

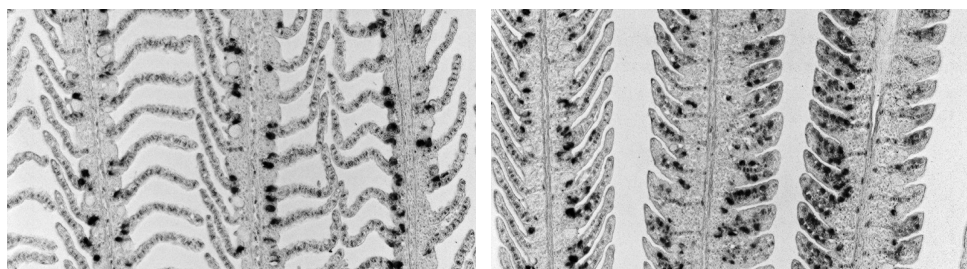
Het effect van een verhoogde ammoniak concentratie in het water op fysiologie, groei en voeropname van Europese paling (*Anguilla anguilla*)

Wout Abbink¹, Ewout Blom¹, Thamar Pelgrim², Pepijn de Vries¹, Hans van de Vis¹, Edward Schram¹

¹) IMARES Wageningen UR

²) Department of Animal Physiology, Institute for Water and Wetland Research, Faculty of Science, Radboud University Nijmegen

Rapport C187/15



IMARES Wageningen UR

(IMARES - Institute for Marine Resources & Ecosystem Studies)

Opdrachtgever:

Mw. drs. G. Mahabir
Ministerie van Economische Zaken
Bezuidenhoutseweg 30
2594 AV Den Haag

BO-20-010-077

Publicatiedatum:

21 december 2015

P.O. Box 68	P.O. Box 77	P.O. Box 57
1970 AB IJmuiden	4400 AB Yerseke	1780 AB Den Helder
Phone: +31 (0)317 48 09 00	Phone: +31 (0)317 48 09 00	Phone: +31 (0)317 48 09 00
Fax: +31 (0)317 48 73 26	Fax: +31 (0)317 48 73 59	Fax: +31 (0)223 63 06 87
E-Mail: imares@wur.nl	E-Mail: imares@wur.nl	E-Mail: imares@wur.nl
www.imares.wur.nl	www.imares.wur.nl	www.imares.wur.nl

© 2015 IMARES Wageningen UR

IMARES, onderdeel van Stichting DLO.
KvK nr. 09098104,
IMARES BTW nr. NL 8113.83.696.B16.
Code BIC/SWIFT address: RABONL2U
IBAN code: NL 73 RABO 0373599285

De Directie van IMARES is niet aansprakelijk voor gevolgschade, noch voor schade welke voortvloeit uit toepassingen van de resultaten van werkzaamheden of andere gegevens verkregen van IMARES; opdrachtgever vrijwaart IMARES van aanspraken van derden in verband met deze toepassing.

Dit rapport is vervaardigd op verzoek van de opdrachtgever hierboven aangegeven en is zijn eigendom. Niets uit dit rapport mag weergegeven en/of gepubliceerd worden, gefotokopieerd of op enige andere manier gebruikt worden zonder schriftelijke toestemming van de opdrachtgever.

A_4_3_1-V14.2

Inhoudsopgave

Samenvatting	4
1. Inleiding	5
2. Materiaal en Methoden	6
2.1 Experimentele omstandigheden	6
2.2 Plasma bemonstering	7
2.3 Kieuwmorfologie.....	7
2.4 Specifieke groeisnelheid en voeropname	7
2.5 Statistiek	8
3. Resultaten	8
3.1 Plasma ammonium	8
3.2 Plasma cortisol.....	8
3.3 Plasma glucose en lactaat.....	8
3.4 Plasma osmolaliteit.....	8
3.5 Kieuwmorfologie.....	9
3.6 Mortaliteit, voeropname en specifieke groeisnelheid.....	10
4. Discussie	11
4.1 Plasma ammonium	11
4.2 Plasma cortisol, glucose en lactaat	12
4.3 Kieuwmorfologie en plasma osmolaliteit.....	13
4.4 Mortaliteit, voeropname en specifieke groeisnelheid.....	13
5. Conclusie.....	14
6. Kwaliteitsborging	15
Referenties	16
Verantwoording	17
Bijlage; Kieuwen.....	18

Samenvatting

IMARES onderzocht het effect van de ammoniakconcentratie (NH_3) in het kweekwater op groei, voeropname en fysiologie van Europese paling (*Anguilla anguilla*). Het doel van dit onderzoek was het vaststellen van de maximale ammoniakconcentratie (grenswaarde) waarbij geen negatieve effecten op het welzijn, de voeropname en de groei van de vis waar te nemen zijn. Palingen met een gemiddeld startgewicht van 66 g werden blootgesteld aan vijf verschillende ammoniak (NH_3) concentraties (0,0011 - 0,0098 - 0,0391 - 0,0713 - 0,1679 mg $\text{NH}_3\text{-N/L}$), gedurende 34 dagen. De plasmaconcentraties van ammonium, cortisol, glucose en lactaat, de osmolaliteit van het plasma, de morfologie van de kieuwen, de voeropname en de specifieke groeisnelheid werden bepaald.

De voeropname en specifieke groeisnelheid werden bij de hoogste concentratie ammoniak in het water (0,168 mg $\text{NH}_3\text{-N/L}$) negatief beïnvloed. Er werd geen effect van de verhoogde ammoniakconcentratie in het water op gemeten parameters in het plasma waargenomen. De morfologie van de kieuwen (een erg gevoelige stress indicator bij veranderingen in het water) werd duidelijk aangetast bij de hoogst geteste concentratie ammoniak in het water. Dit was zichtbaar in de vorm van een verdikt epitheel bij de lamellen, en verplaatste chloridecellen van de filamenten naar de lamellen.

Aangezien bij de hoogste concentratie ammoniak in de proef duidelijk effecten op de groei, voeropname en kieuwfysiologie zijn waar te nemen, en bij de op een na hoogste concentratie alleen lichte aanpassingen in enkele kieuwpreparaten gevonden zijn, adviseren wij voor paling een ammoniakconcentratie in het water van maximaal 0,07 mg $\text{NH}_3\text{-N/L}$. Op het bedrijf vanwaar de palingen afkomstig zijn, is de ammoniakconcentratie in het water 0,004 mg $\text{NH}_3\text{-N/L}$, waardoor deze praktijkwaarde ruim onder de hier aangegeven kritische grenswaarde voor dierenwelzijn en groei (productie) ligt.

1. Inleiding

Vissen produceren stikstofhoudende afvalstoffen door de afbraak van aminozuren (Wood, 1993). De meeste zoet- en zoutwatervissen scheiden het grootste deel van deze stikstofverbindingen uit via actieve uitscheiding van NH_3 via transporters in de kieuwen (Wilkie, 2002). Bij een lage ammoniakconcentratie in het water zorgt diffusie van ammoniak van het bloed naar het water voor het grootste deel van de uitscheiding. De drijvende kracht hierachter is het verschil in concentratie tussen ammoniak in het bloed en ammoniak in het water (Wilkie, 2002). Als de ammoniakconcentratie in het water stijgt, wordt dit verschil kleiner en neemt de diffusie af, het kan zelfs voorkomen dat de diffusie gradiënt omdraait en ammoniak vanuit het water de vis in diffundeert. Een stijging van de ammoniakconcentratie in het water leidt tot een ophoping van ammonium in het bloed en weefsels van de vis (Wright et al., 2007), wat allerlei schadelijke (neurotoxicologische) effecten heeft (Cooper en Plum, 1987 in Wilkie, 2002). Om dit te voorkomen moet de vis de ammoniumconcentratie in het lichaam weer omlaag zien te krijgen via actieve uitscheiding via 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.

Hoge ammoniakconcentraties kunnen een belangrijke beperkende factor voor intensieve viskweek zijn. De grenswaarde voor de ammoniakconcentratie in het water is vissoort-specifiek. In een eerdere vergelijkbare studie in het kader van het BO programma voor waterkwaliteit en welzijn van kweekvis zijn voor Afrikaanse meerval (*Clarias gariepinus*) (Imares rapport C026-10 en Schram et al., 2010) en voor snoekbaars (*Sander lucioperca*) (Schram et al., 2014) de grenswaarde voor ammoniakblootstelling bepaald. Voor meerval werden de voeropname en specifieke groeisnelheid sterk beïnvloed door ammoniak in het water bij concentraties boven de 1,24 en 1,70 mg $\text{NH}_3\text{-N/L}$. Bij deze concentraties werden geen verstoringen van fysiologische bloedparameters waargenomen, maar de morfologie van de kieuwen (een erg gevoelige stress indicator bij veranderingen in het water) werd wel sterk aangetast. De grenswaarde voor ammoniak in het kweekwater voor Afrikaanse meerval is vastgesteld op 0,34 mg $\text{NH}_3\text{-N/L}$. Voor snoekbaars geldt dat grenswaarde is vastgesteld op 0,05 mg $\text{NH}_3\text{-N/L}$ om geen negatieve effecten op de productie en welzijn van de dieren te krijgen. Voor juveniele tarbot (*Psetta maxima*) ligt de ammoniakconcentratie waarboven een effect op groei waargenomen is tussen de 0,10-0,17 mg $\text{NH}_3\text{-N/L}$ (Person-Le Ruyet et al., 1997; Foss et al., 2007) en voor juveniele zeebaars (*Dicentrarchus labrax*) is deze grenswaarde 0,26 mg $\text{NH}_3\text{-N/L}$ (Lemarié et al., 2004).

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} of TAN) is het totaal van NH_3 en NH_4^+

De concentraties worden uitgedrukt op stikstof (N) basis in mg N/L of (bijvoorbeeld) mg $\text{NH}_3\text{-N/L}$. Dit laatste is soms eigenlijk dubbelop maar wordt dan gebruikt om nog duidelijker te maken welke chemische vorm bedoeld wordt.

TAN staat voor *total ammonia nitrogen* en is hetzelfde als T_{amm} .

De verhouding tussen NH_3 en NH_4^+ is afhankelijk van de pH; bij een pH van 9.25 is er een evenwicht, bij een lagere pH is de concentratie van het giftige NH_3 lager en de concentratie NH_4^+ hoger.

Specifiek voor paling is heel weinig literatuur over de effecten van ammoniakblootstelling. Het is niet bekend vanaf welke ammoniakconcentratie in het water leidt tot een aantasting van het welzijn van het dier, en bij welke ammoniakconcentratie een fysiologische respons en gedragsmatige veranderingen optreden, mogelijk in combinatie met een afname van de voeropname en groei. Daardoor is niet bekend of de ammoniakconcentraties zoals deze voor kunnen komen op kwekerijen leiden tot ongerief, mogelijk

in combinatie met een vermindering van de productie. De weinige studies die gedaan zijn naar dit onderwerp, kunnen niet voldoende als vergelijking dienen; een studie van Sadler uit 1982, waarbij hele kleine palingen zijn gebruikt, geeft aanwijzingen over de tolerantie voor ammonium (NH_4^+), maar is vanwege de duur (10 dagen), gewichtsklasse (0,2 gr en 2,8 gr) en doel (overleving-sterfte) niet te vergelijken met de huidige opzet. Bij een concentratie van meer dan 1 mg $\text{NH}_3\text{-N/L}$ trad experimenteel gerelateerde sterfte op. Een studie van Ip et al. (2004a) naar verdedigingsstrategieën voor TAN-blootstelling bij moeraspaling (*Monopterus albus*) toonde aan dat deze vissen geen actieve uitscheiding van ammonium hebben. In plaats daarvan wordt de hoge tolerantie van de moeraspaling voor ammonium behaald door uitzonderlijke tolerantie op cellulair en sub-cellulair niveau.

In deze huidige studie werd Europese paling blootgesteld aan vijf verschillende ammoniakconcentraties in het water gedurende 34 dagen om de grenswaarde voor de ammoniakconcentratie vast te stellen. De grenswaarde werd ingekaderd door een afgenomen groei, voeropname en fysiologische veranderingen in het bloed en de kieuwen.

Dit onderzoek is uitgevoerd binnen het beleidsondersteunend onderzoek van het Ministerie van Economische Zaken (BO-20-010-077).

De dierproef was in overeenstemming met de Nederlandse wet op de dierproeven. Dit is getoetst en akkoord bevonden door de Dier Ethische Commissie (DEC) van Wageningen UR.

2. Materiaal en Methoden

2.1 Experimentele omstandigheden

De paling (203 stuks) was afkomstig van Nijvis BV en werd bij aankomst in de faciliteiten van IMARES in IJmuiden verdeeld over 12 rechthoekige glazen aquaria van 30 L. Na twee weken acclimatiseren werd de nulmeting uitgevoerd met in totaal 43 vissen afkomstig uit twee aquaria ($66,2 \pm 18,9$ g). De vissen in de overige 10 tanks (16 vissen per tank) gingen het eigenlijke experiment in.

De behandelingen werden in tweevoud uitgevoerd en willekeurig aan de aquaria toegewezen. De vijf ammoniakconcentraties ($\text{NH}_3\text{-N}$) in het kweekwater waren: 0,0011 - 0,0098 - 0,0391 - 0,0713 - 0,1679 mg $\text{NH}_3\text{-N/L}$. In de praktijk liggen de waarden voor ammoniak op kwekerijen rond de 0,004 mg $\text{NH}_3\text{-N/L}$ (Nijvis B.V.). De ammoniakconcentraties werden tijdens het experiment gerealiseerd door toevoeging van ammoniumchloride (NH_4Cl) stockoplossingen (Tabel 1). Deze stockoplossingen werden met een peristaltische pomp (Watson Marlow 505 S; Rotterdam) in de aquaria gepompt (15 L/dag per tank). De ammoniakconcentraties werden geleidelijk opgevoerd tot de gewenste concentraties tijdens de eerste vier dagen van de experimentele periode. In elk aquarium zat een luchtsteen om de ammoniumchloride oplossingen goed te mengen met het aquariumwater. De pH lag tussen 5,35 en 6,75 (Tabel 1). De toevoeging van NH_4Cl leidde maximaal tot 1,03 gr/L Cl in de tank bij de hoogste concentratie ammoniakblootstelling, waardoor toevoeging van NaCl bij de overige tanks om de concentratie Cl gelijk te houden tussen de behandelingen niet nodig was (1 gr/L Cl extra geldt nog steeds als zoet water). Stockoplossingen werden dagelijks vers aangemaakt.

De waterkwaliteit (Tabel 1) werd in elk aquarium gecontroleerd door dagelijkse meting van totaal ammonia stikstof (TAN) concentraties (fotometrisch, Hach Lange DR2800), en de temperatuur, pH en zuurstofconcentratie, met een Hach Lange HQ 40 multimeter. De ammoniak ($\text{NH}_3\text{-N}$) concentraties werden berekend uit de temperatuur, pH en saliniteit afhankelijke molfractie en de totaal ammonia concentraties.

Tabel 1. De gemiddelde waarden per behandeling voor de ammoniak (NH₃-N), totaal ammonia stikstof (TAN) en zuurstof (O₂) concentraties, temperatuur en de pH-range in de aquaria tijdens het experiment. De waarden voor ammoniak en TAN zijn gebaseerd op 16 metingen, die van zuurstof, temperatuur en pH op 34 metingen.

Ammoniak (mg NH ₃ -N/L)	TAN (mg/L)	O ₂ (%)	Tempera- tuur (°C)	pH-range	Voorspelde tank [Cl ⁻] (g/L)
0,001 ± 0,001	1	85,8 ± 5,3	22,6 ± 0,1	5,64 – 6,70	0
0,010 ± 0,007	15	87,4 ± 3,1	22,6 ± 0,1	5,58 – 6,70	0,04
0,039 ± 0,059	45	89,4 ± 3,6	22,5 ± 0,1	5,54 – 6,70	0,11
0,071 ± 0,040	135	89,9 ± 1,9	22,6 ± 0,1	5,63 – 6,75	0,34
0,168 ± 0,058	405	85,9 ± 3,8	22,5 ± 0,2	5,35 – 6,64	1,03

2.2 Plasma bemonstering

Een dag voordat de blootstelling aan ammoniak startte (dag 0), werden de vissen uit twee aquaria bemonsterd voor de nulmeting. Na de blootstelling van 34 dagen werden de vissen uit de 10 overgebleven aquaria bemonsterd (twee aquaria voor elk van de vijf behandelingen, 16 vissen per aquarium). De vissen werden gevangen met een net en verdoofd in 0.1% (v/v) 2-phenoxyethanol (Sigma, St. Louis, USA), waarna bloed werd afgenomen uit de caudale ader. Het bloed werd tien minuten gecentrifugeerd (14,000 x g, 4°C) en het verkregen plasma werd opgeslagen bij -20°C. In het plasma werden de concentraties van ammonium (NH₄⁺), glucose en lactaat gemeten met commercieel beschikbare enzymatische test kits (Instruchemie, Delfzijl, Nederland), en werd cortisol gemeten met de methode beschreven in Metz et al. (2005). De osmolaliteit werd bepaald met een Osmometer (Osmomat 030, Gonotec, Duitsland).

2.3 Kieuwmorfologie

Uit iedere tank werden van twee vissen bij het samplen twee kieuwbogen uitgesneden. De kieuwen werden zes uur gefixeerd in Bouin's fixatief en daarna gespoeld en opgeslagen in 70% alcohol. De kieuwpreparaten werden vervolgens gemaakt zoals beschreven in Dang et al. (2000).

2.4 Specifieke groeisnelheid en voeropname

Aan het einde van het experiment werden alle vissen op 1 gram nauwkeurig gewogen (Mettler PM 34 Delta range). De resultaten zijn gebruikt om de specifieke groeisnelheid (SGR) per aquarium te berekenen:

$$SGR = (\ln(W_t) - \ln(W_1)) \times \frac{100}{t}$$

Waarin SGR = specifieke groeisnelheid (%/d), W_t = gemiddelde gewicht op dag 34 (g), W₁ = gemiddelde gewicht op dag 1 (g) en t = aantal dagen.

De vissen werden in de ochtend (9:00) en middag (17:00) tot visueel waargenomen verzadiging gevoerd met een commercieel palingvoer (DANEX 2848, BIOMAR). De hoeveelheid voer per tank werd dagelijks genoteerd. De totale voergift per aquarium resulteerde uit de som van de dagelijkse voeropnames.

2.5 Statistiek

Een one-way ANOVA is uitgevoerd om vast te stellen of er een significant verschil is ontstaan in de SGR en TFI als gevolg van de behandeling. De NOEC wordt gedefinieerd als de hoogste test concentratie die nog geen observeerbare effecten heeft.

Voor de fysiologische parameters zijn voor iedere behandeling 16 vissen gesampled. De plasma waarden zijn weergegeven als gemiddelde $\pm$ standaarddeviatie van de individuele metingen per behandeling. De fysiologische parameters zijn getest op significante verschillen tussen de behandelingen met REML. De statistiek is uitgevoerd in SAS 9.2 (SAS Institute Inc., Cary, North Carolina, USA), met een 95% grens voor significantie voor verschillen tussen de behandelingen.

3. Resultaten

3.1 Plasma ammonium

Er werden geen verschillen in de plasma ammoniumconcentratie gevonden tussen de verschillende experimentele behandelingen ($P = 0,24$; Tabel 2). De plasma ammoniumconcentraties in de experimentele groepen lagen tussen de $0,57 \pm 0,12$ mM bij een ammoniakconcentratie in het water van $0,168$ mg $\text{NH}_3\text{-N/L}$ en $0,42 \pm 0,13$ mM bij een ammoniakconcentratie in het water van $0,071$ mg $\text{NH}_3\text{-N/L}$. De gemiddelde plasma ammonium waarden lagen allemaal in dezelfde range, ondanks dat de ammoniakconcentraties in het water een factor 42 verschilden tussen de hoogste en laagste blootstellingsgroep.

3.2 Plasma cortisol

Er werden geen significante verschillen in de cortisolconcentraties gevonden tussen de verschillende experimentele behandelingen ($P = 0,72$; Tabel 2). De gemiddelde plasma cortisolconcentratie in de controle groep ($0,001$ mg $\text{NH}_3\text{-N/L}$) was $37,2 \pm 17,4$ ng/ml. Het hoogst gemeten gemiddelde was $45,8 \pm 30,5$ ng/ml bij de hoogste ammoniakblootstelling.

3.3 Plasma glucose en lactaat

De gemiddelde plasma glucoseconcentraties lieten geen verschil zien tussen de verschillende behandelingen ($P = 0,92$; Tabel 2), met $6,68 \pm 1,41$ mM bij de controle groep, en $7,94 \pm 1,91$ mM bij de hoogste blootstelling.

Er werden geen verschillen in de lactaatconcentratie gevonden tussen de verschillende experimentele behandelingen ($P = 0,86$; Tabel 2), met concentraties tussen de $5,13 \pm 2,08$ in het plasma bij $0,168$ mg $\text{NH}_3\text{-N/L}$ in het water en $6,17 \pm 2,30$ in het plasma bij $0,071$ mg $\text{NH}_3\text{-N/L}$ in het water.

3.4 Plasma osmolaliteit

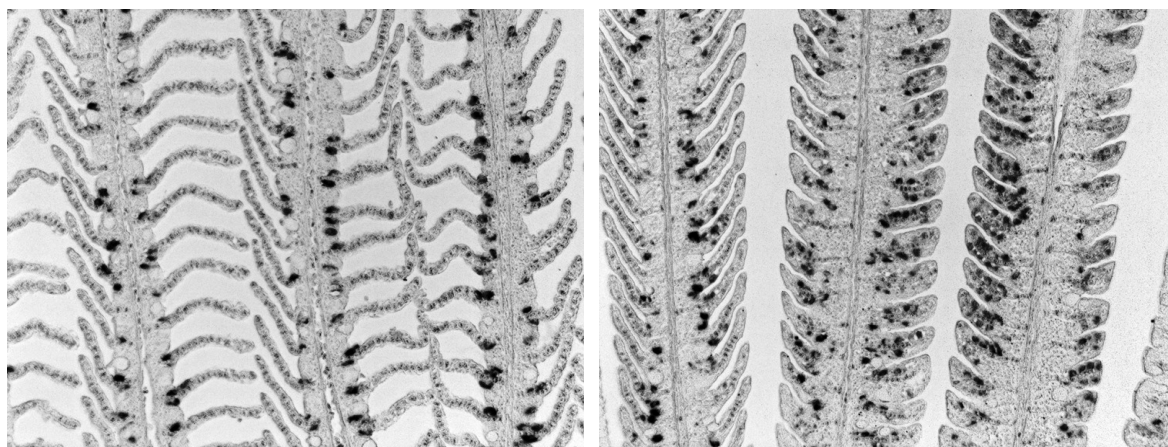
De gemiddelde plasma osmolaliteit nam licht, maar significant af bij een toenemende ammoniakconcentratie in het water. De waarden (tabel 2) varieerden tussen de 292 ± 9 en de 278 ± 15 mOsmol/kg.

3.5 Kieuwmorfologie

De resultaten van de kieuwmorfologie zijn beschrijvend weergegeven, en niet gekwantificeerd. De kieuwen verslechterde met de toenemende ammoniakconcentraties in het water. Figuur 1a en 1b laten kieuwfilamenten en lamellen zien van een vis uit de controlegroep en een vis uit de hoogste blootstellingsgroep. De blootstelling aan ammoniak in het water leidde tot een verdikking van het epitheel van de kieuwlamellen en het epitheel tussen de kieuwlamellen. De ruimte tussen de kieuwlamellen werd daarmee steeds kleiner.

Daarnaast is er een gedeeltelijke verschuiving van de chloridecellen. In de controlegroepen en bij de lagere concentraties ammoniak in het water werden deze cellen voornamelijk op de filamenten (in het gebied tussen de kieuwlamellen) gevonden, en in mindere mate op de lamellen zelf. Met de toenemende ammoniakconcentratie in het water werden meer chloridecellen op de lamellen gevonden, en minder op de filamenten (zie ook bijlage 1).

Deze effecten zijn duidelijk zichtbaar bij de hoogste concentratie ammoniak (0,168 mg NH₃-N/L), bij de op een na hoogste concentratie zijn bij enkele kieuwpreparaten de aanpassingen in lichte vorm waarneembaar (zie ook de bijlage voor representatieve afbeeldingen van alle groepen).



Figuur 1a (links, controle) en 1b (rechts, 0,168 mg NH₃-N/L). Representatieve afbeeldingen van kieuwfilamenten met overdwarse kieuwlamellen (immunohistochemie, 200x). De lamellen zijn bij blootstelling aan ammoniak opgezet, wat de functionaliteit van de kieuw bemoeilijkt. De chloridecellen (in het zwart) zijn door de blootstelling aan ammoniak verplaatst van de filamenten naar de lamellen. In de bijlage staan representatieve afbeeldingen van alle groepen.

Tabel 2. Gemiddelde ($\pm$ standaarddeviaties) waarden aan het begin ($t = 0$) en per behandeling voor het einde ($t = 34$) van het experiment voor plasma cortisol, glucose, lactaat, ammonium en de osmolaliteit. Er is alleen een significante verschil gevonden voor de plasma osmolaliteit ($P = 0,02$). De water ammoniak concentraties staan in de tabel als vergelijking met de gemeten plasma ammonium data. Gemiddelde waarden met een verschillende letter in superscript zijn significant verschillend van elkaar.

Water ammoniak (mg NH ₃ -N/L)	Water ammoniak (mM)	Plasma ammonium (mM)	Plasma glucose (mM)	Plasma lactaat (mM)	Plasma Cortisol (ng/ml)	Plasma Osmolaliteit (mOsmol/kg)
T = 0: 0.0014 $\pm$ 0.001		0,66 $\pm$ 0,21	9,15 $\pm$ 3,16	6,53 $\pm$ 1,87	16,7 $\pm$ 37,2	296 $\pm$ 14,9
0,0011 $\pm$ 0,001	0,0000756	0,53 $\pm$ 0,20	6,68 $\pm$ 1,41	5,33 $\pm$ 2,12	37,2 $\pm$ 17,4	283 $\pm$ 10,6 ^{ac}
0,0098 $\pm$ 0,006	0,0007006	0,47 $\pm$ 0,13	7,29 $\pm$ 2,67	5,60 $\pm$ 1,90	26,6 $\pm$ 10,8	292 $\pm$ 8,8 ^a
0,0391 $\pm$ 0,058	0,0027897	0,48 $\pm$ 0,15	6,79 $\pm$ 2,19	5,94 $\pm$ 2,55	33,8 $\pm$ 19,5	289 $\pm$ 9,3 ^{ab}
0,0713 $\pm$ 0,056	0,0050928	0,42 $\pm$ 0,13	6,89 $\pm$ 3,24	6,17 $\pm$ 2,30	39,2 $\pm$ 21,0	283 $\pm$ 15,4 ^{bc}
0,1679 $\pm$ 0,082	0,0119896	0,57 $\pm$ 0,12	7,94 $\pm$ 1,91	5,13 $\pm$ 2,08	45,8 $\pm$ 30,5	278 $\pm$ 14,7 ^c
P-waarde		P = 0,24	P = 0,92	P = 0,86	P = 0,72	P = 0,02

Tabel 3. Gemiddelde (SD) waardes per behandeling (N = 2) voor het eindgewicht, specifieke groeisnelheid (SGR) en totale voeropname (TFI). De TFI en SGR zijn bij de hoogste blootstellingsgroep significant verlaagd. Gemiddelde waardes met een verschillende letter in superscript zijn significant verschillend van elkaar.

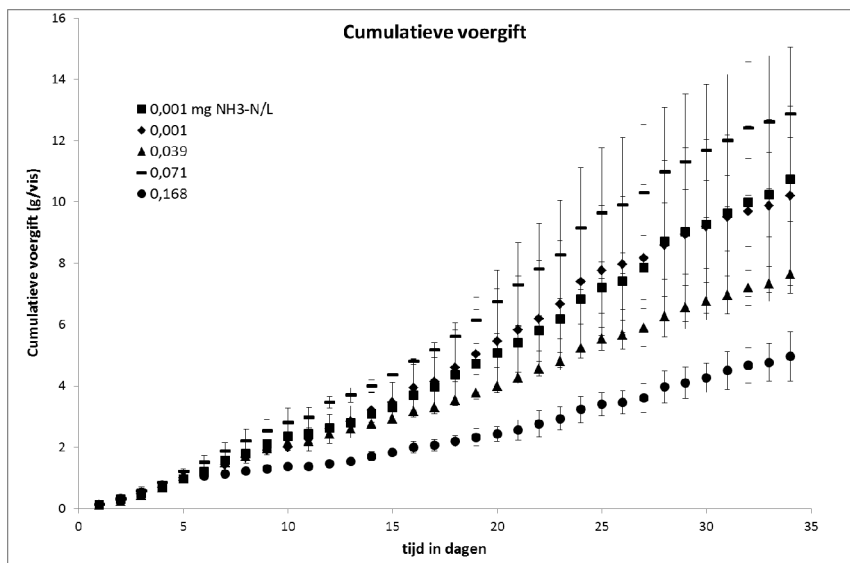
Gewenste TAN concentratie mg/L	Ammoniak concentratie (mg NH ₃ -N/L)	Eindgewicht (g)	TFI (g/vis/d)	SGR (%/BW/d)	Mortaliteit (n)
1	T = 0	73,9 ± 21,6			
1	0,001 ± 0,001	74,6 ± 17,5	10,7 ^{ab}	0,28% ^a	2
15	0,010 ± 0,007	66,8 ± 24,6	10,2 ^{ab}	0,23% ^a	0
45	0,039 ± 0,059	77,4 ± 21,5	7,6 ^{ab}	0,09% ^a	0
135	0,071 ± 0,040	68,7 ± 23,8	12,9 ^a	0,29% ^a	0
405	0,168 ± 0,058	73,9 ± 21,6	4,9 ^b	-0,05% ^b	0
P-waarde	-	-	0,04	0,04	-

3.6 Mortaliteit, voeropname en specifieke groeisnelheid

In beide tanks van de laagste blootstellingsgroep is tijdens het experiment één vis doodgegaan (van de 16), in alle overige tanks overleefde alle vissen de blootstelling.

Voor zowel de specifieke groeisnelheid (SGR) als de totale voeropname (TFI) is een verschil gevonden tussen de behandelingen (P = 0,04). De groep die is blootgesteld aan de hoogste concentratie ammoniak (Tabel 3; 0,168 mg NH₃-N/L) heeft een significant lagere SGR en TFI dan de groep die is blootgesteld aan de op een aan hoogste concentratie (0,071 mg NH₃-N/L). Doordat er alleen bij de hoogste ammoniak blootstelling een effect op SGR en TFI gevonden is, wordt de NOEC voor groei en voeropname vastgesteld op de op één na hoogste concentratie ammoniak; 0,07 mg NH₃-N.

In Figuur 2 is de TFI voor de verschillende behandelingen uitgezet in een grafiek. Hierin is goed zichtbaar dat de vissen van hoogste blootstellingsgroep al vroeg in de proef minder voer opnemen van de vissen van de overige groepen; het verschil in voeropname ontwikkelt zich vanaf de tweede week ten opzichte van de controle groep en wordt gedurende de proef groter. De vissen van de hoogste blootstellingsgroep blijven eten (en groeien).



Figuur 2. Het effect van ammoniak in het water op de cumulatieve voeropname. Dat blootstelling aan de hoogste concentratie leidt al na een week tot een lagere voeropname in vergelijking met de andere groepen. Dit verschil blijft gedurende de experimentele periode toenemen.

4. Discussie

De palingen in dit experiment waren in staat om ook bij de hoogste concentratie ammoniak in het water te blijven eten. De vissen groeiden bij deze concentratie ammoniak in het water echter niet, terwijl bij de overige concentraties ammoniak in het water de groei constant bleef ten opzichte van de controlegroep. De experimentele condities zijn zo geselecteerd dat de grenswaarde voor blootstelling kon worden bepaald voor groei en welzijn, en niet om de uiterste waarde waarbij de vissen zouden overleven te bestuderen.

De praktijkwaarden voor ammoniak liggen met ongeveer 0,004 mg $\text{NH}_3\text{-N/L}$ (zoals gemeten bij Nijvis B.V.) tussen de controles en de laagste experimentele behandelconcentratie in. De sterkte van de blootstelling bij de hoogste blootstellingsgroep is bij deze proef dus 42 maal overschreden ten opzichte van de praktijk (0,168 mg $\text{NH}_3\text{-N/L}$).

Onder alle experimentele condities slaagden de palingen erin om de ammoniumconcentratie in het plasma constant te houden, ondanks de sterk verhoogde ammoniakconcentraties in het water. Desondanks had de hoogst gebruikte concentratie ammoniak in het water negatieve effecten op de vissen; de morfologie van de kieuwen, specifieke groeisnelheid (SGR) en de totale voeropname (TFI) lieten een (negatief) effect van de experimentele behandeling zien. Dit zijn sterke aanwijzingen dat de hoogste ammoniakconcentratie in water leidde tot overbelasting van de vissen.

De eerder aangehaalde studie door Sadler, 1982 naar de lethale dosis voor paling, noemt een waarde van 0,12 mg $\text{NH}_3\text{-N/L}$ vanaf waar de groei wordt aangetast. Deze waarde valt in dezelfde range als de waarde die in de huidige studie naar voren komt (duidelijk waarneembare aantasting bij 0,168 mg $\text{NH}_3\text{-N/L}$, en beginnende kieuwveranderingen bij 0,071 mg $\text{NH}_3\text{-N/L}$).

4.1 Plasma ammonium

De ammonium waarden in het bloedplasma van de palingen uit de proef bleef constant onder verhoogde ammoniakconcentraties in het water. De vissen slaagden er dus in om de interne ammoniumconcentratie constant te houden, ondanks sterk verhoogde ammoniak waarden in het externe milieu.

De (actieve) uitscheiding van ammonia van het plasma naar het water verloopt niet tegen de concentratiegradiënt gaat. De capaciteit om de plasma ammonium concentratie laag te houden tijdens blootstelling aan hoge ammoniak concentraties in het water werd al eerder aangetoond voor Afrikaanse meerval (Ip et al., 2004b) en bij de eerder uitgevoerde studie naar Afrikaanse meerval (Schram et al., 2010). Bij deze laatste studie was de hoogst geselecteerde blootstellingswaarde bijna 100x hoger vergeleken met de huidige studie bij paling, waardoor de concentratiegradiënt bij de meervalstudie omdraaide en het hele uitscheidingsmechanisme voor ammonia sterk aangepast moest worden. De vissen zijn daar niet voldoende toe in staat, met als gevolg dat de negatieve gevolgen voor de meervallen veel duidelijker zichtbaar waren. Dit in tegenstelling tot de huidige studie bij paling, waarbij de concentratie ammoniak in het water niet zo hoog opliep dat de gradiënt omdraaide. De vissen konden hierdoor zonder sterke negatieve gevolgen met de verhoogde ammoniakconcentratie omgaan. De lichte veranderingen in de kieuwen die bij de op één na hoogste ammoniakconcentratie gevonden zijn, leidde niet tot verdere negatieve gevolgen voor de vissen.

In de huidige studie liggen de gemeten waarden voor plasma ammonium een factor 2-3 hoger dan bij de eerder uitgevoerde studie naar Afrikaanse meerval (bij de meerval lagen de waarden rond de 200 μM , in de huidige studie rond de 500 μM). De plasma waarden bij snoekbaars komen wel overeen met de plasma waarden die in het huidige experiment bij paling zijn gevonden. Bij snoekbaars bleef de plasma ammoniumconcentratie constant op ongeveer 650 μM , waarna bij de hoogste blootstellingsconcentratie de plasma ammoniumwaarde was verdubbeld tot 1400 μM . Mogelijk zou de plasma ammonium waarde bij paling ook hoger worden wanneer de ammoniakconcentratie in het water verder verhoogd zou worden.

Zoutwatervissen zijn, vanwege hun totaal andere leefmilieu, veel minder goed in staat tot het constant houden van plasma ammonium concentraties bij verhoogde externe ammoniakconcentraties. In Atlantische zalm (*Salmo salar*) en Europese zeebaars (*Dicentrarchus labrax*) namen de waarden lineair toe tot 1 mM bij chronische blootstelling aan hoge ammoniakconcentraties in het water (Knoph and Thorud, 1996; Lemarié et al, 2004).

4.2 Plasma cortisol, glucose en lactaat

De plasma cortisolconcentraties in deze studie vertoonden grote variatie tussen individuele vissen binnen dezelfde groep. Significante verschillen tussen de behandelingen werden niet gevonden (Tabel 3). In vissen leidt acute stress tot een snelle en sterke verhoging van de plasma cortisolconcentratie, binnen enkele uren gevolgd door een daling naar de oorspronkelijke basale concentratie, wanneer de prikkel verdwenen is. Basale concentraties zijn over het algemeen laag maar variatie bestaat tussen geslachten, vissoorten, levensstadia en zelfs de tijd van de dag. In geval van chronische stress, zoals hoge ammoniakconcentraties in het water, kan de plasma cortisolconcentratie langdurig verhoogd blijven boven het basale niveau, al zal dit wel lager zijn dan de acute stress waarde (Wendelaar Bonga, 1997).

In het huidige experiment varieerde de plasma cortisolconcentratie van 26 tot 45 ng/L, wat niet tot een chronische stresswaarde wordt gerekend (Wendelaar Bonga, 1997). De huidige studie heeft dus niet tot chronische stress bij de palingen geleid, en dit wordt ondersteund door de constant blijvende waarden voor glucose en lactaat.

De in deze studie gevonden plasmawaarden zijn vergelijkbaar met de resultaten die in de studies naar meerval en snoekbaars zijn gevonden. Bij meerval waren de plasma parameters alleen significant verhoogd bij de hoogste blootstellingsgroep, waarbij de concentratiegradiënt voor ionenflux tussen het milieu en het bloed was omgedraaid. Bij de overige blootstellingsgroepen werd geen verschil gevonden. Voor snoekbaars werden, net als bij de paling, geen effecten gevonden. Deze resultaten tezamen suggereren dat alleen wanneer de ammoniakconcentratie dusdanig hoog wordt dat de

concentratiegradiënt tussen de het interne (de vis) en externe milieu (het water) omdraait, de vissen sterk chronisch gestrest raken.

4.3 Kieuwmorfologie en plasma osmolaliteit

Via het kieuwepitheel vindt gasuitwisseling, ionenregulatie, zuur-base regulatie en de uitscheiding van stikstofverbindingen plaats (Evans, 2005). Het rechtstreekse contact met het water en de delicate structuur maken de kieuwen kwetsbaar voor vervuilingen in het water en dit kan leiden tot afwijkingen in de morfologie (Erkmen and Kolankaya, 2000); deze afwijkingen betreffen opzwellen van het epitheel, scheiding van het epitheel van de basale membraan, necrose, en toename van het aantal cellen, waardoor de lamellen samengroeien (Evans, 1987).

In de huidige studie werden duidelijke veranderingen in de kieuwmorfologie waargenomen bij de hoogste ammoniakconcentratie in het water (0,168 mg/L $\text{NH}_3\text{-N}$).

In de vergelijkbare studie met Afrikaanse meerval (Imares rapport C026-10 en Schram et al., 2010) waren deze effecten op kieuwen eveneens zichtbaar. Hiermee laten de twee belangrijkste vissoorten voor de Nederlandse aquacultuur eenzelfde respons zien in de kieuwen bij blootstelling aan verhoogde ammoniakblootstelling. Vergelijkbare morfologische veranderingen zijn tevens waargenomen in een *Capoeta tinca* populatie die leefde in een rivier met hoge vervuilingsgraad, inclusief hoge ammoniak concentraties (ca. 0,8 mg $\text{NH}_3\text{-N/L}$) (Erkmen and Kolankaya, 2000).

Opzwellen van het epitheel van de kieuwfilamenten en de migratie van de chloridecellen in de richting van de lamellen zijn aanpassingen gericht op het beperken van de instroom van ammoniak. Opzwellen van het epitheel (en evt. een sterke toename van slijmcellen) kan worden opgevat als aanpassing met als doel het vergroten van de afstand tussen het water en de bloedstroom, waardoor de doorlaatbaarheid van de kieuwen beperkt wordt. We nemen aan dat met de toename van de ammoniakconcentratie in het water de actieve uitscheiding van ammonium ook toeneemt, omdat de ammoniumconcentratie in het plasma constant blijft.

De plasma osmolaliteit wordt mede bepaald door de uitwisseling van ionen via de kieuwen, en wanneer deze zijn opgezet om de vis te beschermen tegen een verandering in het externe milieu, kan de osmolaliteit ook veranderingen laten zien. In het geval van deze studie nam de osmolaliteit af met een toenemende concentratie ammoniak in het water. Dit suggereert dat de kieuwfunctie beperkt wordt bij toenemende ammoniakconcentraties in het water.

Net als bij de plasma waarden, geldt ook hier dat echt sterke veranderingen pas optreden wanneer de concentratiegradiënt omdraait, en dit was in het huidige studie niet het geval.

4.4 Mortaliteit, voeropname en specifieke groeisnelheid.

Tijdens de proef zijn twee dieren doodgegaan, beide afkomstig uit de laagste blootstellingsgroep. Er is geen sterfte opgetreden die gerelateerd kan worden aan de experimentele omstandigheden. Dit geeft aan dat de lethale concentratie voor chronische blootstelling aan ammoniak hoger is dan 0,168 mg $\text{NH}_3\text{-N/L}$ voor de duur van het huidige experiment.

De voeropname en specifieke groeisnelheid werden beïnvloed bij blootstelling aan de hoogste concentratie ammoniak in het water. Deze verschillen zijn gedurende het experiment ontstaan. In figuur 2 is te zien dat vanaf de tweede week het verschil in TFI zichtbaar werd. Dit wordt veroorzaakt door de geleidelijke opbouw van de ammoniakconcentraties tijdens de eerste vier dagen van het experiment.

De totale voeropname en de SGR werden sterk negatief beïnvloed in de vissen die zijn blootgesteld aan de hoogste ammoniakconcentratie. Blootstelling aan 0,168 mg $\text{NH}_3\text{-N/L}$ resulteerde in een tweemaal lagere totale voeropname en een netto stilstand van de groei vergeleken met de controles en lagere

blootstellingsgroepen (een licht negatieve SGR), alle overige blootstellingsgroepen lieten een netto groei zien na 34 dagen blootstelling.

Deze resultaten komen overeen met de eerder gevonden resultaten voor meerval en snoekbaars.

Bij snoekbaars gingen de vissen die aan de hoogste concentratie werden blootgesteld, vrij snel na begin van de proef minder eten en minder snel groeien. Voor meerval geldt dat de blootstelling aan de hoogste concentratie zelfs leidde tot een stilstand in groei, en een sterk verlaagde voeropname (net als bij het huidige experiment met paling).

5. Conclusie

Uit dit onderzoek blijkt dat voor Europese paling voeropname, groeisnelheid en kieuwmorfologie goede indicatoren zijn om effecten van te hoge ammoniakconcentratie in het water aan te tonen.

Als aanvullende parameters zijn plasma waarden van ammonia, cortisol, glucose, lactaat en osmolaliteit gemeten, en hierbij zijn met uitzondering van osmolaliteit geen veranderingen waargenomen tussen de controles en de verschillende concentraties ammoniak in het water. Deze fysiologische parameters zijn hiermee niet onderscheidend voor ammoniakblootstelling in het water voor paling.

De gemeten fysiologische parameters betreffen zowel primaire (plasma cortisol) en secundaire (plasma glucose en plasma lactaat) stress reacties. Voeropname, groei, en morfologische veranderingen in de kieuwen, zijn tertiaire stress reacties en zijn hiermee goede indicatoren voor negatieve effecten van hoge ammoniakconcentraties in het water op paling, vooral als het gaat om het beoordelen van chronische, suboptimale omstandigheden.

In deze studie is bij de hoogste concentratie ammoniak in het water van 0,168 mg $\text{NH}_3\text{-N/L}$ een effect op groei en voeropname gemeten. Daarnaast is bij deze hoogste concentratie een duidelijk effect op de kieuwen vastgesteld. Bij de op één na hoogste concentratie van 0,071 mg $\text{NH}_3\text{-N/L}$ is geen effect op groei, voeropname en gemeten fysiologische waarden gemeten, en slechts lichte, onregelmatige aanpassingen in de kieuwen.

Wij adviseren derhalve dat voor Europese paling de ammoniakconcentratie in het water niet hoger mag worden dan 0,07 mg $\text{NH}_3\text{-N/L}$ om het risico op verminderde voeropname en groei te voorkomen. In de praktijk liggen de ammoniakconcentraties op ongeveer 0,004 mg $\text{NH}_3\text{-N/L}$, hiermee blijft de praktijkwaarde ruim onder de in dit onderzoek aangegeven kritische grenswaarde voor dierenwelzijn en groei voor paling.

6. Kwaliteitsborging

IMARES beschikt over een ISO 9001:2008 gecertificeerd kwaliteitsmanagementsysteem (certificaatnummer: 187378-2015-AQ-NLD-RvA). Dit certificaat is geldig tot 15 september 2018. De organisatie is gecertificeerd sinds 27 februari 2001. De certificering is uitgevoerd door DNV Certification B.V.

Het chemisch laboratorium van de afdeling Vis beschikt over een NEN-EN-ISO/IEC 17025:2005 accreditatie voor testlaboratoria met nummer L097. Deze accreditatie is geldig tot 1 april 2017 en is voor het eerst verleend op 27 maart 1997; deze accreditatie is verleend door de Raad voor Accreditatie. De scope is te vinden op de website van de Raad voor Accreditatie www.rva.nl. Op grond van deze accreditatie wordt het kwaliteitskenmerk Q toegekend aan resultaten van componenten die in de scope zijn vermeld, mits aan alle kwaliteitseisen is voldaan, zoals beschreven in het toegepaste Interne Standaard Werkvoorschrift (ISW) van de betreffende geaccrediteerde verrichting.

De kwaliteit van de analysemethoden wordt op verschillende manieren gewaarborgd. De juistheid van de analysemethoden wordt regelmatig getoetst door deelname aan ringonderzoeken waaronder die georganiseerd door QUASIMEME. Indien geen ringonderzoek voorhanden is, wordt een tweede lijn controle uitgevoerd. Tevens wordt bij iedere meetserie een eerstelijnscontrole uitgevoerd.

Naast de lijn controles wordende volgende algemene kwaliteitscontroles uitgevoerd:

- Blanco onderzoek
- Terugvinding (recovery)
- Interne standaard voor borging opwerkmethode
- Injectie standard
- Gevoeligheid

Bovenstaande controles staan beschreven in IMARES *ISW 2.10.2.105*.

Indien sprake is van onbeheerste kwaliteit worden passende maatregelen genomen.

Referenties

- Dang, Z., Lock, R.A., Flik, G., Wendelaar Bonga, S.E., 2000. Na⁺/K⁺-ATPase immunoreactivity in branchial chloride cells of *Oreochromis mossambicus* exposed to copper. J. Exp. Biol. 203, 379–387.
- Erkmen, B., Kolankaya, D., 2000. Effects of water quality on epithelial morphology in the gill of capoeta tinca living in two tributaries of Kizilirmak River, Turkey. Bull. Environ. Contam. Toxicol. 64, 418–425.
- Evans, D.H., 1987. The fish gill: site of action and model for toxic effects of environmental pollutants. Environ Health Perspect 71, 47–58.
- Evans, D.H., Piermarini, P.M., Choe, K.P., 2005. The multifunctional fish gill: dominant site of gas exchange, osmoregulation, acid-base regulation, and excretion of nitrogenous waste. Physiol. Rev. 85, 97–177.
- Foss, A., Imsland, A.K., Roth, B., Schram, E., Stefansson, S.O., 2007. Interactive effects of oxygen saturation and ammonia on growth and physiology in juvenile turbot. Aquaculture 271, 244–251.
- Ip, Y.K., Tay, A.S.L., Lee, K.H., Chew, S.F., 2004a. Strategies for Surviving High Concentrations of Environmental Ammonia in the Swamp Eel *Monopterus albus*. Physiol. Biochem. Zool. 77, 390–405.
- Ip, Y.K., Zubaidah, R.M., Liew, P.C., Loong, A.M., Hiong, K.C., Wong, W.P., Chew, S.F., 2004b. African sharp-tooth catfish *Clarias gariepinus* does not detoxify ammonia to urea or amino acids but actively excretes ammonia during exposure to environmental ammonia. Physiol. Biochem. Zool. 77(2), 242–254.
- Knoph, M.B., Thorud, K., 1996. Toxicity of ammonia to Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) in seawater – Effects on plasma osmolality, ion, ammonia, urea and glucose levels and hematologic parameters. Comp. Biochem. Physiol. 113A, 375–381.
- Lemarié, G., Dosdat, A., Covès, D., Dutto, G., Gasset, G., Person-Le Ruyet, J., 2004. Effect of chronic ammonia exposure on growth of European seabass (*Dicentrarchus labrax*) juveniles. Aquaculture 229, 479–491.
- Metz, J.R., Geven, E.J.W., van den Burg, E.H., Flik, G., 2005. ACTH, α -MSH, and control of cortisol release: cloning, sequencing, and functional expression of the melanocortin-2 and melanocortin-5 receptor in *Cyprinus carpio*. Am. J. Physiol. 289, R814–26.
- Person-Le Ruyet, J., Galland, R., Le Roux, A., Chartois, H., 1997. Chronic ammonia toxicity in juvenile turbot (*Scophthalmus maximus*). Aquaculture 154, 155–171.
- Sadler, K., 1982. The toxicity of ammonia to the European eel (*Anguilla anguilla* L.). Aquaculture 26, 173–181.
- Schram, E.S., Roques J.A.C., Abbink, W., Spanings, F.A.T., de Vries, P., Bierman, S., van de Vis, J.W., Flik, G., 2010. The impact of elevated water ammonia concentration on physiology, growth and feed intake of African catfish (*Clarias gariepinus*). Aquaculture 306, 108–115.
- Schram, E.S., Roques J.A.C., van Kuijk, T., Abbink, W., van de Heul, J., de Vries, P., Bierman, S., van de Vis, J.W., Flik, G., 2014. The impact of elevated water ammonia and nitrate concentrations on physiology, growth and feed intake of pikeperch (*Sander lucioperca*). Aquaculture, 420–421, 95–104.
- Wendelaar Bonga, S.E., 1997. The stress response in fish. Physiological Reviews 77, 591–625.
- Wilkie, M.P., 2002. Ammonia excretion and urea handling by fish gills: present understanding and future research challenges. J. Exp. Zool. 293, 284–301.
- Wood, C.M., 1993. Ammonia and urea metabolism and excretion, in: Evans D. (Ed.), The physiology of fishes, CRC press, Boca Raton, FL, 379 – 425.
- Wright, P.A., Steele, S.L., Hvitema, A., Bernier, N.J., 2007. Induction of four glutamine synthetase genes in brain of rainbow trout in response to elevated environmental ammonia. J. Exp. Biol. 198, 127–135.
- Wright, P.A., Wood, C.M., 2009. A new paradigm for ammonia excretion in aquatic animals: role of Rhesus (Rh) glycoproteins. J. Exp. Biol. 212, 2303–2312.

Verantwoording

Rapport C187/15

Projectnummer: 431.4810.002

Dit rapport is met grote zorgvuldigheid tot stand gekomen. De wetenschappelijke kwaliteit is intern getoetst door een collega-onderzoeker en het betreffende afdelingshoofd van IMARES.

Akkoord: Dr. Hans van de Vis
Onderzoeker

Handtekening:

Datum:


21 december 2015

Akkoord: Drs. Jakob Asjes
Afdelingshoofd

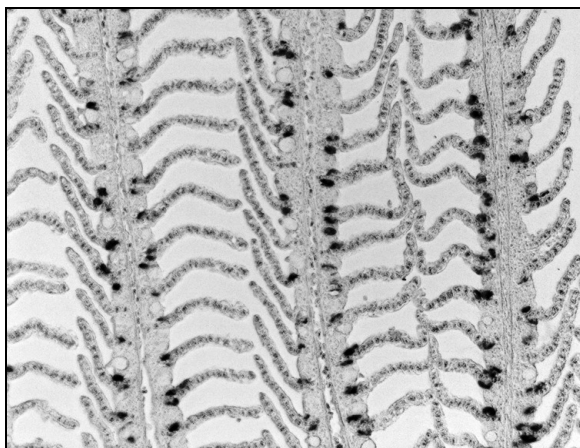
Handtekening:

Datum:

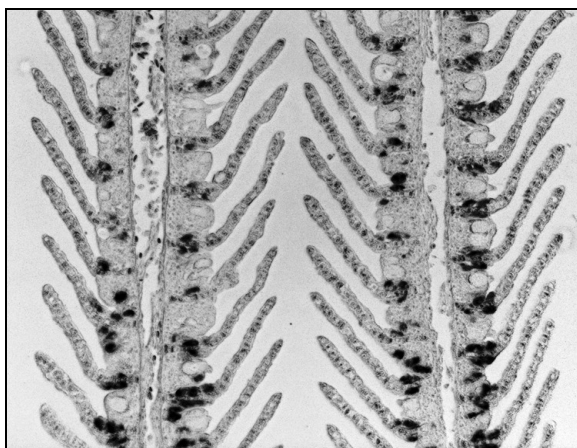

18 december 2015

Bijlage; Kieuwen

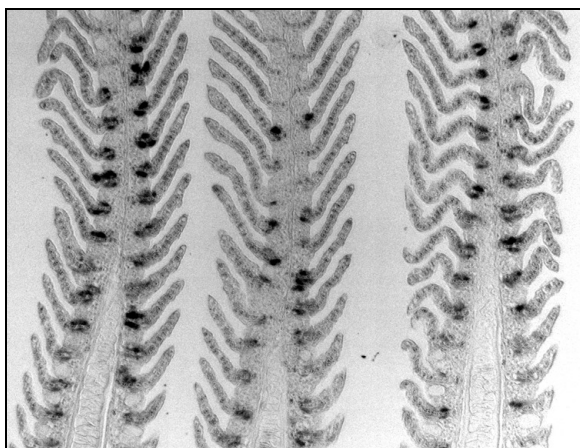
Representatieve afbeeldingen van kieuwpreparaten van vissen van alle groepen uit de studie. De controlegroep (A), en de oplopende concentraties ammoniak ($\text{NH}_3\text{-N}$) in het water (B; 0,001 – C; 0,010 – D; 0,039 – E; 0,071 – F; 0,168 mg $\text{NH}_3\text{-N/L}$) laten de geleidelijke aantasting van de kieuwen zien.



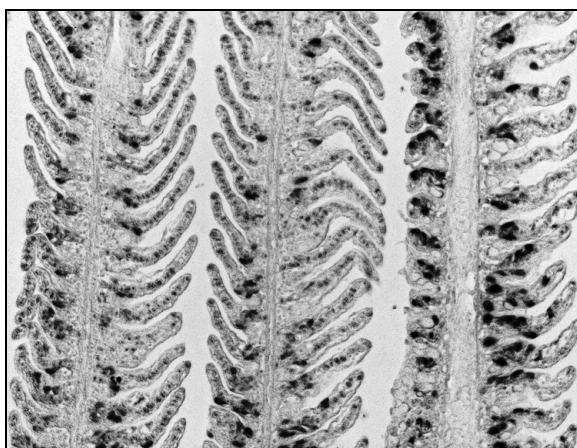
A



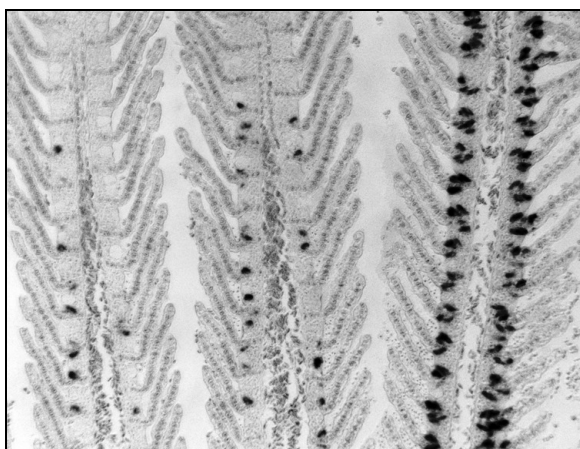
B



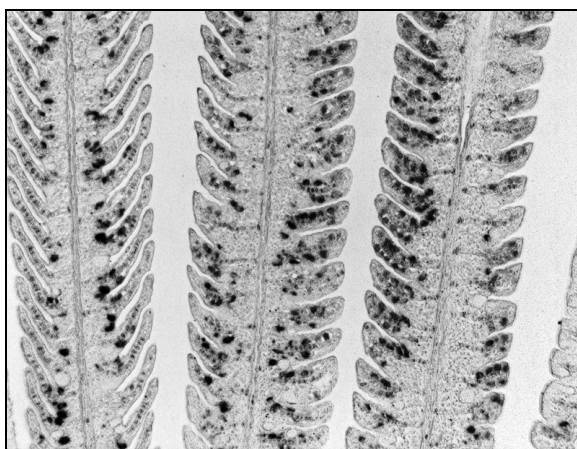
C



D



E



F