

ONDERZOEK

Hoe giftig zijn ammonia en nitraat voor snoekbaars?

Door Edward Schram¹, Jonathan A.C. Roques^{1,2}, Tiedo van Kuijk³, Wout Abbink¹, Jan van de Heul¹, Pepijn de Vries¹, Stijn Bierman¹, Hans van de Vis¹ and Gert Flik²

¹ IMARES, Wageningen Aquaculture*, IJmuiden.

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

³ Aquatic Ecology and Ecotoxicology, Institute for Biodiversity and Ecosystem Dynamics, Universiteit van Amsterdam.

* Wageningen Aquacultuur is een consortium van IMARES Aquacultuur en AFI (Aquaculture and Fisheries Group, Wageningen university), beiden onderdeel van Wageningen UR.

In intensieve recirculatiesystemen lopen vissen het risico blootgesteld te worden aan ammonia en nitraat. Hoe hoog mogen de nitraat- en ammoniacconcentratie zijn zonder dat dit negatieve effecten heeft op de vissen? IMARES onderzocht dit in samenwerking met de Radboud Universiteit Nijmegen en de Universiteit van Amsterdam voor juveniele snoekbaars. Conclusie: de ammonia (NH₃) concentratie moet onder de 0.05 mg NH₃-N/l gehouden worden. Van nitraat lijken juveniele snoekbaarzen zelfs bij 358 mg NO₃-N/l nog weinig hinder te ondervinden.

Inleiding

Vissen produceren ammonia als eindproduct van het eiwitmetabolisme en scheiden dit via de kieuwen uit naar het water. In water komt ammonia voor als opgelost ammoniak gas (NH₃) en als ammonium ion (NH₄⁺). De verdeling van ammonia over deze beide vormen is met name afhankelijk van de pH en temperatuur. Voor de waterkwaliteit en de giftigheid van ammonia is vooral de ammoniak (NH₃) concentratie van belang. Ammoniak kan de kieuwen van een vis namelijk vrij gemakkelijk passeren en is daardoor van invloed op de ammoniumconcentratie in de vis. Een stijging van de ammoniakconcentratie in het water leidt tot een snelle ophoping van ammonium in het bloed en weefsels van de vis. Ophoping van ammonium in de vis heeft allerlei schadelijke (neuro toxicolo-

gische) effecten. Ammonia vergiftiging uit zich in vis onder andere door verlaagde voeropname en groei en verhoogde sterfte. Om blootstelling aan te hoge ammoniacconcentraties te voorkomen wordt ammonia in recirculatiesystemen in biologische filters door bacteriën omgezet in het veel minder giftige nitraat (nitrificatie). Nitraat hoopt zich hierdoor op in het kweekwater. Hoe hoog de nitraatconcentratie wordt, is van meerdere factoren afhankelijk, zoals de pH, de mate van verversing van het kweekwater



en de eventuele omzetting van nitraat in stikstofgas (denitrificatie). Nitraat is veel minder giftig voor vissen dan ammoniak. De nitraatconcentraties waaraan vissen in recirculatiesystemen worden blootgesteld kunnen behoorlijk oplopen en liggen over het algemeen tussen de 50 en 200 mg nitraatstikstof /L. Helemaal onschadelijk is nitraat echter niet. Voor Afrikaanse meerval vonden we in eerder onderzoek dat gehalten boven de 140 mg nitraatstikstof /L nitraat een fors negatief effect hebben op de voeropname en groei (zie *Aquacultuur* 27(6), 2012). Voor snoekbaars waren de effecten en grenswaarden voor ammoniak en nitraat nog niet bekend. Wij onderzochten daarom in twee afzonderlijke experimenten hoe hoog de ammoniak en nitraatconcentraties in het kweekwater mogen oplopen zonder dat dit negatieve effecten heeft op de voeropname, groei en fysiologie van jonge snoekbaars.

Ammoniak experiment

Het ammoniak experiment maakte gebruik van 14 groepen van 12 juveniele snoekbaars met een gemiddeld gewicht van 18g. Elke groep werd gehuisvest in een aquarium van 30 liter. Na een gewenningsperiode van 7 dagen, werden op de eerste dag van het experiment twee groepen bemonsterd om uitgangswaarden vast te stellen. Op de andere 12 groepen werd een van zes behandelingen toegepast (twee groepen per behandeling): 0.01, 0.05, 0.07, 0.10, 0.16 en 0.26 mg $\text{NH}_3\text{-N/L}$. De aquaria werden doorstroomd met leidingwater. De ammoniak behandelingen werden gerealiseerd door met een peristaltische pomp een geconcentreerde ammoniumchloride oplossing te doseren. Dagelijks werd de totale ammoniak (het totaal van NH_3 en NH_4^+) gemeten. Op basis van de gemeten concentraties totaal ammoniak, de temperatuur (23.8°C) en de pH (uiteenlopend van 7.00 tot 8.18) werd per aquarium de NH_3 concentratie berekend

met behulp van Tabel 9 in <http://fisheries.org/hatchery>. De vissen werden bij de start en het einde van het experiment gewogen. De vissen werden tweemaal per dag met de hand gevoerd tot de maximale voeropname was bereikt. De dagelijkse voergift per tank werd opgeschreven. Het experiment werd na 42 dagen gestopt. Van alle vissen in het experiment zijn na de proef bloedmonsters, bloedplasmamonsters en kieuwmonsters genomen.

Effecten van ammoniak op snoekbaars

Vissen produceren ammoniak als eindproduct van het eiwitmetabolisme. Om vergiftiging te voorkomen wordt ammoniak via de kieuwen uitgescheiden naar het water. Hoge ammoniak concentraties in het water leiden echter tot ammoniak opname door de vis. Om onder deze omstandigheden ammoniakvergiftiging te voorkomen, kunnen vissen diverse verdedigingsmechanismen inschakelen. Juveniele snoekbaars bleek in staat om de ammoniumconcentratie in het lichaam (gemeten in het plasma) laag te houden tot en met ammoniak gehalten in het water van 0.16 mg $\text{NH}_3\text{-N/L}$. Bij de hoogste ammoniakconcentratie in het water in ons experiment (0.26 mg $\text{NH}_3\text{-N/L}$) bleek de plasmaconcentratie zich verdubbeld te hebben. Ergens tussen de 0.16 en 0.26 mg $\text{NH}_3\text{-N/L}$ in het water is juveniele snoekbaars blijkbaar niet meer in staat zich te verdedigen tegen het binnenkomende ammoniak. Bij de hoogste ammoniakconcentratie in het experiment vertoonden de vissen ook een verstoring van het chloride evenwicht in het plasma. Effecten op de kieuwen, zoals in meerval, en stress werden echter niet waargenomen.

Vissen kunnen onder andere ammoniakvergiftiging tegengaan door de eigen ammoniakproductie te verlagen door minder te eten. Snoekbaars lijkt deze verdediging ook toe te passen gezien het effect van ammoniak op de voeropname van juveniele

snoekbaars (Fig. 1). In het experiment werden de ammoniakconcentraties geleidelijk opgebouwd. Zodra de ammoniakconcentratie te hoog werd, leidde dit onmiddellijk tot een lagere voeropname en uiteindelijk een lagere productie. De voeropname, of beter gezegd een te lage voeropname, is dus een goede indicator voor een mogelijk te hoge ammoniakconcentratie. Om vast te stellen vanaf welke ammoniakconcentratie de voeropname en groei negatief beïnvloed worden, hebben we de 10% effect concentraties (EC_{10}) voor voeropname en groei uitgerekend. De EC_{10} is de ammoniakconcentratie waarbij ten opzichte van de controlegroep een verlaging van 10% van de voeropname of groei optreedt (Fig. 2a en 2b). Op basis hiervan adviseren wij de ammoniakconcentratie in het kweekwater van juveniele snoekbaars niet hoger te laten worden dan 0.05 mg NH_3 -N/L. Snoekbaars blijkt dus veel gevoeliger voor ammoniak te zijn dan Afrikaanse meerval. De effecten

van ammoniak op voeropname en groei zijn weliswaar vergelijkbaar voor snoekbaars en Afrikaanse meerval. Echter, deze effecten treden bij meerval pas op bij een veel hogere ammoniakconcentratie (geadviseerde 0.34 mg NH_3 -N/L).

De grenswaarde wordt uitgedrukt in ammoniakstikstofconcentratie (NH_3 -N). Op commerciële viskwekerijen wordt meestal niet ammoniak (NH_3) maar eigenlijk altijd de totale ammonia stikstof concentratie (T_{amm} of TAN) gemeten. Dit is het totaal van NH_4^+ -N en NH_3 -N. De verhouding tussen ammonium (NH_4^+) en ammoniak (NH_3) is afhankelijk van de temperatuur, zoutgehalte en vooral de pH waarde van het kweekwater. In zoetwater van 25°C en een geleidbaarheid van 2500 $\mu S/cm$ komt de ammoniakgrenswaarde van 0.05 mg NH_3 -N/L overeen met een totaal ammoniaconcentratie van ongeveer 10 mg N/L bij pH 7.0, met 34 mg N/L bij pH 6.5 en met 1008 mg N/L bij pH 6.0. In Figuur 3 kan worden afgelezen bij welke

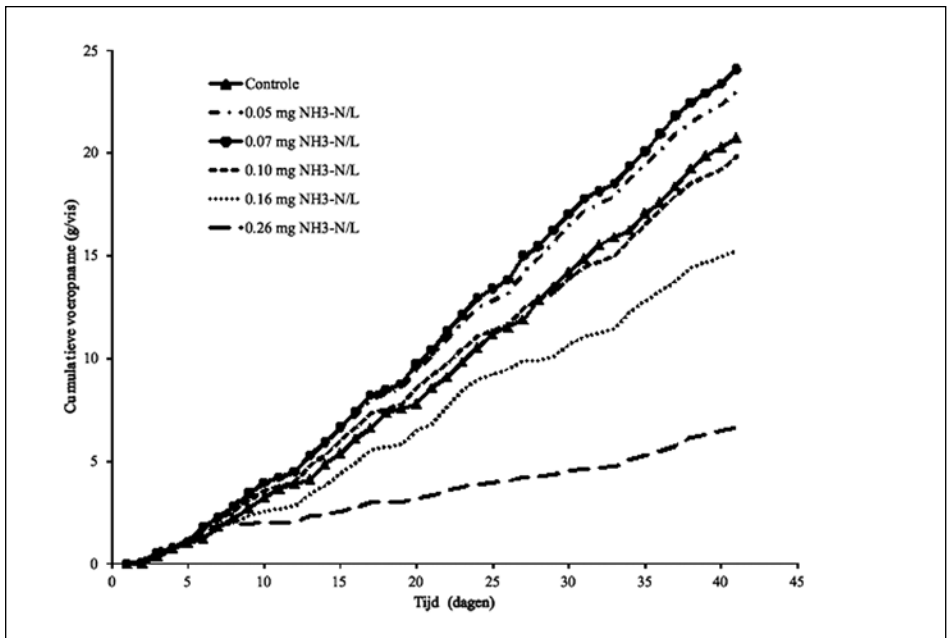


Fig. 1. Cumulatieve voeropname door juveniele snoekbaars tijdens blootstelling aan ammoniak.

totale ammoniakconcentratie en de pH de ammoniakgrenswaarde van 0.05 mg N/L bereikt wordt voor drie verschillende temperaturen. Onder de lijn voor een bepaalde temperatuur is de ammoniakconcentratie lager dan de grenswaarde; daarboven wordt de grenswaarde overschreden. Figuur 3 is van toepassing op water van 20, 23 en 25°C en een geleidbaarheid van 2500 $\mu\text{S}/\text{cm}$. Het ammoniaktaandeel in de totale ammoniakconcentratie neemt toe als het water warmer wordt. Voor water warmer dan 25°C wordt de grenswaarde dus al bij een lagere totale ammoniakconcentratie bereikt. Voor geleidbaarheid geldt het omgekeerde: als de geleidbaarheid stijgt,

neemt het ammoniaktaandeel in de totale ammoniakconcentratie af.

Nitraatexperiment

Het nitraatexperiment maakte gebruik van 18 groepen van 12 juveniele snoekbaarzen met een gemiddeld gewicht van 27g. Elke groep werd gehuisvest in een aquarium van 30 liter. Na een gewenningsperiode van 14 dagen werden op de eerste dag van het experiment twee groepen bemonsterd om uitgangswaarden vast te stellen. Op de andere 12 groepen werd een van acht behandelingen toegepast (twee groepen per behandeling): 1.4, 20, 32, 52, 85, 143, 221 en 358 mg $\text{NO}_3\text{-N}/\text{L}$. De aquaria werden

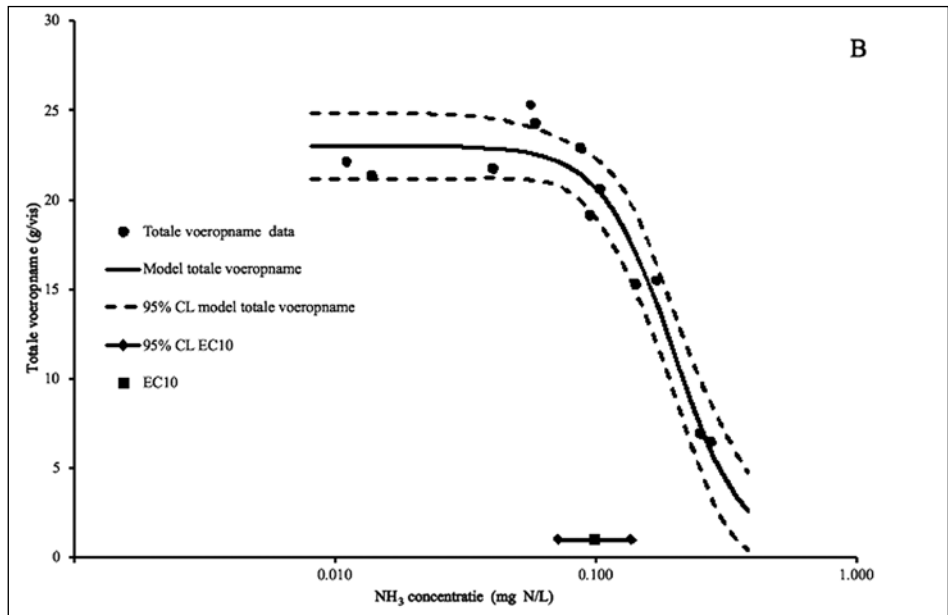


Fig. 2 De concentratie-effectcurves voor specifieke groeisnelheid (SGR, A) en totale voeropname (B). De (●) vertegenwoordigen de werkelijk gemeten waarden (data). De lijn betreft het op basis van de data gefitte model. De stippellijnen zijn de onder- en bovengrenzen van het 95% betrouwbaarheidsinterval van de gefitte lijnen. De EC_{10} is de berekende ammoniakconcentratie waarbij een effect van 10% ten opzichte van de controlebehandelingen optreedt. Ook voor de EC_{10} is een 95% betrouwbaarheidsinterval berekend; het gebied waarin de EC_{10} met 95% zekerheid valt. De ondergrens van het 95% betrouwbaarheidsinterval voor SGR is als grenswaarde voor ammoniak genomen.

doorstroomd met leidingwater. De nitraat-behandelingen werden gerealiseerd door met een peristaltische pomp een geconcentreerde natriumnitraatoplossing te doseren. De vissen werden bij de start en het einde van het experiment gewogen. De vissen werden tweemaal per dag met de hand gevoerd tot de maximale voeropname was bereikt. Het experiment werd na 42 dagen gestopt. Van alle vissen in het experiment zijn na de proef bloedmonsters, bloedplasma-monsters en kieuwmonsters genomen.

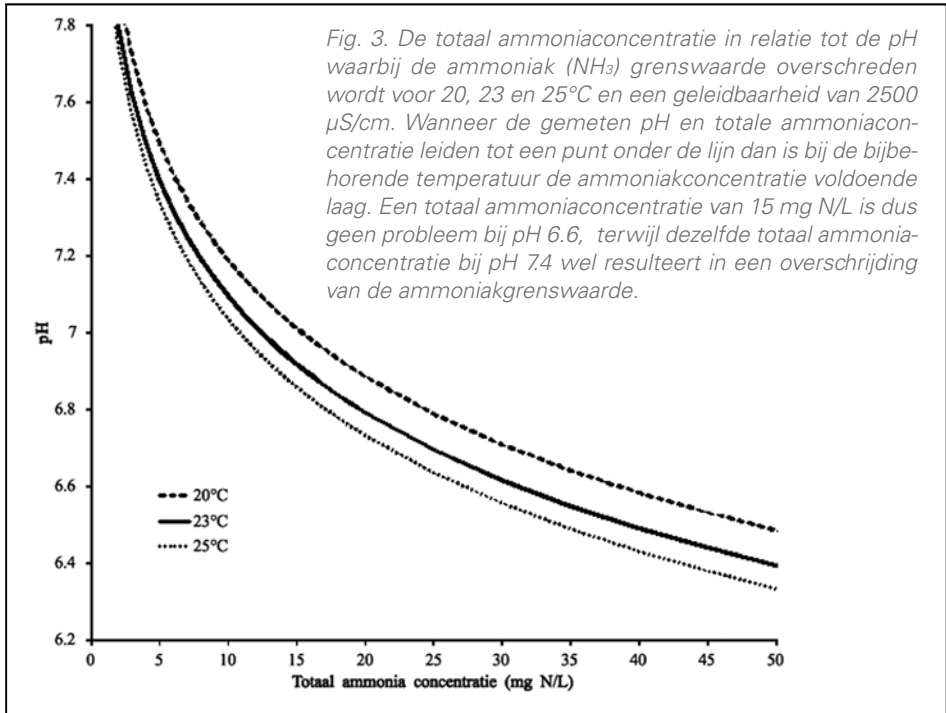
Effecten van nitraat op snoekbaars

Chronische blootstelling van vis aan nitraat leidt tot accumulatie van nitraat in het lichaam. In snoekbaars nam de plasmaconcentratie van nitraat lineair toe met toenemende nitraatconcentratie in het water. De accumulatie van nitraat in het plasma was zeer vergelijkbaar met onze eerdere observaties in Afrikaanse meerval (zie *Aquacultuur* 27(6), 2012). Het verbaasde ons daarom ook dat we, in tegenstelling tot meerval, in snoekbaars geen effecten van nitraat op voeropname en groei vonden, zelfs niet bij een nitraatconcentratie in het water van 358 mg NO₃-N/L. Er zijn duidelijk verschillen in gevoeligheid voor nitraat tussen vissoorten en deze verschillen hangen blijkbaar niet samen met het vermogen van een vissoort om nitraat buiten het lichaam te houden. In plaats daarvan lijkt het veel belangrijker wat er in het lichaam met nitraat gebeurt. De specifieke groeisnelheid van de snoekbaars in ons nitraatexperiment was 2.26%/d. Deze groeiprestatie komt overeen met de groei op commerciële Deense snoekbaarskwekerijen bij dezelfde temperatuur (23.0°C). Het is dus niet waarschijnlijk dat negatieve effecten van nitraat onopgemerkt bleven in ons experiment omdat de vissen in de controlegroepen al slecht groeiden. Nitraat bleek geen effect te hebben op de kieuwen en ook geen stress te veroorzaken. De nitraatconcentratie waarboven negatieve effecten optreden bij juveniele

snoekbaars lijkt buiten de door ons geteste concentratie reeks te liggen. Als veilige nitraat grenswaarde adviseren wij daarom 358 mg NO₃-N/L aan te houden, de hoogste concentratie in het experiment waarbij geen negatieve effecten werden waargenomen. De grenswaarde wordt uitgedrukt als de nitraatstikstof concentratie (NO₃-N/L). Sommige testkits die op kwekerijen gebruikt worden, meten de nitraatconcentratie (NO₃/L) en niet de nitraatstikstof concentratie. De nitraatconcentratie is grofweg viereneenhalf keer zo hoog als de nitraatstikstofconcentratie (exact 4.43 keer). De grenswaarde van 358 mg NO₃-N/L komt dus overeen met 1585 mg NO₃/L.

Het effect van visgrootte op de grenswaarden voor ammoniak en nitraat

Toxicologisch onderzoek worden in veel gevallen om praktische en financiële redenen uitgevoerd met kleine vissen. Ook wij hebben dit onderzoek uitgevoerd met kleine snoekbaars. De giftigheid van stikstofverbindingen varieert echter met de grootte en het levensstadium van vissoorten. Van regenboogforel is bekend dat de gevoeligheid voor ammoniak afneemt tijdens de ontwikkeling van larve tot juveniele vis. Van alle levensstadia is regenboogforel in het juveniele stadium het minst gevoelig voor ammoniak. Naarmate regenboogforel ouder wordt, neemt de gevoeligheid weer toe. Van larvale stadia is bekend dat ze veel gevoeliger zijn voor nitraat dan de juveniele stadia. Of de nitraatgevoeligheid van vissen toeneemt of juist afneemt na het juveniele stadium is niet bekend. Van nitriet is wel bekend dat vissen er na het juveniele stadium weer gevoeliger voor worden. Specifiek voor snoekbaars is het effect van levensstadium en visgrootte op gevoeligheid voor ammoniak en nitraat niet onderzocht. Gezien de bevindingen bij andere vissoorten is het echter waarschijnlijk dat de gevoeligheid ook voor snoekbaars niet voor elk stadium gelijk is.



Dit betekent dat voorzichtigheid geboden is zodra de gevonden grenswaarden worden toegepast op vissen kleiner of groter dan het formaat dat wij getest hebben (17-28g). Over het algemeen zijn de larvale stadia gevoeliger dan het juveniele stadium. De ammoniak- en nitraatgrenswaarden voor snoekbaarslarven zijn daarom waarschijnlijk lager dan de grenswaarden die wij voor juveniele snoekbaars hebben gevonden. Er zijn geen directe aanwijzingen dat oudere snoekbaarsen gevoeliger zijn voor nitraat of ammoniak dan juveniele snoekbaarsen. De grenswaarden kunnen daarom voorzichtig worden toegepast op grote snoekbaars, waarbij in acht genomen moet worden dat de werkelijke grenswaarden mogelijk wat lager zijn. Het nauw volgen van de voeropname is dan een belangrijk hulpmiddel omdat zowel een te hoge ammoniak als een te hoge nitraatconcentratie leidt tot

een acute afwijking naar beneden van de verwachte voeropname. Uit navraag bij de Nederlandse snoekbaarskwekers en eigen metingen op kwekerijen blijkt dat in de praktijk de grenswaarden voor ammoniak en nitraat niet overschreden worden.

Dit Beleidsondersteunend Onderzoek is uitgevoerd in samenwerking met de Radboud Universiteit Nijmegen in opdracht van het Ministerie van Economische Zaken.

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

Dit artikel is een samenvatting van Schram et al. 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.