

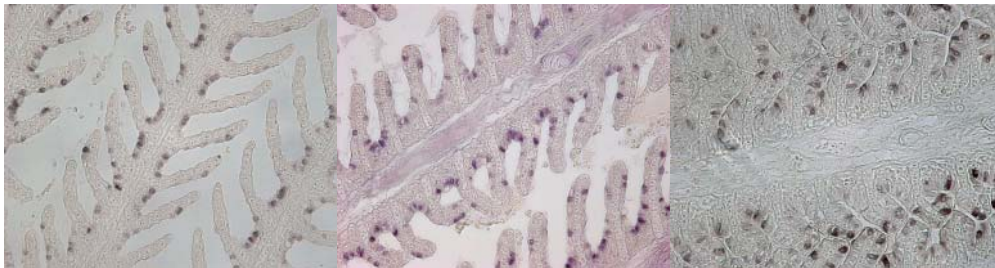
Het effect van verhoogde ammonia concentratie in het water op fysiologie, groei en voeropname van Afrikaanse meerval (*Clarias gariepinus*)

Edward Schram¹, Jonathan Roques^{1,2}, Wout Abbink¹, Tom Spanings², Pepijn de Vries¹, Stijn Bierman¹, Hans van de Vis¹ en Gert Flik²

¹) IMARES Wageningen UR

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

Rapport C026/10



IMARES Wageningen UR

Institute for Marine Resources & Ecosystem Studies

Dit onderzoek is uitgevoerd binnen het Beleidsondersteunend onderzoek in het kader van LNV-programma BO-07-011 Dierenwelzijn, projectnummer BO-07-011-028

BAS code: BO-07-011-028-IMARES

Opdrachtgever

Ministerie van LNV
Directie Visserij
Postbus 20401
2500 EK Den Haag

Publicatiedatum:

22 maart 2010

IMARES is:

- een onafhankelijk, objectief en gezaghebbend instituut dat kennis levert die noodzakelijk is voor integrale duurzame bescherming, exploitatie en ruimtelijk gebruik van de zee en kustzones;
- een instituut dat de benodigde kennis levert voor een geïntegreerde duurzame bescherming, exploitatie en ruimtelijk gebruik van zee en kustzones;
- een belangrijke, proactieve speler in nationale en internationale mariene onderzoeksnetwerken (zoals ICES en EFARO).

© 2010 IMARES Wageningen UR

IMARES is geregistreerd in het
Handelsregister Amsterdam nr. 34135929,
BTW nr. NL 811383696B04.

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-V78.0

Inhoudsopgave

Samenvatting	5
1 Inleiding	7
2 Materialen en methoden	9
2.1 Experimentele omstandigheden.....	9
2.2 Plasma bemonstering.....	10
2.3 Kieuw morfologie	10
2.4 Na^+/K^+ -ATPase activiteit in de kieuwen.....	10
2.5 Specifieke groeisnelheid en voeropname	10
2.6 Statistiek.....	11
3 Resultaten	13
3.1 Plasma ammonium.....	13
3.2 Plasma cortisol.....	13
3.3 Plasma glucose en lactaat	13
3.4 Plasma osmolaliteit	13
3.5 Kieuwmorfologie	13
3.6 Na^+/K^+ -ATPase activiteit in de kieuwen.....	14
3.7 Voeropname, specifieke groeisnelheid, voederconversie en mortaliteit.....	14
3.8 EC_{10} voor de totale voeropname en specifieke groeisnelheid	16
4 Discussie	19
4.1 4.1 Plasma ammonium.....	19
4.2 Plasma cortisol, glucose en lactaat	19
4.3 Plasma osmolaliteit	20
4.4 Kieuwmorfologie en Na^+/K^+ -ATPase activiteit.....	20
4.5 Voeropname, specifieke groeisnelheid, voederconversie en mortaliteit.....	21
4.6 Grenswaarden voor ammoniacconcentratie.....	21
5 Conclusies	23
6 Kwaliteitsborging	23
Literatuur	25

Verantwoording	27
Bijlage A. Figuur 1a tot 1e	28

Samenvatting

IMARES onderzocht het effect van de ammoniacconcentratie in het kweekwater op groei, voeropname en fysiologie van Afrikaanse meerval (*Clarias gariepinus*). Het doel van dit onderzoek was het vaststellen van de maximale ammoniacconcentratie (grenswaarde) waarbij geen negatieve effecten op welzijn van de vis en de productie waar te nemen zijn. Afrikaanse meervallen met een gemiddeld startgewicht van 141.0 g werden blootgesteld aan vijf verschillende ammonia (NH_3) concentraties (0.06, 0.19, 0.53, 2.47, 15.2 mg $\text{NH}_3\text{-N/L}$) gedurende 34 dagen. De plasmaconcentraties van ammonium, cortisol, glucose en lactaat, de plasma osmolaliteit, de morfologie van de kieuwen, de activiteit van $\text{Na}^+/\text{K}^+\text{-ATPase}$ in de kieuwen, voeropname en specifieke groeisnelheid werden gemeten. Er werd geen effect van de ammoniacconcentratie in het water op de ammoniumconcentratie in het plasma waargenomen. Voeropname en specifieke groeisnelheid werden sterk beïnvloed door ammonia in het water bij concentraties boven de 1.24 en 1.70 mg $\text{NH}_3\text{-N/L}$ (berekende 10% effect concentraties (EC_{10} waarden)). Bij deze ammoniacconcentraties werden geen verstoringen van fysiologische bloedparameters waargenomen. De morfologie van de kieuwen (een erg gevoelige stress indicator) werd sterk aangetast. Op basis van de ondergrens van het 95% betrouwbaarheidsinterval voor de EC_{10} , adviseren wij dat voor Afrikaanse meerval de ammoniacconcentratie in het water niet hoger mag zijn dan 0.34 mg $\text{NH}_3\text{-N/L}$. Deze bevinding is relevant voor het ontwerp en management van kweeksystemen voor Afrikaanse meerval.

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 als ammonia via de kieuwen (Wilkie, 2002). 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 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 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 (Wright *et al.*, 2007). Ophoping van ammonium in de vis heeft allerlei schadelijke (neurotoxicologische) effecten (Cooper and Plum, 1987 in Wilkie, 2002). 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 (Wright and Wood, 2009). 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 vissoortspecifiek. 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). Voor juveniele zeebaars (*Dicentrarchus labrax*) is deze grenswaarde 0.26 mg $\text{NH}_3\text{-N/L}$ (Lemarié *et al.*, 2004).

Afrikaanse meerval (*Clarias gariepinus*) beschikt over een heel aantal verdedigingsstrategieën tegen ammoniavergiftiging, waardoor deze vis hoge ammoniakconcentraties in het water tolereert (Ip *et al.*, 2004a). Afrikaanse meerval leeft van nature in een wisselend milieu, en wordt daar regelmatig blootgesteld aan hoge ammoniakconcentraties in het water met hoge ammoniakconcentraties in het lichaam als gevolg. 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 een aantal verdedigingsstrategieën tegen ammoniavergiftiging ontstaan. Deze strategieën betreffen een goed ontwikkelde actieve uitscheiding van ammonium tegen de concentratiegradiënt in, een afname van de eigen ammoniaproductie door een verlaging van de afbraak van aminozuren en een hoge tolerantie voor ammonia in weefsels en cellen. Daarnaast is het waarschijnlijk dat de Afrikaanse meerval in staat is om de doorlaatbaarheid voor ammonia van de huid en membranen te verlagen als reactie op hoge ammoniakconcentraties in het water, waardoor ammonia minder makkelijk vanuit het water het lichaam binnenkomt.

Ondanks dat deze verdedigingsstrategieën beschreven zijn, is niet bekend welke ammoniakconcentraties in het water bij de Afrikaanse meerval leiden tot een aantasting van het welzijn van het dier. Er zijn geen gerapporteerde studies beschikbaar waarin is vermeld in hoeverre het dier tijdens de houderij chronisch kan worden blootgesteld aan hoge ammoniakconcentraties. Ook is onduidelijk bij welke ammoniakconcentraties een fysiologische respons en gedragsmatige veranderingen optreden, mogelijk in combinatie met een afname van de voeropname en groei.

Daardoor is niet bekend of de hoge ammoniac concentraties zoals deze voor kunnen komen op kwekerijen leiden tot ongerief, mogelijk in combinatie met een vermindering van de productie.

In deze studie werd Afrikaanse meerval blootgesteld aan vijf verschillende ammoniac concentraties gedurende 34 dagen om de grenswaarde voor de ammoniac concentratie vast te stellen.

2 Materialen en methoden

2.1 Experimentele omstandigheden

De Afrikaanse meerval was afkomstig van Fleuren-Nooijen BV. De vissen (168 stuks) werden willekeurig verdeeld over 12 rechthoekige glazen aquaria van 30L waarna de vis gedurende 7 dagen kon wennen aan de experimentele omstandigheden. Bij aanvang van het 34 dagen durende experiment wogen de vissen gemiddeld 141g. De duur van het experiment komt overeen met circa 30% van de afmestperiode van pootvis tot marktgewicht op commerciële Afrikaanse meervalkwekerijen. De behandeling van de vissen 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.

De behandelingen werden in tweevoud uitgevoerd en willekeurig aan de aquaria toegewezen. Vijf verschillende ammoniacconcentraties ($\text{NH}_3\text{-N}$) in het kweekwater werden gebruikt: 0.06 (Controle), 0.19, 0.53, 2.47 en 15.2 mg $\text{NH}_3\text{-N/L}$. Tijdens de gewenningsperiode en het experiment werden alle tanks doorstroomd met leidingwater (185 L/dag per tank). De verschillende ammoniacconcentraties 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 (4.75 L/dag per tank). In elk aquarium zat een luchtsteen om de ammoniumchloride oplossingen goed te mengen met het aquariumwater. Natriumbicarbonaat (NaHCO_3) werd aan de stockoplossingen toegevoegd om de pH zoveel mogelijk gelijk te houden tussen de behandelingen. Daarnaast werd natriumchloride (NaCl) toegevoegd aan de stockoplossingen om de verschillen in chloride-concentratie voortkomend uit de ammoniumchloride toevoeging te compenseren. De totale hoeveelheid natrium die als natriumchloride en natriumbicarbonaat aan de stockoplossing werd toegevoegd, was gelijk voor alle aquaria (Tabel 1). Stockoplossingen werden dagelijks vers aangemaakt. De saliniteit van het aquariumwater was maximaal 5g/L. Volgens Clay (1977) tolereert Afrikaanse meerval een saliniteit tot 10 g/L.

De waterkwaliteit (Tabel 2) werd gecontroleerd door dagelijkse meting van totaal ammonia stikstof (TAN) concentraties (fotometrisch, Hach Lange DR2800), temperatuur, pH, zuurstofconcentratie (Hach Lange HQ 40 multimeter) en geleidbaarheid (WTW Cond 315i) in elk aquarium. De ammonia ($\text{NH}_3\text{-N}$) concentraties werden berekend uit de temperatuur, pH en saliniteit afhankelijke molfractie en de totaal ammonia concentraties. De ammoniacconcentraties werden geleidelijk opgevoerd tot de gewenste concentraties tijdens de eerste vier dagen van de experimentele periode.

Tabel 1 Samenstelling van de stockoplossingen en de berekende¹ TAN, natrium en chloride concentraties in de aquaria.

Behandeling	NH_4Cl (g/10L)	NaHCO_3 (g/10L)	NaCl (g/10L)	Totale Cl^- dosering (g/10L)	Totale Na^+ dosering (g/10L)	Voorspelde tank [Na^+] (g/L)	Voorspelde tank [Cl^-] (g/L)
1	0	0	1555	933	622	1.6	2.4
2	15	9	1549	939	622	1.6	2.4
3	45	47	1523	943	622	1.6	2.4
4	135	180	1432	948	621	1.6	2.5
5	404	530	1192	982	620	1.6	2.5

¹⁾ op basis van gelijke debieten per tank van 4.75 L/d voor de stockoplossingen en 185 L/d voor het leidingwater

Tabel 2. Gemiddelde waarden per behandeling voor de ammonia ($\text{NH}_3\text{-N}$), totaal ammonia stikstof (TAN) en zuurstof (O_2) concentraties, water temperatuur, geleidbaarheid en de pH range in de aquaria tijdens het experiment.

Behandeling	Ammonia		TAN	O_2	Water temperatuur	Geleidbaarheid	pH range
	(μM)	(mg/L)	(mg/L)	(mg/L)	($^{\circ}\text{C}$)	(mS/cm)	
1	4	0.06	5.2	4.8	27.0	7.18	7.17-7.72
2	14	0.19	14.8	4.5	27.0	7.07	7.07-7.64
3	38	0.53	29.7	4.9	27.1	7.44	7.30-7.83
4	176	2.47	72.2	5.1	27.0	7.68	7.26-8.18
5	1084	15.2	275.1	5.6	27.0	8.78	7.46-8.66

2.2 Plasma bemonstering

Een dag voordat de blootstelling aan ammonia startte (dag 0), werden de vissen uit twee aquaria bemonsterd. Na een blootstelling van 34 dagen werden de vissen uit de 10 overgebleven aquaria bemonsterd (twee aquaria voor elk van de vijf behandelingen, 14 vissen per aquarium). De vissen werden snel gevangen met een net en verdoofd in 0.1% (v/v) 2-phenoxyethanol (Sigma, St. Louis, USA). Binnen twee minuten werd bloed afgenomen uit de caudale vene. Het bloed werd tien minuten gecentrifugeerd ($14000 \times g$, 4°C) en het verkregen plasma werd opgeslagen bij -20°C . In het plasma werden de concentraties van ammonium, glucose en lactaat gemeten met commercieel beschikbare enzymatische test kits (Instruchemie, Delfzijl, Nederland). Plasma cortisol werd gemeten met de methode beschreven in Metz *et al.* (2005). Plasma osmolaliteit werd gemeten met een osmometer (Osmomat 030, Gonotec, Duitsland).

2.3 Kieuw morfologie

Van elke vis werd onmiddellijk na het nemen van het bloedmonster een kieuwboog verwijderd en gedurende een nacht geplaatst in Bouin's fixeermiddel. De kieuwpreparaten werden gemaakt zoals beschreven in Dang *et al.* (2000).

2.4 Na^+/K^+ -ATPase activiteit in de kieuwen

De Na^+/K^+ -ATPase activiteit in de kieuwen is gemeten in gehomogeniseerde kieuwmonsters zoals beschreven in Metz *et al.* (2003).

2.5 Specifieke groeisnelheid en voeropname

Op dag 34 werden de vissen in elke tank geteld en op 1 gram nauwkeurig gewogen. (Mettler PM 34 Delta range). De resultaten zijn gebruikt om de specifieke groeisnelheid (SGR) per aquarium te berekenen:

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

Waarin SGR = specifieke groeisnelheid (%/d), W_t = gemiddelde gewicht op dag 34 (g), W_1 = 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 (Catfish type Me-3; Skretting, Boxmeer). De hoeveelheid voer per tank werd opgeschreven. Uit elk aquarium werd een uur na het voeren de niet opgegeten voerkorrels verzameld. Het voerverlies per aquarium werd berekend door het

aantal niet opgegeten voerkorrels te vermenigvuldigen met 0.0966 g/voerkorrel (het gewicht van een voerkorrel is vastgesteld door 100 voerkorrels te wegen). De dagelijkse voeropname per aquarium werd gedefinieerd als het verschil tussen de dagelijkse voergift en het voerverlies. De totale voeropname per aquarium resulteerde uit de som van de dagelijkse voeropnames.

2.6 Statistiek

De fysiologische parameters, voeropname en groei zijn getest op significante verschillen tussen de behandelingen met REML. De specifieke groeisnelheid (SGR) en totale voeropname (TFI) zijn gerelateerd aan de ammonia concentraties door middel van concentratie – effect curven. De 10% effect concentraties (EC10 waarden) zijn de concentraties waarbij groei en voeropname 10% lager zijn geworden ten opzichte van de controle groep. Deze EC10 concentraties zijn vastgesteld aan de hand van de concentratie-effect curven. Voor de EC10 van de specifieke groeisnelheid en de totale voeropname zijn 95% betrouwbaarheidsintervallen vastgesteld. Dit zijn de concentratie ranges waarbinnen de EC10 concentraties met 95% zekerheid liggen.

3 Resultaten

3.1 Plasma ammonium

Er werden geen verschillen in de plasma ammoniacconcentraties gevonden tussen de verschillende experimentele behandelingen (REML, $P = 0.10$, Tabel 3). De plasma ammoniumconcentraties waren gelijk in de Afrikaanse meervallen die werden blootgesteld aan ammoniacconcentraties in het water uiteenlopend van 0.06 tot 15.2 mg $\text{NH}_3\text{-N/L}$.

3.2 Plasma cortisol

Er werden geen verschillen in de cortisolconcentraties gevonden tussen de verschillende experimentele behandelingen (REML, $P = 0.25$). De gemiddelde (SD) plasma cortisolconcentratie in de controle groep (0.06 mg $\text{NH}_3\text{-N/L}$) was 44.5 (35.1) nM. In de andere experimentele groepen liepen de gemiddelde (SD) concentraties uiteen van 33.6 (26.4) (15.2 mg $\text{NH}_3\text{-N/L}$) tot 72.9 (52.7) nM (0.53 mg $\text{NH}_3\text{-N/L}$). De gemiddelde (SD) cortisolconcentratie bij aanvang van het experiment was 30.0 (18.2) nM.

3.3 Plasma glucose en lactaat

De gemiddelde plasma glucoseconcentratie in de controle groep (0.06 mg $\text{NH}_3\text{-N/L}$) was 3.51 mM en vertoonde een lichte afname in de 0.19, 0.53 en de 2.47 mg $\text{NH}_3\text{-N/L}$ behandelingen (REML, $P = 0.002$, Tabel 3). De 15.2 mg $\text{NH}_3\text{-N/L}$ behandelingen vertoonde een verhoogde plasma glucoseconcentratie van 4.8 mM in vergelijking met alle andere behandelingen en de controle groep.

Er werden geen verschillen in de lactaatconcentraties gevonden tussen de verschillende experimentele behandelingen (REML, $P = 0.24$, Tabel 3). De gemiddelde plasma lactaatconcentratie in de controle groep (0.06 mg $\text{NH}_3\text{-N/L}$) was 3.84 mM. De concentraties in de 0.19, 0.53 en de 2.47 mg $\text{NH}_3\text{-N/L}$ behandelingen lagen in dezelfde range.

3.4 Plasma osmolaliteit

De gemiddelde plasma osmolaliteit in de controle groep (0.06 $\text{NH}_3\text{-N/L}$) was 267.1 mOsmol/kg (Tabel 3). De osmolaliteit in de 0.19, 0.53 en de 2.47 mg $\text{NH}_3\text{-N/L}$ behandelingen lagen in dezelfde range en verschilden niet van elkaar. De plasma osmolaliteit piekte in de 15.2 mg $\text{NH}_3\text{-N/L}$ behandeling met een waarde van 347 mOsmol/kg, significant hoger dan alle andere behandelingen (REML, $P = 0.002$).

3.5 Kieuwmorfologie

De morfologie van de kieuwen verslechterde met de toenemende ammoniacconcentraties in het water. In Figuur 1a tot en met 1e (Bijlage A) is te zien dat de oplopende ammoniacconcentratie 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. Deze effecten werden goed zichtbaar in de 0.53 mg $\text{NH}_3\text{-N/L}$ behandeling (Figuur 1c) en zijn het grootst in de 15.2 mg $\text{NH}_3\text{-N/L}$ behandeling (Figuur 1e). In deze groep werden sterk opgezwollen kieuwlamellen en een verhoogde slijmproductie waargenomen.

In de controle groep (0.06 mg NH₃-N/L, Figuur 1a) waren de chloride cellen voornamelijk aanwezig in het gebied tussen de kieuwlamellen en in mindere mate op de lamellen zelf. Met de toenemende ammoniacconcentratie nam het aantal chloride cellen toe en het aantal chloride cellen op de lamellen nam toe (Figuur 1b to 1e).

3.6 Na⁺/K⁺-ATPase activiteit in de kieuwen

De gemiddelde Na⁺/K⁺-ATPase activiteit in de controle groep (0.06 mg NH₃-N/L) was 3.4 (1.24) µmol Pi/h/mg eiwit (Tabel 3). De activiteit in de 0.19, 0.53 en de 2.47 mg NH₃-N/L behandelingen lagen in dezelfde range (3.9 (1.47), 3.6 (1.85) en 5.5 (0.93) µmol Pi/h/mg eiwit respectievelijk). De Na⁺/K⁺-ATPase activiteit in de 15.2 mg NH₃-N/L was significant verhoogd vergeleken met de andere behandelingen. (10.2 (2.30) µmol Pi/h/mg eiwit; REML, P < 0.001)

3.7 Voeropname, specifieke groeisnelheid, voederconversie en mortaliteit

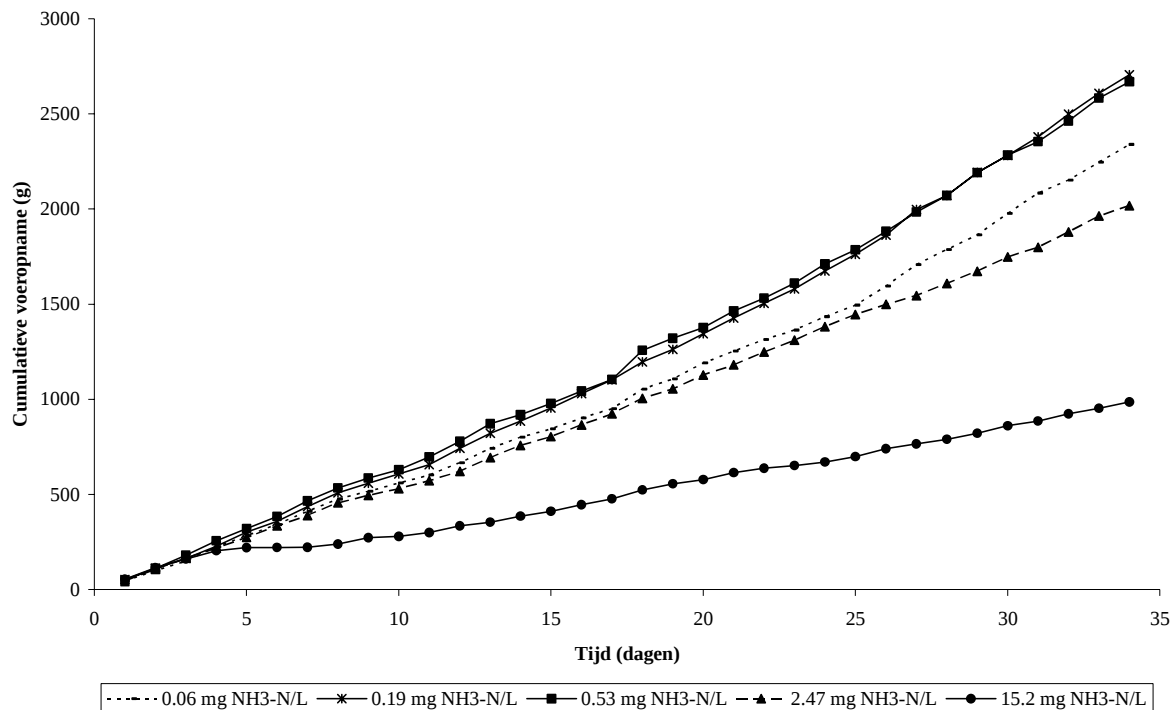
De totale voeropname verschilde tussen de behandelingen. (one way ANOVA, P < 0.01, Tabel 4). De totale voeropname was het hoogst in de 14 en 38 µM ammonia behandelingen (one way ANOVA, P < 0.01, Tabel 4). Deze verschillende ontwikkelden zich tijdens het experiment (Figuur 2). In vergelijking met de controle groep (0.06 mg NH₃-N/L), was de wekelijkse voeropname hoger in de 0.53 mg NH₃-N/L behandeling vanaf week 3 en in de 0.19 mg NH₃-N/L behandeling vanaf week 4 tot het einde van het experiment (one way ANOVA, Figuur 3).

Tabel 3. Gemiddelde (SD) waarden aan het begin (t = 0) en per behandeling voor het einde (t = 34d) van het experiment voor plasma cortisol, plasma glucose, plasma lactaat, plasma ammonium, plasma osmolariteit en Na⁺/K⁺-ATPase activiteit in de kieuwen. Gemiddelde waarden met een verschillende letter zijn significant verschillend van elkaar.

Behandeling	Ammonia (mg NH ₃ -N/L)	Plasma cortisol (nM) n	Plasma glucose (mM) n	Plasma lactaat (mM) n	Plasma ammonium (µM) n	Plasma osmolariteit (mOsmol/kg) n	Na ⁺ /K ⁺ -ATPase activiteit n
T = 0		30.0 (18.2) 24	3.4 (1.0) 24	2.74 (0.78) 24	167.9 (27.8) 23	251.2 (10.5) 24	2.5 (1.2) 10
1	0.06	44.5 (35.1) 24	3.5 (0.6) ^b 24	3.84 (1.58) 24	159.2 (39.9) 16	267.3 (8.1) ^a 24	3.4 (1.5) ^a 12
2	0.19	43.3 (20.9) 24	3.0 (0.5) ^a 24	4.17 (1.58) 24	200.1 (19.3) 15	278.7 (24.3) ^a 24	3.9 (1.9) ^a 12
3	0.53	72.9 (52.7) 24	3.1 (0.8) ^{ab} 24	3.88 (1.16) 24	205.7 (31.0) 16	276.8 (8.3) ^a 24	3.6 (0.9) ^a 6
4	2.47	62.1 (38.6) 24	3.0 (0.8) ^a 23	4.02 (0.97) 24	213.4 (13.5) 22	278.3 (13.8) ^a 22	5.5 (2.3) ^a 12
5	15.2	33.6 (26.4) 23	4.8 (0.9) ^c 23	6.23 (1.53) 23	217.8 (17.8) 21	347.0 (16.9) ^b 23	10.2 (3.6) ^b 9
P-value		0.21	0.002	0.25	0.10	0.002	<0.001

Tabel 4. Gemiddelde (SD) waarden per behandeling (N = 2) voor het eindgewicht, specifieke groeisnelheid (SGR), totale voeropname en voederconversie (FCR). Waarden met een verschillende letter verschillen significant van elkaar.

Behandeling	Ammonia (mg NH ₃ -N/L)	Eindgewicht (g)	Totale voeropname (g)	SGR (%/BW/d)	FCR
1	0.06	412 (1.2) ^{ab}	2339 (2) ^a	3.25 (0.01) ^{ab}	0.72 (0.004) ^a
2	0.19	468 (10.4) ^a	2705 (104) ^b	3.64 (0.07) ^a	0.69 (0.005) ^a
3	0.53	466 (44.8) ^a	2668 (170) ^b	3.61 (0.29) ^a	0.69 (0.004) ^a
4	2.47	370 (17.1) ^b	2017 (181) ^c	2.92 (0.14) ^b	0.73 (0.011) ^a
5	15.2	224 (9.6) ^c	986 (32) ^d	1.40 (0.13) ^c	1.00 (0.15) ^b
P-value		<0.01	<0.01	<0.01	0.03



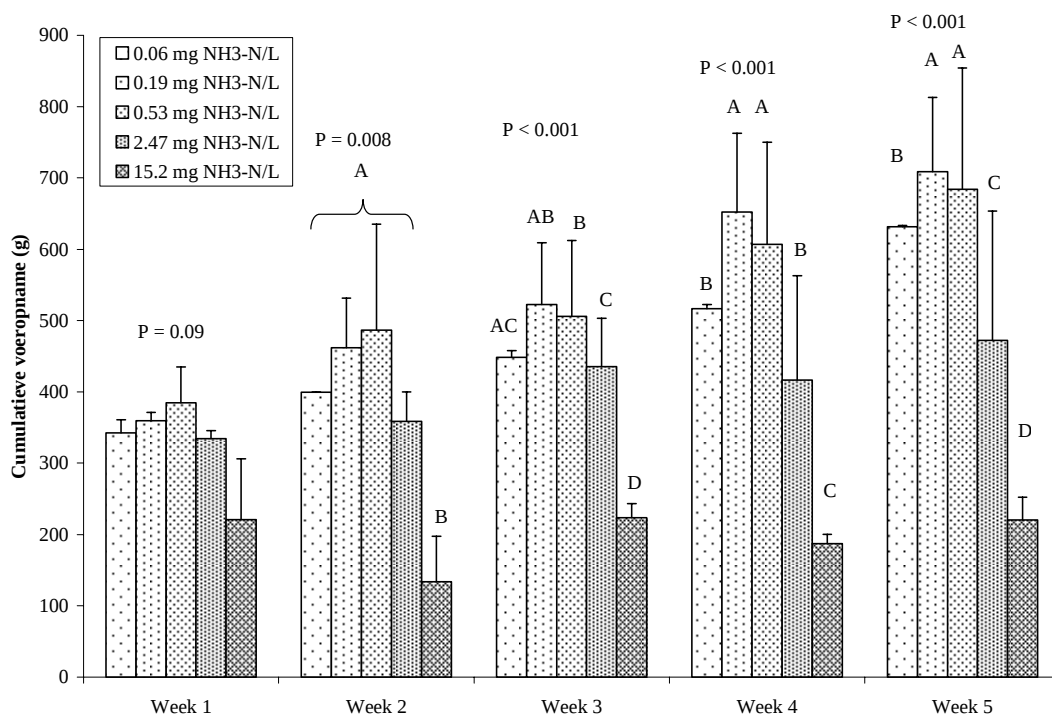
Figuur 2. Het effect van ammonia op de cumulatieve voeropname ($N = 2$).

De totale voeropname was lager in de 2.47 mg NH₃-N/L behandeling vergeleken met de controle groep en de 0.19 en 0.53 mg NH₃-N/L behandelingen (one way ANOVA, $P < 0.01$, Tabel 4). De wekelijkse voeropname in deze behandeling was lager dan in de controle groep in week 5 en lager dan in de 0.19 en 0.53 mg NH₃-N/L behandelingen vanaf week 3 tot het einde van het experiment (Figuur 3).

De totale voeropname was sterk verlaagd in de 15.2 mg NH₃-N/L behandeling vergeleken met alle andere behandelingen (One way ANOVA, $P < 0.01$, Tabel 4). De wekelijkse voeropname in deze behandeling was altijd lager dan in alle andere behandelingen, behalve in week 1 (Figuur 3).

De gemiddelde specifieke groeisnelheid (SGR) verschildte tussen de behandelingen (ANOVA, $P < 0.01$, Tabel 4). De hoogste SGR werd waargenomen in de 0.06, 0.19 en 0.53 mg NH₃-N/L behandelingen. De SGR in de 2.47 mg NH₃-N/L behandeling was lager dan waargenomen in de 0.19 en 0.53 mg NH₃-N/L behandelingen, maar gelijk aan de SGR waargenomen in de controle groep (0.06 mg NH₃-N/L). De SGR in de 15.2 mg NH₃-N/L behandeling was lager dan in alle andere behandelingen.

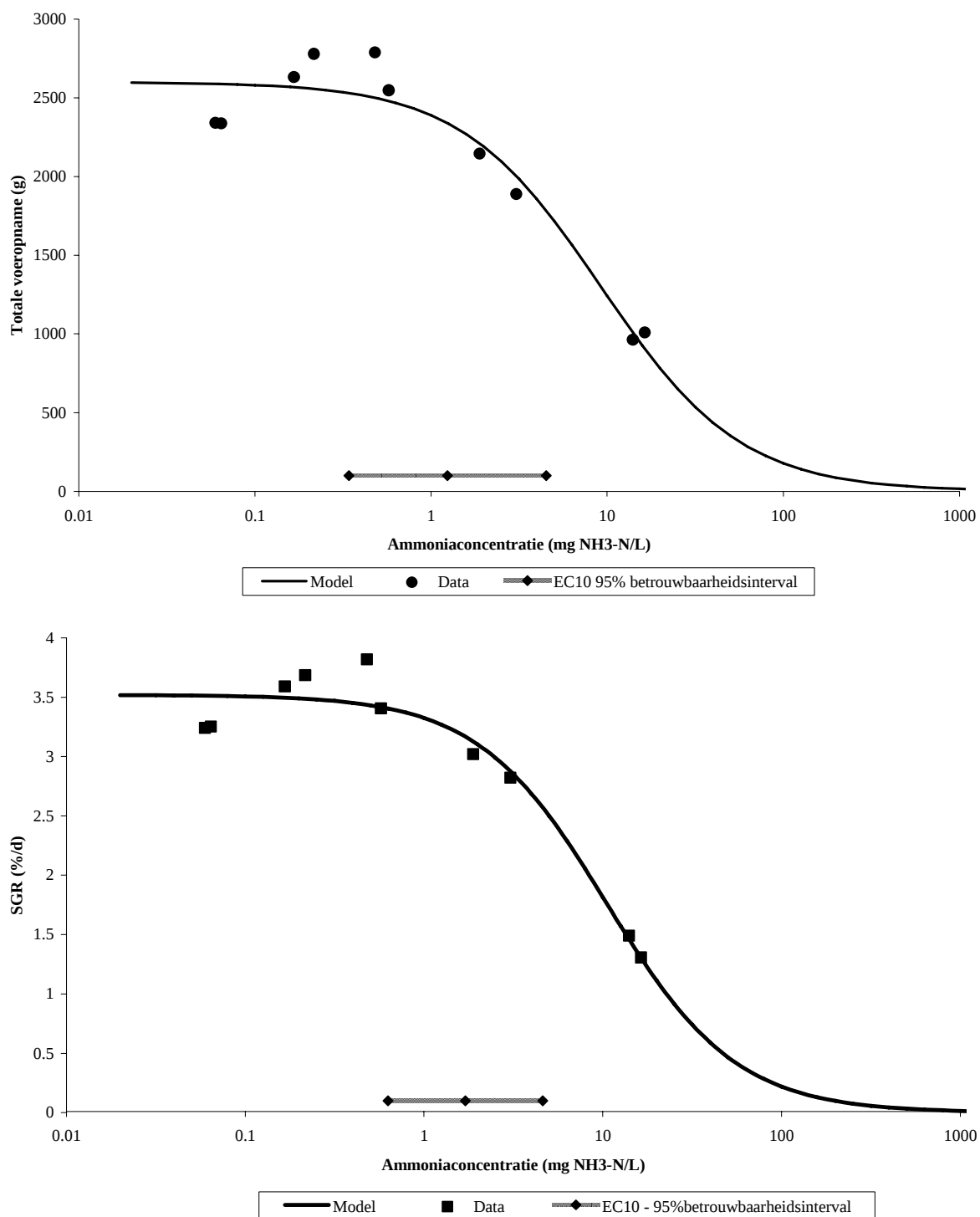
De voederconversie (FCR) was gelijk in alle behandelingen behalve in de 15.2 mg NH₃-N/L behandeling, waarin een hogere FCR werd gevonden (One way ANOVA, $P < 0.03$, Tabel 4). Er werd geen mortaliteit waargenomen tijdens het experiment.



Figuur 3. Gemiddelde ($N = 2$) wekelijkse voeropname voor elke ammonia behandeling. Gemiddelde waarden met verschillende letters verschillen significant.

3.8 EC_{10} voor de totale voeropname en specifieke groeisnelheid

De concentratie – effect curves voor de totale voeropname en de SGR in relatie tot de ammonia (NH_3 -N) concentratie in het water worden weergegeven in Figuur 4a and 4b. Voor de totale voeropname werd een EC_{10} voor ammonia gevonden van 1.24 mg NH_3 -N/L, met een 95% betrouwbaarheidsinterval van 0.34 tot 4.5 mg NH_3 -N/L. Voor de SGR werd een EC_{10} voor ammonia gevonden van 1.70 mg NH_3 -N/L, met een 95% betrouwbaarheidsinterval van 0.63 tot 4.6 mg NH_3 -N/L.



Figuur 4 Concentratie-effect curves voor de totale voeropname (boven, $r^2 = 0.93$) en de specifieke groeisnelheid (SGR) (onder, $r^2 = 0.95$) in relatie tot de ammoniacconcentratie in het water.

4 Discussie

De Afrikaanse meervallen in dit experiment waren goed in staat de ammoniumconcentratie in het plasma laag te houden ondanks de hoge ammoniacconcentraties in het water. Desondanks hadden de hoge ammoniacconcentraties in het water effecten op de vissen; plasma glucose, plasma osmolality, Na^+/K^+ -ATPase activiteit, morfologie van de kieuwen, specifieke groeisnelheid (SGR), totale voeropname (TFI) en voederconversie (FCR) lieten een effect van de experimentele behandelingen zien. Dit zijn sterke aanwijzingen dat de hoge ammoniacconcentraties in water leidden tot overbelasting van het dier.

4.1 Plasma ammonium

In bloedplasma van de Afrikaanse meerval is ammonia voornamelijk (84-98 %) aanwezig in de vorm van ammonium (Ip *et al.*, 2004b). De capaciteit om de plasma ammonium concentratie laag te houden tijdens blootstelling aan hoge ammonia concentraties in het water werd al eerder aangetoond voor Afrikaanse meerval (Ip *et al.*, 2004b). De plasma ammonium concentratie zoals gerapporteerd door Ip *et al.* (2004b) na een vijfdaagse blootstelling aan 690 μM ammonia was 2.12 mM. Dit is ongeveer tienmaal hoger dan gevonden in de huidige studie na een 34 dagen durende blootstelling aan 0.06 tot 15.2 mg $\text{NH}_3\text{-N/L}$ (4 tot 1084 μM). Dit suggereert dat in de Afrikaanse meerval blootstelling aan hoge ammoniacconcentraties in het water in eerste instantie leidt tot een piek in de plasma ammoniacconcentratie als gevolg van de influx van ammonia vanuit het water. Dit wordt gevolgd tot het opgang komen van verdedigingsmechanismen tegen ammoniavergiftiging, hetgeen leidt tot een daling van de plasma ammoniacconcentratie tot een basaal niveau. Bestudering van de opname en uitscheiding van ammonia door Afrikaanse meerval in de tijd is nodig om dit patroon exact vast te stellen, maar onze resultaten laten wel zien dat Afrikaanse meerval in staat is de plasma ammoniacconcentratie laag te houden bij hoge ammoniacconcentraties in het water.

Actieve uitscheiding van ammonium tegen de concentratiegradiënt in is het belangrijkste verdedigingsmechanisme tegen ammoniavergiftiging waarover Afrikaanse meerval beschikt. (Ip *et al.*, 2004a, 2004b). De lage plasma ammoniumconcentraties zoals waargenomen in het huidige experiment kunnen mogelijk worden toegeschreven aan deze actieve uitscheiding. Omdat ammonium wordt uitgewisseld tegen natrium is het mogelijk dat de saliniteit van 5 g/L in ons experiment de uitscheiding van ammonium makkelijker maakte. De Afrikaanse meerval beschikt echter ook over andere verdedigingsmechanismen (zie Inleiding) en de huidige studie geeft geen uitsluitsel welke mechanismen daadwerkelijk werden toegepast.

Het kunnen handhaven van lage plasma ammoniacconcentraties bij chronisch hoge ammoniacconcentraties in het water is uniek onder kweekvis. De plasma ammoniacconcentraties in Atlantische zalm (*Salmo salar*) en Europese zeebaars (*Dicentrarchus labrax*) namen lineair toe tot 1 mM door chronische blootstelling aan hoge ammonia concentraties 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 de gebruikelijke grote variatie tussen individuele vissen. Significante verschillen tussen de behandelingen werden niet gevonden (Tabel 3). In vissen leidt acute stress tot een snelle tien tot honderdvoudige verhoging van de plasma cortisolconcentratie, binnen enkele uren gevolgd door een daling naar de oorspronkelijke basale concentratie. Basale concentraties zijn over het algemeen laag maar variatie tussen geslachten, vissoorten en levensstadia bestaat. In geval van chronische stress, zoals hoge ammoniacconcentraties in het water, kan de plasma cortisolconcentratie verhoogd blijven boven het basale niveau, maar lager zijn dan in geval van acute stress (Wendelaar Bonga, 1997). In het huidige experiment varieerde de plasma cortisolconcentratie van 33.6 tot 44.5 nM, hetgeen ver onder de eerder

gerapporteerde basale concentratie van 122.8 nM (45.5 ng/mL) voor Afrikaanse meerval ligt (Martins *et al.*, 2006a). Wij concluderen daarom dat dit experiment niet tot chronische stress bij de vissen leidde, met uitzondering van wellicht de 15.2 mg NH₃-N/L behandeling. De lage plasma cortisol concentraties die in deze groep gevonden werden kunnen namelijk ook geïnterpreteerd worden als een uitputting van de *pituitary-inter-renal-axis* als gevolg van langdurige overactiviteit van dit systeem (Hontela *et al.*, 1992). Dit wordt onderbouwd door de significant verhoogde plasma glucoseconcentratie in de 15.2 mg NH₃-N/L behandeling (Tabel 3) en een hogere, hoewel niet significant verschillende, plasma lactaatconcentratie in die behandeling. Hoge plasma glucose en plasma lactaatconcentraties komen namelijk algemeen voor in gestresste vissen (Wendelaar Bonga, 1997). De verhoogde plasma glucoseconcentratie in de 15.2 mg NH₃-N/L behandeling kan mogelijk verklaard worden door de energiebehoefte voor actieve ammonia uitscheiding. De verhoogde plasma lactaatconcentratie in deze behandeling suggereert het gebruik van lactaat als substraat voor gluconeogenese (Wendelaar Bonga, 1997). Deze aanpassing van het energiemetabolisme is mogelijk gerelateerd aan de verhoogde energiebehoefte voor de actieve uitscheiding van ammonia terwijl de voeropname en daarmee de energie opname verlaagd is (Tabel 4).

4.3 Plasma osmolaliteit

De plasma osmolaliteit was gelijk voor de 0.06 tot de 2.47 mg NH₃-N/L behandelingen en liep uiteen van 267 tot 278 mOsmol/kg. In vergelijking met deze behandelingen was de plasma osmolaliteit significant verhoogd in de 15.2 mg NH₃-N/L behandeling tot 347 mOsmol/kg (Tabel 3). Teleosteen, waartoe de Afrikaanse meerval behoort, reguleren nauwkeurig hun plasma osmolaliteit binnen de soortafhankelijke waarden (Varsamos *et al.*, 2005). In het huidige experiment werd de osmolaliteit van het water constant gehouden tussen de aquaria (zie 2.1 en Tabel 1) en er zijn geen verschillen in de geleidbaarheid van het water waargenomen tussen de behandelingen (Tabel 2). De waargenomen verschillen in plasma osmolaliteit kunnen daarom worden toegeschreven aan de experimentele behandelingen. De verhoogde osmolaliteit in de 15.2 mg NH₃-N/L behandeling is mogelijk een gevolg van de hogere opname van Na⁺ door de hogere actieve uitscheiding van ammonium. Aan de andere kant kan een beperkte ionen uitwisseling met de omgeving leiden tot een verlaging van het plasma volume en daarmee een toename van de osmolaliteit (Wendelaar Bonga, 1997), hetgeen deze observatie ook kan verklaren.

4.4 Kieuwmorfologie en Na⁺/K⁺-ATPase activiteit

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 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; Erkmen and Kolankaya, 2000).

In dit experiment werden geleidelijke veranderingen in de kieuwmorfologie waargenomen met toenemende ammoniacconcentratie in het water vanaf de 0.53 mg NH₃-N/L behandeling. De meest drastische veranderingen werden waargenomen in de 15.2 mg NH₃-N/L behandeling. Vergelijkbare morfologische veranderingen zijn waargenomen in een *Capoeta tinca* populatie die leefde in een rivier met hoge vervuilingsgraad, inclusief hoge ammonia concentraties (ca. 0.8 mg NH₃-N/L) (Erkmen and Kolankaya, 2000). Deze histopathologische veranderingen kunnen ionentransport verstoren (Ip *et al.*, 2004a). 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 ammonia. Opzwellen van het epitheel gekoppeld aan en het samenvoegen van lamellen, en een sterke toename van slijmcellen kunnen opgevat worden als aanpassingen 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 ammoniacconcentratie in het water, de actieve uitscheiding van ammonia ook toeneemt. Dit wordt onderbouwd door de waargenomen toename van de Na⁺/K⁺-ATPase activiteit in de 1084 µM groep.

4.5 Voeropname, specifieke groeisnelheid, voederconversie en mortaliteit.

De afwezigheid van sterfte in dit experiment toont aan dat de letale concentratie voor chronische blootstelling aan ammonia hoger is dan 15.2 mg $\text{NH}_3\text{-N/L}$.

Voeropname en specifieke groeisnelheid (SGR) werden sterk beïnvloed door hoge ammonia concentraties in het water (Tabel 3, Figuur 2, Figuur 3). De voederconversie (FCR) was gelijk in all behandelingen met uitzondering van de 15.2 mg $\text{NH}_3\text{-N/L}$ behandeling, waarin een verhoogde FCR werd waargenomen (Tabel 3).

In de eerste week van het experiment werden geen verschillen in voeropname waargenomen (Figuur 3). Dit schrijven we toe aan de geleidelijke opbouw van de ammonia concentraties tijdens de eerste vier dagen van het experiment.

Tot onze verrassing werd een hogere voeropname waargenomen in de 0.19 en de 0.53 mg $\text{NH}_3\text{-N/L}$ behandelingen ten opzichte van de controle groep. (Tabel 3). Wij vermoeden dat deze verhoogde voeropname door vis veroorzaakt wordt door de verhoogde energiebehoefte van de vis voor de actieve uitscheiding van ammonia. Een dergelijk stimulerend effect bij lage concentraties van een toxische stof wordt hormesis genoemd (Calabrese, 2005).

De totale voeropname in de 2.47 mg $\text{NH}_3\text{-N/L}$ behandeling en de controle groep waren gelijk tot ongeveer dag 25 van het experiment (Figuur 2). Na dag 25 was de voeropname lager in de 2.47 mg $\text{NH}_3\text{-N/L}$ behandeling (Figuur 2, Figuur 3). Dit suggereert dat de vissen die werden blootgesteld aan 2.47 mg $\text{NH}_3\text{-N/L}$ het normale niveau van voeropname in stand wilden houden, maar dit op langere termijn niet vol konden houden. Uiteindelijk leidde dit tot een lagere totale voeropname in deze behandeling vergeleken met de controle groep (Tabel 3).

De voeropname en SGR waren lager in de 2.47 mg $\text{NH}_3\text{-N/L}$ behandeling in vergelijking met de 0.19 en 0.53 mg $\text{NH}_3\text{-N/L}$ behandelingen. Aangezien de voederconversie gelijk was in deze behandelingen, moet de lagere SGR in de 2.47 mg $\text{NH}_3\text{-N/L}$ behandeling toegeschreven worden aan een lagere voeropname en niet aan een lagere voerbenutting. Voor tarbot is ook vastgesteld dat ammonia de groei remt door een verlaging van de voeropname (Person-LeRuyet *et al.*, 1997).

De totale voeropname en de SGR waren sterk negatief beïnvloed in de vissen die zijn blootgesteld aan de hoogste ammonia concentratie. Blootstelling aan 15.2 mg $\text{NH}_3\text{-N/L}$ resulteerde in een 58% lagere totale voeropname en een 57% lagere SGR in vergelijking met de controle groep. De wekelijkse voeropname in de 15.2 mg $\text{NH}_3\text{-N/L}$ behandeling was elke week lager dan in alle andere behandelingen, behalve in de eerste week (Figuur 3). Dit laat zien dat de voeropname verlaagd was in deze behandeling vanaf het moment van blootstelling aan de hoge ammoniaconcentratie.

De vissen die werden blootgesteld aan 15.2 mg $\text{NH}_3\text{-N/L}$ hadden een hogere voederconversie dan de vissen in de rest van de behandelingen. Dit suggereert dat het handhaven van lage plasma ammoniaconcentraties veel energie kost, ten koste van groei.

4.6 Grenswaarden voor ammoniaconcentratie

Afrikaanse meerval die chronisch werd blootgesteld aan ammoniaconcentraties zo hoog als 2.47 mg $\text{NH}_3\text{-N/L}$ vertoonden geen grote fysiologische verstoringen, met uitzondering van de kieuwmorfologie. Dit suggereert dat de grenswaarde voor de ammoniaconcentratie ten minste 2.47 mg $\text{NH}_3\text{-N/L}$ is. Echter, zowel de voeropname als specifieke groeisnelheid waren verlaagd bij veel lagere ammoniaconcentraties: de EC_{10} voor ammonia werd vastgesteld op 1.24 mg $\text{NH}_3\text{-N/L}$ voor voeropname en op 1.70 mg $\text{NH}_3\text{-N/L}$ voor SGR.

De gemeten fysiologische parameters betreffen zowel primaire (plasma cortisol) en secundaire (plasma glucose en plasma lactaat) stress reacties. Voeropname en groei zijn tertiaire stress reacties (Wendelaar Bonga, 1997). Het is daarom verrassend dat een effect op voeropname en groei werd waargenomen zonder dat er sprake was van sterke fysiologische verstoringen. Dit geeft wel aan dat in de vis een goede stressregulatie voorrang krijgt boven het in standhouden van groei. Voeropname en groei zijn daarom goede indicatoren voor negatieve effecten van hoge ammoniac concentraties in het water op Afrikaanse meerval, vooral als het gaat om het beoordelen van chronische suboptimale omstandigheden. De grenswaarde voor de concentratie voor chronische blootstelling van Afrikaanse meerval aan ammonia kan daarom naar onze mening 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 ammonia (NH_3) grenswaarde bijvoorkeur vastgesteld worden op 0.34 mg NH_3 -N/L. Bij deze ammoniac concentratie is de kans op een 10% reductie van de voeropname ten hoogste 5%, tegelijkertijd wordt de groei niet negatief beïnvloed.

Op commerciële kwekerijen wordt niet specifiek ammonia (NH_3) gemeten, maar wordt eigenlijk altijd de totale ammonia stikstof concentratie (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 25°C komt de ammonia grenswaarde van 0.34 mg NH_3 -N/L overeen met een TAN concentratie van 60 mg TAN/L bij pH 7.0, 190 mg TAN/L bij pH 6.5 en 600 mg TAN/L bij pH 6.0. Hieruit blijkt dat verlaging van de pH van het kweekwater ammoniavergiftiging kan voorkomen. Hierbij moet echter opgemerkt worden dat niet bekend is of een lage pH waarde van het kweekwater negatieve effecten heeft op voeropname, groei en fysiologie.

De hoogste concentraties van totaal ammonia (NH_4^+ -N + NH_3 -N = TAN) die wij in 2008 gemeten hebben op commerciële Afrikaanse meervalkwekerijen liggen rond de 60 tot 70 mg TAN/L bij een pH van 6.5. Dit komt overeen met een ammonia (NH_3) concentratie van 0.11 tot 0.13 mg NH_3 -N/L. Deze ammoniac concentraties liggen onder de in deze studie vastgestelde grenswaarde voor de ammoniac concentratie en daarom is het onwaarschijnlijk dat de meerval op deze kwekerijen ongerief ondervond van het ammonia in het kweekwater.

5 Conclusies

Uit dit onderzoek blijkt dat voor Afrikaanse meerval de plasma gehalten van ammonium, cortisol, glucose en lactaat en ook plasma osmolaliteit niet de beste indicatoren zijn voor het vaststellen van toxische effecten van chronisch hoge ammonia concentraties in het water. Voeropname en groeisnelheid zijn echter wel goede indicatoren voor ammonia effecten op Afrikaanse meerval gebleken. Wij adviseren daarom dat voor Afrikaanse meerval de ammonia concentratie in het water niet hoger mag worden dan 0.34 mg $\text{NH}_3\text{-N/L}$ om het risico op verminderde voeropname en groei te voorkomen.

6 Kwaliteitsborging

IMARES beschikt over een ISO 9001:2000 gecertificeerd kwaliteitsmanagementsysteem (certificaatnummer: 08602-2004-AQ-ROT-RvA). Dit certificaat is geldig tot 15 maart 2010. De organisatie is gecertificeerd sinds 27 februari 2001. De certificering is uitgevoerd door DNV Certification B.V. Het laatste controlebezoek vond plaats op 22-24 april 2009. Daarnaast beschikt het chemisch laboratorium van de afdeling Milieu over een NEN-EN-ISO/IEC 17025:2005 accreditatie voor testlaboratoria met nummer L097. Deze accreditatie is geldig tot 27 maart 2013 en is voor het eerst verleend op 27 maart 1997; deze accreditatie is verleend door de Raad voor Accreditatie.

Literatuur

- Boeuf, G., Boujard, D., Person-Le Ruyet, J., 1999. Control of the somatic growth in turbot. *J. Fish Biol.* 55A, 128-147.
- Calabrese, E. J., 2005. Paradigm lost, paradigm found: The re-emergence of hormesis as a fundamental dose response model in the toxicological sciences. *Environmental Pollution* 138 (3), 378-411.
- Clay, D., 1977. Preliminary observations on salinity tolerance of *Clarias lazera* from Israel. *Bamidgeh.* 29 (3), 102-109.
- 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.
- Handy, R.D., Poxton, M.G., 1993. Nitrogen pollution in mariculture—toxicity and excretion of nitrogenous compounds by marine fish. *Rev. Fish Biol. Fish.* 3, 205–241.
- Hargreaves J.A., Kucuk S., 2001. Effects of diel un-ionized ammonia fluctuation on juvenile hybrid striped bass, channel catfish, and blue tilapia. *Aquaculture* 195, (1-2) 163-181.
- Heisler, N., 1984. Acid-base regulation in fishes, in: Hoar, W.S., Randall, D.J. (Eds.), *Fish Physiology*, Academic, Orlando, pp. 315–401.
- Hontela, A., Rasmussen, J.B., Audet, C., Chevalier, G., 1992. Impaired cortisol stress response in fish from environments polluted by PAHs, PCBs, and mercury. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 22, 278-283.
- Ip, Y.K., Chew, S.F., Randall, D. J., 2001. Ammonia toxicity, tolerance, and excretion, in: Wright, P.A., Anderson, P.M. (Eds). *Fish physiology* 20. Nitrogen excretion. Academic Press, San Diego, 109–148.
- Ip, Y.K., Chew, S.F., Wilson, J.M., Randall, D.J., 2004a. Defences against ammonia toxicity in tropical air-breathing fishes exposed to high concentrations of environmental ammonia: a review. *J. Comp. Physiol.* 174 (7), 565–575.
- 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. *Physiological and Biochemical Zoology* 77(2), 242-254.
- Knoph, M.B., Thorud, K., 1996. Toxicity of ammonia to Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) in seawater – Effects on plasma osmolarity, 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., van den Burg, E.H., Wendelaar-Bonga, S.E., Flik, G., 2003. Regulation of branchial Na⁺/K⁺-ATPase in common carp *Cyprinus carpio* acclimated to different temperatures. *J. Exp. Biol.* 206, 2273-2280.
- 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, 814-826.
- Martins, C.I., Schrama, J.W., Verreth, J.A.J., 2006a. The effect of group composition on the welfare of African catfish (*Clarias gariepinus*). *Applied Animal Behaviour Science* 97, 323-334.

- Martins, C.I., Schrama, J.W., Verreth, J.A.J., 2006b. The relationship between individual differences in feed efficiency and stress response in African catfish *Clarias gariepinus*. *Aquaculture* 256, 588-595.
- Person-Le Ruyet, J., Galland, R., Le Roux, A., Chartois, H., 1997. Chronic ammonia toxicity in juvenile turbot (*Scophthalmus maximus*). *Aquaculture* 154, 155–171.
- Varsamos, S., Nebel, C., Charmantier, G., 2005. Ontogeny of osmoregulation in postembryonic fish : a review. *Comp. Biochem. Physiol. A* 141(4), 401-429.
- 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.
- 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.
- 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.

Verantwoording

Rapport C026/10
Projectnummer: 430.43029.02

Verantwoording

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: Henk van der Mheen
Afdelingshoofd Aquacultuur

Handtekening:



Datum: 22 maart 2010

Aantal exemplaren:	5
Aantal pagina's:	24
Aantal tabellen:	4
Aantal figuren:	4
Aantal bijlagen:	1

Bijlage A. Figuur 1a tot 1e

Figuur 1 Histologische structuur van kieuwepitheel met zichtbaar gemaakte chloride cellen voor de 4 μM (1a) 14 μM (1b) 38 μM (1c) 176 μM (1d) en 1084 μM (1e) ammonia behandelingen (400 $\times$ vergroot). Verdikking van het epitheel tussen de lamellen en het epitheel van de lamellen (afname van de ruimte tussen de lamellen) neemt toe met de toename van de ammoniacconcentratie. In de 1084 μM behandeling (Figuur 1e) laat een abnormale toename van het aantal cellen zien waardoor de lamellen fuseren. Daarnaast is zwelling van het epitheel en een verhoogde slijmproductie zichtbaar.

