

Het effect van ammoniak op voeropname, groei en fysiologie van Afrikaanse meerval

Door Edward Schram en Wout Abbink, IMARES Wageningen UR (Edward.schram@wur.nl)

IMARES heeft in 2008 een inventarisatie uitgevoerd van de waterkwaliteit in meervalkwekerijen. Om in te schatten of er sprake is van niet optimale waterkwaliteit zijn de meetresultaten vergeleken met literatuurgegevens. Hieruit bleek dat er over het effect van ammoniak op meerval onvoldoende bekend is om goed in te kunnen schatten of de soms hoge concentraties in het water slecht zijn voor de groei en het welzijn van de visen. Daarom is een experiment opgezet om het effect van ammoniakconcentratie in het kweekwater voor Afrikaanse meerval vast te stellen.

Ammonia-uitscheiding door vis

Vissen produceren stikstofhoudende afvalstoffen door de afbraak van aminozuren. De meeste zoet- en zoutwatervissen scheiden het grootste deel van deze stikstofverbindingen uit als ammonia via de kieuwen. De manier waarop dit gebeurt, wordt al tientallen jaren onderzocht maar desondanks nog steeds niet helemaal begrepen. Duidelijk is echter dat twee processen een belangrijke rol spelen: passieve diffusie van ammoniak (NH_3) en actieve uitscheiding van ammonium (NH_4^+). Bij een lage ammoniakconcentratie in het water zorgt diffusie van ammoniak van het bloed naar het water voor het grootste deel van de uitscheiding. Ammoniak stroomt als het ware vanzelf van het bloed naar het water. De drijvende kracht hierachter is het concentratieverschil tussen het bloed en het water. Als de ammoniakconcentratie in het water stijgt, wordt dit verschil kleiner en stroomt ammoniak minder makkelijk naar buiten. Als de ammoniakconcentratie

in het water nog verder stijgt, stroomt het zelfs de vis in. In beide gevallen leidt een stijging van de ammoniakconcentratie in het water tot een snelle ophoping van ammonium in het bloed en weefsels van de vis. Ophoping van ammonium in de vis heeft allerlei schadelijke (neuro-toxicologische) effecten. Om dit te voorkomen moet de vis de ammoniumconcentratie in het lichaam weer omlaag zien te krijgen. Hiervoor schakelt de vis over op actieve uitscheiding van ammonium. Heel recent is aangetoond dat rhesus-eiwitten een belangrijke rol spelen bij het actieve transport van ammonium over de celmembranen in de kieuwen. Niet alle vissoorten zijn even goed in het actief uitscheiden van ammonium en dat verklaart de verschillen in gevoeligheid voor ammoniak in het water tussen vissoorten.

Ammonia in aquacultuur

Voor de waterkwaliteit en de giftigheid van ammonia is vooral de ammoniak (NH_3) concentratie van belang. Ammoniak

kan namelijk de kieuwen van een vis vrij gemakkelijk passeren en is daardoor van invloed op de ammoniumconcentratie in de vis. Ammonium (NH_4^+) kan de kieuwen van zoetwatervissen niet zomaar passeren en is daarom van weinig belang voor de ammoniumconcentratie in de vis.

Hoge ammoniakconcentraties in het water, veroorzaakt door een hoge visdichtheid en een hoge voerbelasting, leiden in de vis teelt tot verlaagde voeropname, verlaagde groei en sterfte. Ammoniak is daarom een belangrijke beperkende factor voor intensieve viskweek en de concentratie in het water mag niet te hoog worden. Hoe hoog de ammoniakconcentratie in het water mag worden (grenswaarde) is vissoortspecifiek. Voor juveniele tarbot (*Psetta maxima*) ligt de ammoniakconcentratie waarboven een effect op groei waargenomen is tussen de 0.10-0.17 mg NH_3 -N/L. Voor juveniele zeebaars (*Dicentrarchus labrax*) is deze grenswaarde 0.26 mg NH_3 -N/L.

Darwin - aanpassen aan het natuurlijk milieu

Afrikaanse meerval (*Clarias gariepinus*) leeft van nature in een wisselend milieu, en wordt daardoor regelmatig geconfronteerd met hoge ammoniumconcentraties in het lichaam. Tijdens het droge seizoen komen ze vaak terecht in modderpoelen. In een modderpoel heeft een meerval maar weinig water om zich heen waaraan ammonia kan worden afgegeven, waardoor de concentratie in het water en dus ook in het lichaam oploopt. Individuele vissen die daar goed tegen kunnen, hebben een grotere kans om onder deze omstandigheden te overleven en om deze eigenschap vervolgens door te geven aan de volgende generatie. Onder deze natuurlijke selectiedruk zijn in de Afrikaanse meerval enkele verdedigingsmechanismen tegen ammoniavergiftiging ontstaan. Deze mechanismen betreffen een goed ontwikkelde actieve uitscheiding

van ammonium, een afname van de eigen ammoniaproductie door een verlaging van de afbraak van aminozuren en een hoge tolerantie voor ammonium in weefsels en cellen. Daarnaast is het waarschijnlijk dat de Afrikaanse meerval in staat is om de doorlaatbaarheid voor ammoniak van de huid en membranen te verlagen als reactie op hoge ammoniakconcentraties in het water, waardoor ammoniak minder makkelijk vanuit het water het lichaam binnenkomt.

Experiment

Dankzij deze verdedigingsmechanismen kan de Afrikaanse meerval, in vergelijking met andere vissoorten, behoorlijk goed tegen hoge ammoniakconcentraties in het water. Hoe hoog deze concentratie mag worden zonder dat de Afrikaanse meerval daar last van heeft, weten we niet. Daardoor is het onduidelijk of de hoge totaal ammoniacconcentraties die soms voorkomen op kwekerijen leiden tot vermindering van de productie en tot aantasting van het welzijn van de vissen. Ook voor het ontwerpen en beheren van kweeksystemen is een goed gedefinieerde grenswaarde belangrijk.

Deze grenswaarde is vastgesteld in een experiment waarin Afrikaanse meervallen met een gemiddeld startgewicht van 141,0 g gedurende 34 dagen werden blootgesteld aan vijf verschillende ammoniak (NH_3) concentraties (0,06, 0,19, 0,53, 2,47, 15,2 mg NH_3 -N/L). Deze ammoniakconcentraties komen overeen met totaal ammonia ($\text{NH}_3 + \text{NH}_4^+$) concentraties van 5, 15, 30, 72 en 275 mg N/L. Om vast te stellen of blootstelling aan hoge ammoniakconcentraties leidt tot fysiologische verstoringen in de vis werden de plasmaconcentraties van ammonium, cortisol, glucose en lactaat, de plasma osmolaliteit, de morfologie van de kieuwen en de activiteit van Na^+/K^+ -ATPase in de kieuwen bestudeerd. Daarnaast werd gekeken naar de voeropname en specifieke groeisnelheid in relatie tot de ammoniak-

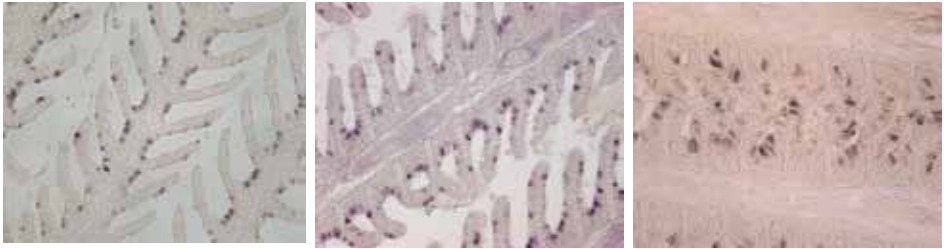


Fig. 1 Kieuwlamellen (400x vergroot) van Afrikaanse meerval blootgesteld aan 0,06 mg $\text{NH}_3\text{-N/L}$ (A), 0,53 mg $\text{NH}_3\text{-N/L}$ (B) en 15,2 mg $\text{NH}_3\text{-N/L}$ (C).

concentraties. Met de resultaten daarvan hebben we de 10% effect concentraties (EC_{10}) voor voeropname en groei uitgerekend. De EC_{10} is de ammoniakconcentratie waarbij ten opzichte van de controlegroep een verlaging van 10% van de voeropname of groei optreedt.

Ammoniumconcentraties in het bloedplasma

De Afrikaanse meervallen in dit experiment bleken, zoals al eens eerder werd aangetoond, heel goed in staat de ammoniumconcentratie in het bloedplasma niet mee te laten stijgen met toenemende ammoniakconcentraties in het water. Onze resultaten laten zien dat Afrikaanse meerval zich goed aan kan passen aan extreme ammoniakconcentraties in het water. Dit is uniek onder kweekvissen. Desondanks hadden de vissen last van de hoge ammoniakconcentraties in het water, zoals bleek uit de fysiologische en productieparameters.

Stressfysiologie

In vissen leidt acute stress tot een snelle, tien tot honderdvoudige verhoging van de plasma cortisolconcentratie. Dit wordt binnen enkele uren gevolgd door een daling naar de oorspronkelijke basale concentratie. Basale concentraties zijn over het algemeen laag maar variatie bestaat tussen geslachten, vissoorten en levensstadia. In geval van chronische stress, zoals hoge

ammoniakconcentraties in het water, kan de plasma cortisolconcentratie verhoogd blijven boven het basale niveau, maar wel lager dan in geval van acute stress.

De plasma cortisolconcentraties in deze studie vertoonden de gebruikelijke grote variatie tussen individuele vissen. Verschillen tussen de behandelingen werden niet gevonden. Het lijkt er op dat de ammoniakconcentraties niet tot chronische stress bij de vissen leidde, met uitzondering van wellicht blootstelling aan de hoogste ammoniakconcentratie. De lage plasma cortisolconcentraties die in deze groep gevonden werden kunnen namelijk ook geïnterpreteerd worden als uitputting van de cortisolproductie door de chronische blootstelling aan een hoge ammoniakconcentratie. Dit wordt onderbouwd door de significant verhoogde plasma glucoseconcentratie in de 15,2 mg $\text{NH}_3\text{-N/L}$ behandeling. Hoge plasma glucose en plasma lactaatconcentraties komen namelijk algemeen voor in gestreste vissen. De verhoogde plasma glucoseconcentratie in de 15,2 mg $\text{NH}_3\text{-N/L}$ behandeling kan mogelijk ook verklaard worden door de energiebehoefte van actieve ammoniumuitscheiding.

Kieuwen

Via het kieuwepitheel vindt gasuitwisseling, ionenregulatie, zuur-base regulatie en de uitscheiding van stikstofverbindingen plaats. Het rechtstreekse contact met het

water en de delicate structuur maken de kieuwen kwetsbaar voor vervuilingen en dit kan leiden tot afwijkingen in de morfologie. Afwijkingen in de kieuwen zijn daarom een van de eerste effecten die je kunt verwachten als gevolg van een niet optimale waterkwaliteit.

In dit experiment werden geleidelijke veranderingen in de kieuwmorfologie waargenomen bij een toenemende ammoniakconcentratie in het water. De kieuwen van de vissen die werden blootgesteld aan de laagste ammoniakconcentratie zagen er normaal uit; afwijkingen in de morfologie werden niet gezien (Fig. 1A). Vanaf de 0,53 $\text{NH}_3\text{-N/L}$ behandeling werden wel afwijkingen gezien (Fig. 1B). De meest drastische veranderingen werden waargenomen bij de hoogste ammoniakconcentratie (Fig. 1C). De sterke opzwellen van het epitheel en een sterke toename van de slijmproductie zijn waarschijnlijk aanpassingen aan de hoge ammoniakconcentratie in het water.

Deze aanpassingen hebben als doel de afstand tussen het water en de bloed-stroom te vergroten, waardoor de doorlaatbaarheid van de kieuwen en daarmee de instroom van ammoniak beperkt wordt. Het is aanneemelijk dat met de toename van de ammoniakconcentratie in het water de actieve uitscheiding van ammonium ook toeneemt. Dit wordt onderbouwd door de waargenomen toename van de activiteit van het enzym dat hierbij betrokken is ($\text{Na}^+/\text{K}^+\text{-ATPase}$) bij de hoogste ammoniakconcentratie.

Voeropname en groei

De totale voeropname en de specifieke groeisnelheid (SGR) waren sterk negatief beïnvloed bij de vissen die werden blootgesteld aan de hoogste ammoniakconcentratie. Blootstelling aan 15,2 $\text{NH}_3\text{-N/L}$ resulteerde in een 58% lagere totale voeropname en een 57% lagere SGR in vergelijking met de controle groep. De voederconversie (FCR) was gelijk in alle behandelingen

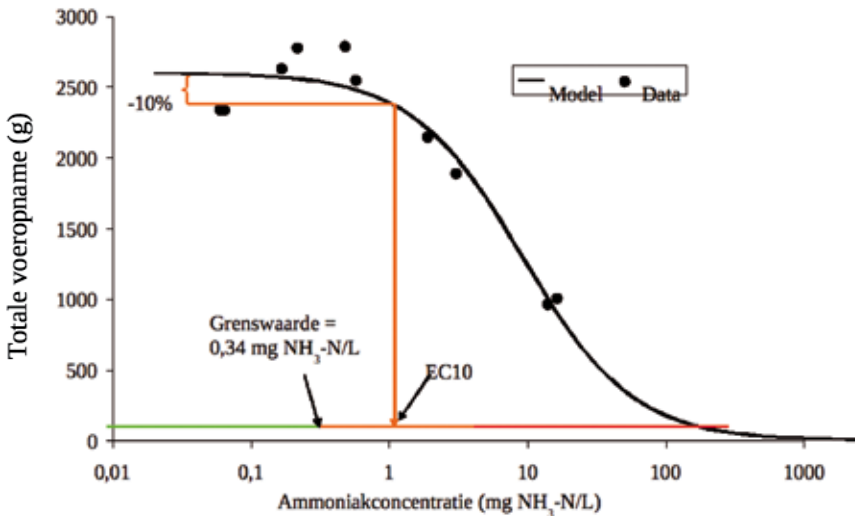


Fig. 2 Concentratie – effect curve voor de totale voeropname en de ammoniakconcentratie in het water voor Afrikaanse meerval. De grenswaarde voor de ammoniakconcentratie wordt vastgesteld op de ondergrens van het 95% betrouwbaarheidsinterval (oranje) van de EC_{10} .

met uitzondering van de 15,2 mg $\text{NH}_3\text{-N/L}$ behandeling, waarin een verhoogde FCR werd waargenomen. Dit suggereert dat het handhaven van lage plasma ammoniumconcentraties veel energie kost en ten koste gaat van groei.

Tot onze verrassing werd een licht hogere voeropname waargenomen in de 0,19 en 0,53 mg $\text{NH}_3\text{-N/L}$ behandelingen ten opzichte van de controle groep. Wij vermoeden dat de vis met deze verhoogde voeropname inspeelt op de verhoogde energiebehoefte vanwege de actieve uitscheiding van ammonium. Een dergelijk 'positief' effect bij lage concentraties van een toxische stof komt vaker voor en wordt hormesis genoemd. Meestal uit hormesis zich door een wat verhoogde groei bij blootstelling aan lage concentraties van een toxische stof. Dit komt doordat de verhoogde voeropname meer dan voldoende is om de verhoogde energiebehoefte te dekken; de rest wordt

dan benut voor groei. In ons experiment was dat effect een beetje zichtbaar: we zagen een trend in de richting van hogere groei in de 0,19 en 0,53 mg $\text{NH}_3\text{-N/L}$ behandelingen ten opzichte van de controle groep.

Ammoniakgrenswaarde

Chronische of acute suboptimale omstandigheden kunnen in een dier leiden tot primaire (plasma cortisol), secundaire (plasma glucose en plasma lactaat) en tertiaire (voeropname en groei) stressreacties, afhankelijk van hoe slecht de omstandigheden zijn. Dat betekent dat er in het algemeen al lang sprake is van fysiologische verstoring van een dier voordat je een effect daarvan op groei ziet. Dat is precies de reden waarom terecht gesteld wordt dat voeropname en groei niet perse goede indicatoren zijn voor negatieve effecten van suboptimale omstandigheden op landbouwhuisdieren.

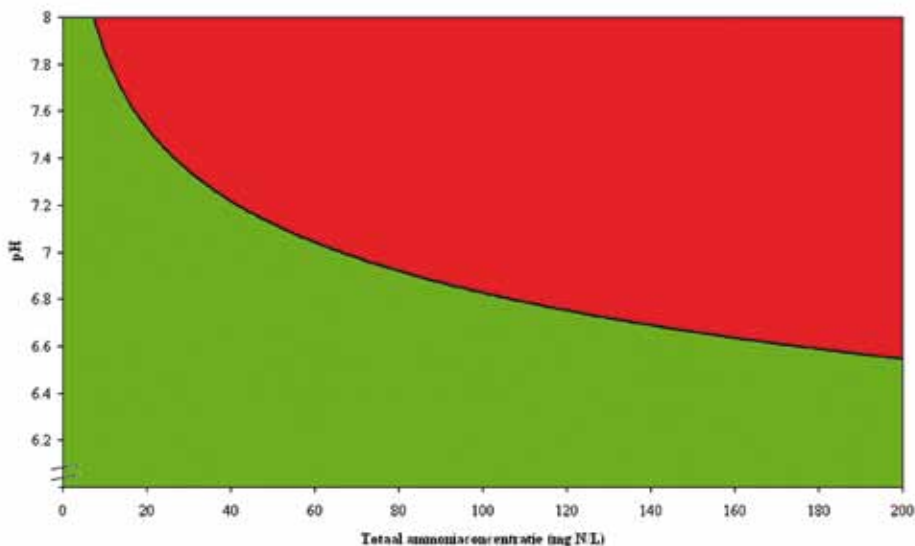


Fig. 3 De ammoniak (NH_3) grenswaarden in relatie tot de totale ammoniacconcentratie en de pH bij 26°C en een geleidbaarheid van 2500 $\mu\text{S/cm}$. In het groene gebied is de ammoniakconcentratie voldoende laag. In het rode gebied is de ammoniakconcentratie te hoog.

Ammonia, ammoniak en ammonium....

De terminologie rondom ammonia is niet altijd eenvoudig en wordt ook niet altijd even duidelijk gebruikt, waardoor verwarring kan ontstaan. In dit artikel hebben we de volgende termen gebruikt:

- Ammoniak is het in water opgeloste gas NH_3
- Ammonium is de geïoniseerde vorm NH_4^+
- Ammonia wordt gebruikt als de chemische vorm niet gespecificeerd wordt.
- Totaal ammonia (officiële notatie T_{amm}) is het totaal van NH_3 en NH_4^+ .

De concentraties worden uitgedrukt op stikstof (N) basis in mg N/L of (bijvoorbeeld) mg NH_3 -N/L. Dit laatste is eigenlijk dubbelop maar wordt dan gebruikt om nog duidelijker te maken welke chemische vorm bedoeld wordt.

Een andere term die vaak gebruikt wordt is TAN. Dit staat voor *total ammonia nitrogen* en is dus hetzelfde als T_{amm} . In het Engels is het nog lastiger omdat het woord ammoniak daarin niet voorkomt. Ammonia kan dan zowel het opgeloste gas NH_3 (in het Nederlands dus ammoniak) als de niet gespecificeerde chemische vorm zijn.

Eenzelfde patroon verwachtten wij ook waar te nemen bij de blootstelling van Afrikaanse meerval aan ammoniak: met toenemende ammoniakconcentratie: eerst fysiologische verstoring van de vis en pas bij hogere concentraties ook effecten op voeropname en groei.

Tot onze verrassing vonden we het omgekeerde. Afrikaanse meerval die chronisch werd blootgesteld aan ammoniakconcentraties zo hoog als 2,5 mg NH_3 -N/L vertoonden geen grote fysiologische verstoringen, met uitzondering van de kieuwmorfologie. De voeropname en de specifieke groeisnelheid waren verlaagd bij veel lagere ammoniakconcentraties: de EC_{10} voor ammoniak werd vastgesteld op 1,24 mg NH_3 -N/L voor voeropname (Fig. 2) en op 1,70 mg NH_3 -N/L voor SGR.

Dit geeft aan dat Afrikaanse meerval een goede stressregulatie blijkbaar belangrijker vindt dan het in standhouden van groei. Voeropname en groei zijn voor wat betreft

negatieve effecten van hoge ammoniakconcentraties in het water op Afrikaanse meerval daarom wel goede indicatoren, vooral als het gaat om het beoordelen van chronische suboptimale omstandigheden. Daarom kan naar onze mening de grenswaarde voor de concentratie voor chronische blootstelling van Afrikaanse meerval aan ammoniak het best worden gebaseerd op de effecten van ammonia op voeropname en groei. Aangezien de laagste EC_{10} waarde is gevonden voor voeropname en rekening houdend met de ondergrens van het 95% betrouwbaarheidsinterval, moet de ammoniakgrenswaarde bijvoorkeur vastgesteld worden op 0,34 mg NH_3 -N/L (Fig. 2). Bij deze ammoniakconcentratie is de kans op een 10% reductie van de voeropname ten hoogste 5%, tegelijkertijd wordt de groei niet negatief beïnvloed.

Praktische consequenties

Uit het bovenstaande blijkt dat een verlaging van de voeropname ten opzichte van de verwachte voeropname voor Afrikaanse meerval de beste aanwijzing is voor een te hoge ammoniakconcentratie. Voor deze beoordeling zijn relatief geavanceerde metingen waarover een kweker moeilijk kan beschikken dus niet nodig. Daarnaast is duidelijk dat een te hoge ammoniakconcentratie een direct effect heeft op de productie. Het handhaven van een goede waterkwaliteit ten behoeve van het welzijn van de vis gaat dus hand in hand met het optimaliseren van de productie.

Op commerciële meervalkwekerijen wordt meestal niet ammoniak (NH_3) maar eigenlijk altijd de totale ammonia stikstofconcentratie (T_{amm} of TAN) gemeten. Dit is het totaal van NH_4^+ -N en NH_3 -N. De verhouding tussen ammonium (NH_4^+) en ammonia (NH_3) is afhankelijk van de temperatuur, zoutgehalte en vooral de pH waarde van het kweekwater. In zoetwater van 26°C en een geleidbaarheid van 2500 $\mu\text{S}/\text{cm}$ komt

de ammoniakgrenswaarde van 0,34 mg $\text{NH}_3\text{-N/L}$ overeen met een totaal ammoniacconcentratie van 68 mg N/L bij pH 7,0, met 680 mg N/L bij pH 6,0 en met 6800 mg N/L bij pH 5,0. In Figuur 3 kan worden afgelezen bij welke totale ammoniacconcentratie en de pH de ammoniakgrenswaarde van 0,34 mg N/L bereikt wordt. In het groene gebied is de ammoniakconcentratie lager dan de grenswaarde en in het rode gebied wordt de EC_{10} overschreden. Figuur 3 is van toepassing op water van 26°C en een geleidbaarheid van 2500 $\mu\text{S/cm}$. Het ammoniak aandeel in de totale ammoniacconcentratie neemt toe als het water warmer wordt. Voor water warmer dan 26°C wordt de grenswaarde dus al bij een lagere totale ammoniacconcentratie bereikt. Voor geleidbaarheid geldt het omgekeerde: als de geleidbaarheid stijgt, neemt het ammoniak aandeel in de totale ammoniacconcentratie af.

Uit het bovenstaande blijkt dat bij lage pH de totaal ammoniacconcentratie extreem hoog kan worden voordat de ammoniakgrenswaarde wordt bereikt. De vraag is echter of we bij dergelijke hoge totaal ammoniacconcentraties er nog steeds vanuit mogen gaan dat ammonium geen kwaad kan. Toxicologen zeggen niet voor niets dat alles giftig is als de dosis maar hoog genoeg is. Dit is de reden waarom in figuur 3 de totaal ammoniacconcentratie op de X-as beperkt is tot 200 mg N/L. Bij zeevissen moeten we nog voorzichtiger zijn met ammonium. De kieuwen van zeevissen laten namelijk makkelijker ionen (NH_4^+ is een ion!) door.

Duidelijk en natuurlijk al jaren bekend is dat verlaging van de pH van het kweekwater ammoniakvergiftiging kan voorkomen. Voorzichtigheid met extreem lage pH waarden blijft echter geboden. Op basis van literatuurgegevens lijkt het er weliswaar op dat Afrikaanse meerval pH waarden toereert van 5 tot 9, op voorwaarde dat een pH verandering geleidelijk plaatsvindt,

maar er is voor zover ons bekend nog nooit heel gedetailleerd naar de effecten van lage pH op de fysiologie van Afrikaanse meerval gekeken. Daarnaast heeft pH nog allerlei andere effecten op de waterkwaliteit waar ook rekening meegehouden moet worden, zoals bijvoorbeeld de koolstofdioxide (CO_2) concentratie en de oplosbaarheid van metalen. De hoogste concentraties van totaal ammonia ($\text{NH}_4^+\text{-N} + \text{NH}_3\text{-N}$) die wij in 2008 gemeten hebben op commerciële Afrikaanse meervalkwekerijen liggen rond de 60 tot 70 mg N/L bij een pH van 6,5. Dit komt overeen met een ammoniakconcentratie van 0,11 tot 0,13 $\text{NH}_3\text{-N/L}$. Deze ammoniakconcentraties liggen onder de in deze studie vastgestelde grenswaarde voor de ammoniakconcentratie en daarom is het onwaarschijnlijk dat de meerval op deze kwekerijen last hadden van het ammoniak in het kweekwater.

Samenvattend

Wij adviseren de ammoniakconcentratie in het kweekwater van Afrikaanse meerval niet hoger te laten worden dan 0,34 mg $\text{NH}_3\text{-N/L}$. Bij deze ammoniakconcentratie is de kans op een 10% reductie van de voeropname ten hoogste 5%. Ook worden de kieuwen niet aangetast bij deze concentratie. Een te lage voeropname is voor Afrikaanse meerval een goede indicator voor een te hoge ammoniakconcentratie.

Dit Beleidsondersteunend onderzoek is uitgevoerd in samenwerking met de Radboud universiteit Nijmegen in het kader van LNV-programma BO-07-011 Dierenwelzijn, projectnummer BO-07-011-028

Ten behoeve van de leesbaarheid zijn in dit artikel literatuurreferenties weggelaten.

*Dit artikel is een samenvatting van het rapport "Het effect van verhoogde ammoniaconcentratie in het water op fysiologie, groei en voeropname van Afrikaanse meerval (*Clarias gariepinus*). Dit rapport komt beschikbaar op www.aquacultuur.wur.nl.*