	2,306
Significant		nee	ja	nee	ja	ja	nee	nee	nee	nee

De procentuele groei wordt uitgezet in functie van de incubatietijd, zie Figuur 19 tot en met Figuur 28. Dit geeft telkens een exponentiële curve waarvan de regressievergelijking wordt opgesteld. Figuur 18 geeft de formules weer die gebruikt worden voor de verdere berekening naar verdubbelingstijd.

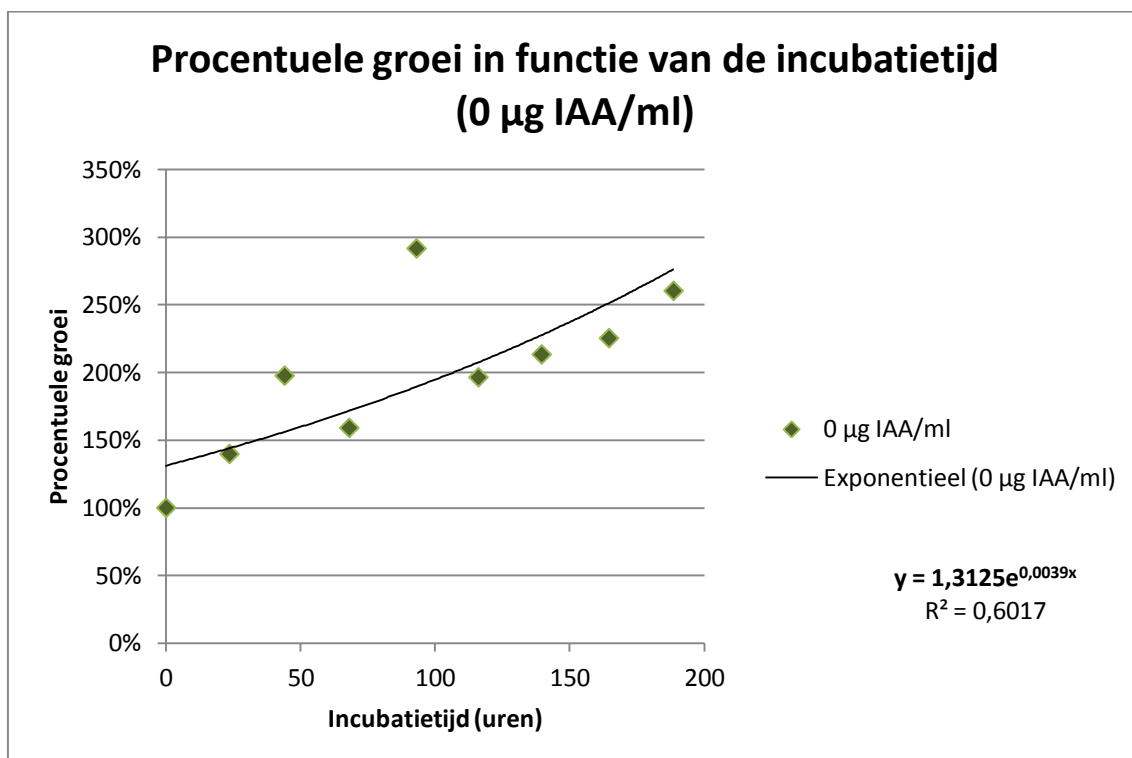
Groei (%) in functie van incubatietijd = $a * e^{(b * tijd)}$

$$\text{Verdubbelingstijd } t \text{ (uren)} = \frac{\ln \frac{2}{a}}{b}$$

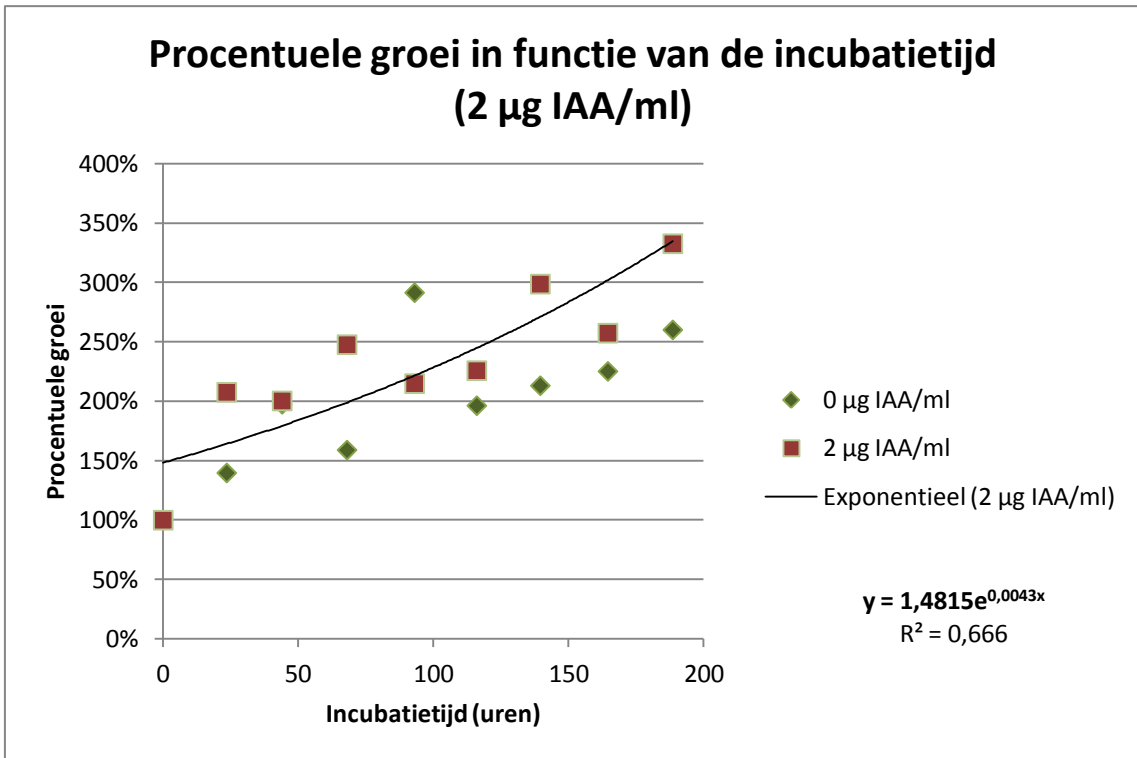
Figuur 18: Formule berekening verdubbelingstijd

In Tabel 10 worden de verdubbelingstijden weergegeven.

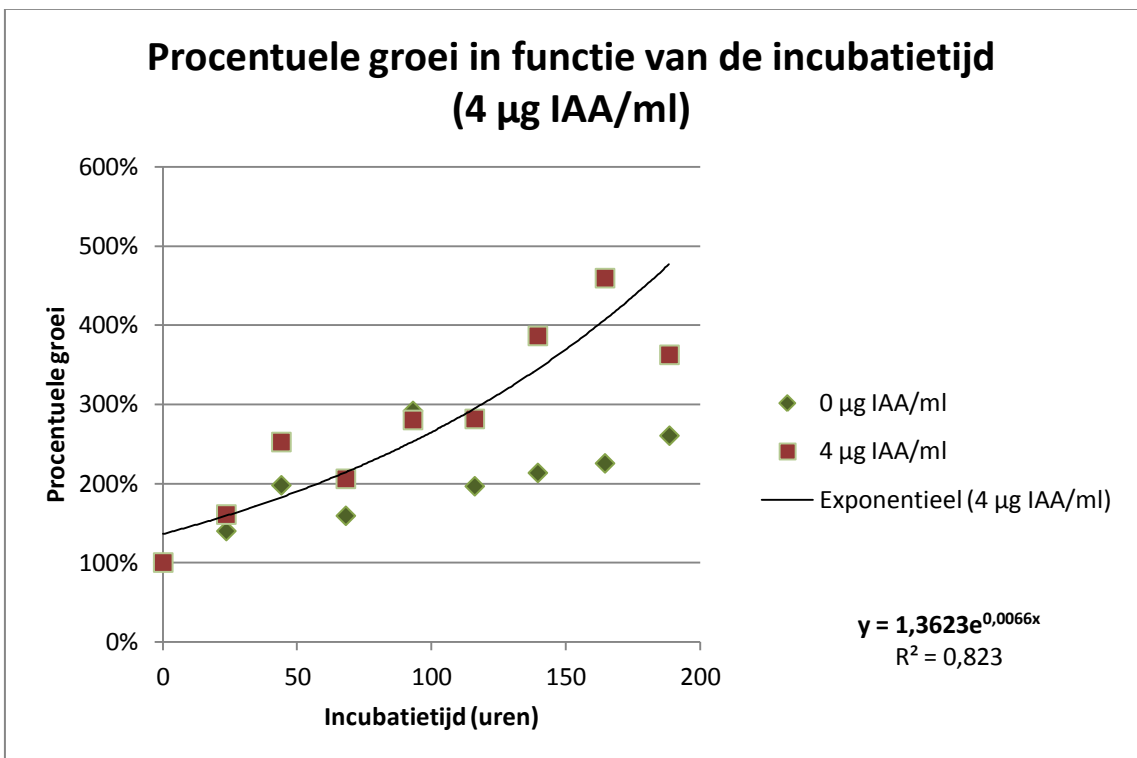
Tabel 10: Verdubbelingstijd IAA-experiment					
	0 µg IAA/ml	2 µg IAA/ml	4 µg IAA/ml	6 µg IAA/ml	8 µg IAA/ml
a	1,3125	1,4815	1,363	0,9645	1,6006
b	0,0039	0,0043	0,0066	0,005	0,0056
Verdubbelingstijd (uren)	108,0	69,8	58,1	145,9	39,8
	10 µg IAA/ml	12 µg IAA/ml	14 µg IAA/ml	16 µg IAA/ml	18 µg IAA/ml
a	1,0031	1,1701	1,0418	1,2049	0,9853
b	0,0033	0,006	0,0048	0,0075	0,0062
Verdubbelingstijd (uren)	209,1	89,3	135,9	67,6	114,2



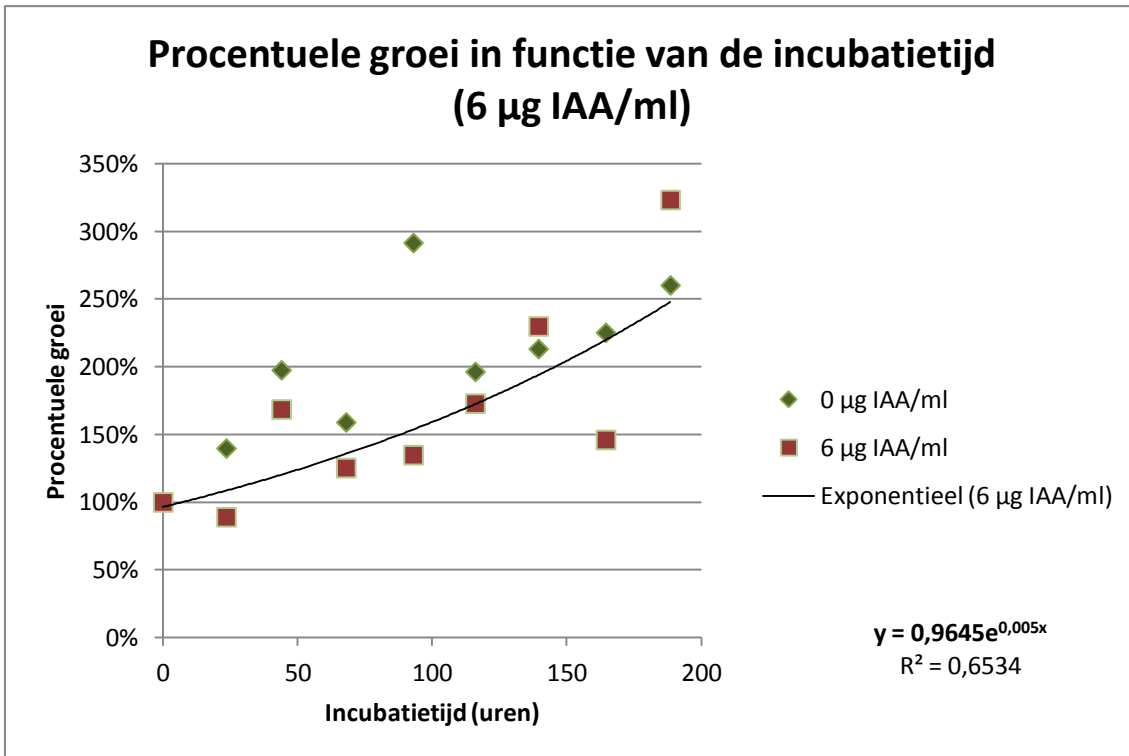
Figuur 19: Procentuele groei in functie van de incubatietijd (0 µg IAA/ml)



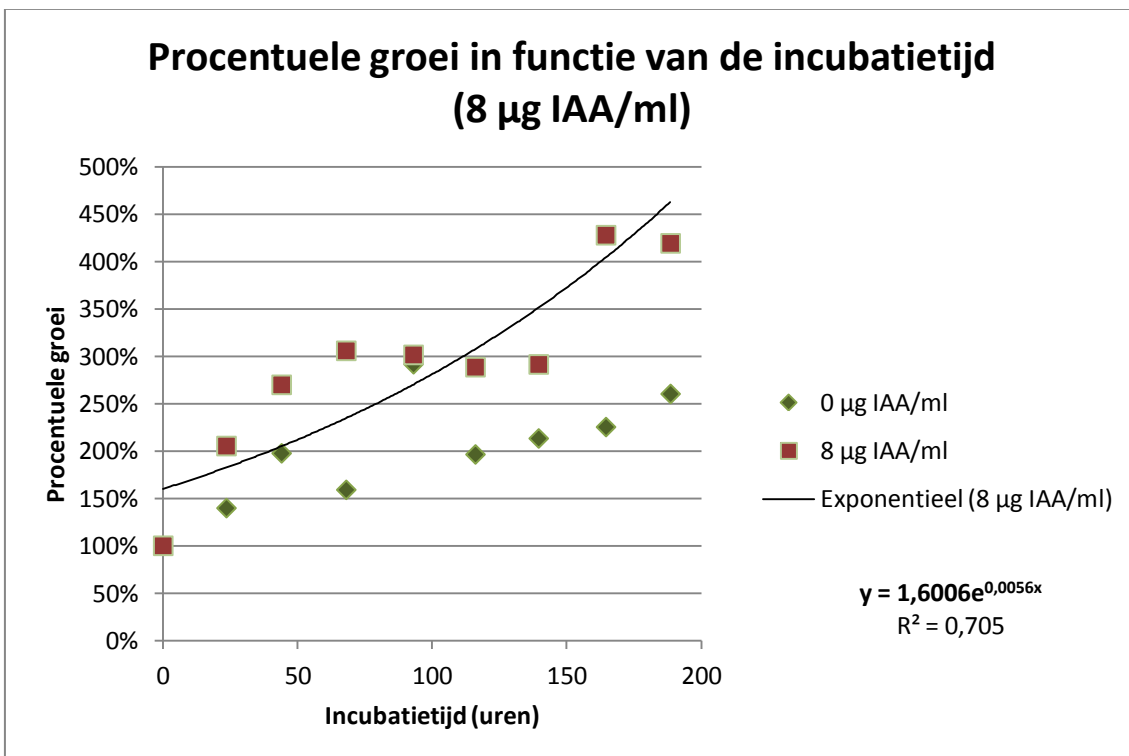
Figuur 20: Procentuele groei in functie van de incubatietijd (2 µg IAA/ml)



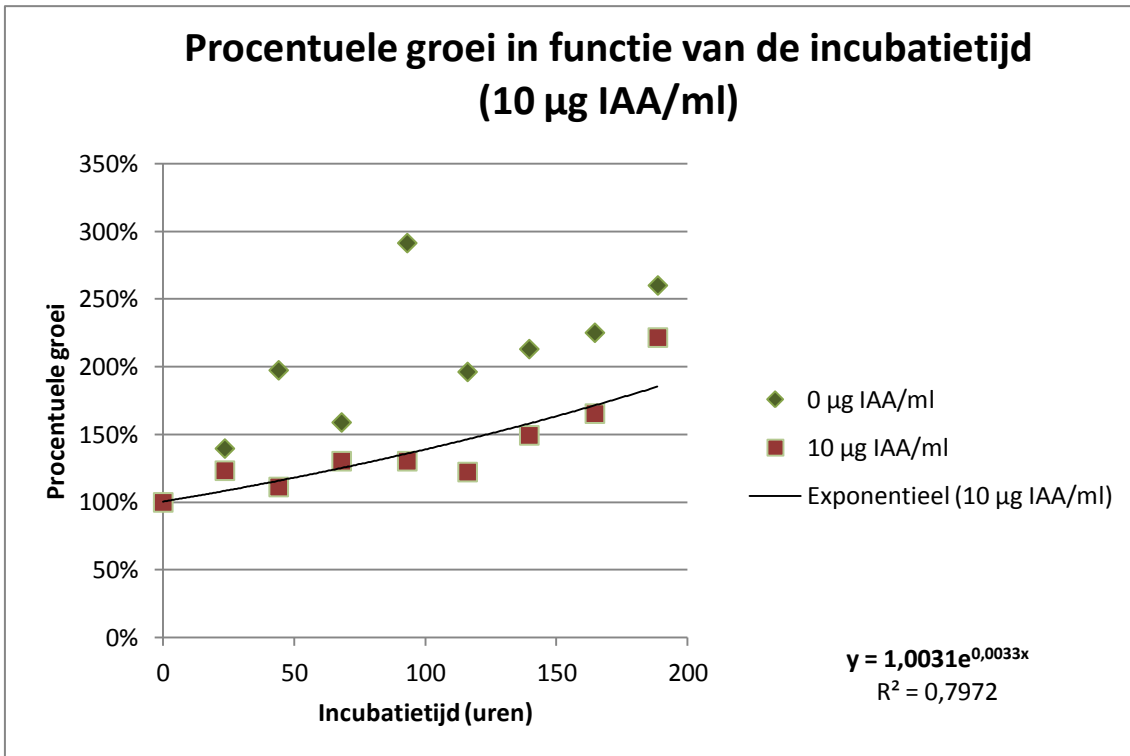
Figuur 21: Procentuele groei in functie van de incubatietijd (4 µg IAA/ml)



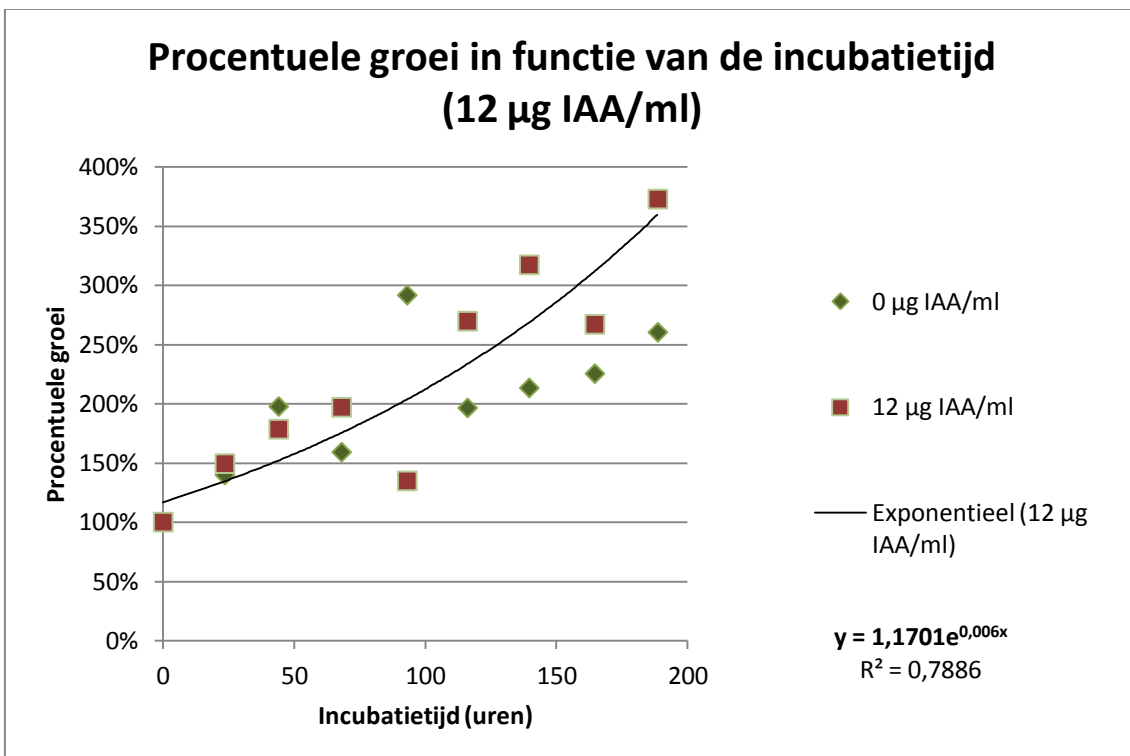
Figuur 22: Procentuele groei in functie van de incubatietijd (6 µg IAA/ml)



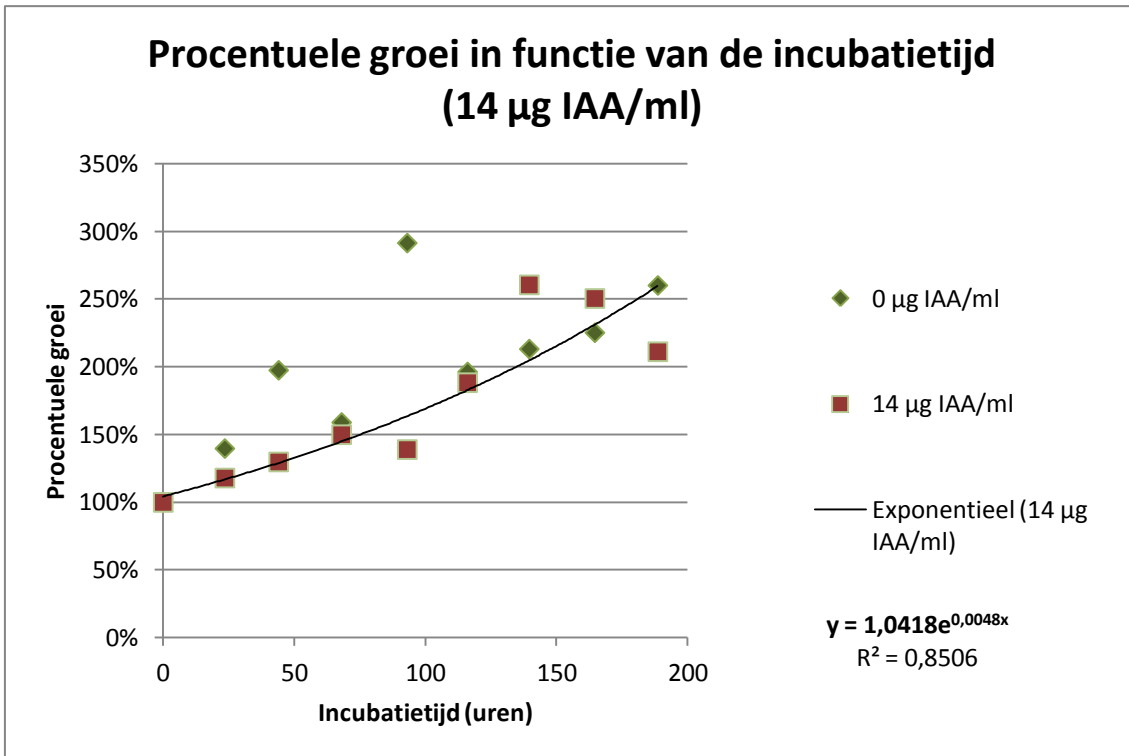
Figuur 23: Procentuele groei in functie van de incubatietijd (8 µg IAA/ml)



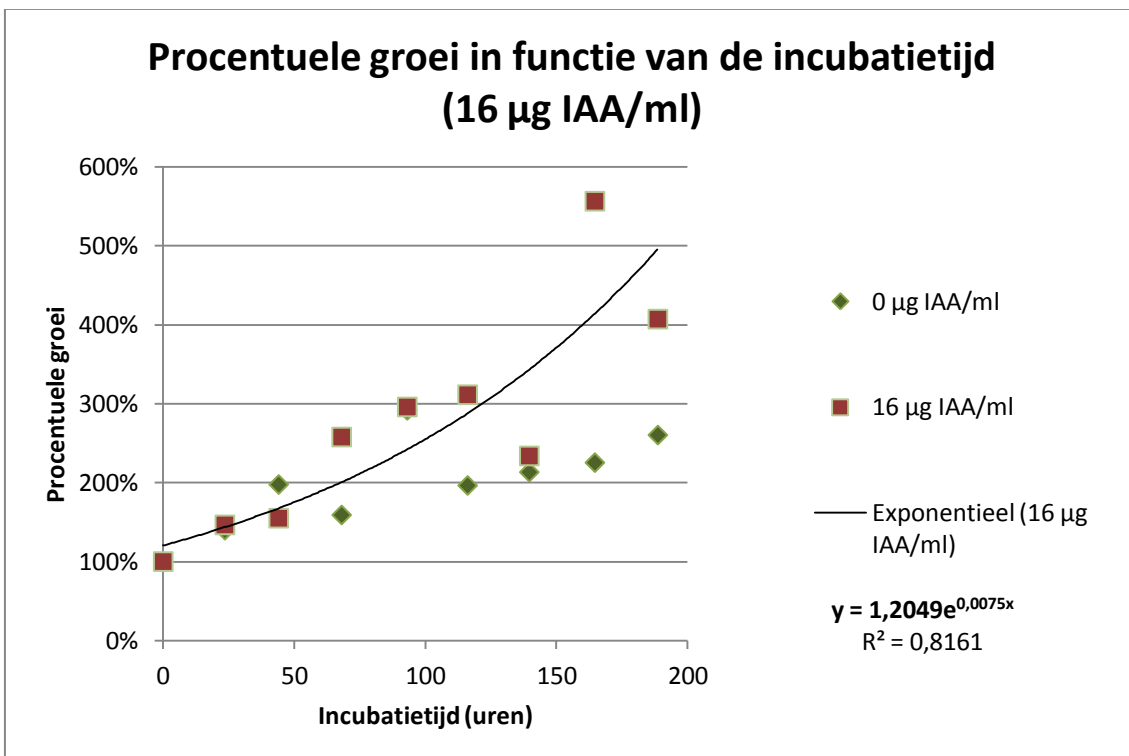
Figuur 24: Procentuele groei in functie van de incubatietijd (10 µg IAA/ml)



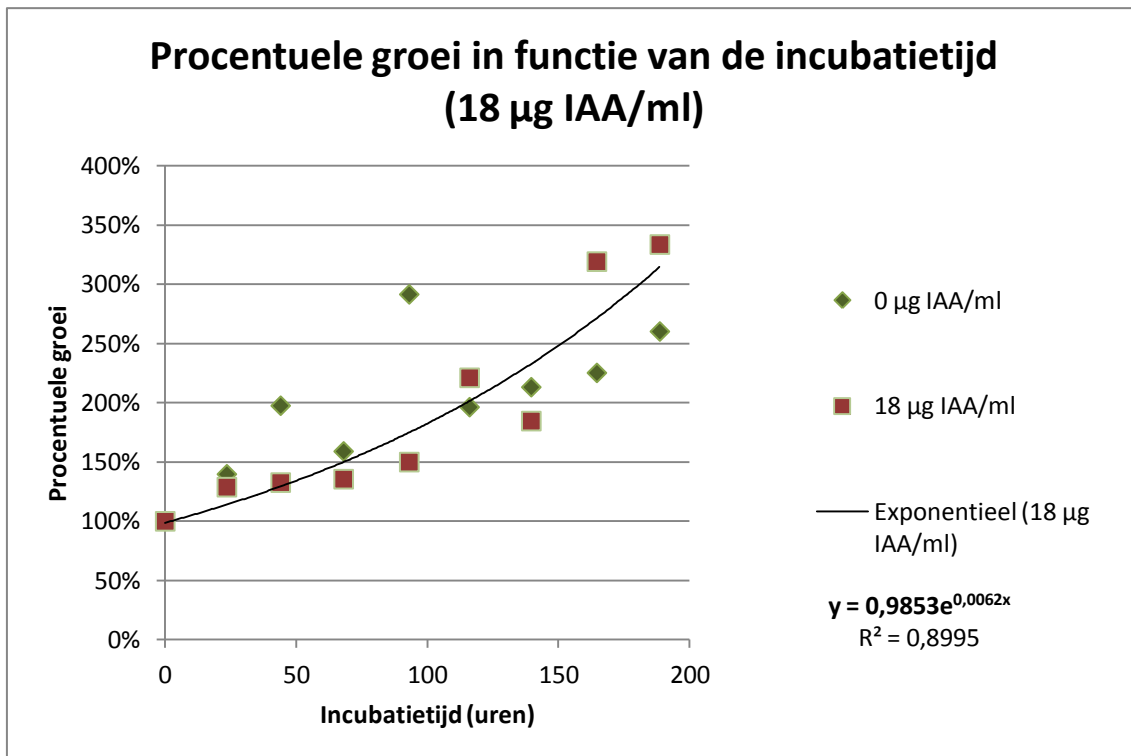
Figuur 25: Procentuele groei in functie van de incubatietijd (12 µg IAA/ml)



Figuur 26: Procentuele groei in functie van de incubatietijd (14 µg IAA/ml)

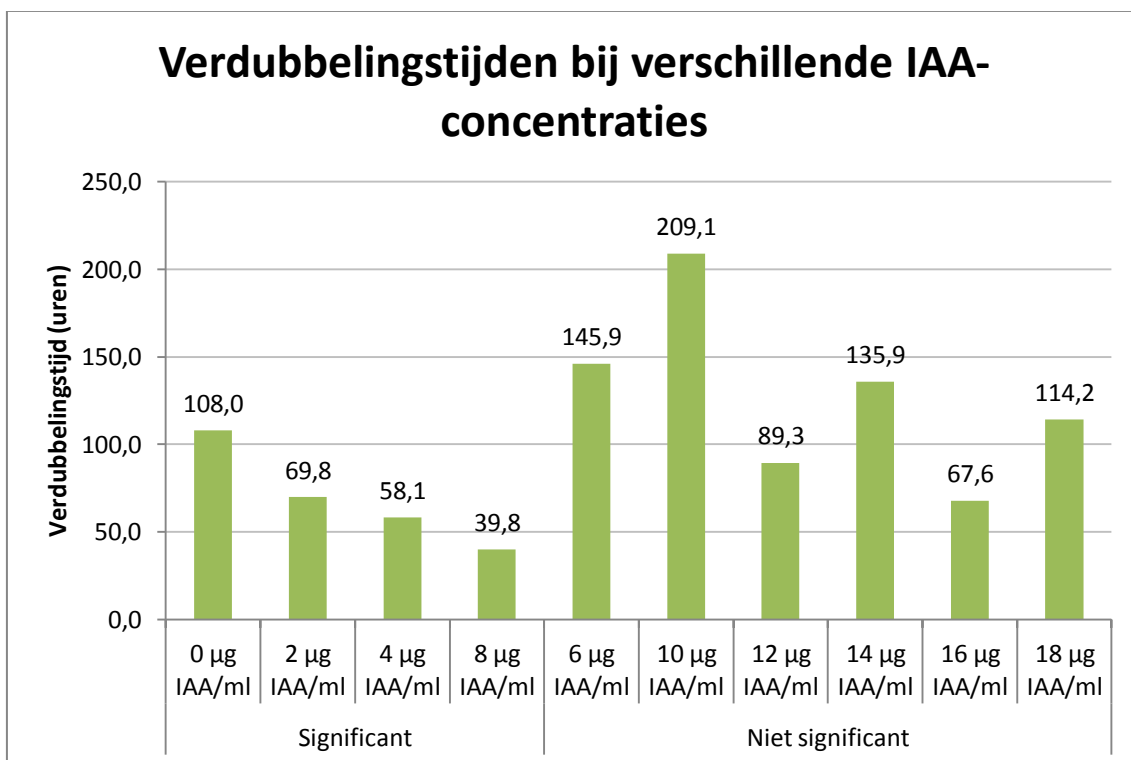


Figuur 27: Procentuele groei in functie van de incubatietijd (16 µg IAA/ml)



Figuur 28: Procentuele groei in functie van de incubatietijd (18 µg IAA/ml)

Zoals weergegeven in Tabel 9 pagina 38 vertonen de kweekflessen met 2 µg IAA/ml, 4 µg IAA/ml en 8 µg IAA/ml een significant verschil in groei met de blanco. Deze IAA-concentraties correleren met kortere verdubbelingstijden, zoals samengevat in Figuur 29.



Figuur 29: Verdubbelingstijden (overzicht)

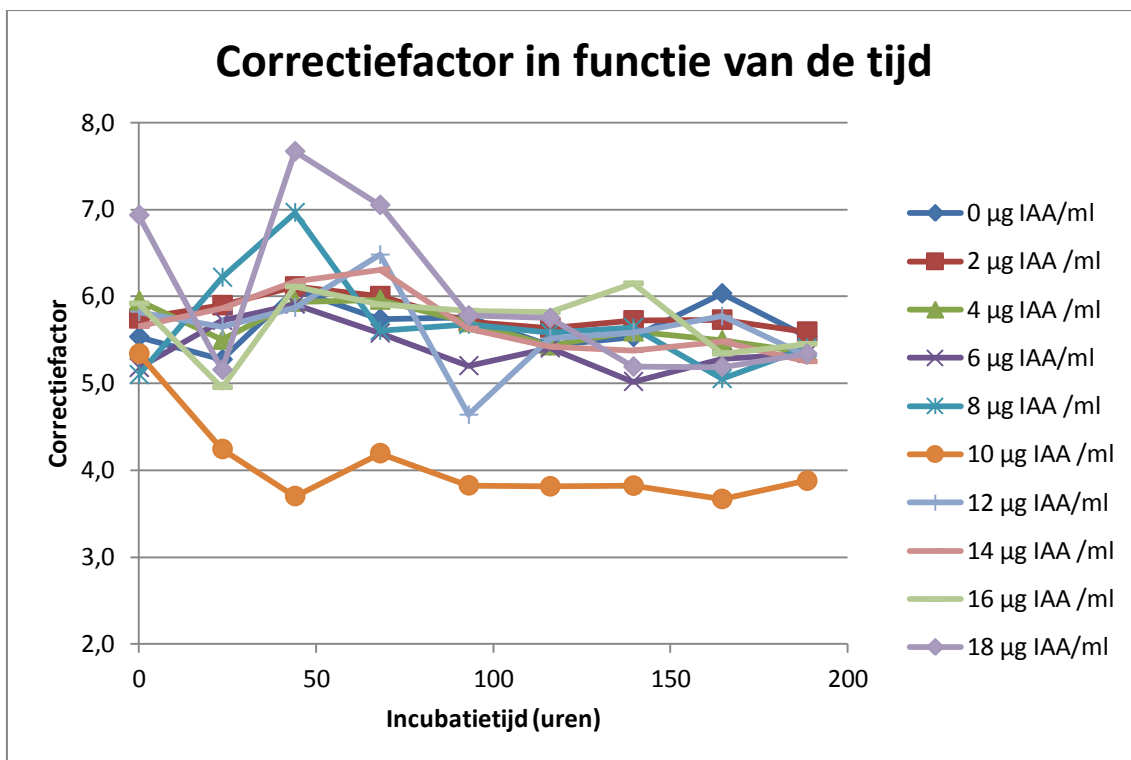
Hierbij valt op dat de 6 µg IAA/ml niet significante resultaten geeft en dus niet verschilt met de blanco, terwijl flankerende waarden 4 µg IAA/ml en 8 µg IAA/ml wel een kortere verdubbelingstijd veroorzaken. Het is aan te raden dit experiment te herhalen.

Voor praktische toepassingen is het interessant om te bepalen of er een significant verschil is in groeisnelheid tussen de drie culturen met de kortste verdubbelingstijden, namelijk 2 µg IAA/ml, 4 µg IAA/ml en 8 µg IAA/ml. Uit de T-toets blijkt dat deze niet significant van elkaar verschillen. In praktijk wordt dus hetzelfde effect bekomen indien 2 µg IAA/ml wordt toegevoegd als wanneer 4 of 8 µg IAA/ml wordt toegevoegd. Om kostenbesparend te werken wordt dus aangeraden om 2 µg IAA/ml toe te voegen.

3.1.2 Celmorfologie

Microscopisch was er geen verschil in celmorfologie visueel zichtbaar tussen de verschillende stalen. De gemiddelde lengte per trichoom, uitgedrukt als correctiefactor, verschilt echter wel. Via een gepaarde T-toets (formules Figuur 17) wordt bepaald of dit verschil significant is. De resultaten hiervan worden samengevat in Tabel 11. Figuur 30: Correctiefactor in functie van de tijd geeft weer hoe de correctiefactor van elke cultuur evolueert tijdens het experiment.

Hieruit blijkt dat Spirulina relatief constant blijft in lengte gedurende de acht dagen waarop de groei werd opgevolgd, ongeacht de IAA-concentratie. Uitzondering is de cultuur met 10 µg IAA/ml. Deze geeft over de hele lijn van het experiment kortere Spirulina. Deze anomalie wordt mogelijk veroorzaakt door een menselijke fout en er wordt aangeraden om het experiment te herhalen.



Figuur 30: Correctiefactor in functie van de tijd

Tabel 11: Significantiebepaling ($\alpha = 0,05$) van lengte Spirulina

Incubatietijd (uren)	$\mu\text{g IAA/ml}$										
	0	2	4	6	8	10	12	14	16	18	
0	5,5	5,7	5,9	5,2	5,1	5,3	5,8	5,7	5,9	6,9	
23,5	5,3	5,9	5,5	5,7	6,2	4,2	5,7	5,9	5,0	5,2	
44	6,1	6,1	5,9	5,9	7,0	3,7	5,9	6,2	6,1	7,7	
68	5,7	6,0	6,0	5,6	5,6	4,2	6,5	6,3	5,9	7,1	
93	5,8	5,7	5,7	5,2	5,7	3,8	4,6	5,6	5,8	5,8	
116	5,4	5,6	5,4	5,4	5,6	3,8	5,5	5,4	5,8	5,8	
139,5	5,5	5,7	5,6	5,0	5,6	3,8	5,6	5,4	6,1	5,2	
164,5	6,0	5,7	5,5	5,3	5,1	3,7	5,8	5,5	5,3	5,2	
188,5	5,5	5,6	5,4	5,3	5,4	3,9	5,3	5,3	5,5	5,3	
gemiddelde	5,7	5,8	5,7	5,4	5,7	4,1	5,6	5,7	5,7	6,0	
d_i	0		-0,2	-0,4	0,4	0,4	0,2	-0,3	-0,1	-0,4	-1,4
	23,5		-0,6	-0,2	-0,4	-0,9	1,0	-0,4	-0,6	0,3	0,1
	44		0,0	0,1	0,2	-0,9	2,4	0,2	-0,1	0,0	-1,6
	68		-0,3	-0,2	0,2	0,1	1,5	-0,7	-0,6	-0,2	-1,3
	93		0,1	0,1	0,6	0,1	1,9	1,1	0,1	-0,1	0,0
	116		-0,2	0,0	0,0	-0,2	1,6	-0,1	0,0	-0,4	-0,3
	139,5		-0,2	-0,1	0,5	-0,1	1,7	-0,1	0,2	-0,6	0,3
	164,5		0,3	0,5	0,8	1,0	2,4	0,3	0,6	0,7	0,8
	188,5		-0,1	0,2	0,2	0,1	1,7	0,2	0,3	0,1	0,2
som d_i		-1,22	-0,01	2,28	-0,32	14,44	0,27	-0,24	-0,55	-3,13	
n		9	9	9	9	9	9	9	9	9	
s_d		0,25	0,28	0,35	0,60	0,67	0,52	0,37	0,40	0,87	
T		-1,61	-0,01	2,17	-0,18	7,16	0,18	-0,22	-0,47	-1,19	
T($\alpha, n-1$)		2,306	2,306	2,306	2,306	2,306	2,306	2,306	2,306	2,306	
Significant?		nee	nee	nee	nee	ja	nee	nee	nee	nee	

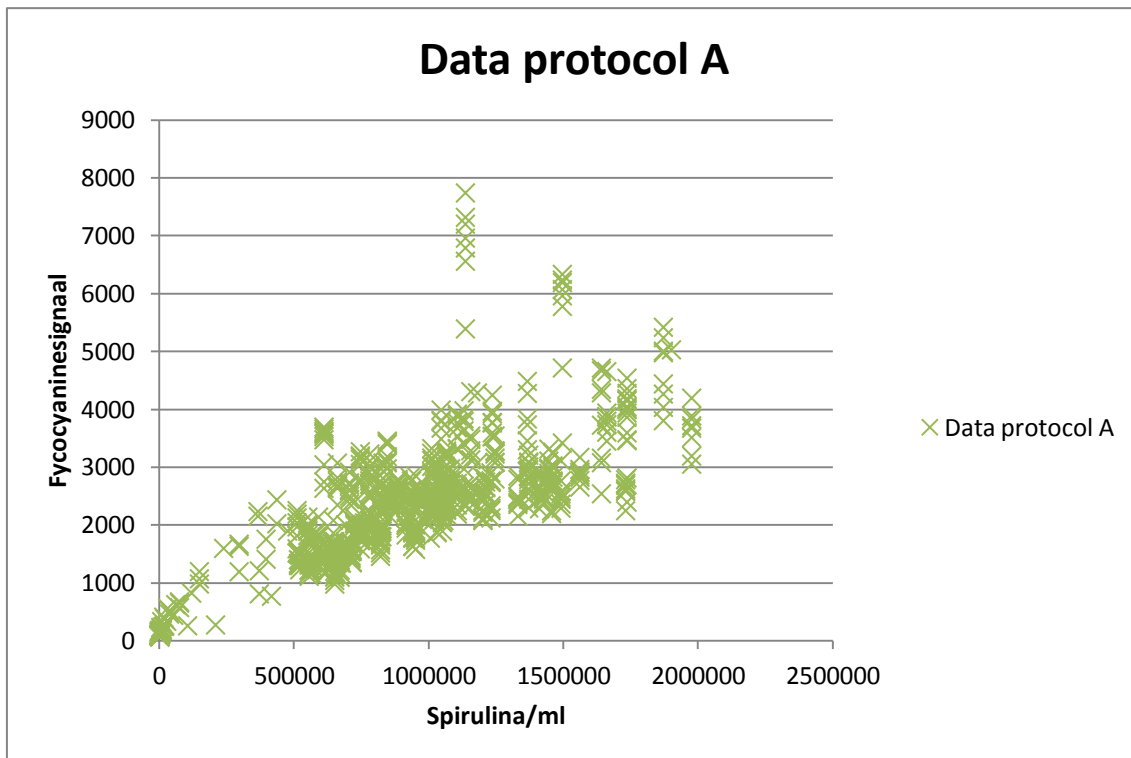
3.2 Concentratiebepaling via fycocyanine fluorescentie

De resultaten van de concentratiebepaling van Spirulina zonder voorafgaande celdestructie (protocol A) en met voorafgaande celdestructie (protocol B), worden hieronder weergegeven en tot slot vergeleken.

3.2.1 Protocol A: geen celdestructie

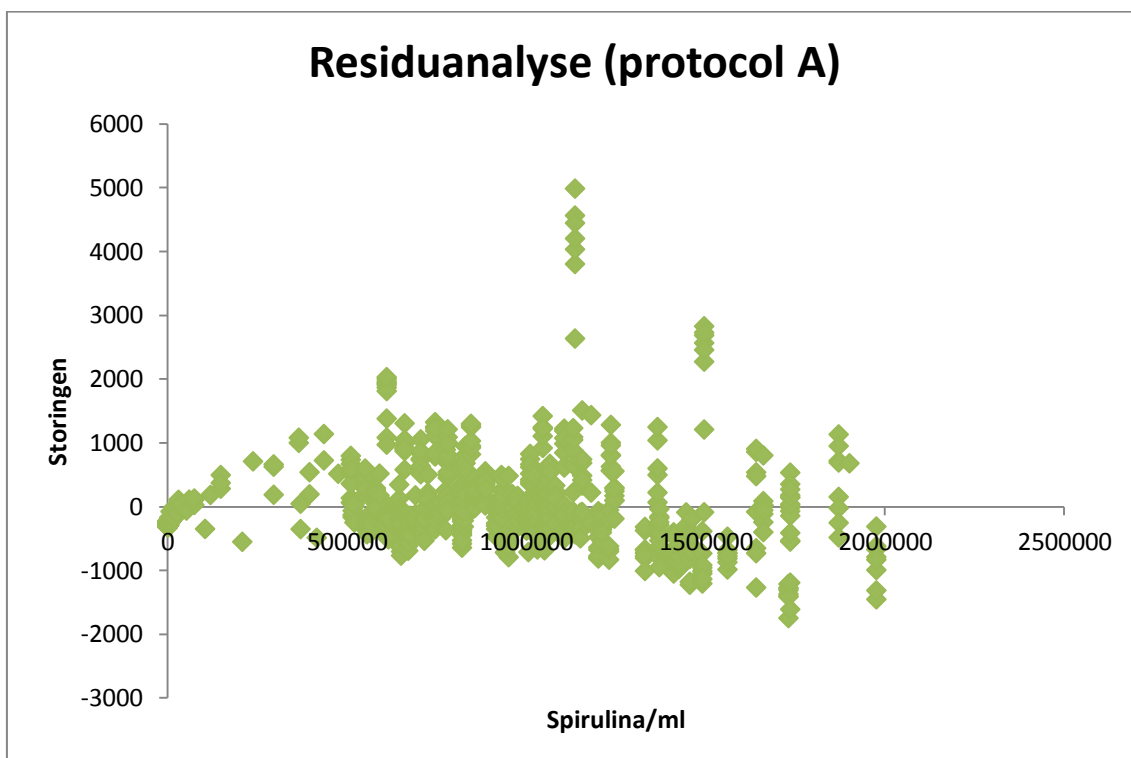
De data werden verzameld gedurende negen dagen. Elk staal werd achtmaal gemeten via VICTOR™ X4 Multilabel Plate Reader en de concentratie werd microscopisch bepaald via de Makler telkamer.

902 data werden verzameld voor protocol A en worden grafisch weergegeven in Figuur 31.



Figuur 31: Data (protocol A)

Ter controle of het lineaire model toepasbaar is, wordt de residuanalyse uitgevoerd. Aan de willekeurige verdeling van de residuen rond de nullijn in Figuur 32 kan afgeleid worden dat het lineaire model inderdaad van toepassing is op deze data.



Figuur 32: Residuanalyse (protocol A)

Tabel 12 geeft de resultaten van de regressieanalyse op Figuur 31 weer.

Tabel 12: Resultaten regressieanalyse (protocol A)	
Gegevens voor de regressie	
R-kwadraat	0,696184498
Standaardfout	680,9300697
Waarnemingen	902
y = ax + b	
y (fycocyaninesignaal); x (Spirulina/ml)	Coëfficiënten
Snijpunt (b)	396,7878618
Helling (a)	0,002083358

De berekening van de aantoonbaarheidsgrens wordt samengevat in Bijlage A1: Berekening aantoonbaarheidsgrens protocol A. De aantoonbaarheidsgrens komt overeen met driemaal de standaardafwijking op 115 stalen uit het lage concentratiegebied, namelijk **35185 Spirulina/ml**.

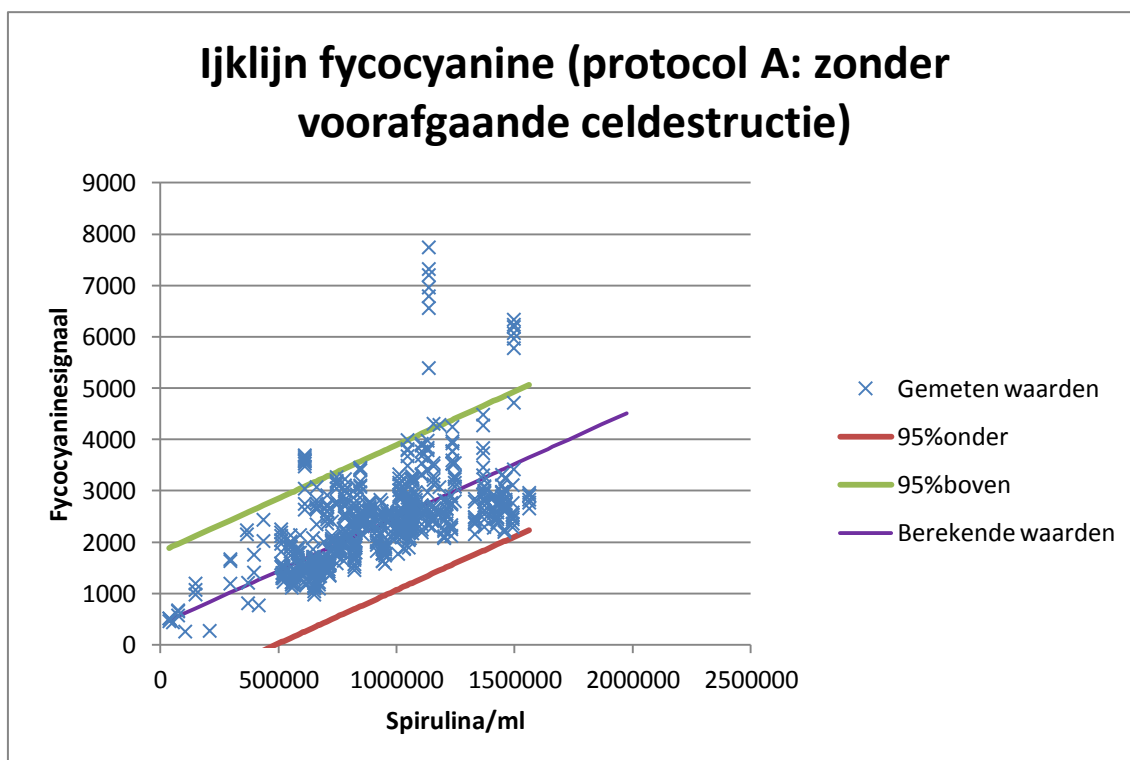
De meetonzekerheid werd bepaald door een staal dat boven de aantoonbaarheidsgrens lag, namelijk 745000 Spirulina/ml, meermaals te analyseren. De resultaten en berekening wordt samengevat in Tabel 13. De berekening gebeurt via de formules uit Figuur 16.

Tabel 13: Meetonzekerheid (protocol A)				
Spirulina/ml	Fycocyanine	$(y_i - y_{gem})/y_{gem}$	$((y_i - y_{gem})/y_{gem})^2$	
745000	2744	0,1388	0,0193	
745000	3136	0,3014	0,0909	
745000	2734	0,1346	0,0181	
745000	3052	0,2666	0,0711	
745000	3272	0,3579	0,1281	
745000	2796	0,1603	0,0257	
745000	3198	0,3272	0,1070	
745000	3176	0,3180	0,1012	
745000	1734	-0,2804	0,0786	
745000	1938	-0,1957	0,0383	
745000	1988	-0,1750	0,0306	
745000	1828	-0,2414	0,0583	
745000	1592	-0,3393	0,1151	
745000	1848	-0,2331	0,0543	
745000	1784	-0,2596	0,0674	
745000	1734	-0,2804	0,0786	
gemiddelde	2409,625	SOM	1,0826	
N	16	CV_{Rw}	0,27	

Vervolgens wordt de reproduceerbaarheid bepaald. De berekening hiervan is terug te vinden in Bijlage A2: Berekening reproduceerbaarheid protocol A. Het resultaat wordt samengevat in Tabel 14.

Tabel 14: Resultaat reproduceerbaarheid (protocol A)	
N	86
S_{Rw}	130,8

Tot slot wordt het 95% betrouwbaarheidsinterval berekend. De resultaten worden samengevat in Figuur 33. (Bijlage C: Voorbeeldberekening 95% Betrouwbaarheidsinterval)



Figuur 33: Ijklijn fycocyanine (protocol A: zonder voorafgaande celdestructie) met 95% betrouwbaarheidsinterval.

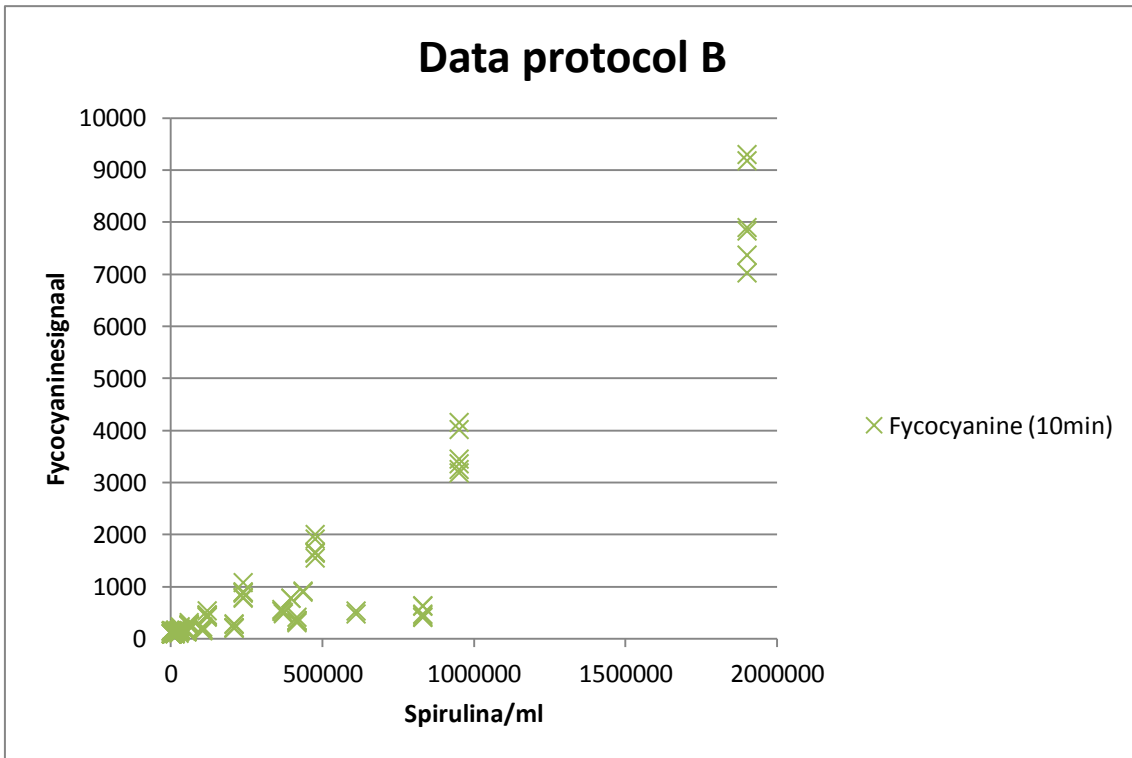
Deze resultaten worden verder besproken en vergeleken met de resultaten van protocol B in paragraaf 3.2.3.

3.2.2 Protocol B: celdestructie via SONOPULS (Bandelin)

Protocol B werd later in dit onderzoek uitgetest. Daardoor zijn minder datapunten beschikbaar, namelijk 146. Figuur 34 geeft ze grafisch weer.

Uit de residuanalyse (Figuur 35) blijken de residuen opnieuw willekeurig rond de nullijn verdeeld te zijn. Het lineaire model is dus opnieuw toepasbaar.

Tabel 15 geeft de resultaten van de regressieanalyse weer.



Tabel 15: Resultaten regressieanalyse (protocol B)	
Gegevens voor de regressie	
R-kwadraat	0,833018691
Standaardfout	697,7698
Waarnemingen	146
$y = ax + b$	
y (fycocyaninesignaal); x (Spirulina/ml)	Coëfficiënten
Snijpunt (b)	-129,573
Helling (a)	0,003603

De berekening van de aantoonbaarheidsgrens is weergegeven in Bijlage B1: Berekening aantoonbaarheidsgrens protocol B. De aantoonbaarheidsgrens komt overeen met driemaal de standaardafwijking op 58 stalen uit het lage concentratiegebied, namelijk **18013 Spirulina/ml**.

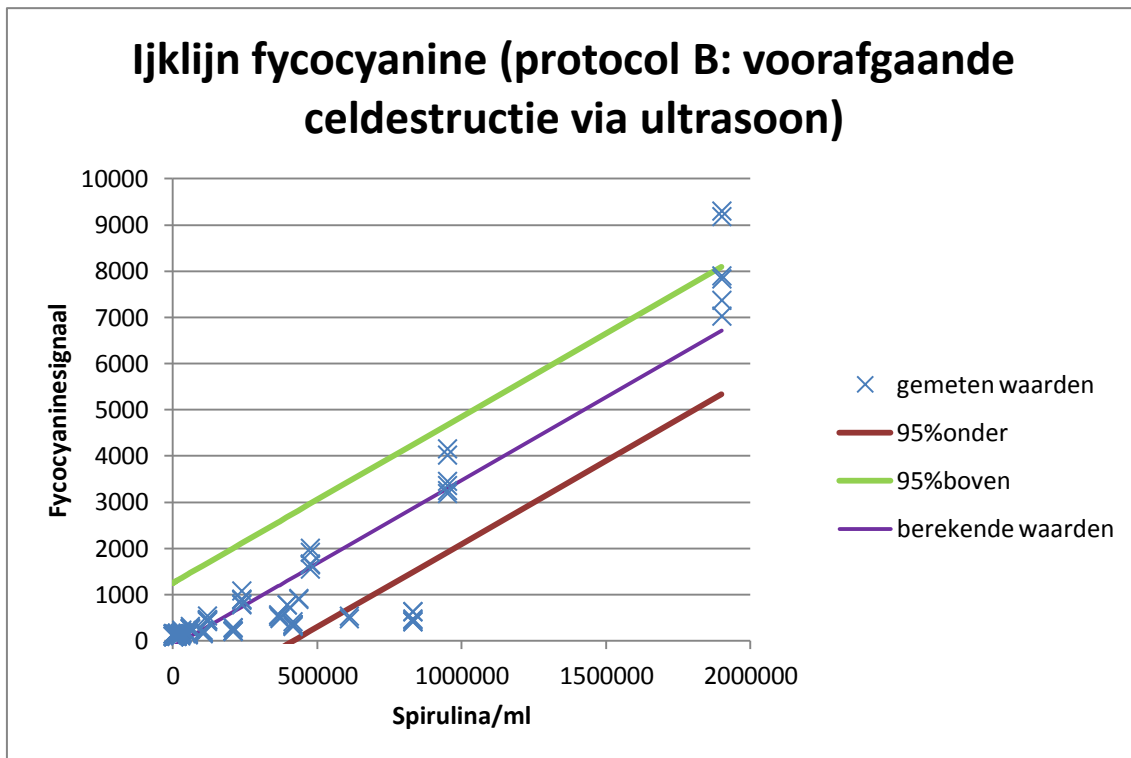
De berekening van de reproduceerbaarheid kan worden teruggevonden in Bijlage B2: Berekening reproduceerbaarheid protocol B. Het resultaat wordt samengevat in Tabel 16.

Tabel 16: Resultaat reproduceerbaarheid (protocol B)	
N	68
S_{Rw}	93,8

De meetonzekerheid werd bepaald door een staal dat boven de aantoonbaarheidsgrens lag, namelijk 415000 Spirulina/ml, meermaals te analyseren. De berekeningen en resultaten worden samengevat in Tabel 17.

Tabel 17: Meetonzekerheid (protocol B)			
Spirulina/ml	Fycocyanine(10min)	$(y_i - y_{gem})/y_{gem}$	$((y_i - y_{gem})/y_{gem})^2$
415000	356	0,00093721	0,00000088
415000	418	0,17525773	0,03071527
415000	314	-0,11715089	0,01372433
415000	358	0,00656045	0,00004304
415000	334	-0,06091846	0,00371106
415000	354	-0,00468604	0,00002196
gemiddelde	355,7	SOM	0,04821654
N	6	CV_{Rw}	0,098

Tot slot wordt ook voor protocol B het 95% betrouwbaarheidsinterval berekend. De betrouwbaarheidsgrenzen worden weergegeven in Figuur 36. (Bijlage C: Voorbeeldberekening 95% Betrouwbaarheidsinterval)



Figuur 36: Ijkljn fycocyanine (protocol B: voorafgaande celdestructie via ultrasoon) met 95% betrouwbaarheidsinterval

3.2.3 Vergelijking van beide methodes

Tabel 18 geeft een overzicht van de onderzochte prestatiekenmerken van protocol A en protocol B.

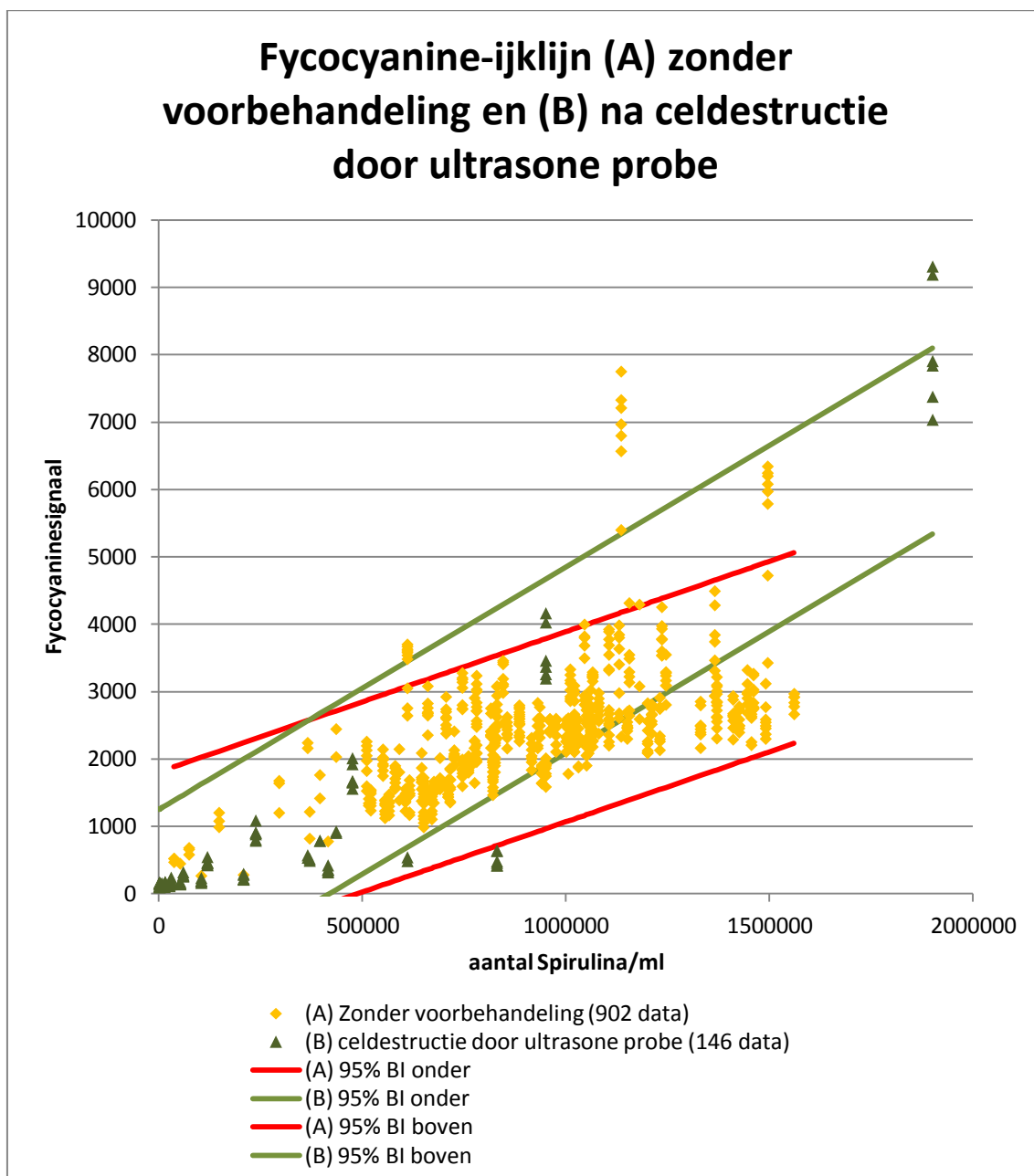
Tabel 18: Samenvatting protocol A en B			
Prestatiekenmerk	Parameter	Protocol A: zonder voorbehandeling	Protocol B: na celdestructie
Aantoonbaarheidsgrens		35185 Spirulina/ml	18031 Spirulina/ml
Regressievergelijking ($y=ax+b$)	R^2	0,6962	0,8330
	a	0,0021	0,0036
	b	396,7879	-129,5734
Reproduceerbaarheid	S_{Rw}	130,82	93,80
Meetonzekerheid	CV_{Rw}	0,27	0,10

Zoals te verwachten ligt de aantoonbaarheidsgrens lager bij protocol B. In dit protocol wordt immers de celinhoud van de Spirulinacellen in de oplossing vrijgesteld, waardoor meer fycocyanine in de oplossing komt dat op zijn beurt het signaal verhoogt. Dit kan ook afgeleid worden aan de richtingscoëfficiënt van de regressielijn, respectievelijk 0,0021 en 0,0036 voor protocol A en B. Een grotere richtingscoëfficiënt zoals bij protocol B betekent dat een bepaald concentratieverschil een grotere verandering in signaal geeft. Bovendien is ook de meetonzekerheid kleiner bij protocol B en is de

reproduceerbaarheid beter, want de variatie op de meting (zoals weergegeven door de parameter s_{Rw}) is bij protocol B het kleinste.

Hierbij moet echter wel de kanttekening gemaakt worden dat protocol B minder datapunten (namelijk 146 data) bevatte dan protocol A (902 data) en zodoende de prestatiekenmerken mogelijk minder representatief zijn.

Figuur 37 toont de betrouwbaarheidsintervallen van beide protocollen. Uit deze figuur kan worden afgeleid dat beide methodes een vergelijkbaar 95% betrouwbaarheidsinterval hebben. Hoe dichter de ondergrens en de bovengrens bij elkaar liggen, hoe nauwkeuriger de methode.



Figuur 37: Vergelijking betrouwbaarheidsintervallen protocol A en B

4 Besluit

Indool-3-azijnzuur bleek inderdaad de groeisnelheid van Spirulina te bevorderen.

Een concentratie van 2 tot en met 8 µg IAA/ml verkortte de verdubbelingstijd 40 tot 60% vergeleken met de blanco (0 µg IAA/ml). Er was geen significant verschil tussen 2 µg IAA/ml toevoegen of 8 µg IAA/ml toevoegen. Indien er 10-18 µg IAA/ml werd toegevoegd, werd de verdubbelingstijd weer vergelijkbaar met die van de blanco.

De gemiddelde lengte van Spirulina, uitgedrukt als gemiddeld aantal lussen/alg, werd niet significant beïnvloed door de concentratie IAA.

Twee uitzonderingen stelden zich. Ten eerste, de cultuur van 6 µg IAA/ml vertoonde een onverwacht tragere groeisnelheid die niet significant met de blanco verschilde. Ten slotte bleek de cultuur met 10 µg IAA/ml, die niet significant verschilde in verdubbelingstijd met de blanco, te bestaan uit algen die gemiddeld korter waren dan in de andere culturen. Beide uitzonderingen zijn vermoedelijk te wijten aan contaminaties. Er wordt aangeraden om het experiment te herhalen om te controleren of deze afwijkingen zich blijven voordoen.

Met het oog op de verwerking van varkensdrijfmest wordt aangeraden om 2 µg IAA/ml aan het medium toe te voegen. Dit is de laagste concentratie die een significante verbetering in verdubbelingstijd toonde. Tussen 2 µg IAA/ml en hogere concentraties was er geen significant verschil. 2 µg IAA/ml is zodoende de meest rendabele optie om de groeisnelheid te verbeteren met behulp van indool-3-azijnzuur. De kostprijs van 5 gram IAA is ongeveer 17 euro. (Plant Media, 2015)

Het wordt aangeraden om het IAA-experiment te herhalen om te controleren of het afwijkend resultaat bij 6 µg IAA/ml reproduceerbaar is. Ook is het interessant om hetzelfde experiment uit te voeren op Spirulina in een medium van 10% varkensdrijfmest in regenwater, en hiervan niet enkel de groei en morfologie van Spirulina op te volgen, maar ook de mate van zuivering van de drijfmest.

De concentratie aan Spirulina is te benaderen via meting van fycocyanine dat een lineair model volgt. Onderzoek bewijst tevens dat de aantoonbaarheidsgrens en de reproduceerbaarheid verbetert als de stalen eerst een celdestructie via een ultrasone probe ondergaan. Ook de meetonzekerheid was in dit geval kleiner. Desondanks is deze meting nog niet geoptimaliseerd en dus voorlopig enkel bruikbaar om een indicatie te krijgen van de Spirulinaconcentratie.

Er zijn verschillende mogelijkheden om deze meting te optimaliseren.

Om te beginnen wordt aangeraden om een objectieve methode te gebruiken om de Spirulinaconcentratie te bepalen, zoals drogestofbepaling. Vermoedelijk is het brede betrouwbaarheidsinterval van de fycocyanine/concentratie rechte grotendeels veroorzaakt door de onvermijdelijke fout op de microscopische telling.

De voorbehandeling via probe kan aangepast worden, eventueel door het staal in een ijsbad te zetten tijdens de sonificatie om de ongewenste temperatuurstijging tegen te gaan. Fycocyanine verliest namelijk aan stabiliteit bij temperaturen hoger dan 47 °C. (Chaiklahana, 2012)

Een andere mogelijkheid is fycocyanine volledig te extraheren, op te lossen in een geschikte buffer en hier de fluorescentie van te meten.

Eventueel kan een gelijksoortig protocol worden uitgewerkt waarbij het signaal van fyco-erythrine, in plaats van fycocyanine zoals in dit onderzoek, wordt gecorreleerd aan de Spirulinaconcentratie.

Spirulina biedt economisch veel mogelijkheden. Deze alg kan worden gekweekt op varkensdrijfmest, eventueel met toegevoegde IAA om de groei te stimuleren. De varkensdrijfmest ondergaat zo een zuiveringsstap. Uit de Spirulinamassa kan vervolgens fycocyanine en eventueel zelfs fyco-erythrine geëxtraheerd worden, om afzonderlijk te verkopen. Het overschot van de Spirulinamassa kan daarna gebruikt worden als voedingsadditief voor de veestapel. Het grootste probleem zal de opschaling zijn, aangezien Spirulina een slechte groei vertoont bij omgevingstemperaturen onder de 20 °C en het Belgisch klimaat daarom niet optimaal is om Spirulina gedurende alle seizoenen in buitenkweekvijvers te cultiveren.

Literatuurlijst

- Ahn, C. J. (2007). Alternative Alert System for Cyanobacterial Bloom, Using Phycocyanin as a Level Determinant. *The Journal of Microbiology*, 98-104.
- Beutler, M. W. (2001). In vivo fluorescence of phycocyanin in combination with multispectral chlorophyll fluorescence spectroscopy A powerful tool for the analysis of cyanobacteria and algae. *Photosynthesis Research*, 228-229.
- Campbell, R. e. (2008). *Biology*. San Francisco: Pearson International Edition.
- Chaiklahana, R. C. (2012). Stability of phycocyanin extracted from *Spirulina* sp.: Influence of temperature, pH and preservatives. *Process Biochemistry*, 659–664.
- Coppens, G. (2009). *Mest zo efficiënt mogelijk gebruiken*. België: Bodemkundige Dienst van België vzw.
- Cyanosite. (2015, juni 4). *Assessment of extraction methods for microcystin-LR from Microcystis aeruginosa*. Opgehaald van Cyanosite: <http://www-cyanosite.bio.purdue.edu/cyanotox/methods/extract.html>
- Danesi, E. R.-Y. (2011). Growth and Content of *Spirulina platensis* Biomass Chlorophyll Cultivated at Different Values of Light Intensity and Temperature Using Different Nitrogen Sources. *Brazilian Journal of Microbiology*, 362-373.
- Food and Agriculture Organisation of the United Nations. (2015, april 17). *Spirulina under the Microscope*. Opgehaald van Food and Agriculture Organisation of the United Nations: <ftp://ftp.fao.org/docrep/fao/010/y5118e/y5118e09c.pdf>
- Fu, J. W. (2011). Insights into auxin signaling in plant-pathogen interactions. *Frontiers in Plant Science*, 1-7.
- Gami, B. N. (2011). Cultivation of *Spirulina* species in different liquid media. *Journal of Algal Biomass Utilization*, 15-26.
- Gantar, M. O. (1991). Nutrient Removal and Algal Succession during the Growth of *Spirulina platensis* and *Scenedesmus quadricauda* on Swine Wastewater. *Bioresource Technology*, 167-171.
- Govindjee, S. D. (2011, juli 6). *Adventures with cyanobacteria: a personal perspective*. Opgehaald van Frontiers in Plant Science: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fpls.2011.00028/full>
- Green Plantchem. (2009). *3-Indoleacetic acid(IAA)*. Opgehaald van Green Plantchem: http://www.gplantchem.com/3-Indoleacetic_acid.html
- Jourdan, J. (2001). *Grow Your Own Spirulina*. United Kingdom: Antenna Technologies.
- Karkos, P. L. (2011). *Spirulina in Clinical Practice: Evidence-Based Human Applications. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*.

- Kasinak, J. H. (2015). Benchtop fluorometry of phycocyanin as a rapid approach for estimating cyanobacterial biovolume. *Journal of Plankton Research*, 248-257.
- Klaessens, D. J. (2010). *Statistiek, validatie en meetonzekerheid voor het laboratorium*. Arnhem: Syntax Media.
- Koehler, R. L. (2013). *Effects of swine manure applications on soil nutrient levels and phosphorus loss risk*. Opgehaald van University of Minnesota extension: <http://www.extension.umn.edu/agriculture/swine/effects-of-swine-manure-applications-on-soil-nutrient-levels-and-phosphorus-loss-risk/>
- Kolodny, N. B. (2006). Effect of Nitrogen Source on Cyanophycin Synthesis in *Synechocystis* sp. Strain PCC 6308. *Journal of Bacteriology*, 934–940.
- Kosuge, T. M. (1966). Microbial Synthesis and Degradation of Indole-3-acetic Acid. *The Journal of Biological Chemistry*, 3738-3744.
- Kwaliteit Zwemwater. (2015, april 17). *Cyanobacteriën informatiefolder*. Opgehaald van Kwaliteit Zwemwater: <http://www.kwaliteitzwemwater.be/gezondheid/cyanobacterien>
- Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes. (2015, april 1). *Tryptophan metabolism - Reference pathway*. Opgehaald van KEGG: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes: <http://www.genome.jp/kegg/pathway/map/map00380.html>
- Lee, R. (2008). *Phycology* (Fourth Edition ed.). The Edinburgh Building, Cambridge CB2 8RU, UK: Cambridge University Press.
- Mehboob, A. S. (2010). Production of Indole-3-Acetic Acid by the Cyanobacterium *Arthrospira platensis* Strain MMG-9. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 1259-1265.
- Mestbank. (2013). *Voortgangsrapport Mestbank 2013*. Vlaanderen: Vlaamse Landmaatschappij.
- MIRA. (2015, maart 20). *Milieuthema's - vermessing*. Opgehaald van Milieurapport: <http://www.milieurapport.be/nl/feitencijfers/milieuthemas/vermessing/>
- Mohammed, M. M. (2011). Enhancement in Production of Phenolic Compounds (Antioxidants) in *Spirulina platensis* under different IAA Regimes. *International Journal of Engineering Science and Technology*, 3004-3009.
- Phyco Biotech. (2013). *C-PHYCOCYANIN (C-PC)*. Opgehaald van Phyco Biotech: <http://phyco-biotech.com/en/c-phycocyanin>
- Plant Media. (2015). *Indole-3-acetic acid*. Opgehaald van Plant Media: http://www.plantmedia.com/productinfo/3_43_288_691/7004/Indole-acetic-acid-IAA.html
- Ravi, M. L. (2010). The beneficial effects of spirulina focusing on its immunomodulatory and antioxidant properties. *Nutrition and Dietary Supplements*, 73-83.
- Sefi Medical Instruments LTD. (2003). *Makler Counting Chamber: Instructions for use*. Haifa, Israel: Sefi Medical Instruments LTD.

- Sheldrake, R. (1973). *The Production of Hormones in Higher Plants*. Opgehaald van Sheldrake.org:
http://www.sheldrake.org/Articles&Papers/papers/hormone/higherplants_abs.html
- Smith, V. C. (2014). Applying ecological principles of crop cultivation in large-scale algal biomass production. *Algal Research*, 23-34.
- Solovchenko, A. L. (2013). Possibilities of Bioconversion of Agricultural Waste with the Use of Microalgae. *Moscow University Biological Sciences Bulletin*, pp. 206-215.
- Spaepen, S. V. (2013, februari 26). *Auxin signaling in Azospirillum*. Opgehaald van KU Leuven: <https://www.biw.kuleuven.be/m2s/cmpg/research/AI/auxin/Auxinsig>
- Su, X. F. (1992). Excitation energy transfer from phycocyanin to chlorophyll in an *apcA*-defective mutant of *Synechocystis* sp. PCC 6803. *The Journal of Biological Chemistry*, 22944-2950.
- Suresh, M. M. (2009). The detection of Hg²⁺ by cyanobacteria in aqueous media. *Chemical Communication*, 2496-2498.
- VCM. (2015). *Technieken: biologie*. Opgehaald van VCM-Mestverwerking: http://www.vcm-mestverwerking.be/tech/detail_nl.phtml?id=16
- VLM. (2015, maart 20). *Mestbank - sancties*. Opgehaald van Vlaamse Landmaatschappij: <http://www.vlm.be/landtuinbouwers/mestbank/sanctie/Pages/default.aspx>
- Volkman, H. I. (2008). Cultivation of *Arthrospira* (*Spirulina*) *platensis* in desalinator wastewater and salinated synthetic medium: protein content and amino-acid profile. *Brazilian Journal of Microbiology*, 98-101.
- Xu, H. Z. (2013). Sonochemical synthesis of nanomaterials. *Chemical Society Reviews*, 2555-2567.
- Yang, Y. P. (2011). In vitro and in vivo assessment of edible blue-green algae, *Nostoc commune* var. *sphaeroides* Kützing and *Spirulina plantensis*. *Food and Chemical Toxicology*, 1560-1564.

Bijlagen

BIJLAGE A1: BEREKENING AANTOONBAARHEIDSGRENS PROTOCOL A.....	62
BIJLAGE A2: BEREKENING REPRODUCEERBAARHEID PROTOCOL A	64
BIJLAGE B1: BEREKENING AANTOONBAARHEIDSGRENS PROTOCOL B	66
BIJLAGE B2: BEREKENING REPRODUCEERBAARHEID PROTOCOL B.....	67
BIJLAGE C: VOORBEELDBEREKENING 95% BETROUWBAARHEIDSINTERVAL.....	68

Bijlage A1: Berekening aantoonbaarheidsgrens protocol A

Uit regressie-analyse		a	0,002083358	gemiddelde	-138925	kwadraten som	15680748118
		b	396,79	n	115	s	11728
y	xi	AG 35185					
Fycocyanine	Spirulina/ml	xi-xgem	(xi-xgem) ²	fycocyanine	Spirulina/ml	xi-xgem	(xi-xgem) ²
92	-146296	-7371	54332303	96	-144376	-5451	29714133
90	-147256	-8331	69406123	100	-142457	-3531	12468593
158	-114617	24309	590907421	138	-124217	14709	216345821
94	-145336	-6411	41101639	108	-138617	309	95398
104	-140537	-1611	2595681	72	-155896	-16971	288012582
96	-144376	-5451	29714133	104	-140537	-1611	2595681
172	-107897	31029	962768395	158	-114617	24309	590907421
106	-139577	-651	423961	98	-143417	-4491	20169784
86	-149176	-10251	105083236	90	-147256	-8331	69406123
84	-150136	-11211	125686528	84	-150136	-11211	125686528
134	-126137	12789	163551388	160	-113657	25269	638500946
116	-134777	4149	17212719	94	-145336	-6411	41101639
86	-149176	-10251	105083236	84	-150136	-11211	125686528
104	-140537	-1611	2595681	96	-144376	-5451	29714133
106	-139577	-651	423961	150	-118457	20469	418964895
90	-147256	-8331	69406123	98	-143417	-4491	20169784
100	-142457	-3531	12468593	88	-148216	-9291	86323101
98	-143417	-4491	20169784	90	-147256	-8331	69406123
122	-131897	7029	49403860	146	-120377	18549	344052575
102	-141497	-2571	6610558	90	-147256	-8331	69406123
104	-140537	-1611	2595681	110	-137657	1269	1609993
92	-146296	-7371	54332303	72	-155896	-16971	288012582
134	-126137	12789	163551388	124	-130937	7989	63820555
90	-147256	-8331	69406123	112	-136697	2229	4967744
86	-149176	-10251	105083236	90	-147256	-8331	69406123
108	-138617	309	95398	90	-147256	-8331	69406123
154	-116537	22389	501249844	170	-108857	30069	904115928
88	-148216	-9291	86323101	106	-139577	-651	423961
108	-138617	309	95398	92	-146296	-7371	54332303
86	-149176	-10251	105083236	102	-141497	-2571	6610558
116	-134777	4149	17212719	140	-123257	15669	245507774
92	-146296	-7371	54332303	88	-148216	-9291	86323101
104	-140537	-1611	2595681	84	-150136	-11211	125686528
94	-145336	-6411	41101639	100	-142457	-3531	12468593
152	-117497	21429	459185791	152	-117497	21429	459185791
88	-148216	-9291	86323101	90	-147256	-8331	69406123
86	-149176	-10251	105083236	84	-150136	-11211	125686528

Fycocyanine	Spirulina/ml	xi-xgem	(xi-xgem) ²	fycocyanine	Spirulina/ml	xi-xgem	(xi-xgem) ²
84	-150136	-11211	125686528	106	-139577	-651	423961
180	-104057	34868	1215809839	138	-124217	14709	216345821
100	-142457	-3531	12468593	78	-153016	-14091	198555347
94	-145336	-6411	41101639	102	-141497	-2571	6610558
88	-148216	-9291	86323101	98	-143417	-4491	20169784
108	-138617	309	95398	172	-107897	31029	962768395
106	-139577	-651	423961	100	-142457	-3531	12468593
76	-153976	-15051	226531268	94	-145336	-6411	41101639
88	-148216	-9291	86323101	104	-140537	-1611	2595681
118	-133817	5109	26099942	160	-113657	25269	638500946
102	-141497	-2571	6610558	100	-142457	-3531	12468593
100	-142457	-3531	12468593	94	-145336	-6411	41101639
110	-137657	1269	1609993	84	-150136	-11211	125686528
126	-129977	8949	80080407	144	-121337	17589	309361151
110	-137657	1269	1609993	102	-141497	-2571	6610558
104	-140537	-1611	2595681	114	-135737	3189	10168653
100	-142457	-3531	12468593	92	-146296	-7371	54332303
164	-111737	27189	739217467	120	-132857	6069	36830323
112	-136697	2229	4967744	102	-141497	-2571	6610558
78	-153016	-14091	198555347	104	-140537	-1611	2595681
118	-133817	5109	26099942				

Bijlage A2: Berekening reproduceerbaarheid protocol A

Spirulina/ ml	herhaling 1	herhalin g 2	x1- x2	(x1- x2) ²	Spirulina /ml	herhaling 1	herhaling 2	x1- x2	(x1- x2) ²
1180000	3236	3074	162	26244	855000	2234	2222	12	144
590000	2036	2142	-106	11236	605000	1640	1816	-176	30976
295000	1578	1196	382	145924	515000	1650	1482	168	28224
147500	1002	984	18	324	715000	1600	1780	-180	32400
73750	564	576	-12	144	615000	1552	1256	296	87616
36875	394	464	-70	4900	565000	1224	1218	6	36
580000	1666	1850	-184	33856	645000	1408	1904	-496	246016
855000	2198	2460	-262	68644	520000	1696	1384	312	97344
605000	1350	1332	18	324	670000	1572	1434	138	19044
515000	1582	1534	48	2304	580000	1742	1548	194	37636
715000	1754	1616	138	19044	855000	2420	2354	66	4356
615000	1570	1388	182	33124	605000	1382	1306	76	5776
565000	1416	1288	128	16384	515000	1426	1432	-6	36
645000	1742	1590	152	23104	715000	1450	1492	-42	1764
520000	1564	1632	-68	4624	615000	1382	1388	-6	36
670000	1442	1402	40	1600	565000	1414	1138	276	76176
820000	1768	1652	116	13456	645000	1446	1610	-164	26896
825000	1854	2118	-264	69696	520000	1362	1706	-344	118336
950000	1726	1794	-68	4624	670000	1290	1508	-218	47524
975000	2074	2052	22	484	820000	1696	1796	-100	10000
940000	1556	1774	-218	47524	825000	1786	1868	-82	6724
555000	1368	1264	104	10816	950000	1898	1712	186	34596
675000	1750	1736	14	196	975000	2344	1908	436	190096
710000	1714	1586	128	16384	940000	1928	1548	380	144400
550000	1886	1888	-2	4	555000	1332	1316	16	256
690000	1998	1832	166	27556	675000	1612	1526	86	7396
580000	2000	1820	180	32400	710000	1462	1658	-196	38416
855000	2216	2314	-98	9604	550000	1722	1906	-184	33856
605000	1392	1426	-34	1156	690000	1732	1724	8	64
515000	1424	1484	-60	3600	820000	1758	1782	-24	576
715000	1500	1760	-260	67600	825000	1974	1660	314	98596
615000	1708	1312	396	156816	950000	1754	1992	-238	56644
565000	1284	1376	-92	8464	975000	2074	2230	-156	24336
645000	1710	1464	246	60516	940000	2082	1808	274	75076
520000	1498	1644	-146	21316	555000	1368	1324	44	1936
670000	1252	1420	-168	28224	675000	1714	1452	262	68644
580000	1816	1824	-8	64	710000	1578	1522	56	3136
940000	1874	1784	90	8100	550000	1632	1814	-182	33124
555000	1204	1316	-112	12544	690000	1668	1636	32	1024
675000	1568	1506	62	3844	820000	1986	1838	148	21904
710000	1488	1494	-6	36	825000	1996	1854	142	20164
550000	1988	1686	302	91204	950000	1810	2082	-272	73984
690000	1768	1684	84	7056	975000	1978	2186	-208	43264

$\text{som}((x_1-x_2)^2)$	2943612
n	86
SRw	130,8

Bijlage B1: Berekening aantoonbaarheidsgrens protocol B

Uit regressie-analyse			a	0,003603173			
			b	-129,57			
gemiddelde	71045	kwadratensom	2059182696				
n	58	s	6010				
		AG	18031				
fycocyanine	Spirulina/ml	xi-xgem	(xi-xgem) ²	fycocyanine	Spirulina/ml	xi-xgem	(xi-xgem) ²
102	64269,29416	-6776	45909265	128	71485,15677	440	193798
146	76480,75397	5436	29548163	112	67044,62593	-4000	16002446
162	80921,28481	9876	97542350	112	67044,62593	-4000	16002446
154	78701,01939	7656	58615678	132	72595,28948	1550	2403609
108	65934,49322	-5110	26116582	122	69819,95771	-1225	1500561
158	79811,1521	8766	76846620	130	72040,22313	995	990605
146	76480,75397	5436	29548163	130	72040,22313	995	990605
100	63714,2278	-7331	53739220	150	77590,88668	6546	42849526
94	62049,02874	-8996	80926271	132	72595,28948	1550	2403609
108	65934,49322	-5110	26116582	134	73150,35584	2105	4432811
104	64824,36051	-6221	38695506	124	70375,02406	-670	448776
104	64824,36051	-6221	38695506	124	70375,02406	-670	448776
114	67599,69229	-3445	11869675	128	71485,15677	440	193798
98	63159,16145	-7886	62185373	136	73705,42219	2660	7078209
98	63159,16145	-7886	62185373	98	63159,16145	-7886	62185373
116	68154,75864	-2890	8353100	110	66489,55958	-4555	20751415
144	75925,68761	4881	23821778	104	64824,36051	-6221	38695506
124	70375,02406	-670	448776	108	65934,49322	-5110	26116582
102	64269,29416	-6776	45909265	126	70930,09042	-115	13189
146	76480,75397	5436	29548163	164	81476,35116	10431	108814511
148	77035,82032	5991	35890746	164	81476,35116	10431	108814511
160	80366,21845	9321	86886386	166	82031,41752	10986	120702870
98	63159,16145	-7886	62185373	168	82586,48387	11542	133207426
120	69264,89135	-1780	3168544	146	76480,75397	5436	29548163
100	63714,2278	-7331	53739220	158	79811,1521	8766	76846620
104	64824,36051	-6221	38695506	138	74260,48855	3216	10339806
122	69819,95771	-1225	1500561	104	64824,36051	-6221	38695506
116	68154,75864	-2890	8353100	150	77590,88668	6546	42849526
120	69264,89135	-1780	3168544	118	68709,825	-2335	5452723

Bijlage B2: Berekening reproduceerbaarheid protocol B

$\text{som}((x_1-x_2)^2)$	1196666
n	68
SRw	93,8

Spirulina/ml	herhaling 1	herhaling 2	x1-x2	(x1-x2) ²	Spirulina/ml	herhalin g 1	herhalin g 2	x1-x2	(x1-x2) ²
1900000	9306	9186	120	14400	830000	640	630	10	100
950000	4160	4024	136	18496	415000	356	418	-62	3844
475000	1920	2008	-88	7744	207500	292	278	14	196
237500	1084	898	186	34596	103750	230	184	46	2116
118750	542	452	90	8100	51875	156	172	-16	256
59375	316	280	36	1296	25938	150	164	-14	196
29688	168	178	-10	100	12969	136	98	38	1444
14844	164	164	0	0	6484	112	112	0	0
7422	150	132	18	324	3242	98	120	-22	484
3711	120	138	-18	324	1621	104	104	0	0
1855	144	124	20	400	811	162	154	8	64
928	94	108	-14	196	405	102	146	-44	1936
1900000	7903	7032	871	758641	830000	414	478	-64	4096
950000	3192	3366	-174	30276	415000	314	334	-20	400
475000	1556	1668	-112	12544	207500	210	206	4	16
237500	802	906	-104	10816	103750	182	158	24	576
118750	420	456	-36	1296	51875	146	142	4	16
59375	270	266	4	16	25938	130	110	20	400
29688	236	192	44	1936	12969	110	108	2	4
14844	166	168	-2	4	6484	132	130	2	4
7422	134	124	10	100	3242	100	122	-22	484
3711	104	150	-46	2116	1621	114	98	16	256
1855	102	146	-44	1936	811	108	146	-38	1444
1900000	7837	7374	463	214369	830000	422	454	-32	1024
950000	3256	3456	-200	40000	415000	358	354	4	16
475000	1658	1648	10	100	207500	220	218	2	4
237500	784	880	-96	9216	103750	194	176	18	324
118750	466	432	34	1156	51875	136	152	-16	256
59375	258	254	4	16	25938	160	144	16	256
29688	186	152	34	1156	12969	104	126	-22	484
14844	146	158	-12	144	6484	122	130	-8	64
7422	124	128	-4	16	3242	104	116	-12	144
3711	118	128	-10	100	1621	98	116	-18	324
1855	148	160	-12	144	811	158	100	58	3364

Bijlage C: Voorbeeldberekening 95% Betrouwbaarheidsinterval

Bij het berekenen van het betrouwbaarheidsinterval zijn enkel de datapunten verwerkt die boven de aantoonbaarheidsgrens vallen.

Protocol A

richting	0,002083358
snijpunt	396,79
Rkwadraat	0,696184498
st.fout yx	680,93
t waarde	1,96
vrijheidsgraden	900
st.fout*t waarde	1336,396

x	y		BI	BI
Spirulina/ml	Fycocyanine (10min)	y(berekend)	95%onder	95%boven
780000	3232	2021,807	685,4111	3358,202

Protocol B

richting	0,003603173
snijpunt	-129,57
Rkwadraat	0,833018691
st.fout yx	697,77
t waarde	1,98
vrijheidsgraden	144
st.fout*t waarde	1379,194

x	y		BI	BI
Spirulina/ml	Fycocyanine (10min)	y(berekend)	95%onder	95%boven
405	102	-128,113	-1507,308	1251,081

Auteursrechtelijke overeenkomst

Ik/wij verlenen het wereldwijde auteursrecht voor de ingediende eindverhandeling:
Groefactoren uit varkensmest en hun invloed op de groei van Spirulina

Richting: **master in de industriële wetenschappen: biochemie**

Jaar: **2015**

in alle mogelijke mediaformaten, - bestaande en in de toekomst te ontwikkelen - , aan de Universiteit Hasselt.

Niet tegenstaand deze toekenning van het auteursrecht aan de Universiteit Hasselt behoud ik als auteur het recht om de eindverhandeling, - in zijn geheel of gedeeltelijk -, vrij te reproduceren, (her)publiceren of distribueren zonder de toelating te moeten verkrijgen van de Universiteit Hasselt.

Ik bevestig dat de eindverhandeling mijn origineel werk is, en dat ik het recht heb om de rechten te verlenen die in deze overeenkomst worden beschreven. Ik verklaar tevens dat de eindverhandeling, naar mijn weten, het auteursrecht van anderen niet overtreedt.

Ik verklaar tevens dat ik voor het materiaal in de eindverhandeling dat beschermd wordt door het auteursrecht, de nodige toelatingen heb verkregen zodat ik deze ook aan de Universiteit Hasselt kan overdragen en dat dit duidelijk in de tekst en inhoud van de eindverhandeling werd genotificeerd.

Universiteit Hasselt zal mij als auteur(s) van de eindverhandeling identificeren en zal geen wijzigingen aanbrengen aan de eindverhandeling, uitgezonderd deze toegelaten door deze overeenkomst.

Voor akkoord,

Hendrickx, Sarah

Datum: **9/06/2015**