Vlaanderen
is omgeving

Leidraad ter bevordering van het welzijn van zebravissen in proefdierfaciliteiten

DEPARTEMENT
OMGEVING

omgeving.vlaanderen.be

Dit rapport bevat de mening van externe auteurs en niet noodzakelijk die van de Vlaamse overheid.

COLOFON

Verantwoordelijke uitgever
Peter Cabus
Departement Omgeving
Koning Albert II-laan 20 bus 8, 1000 Brussel
www.omgeving.vlaanderen.be

Een uitgave van het Departement Omgeving, afdeling Dierenwelzijn
dierenwelzijn@vlaanderen.be

Auteurs
Charlotte Philippe, Lucia Vergauwen, Chris Van Ginneken, Gudrun De Boeck, Dries Knapen

Afdeling Dierenwelzijn, Departement Omgeving

Externe specialisten
Johan Aerts (UGent), Stef Aerts (Odisee), Gert Flik (Radboud Universiteit), Ann Huysseune (UGent), Kathleen Lambaerts (KULeuven), Christel Moons (UGent), Ruud van den Bos (Radboud Universiteit), Hilda Witters (VITO)

Publicatiedatum
1 februari 2023

Coverfoto
© Novartis AG, Dr. Peixin Zhu

Depotnummer
D/2023/3241/052

Contact
Voor vragen of opmerkingen over de leidraad kunnen de auteurs gecontacteerd worden via e-mail: leidraad.zebravis@uantwerpen.be.

PARTNERS

Universiteit Antwerpen

INHOUDSTAFEL

Hoofdstuk 1: Inleiding tot de leidraad 5
1.1 Waarom deze leidraad? 5
1.2 Opbouw van de leidraad 6
1.3 Lijst van afkortingen 6
Hoofdstuk 2: Kader van deze leidraad 7
Hoofdstuk 3: De zebravis als proefdier 8
Hoofdstuk 4: Dierenwelzijn 9
4.1 Noodzaak van dierenwelzijn in onderzoek 9
4.2 Welzijnsindicatoren 9
4.2.1 Overleving 10
4.2.2 Levensgeschiedenis 11
4.2.3 Gedrag 11
4.2.4 Fysiologie 13
4.3 Conclusie 14
Hoofdstuk 5: Huisvesting in zebravisfaciliteiten 15
5.1 Fysieke huisvesting 15
5.1.1 Type huisvestingssysteem 15
5.1.2 Eigenschappen van de aquaria 15
5.1.3 Eigenschappen van de ruimte 15
5.2 Water 16
5.2.1 Introductie 16
5.2.2 Filters 16
5.2.3 Waterparameters 17
5.2.4 AANBEVELINGEN: WATER 21
5.3 Licht 21
5.3.1 Fotoperiode 21
5.3.2 Intensiteit 22
5.3.3 Golflengte 22
5.3.4 Graduele verandering licht 23
5.3.5 AANBEVELINGEN: LICHT 23
5.4 Trillingen 23
5.4.1 Het gehoor van zebravissen 23
5.4.2 Omgevingsgeluiden 24
5.4.3 AANBEVELINGEN: TRILLINGEN 24
5.5 Densiteit 25
5.5.1 Introductie 25
5.5.2 Larvale densiteit 25
5.5.3 Adulte densiteit 26
5.5.4 AANBEVELINGEN: DENSITEIT 28
Hoofdstuk 6: Verzorging in zebravisfaciliteiten 29
6.1 Verrijking 29
6.1.1 Structurele verrijking 29
6.1.2 Nutritionele verrijking 30
6.1.3 Visuele verrijking 30
6.1.4 Auditieve verrijking 31
6.1.5 Sociale verrijking 31
6.1.6 AANBEVELINGEN: VERRIJKING 31
6.2 Voeding 31
6.2.1 Hoeveelheid 32
6.2.2 Soorten voeding 32
6.2.3 Voedingsschema 34
6.2.4 AANBEVELINGEN: VOEDING 34
6.3 Hygiëne en gezondheidsmonitoring 35

6.3.1 Hygiëne 35
6.3.2 Gezondheidsmonitoring 36
6.3.3 AANBEVELINGEN: HYGIËNE EN GEZONDHEIDSMONITORING 38
Hoofdstuk 7: Handelingen in zebravisfaciliteiten 39
7.1 Vangen en verplaatsen van vissen 39
7.1.1 AANBEVELINGEN: VANGEN EN VERPLAATSEN VAN VISSEN 40
7.2 Reproductie 40
7.2.1 Hormonale stimulatie 40
7.2.2 Eigenschappen van broedaquaria 41
7.2.3 Samenstelling broedgroep 41
7.2.4 Effect van fotoperiode 41
7.2.5 Embryoproductie 42
7.2.6 AANBEVELINGEN: REPRODUCTIE 42
7.3 Pijnstilling, verdoving en humaan doden 43
7.3.1 Pijnstilling of analgesie 43
7.3.2 Verdoving of anesthesie 43
7.3.3 Humaan doden 45
7.3.4 AANBEVELINGEN: PIJNSTILLING, VERDOVING, HUMAAN DODEN 47
Hoofdstuk 8: Monitoring en evaluatie welzijn 49
8.1 Dagelijkse welzijnscontrole 49
8.2 Scoringsmethodes 50
8.3 Performantie monitoring 50
8.4 AANBEVELINGEN: WELZIJNSCONTROLE 51
Referenties 52
Appendix 1: Huishouding en welzijn van zebravissen in Vlaamse faciliteiten 63
Appendix 2: Scoretabel dagelijkse welzijnscontrole 77

HOOFDSTUK 1: INLEIDING TOT DE LEIDRAAD

1.1 WAAROM DEZE LEIDRAAD?

Het werken met proefdieren, zoals zebravissen, moet gebeuren binnen de bestaande, wettelijke kaders. De regelgeving rond het werken met proefdieren in Vlaanderen kan worden teruggevonden in Richtlijn 2010/63/EU van het Europees parlement (Directive 2010), de Dierenwelzijnswet (FOD Volksgezondheid 2012) en het KB van 29 mei 2013 (FOD Volksgezondheid 2013). Verzorgers en onderzoekers die met proefdieren werken moeten hiervoor opgeleid zijn. Deze opleidingen zijn echter vooral gefocust op de meest gebruikte proefdieren, namelijk knaagdieren. De huisvesting en verzorging van vissen verschilt op vele gebieden van deze van knaagdieren. Verder zijn er ook veel soortspecifieke eisen die moeten gekend zijn om de juiste verzorging aan een proefdier te bieden. De bestaande Europese normen zoals Annex III van Richtlijn 2010/63/EU (2010) komen hier slechts in beperkte mate aan tegemoet en moeten dus steeds toegepast worden rekening houdend met de typerende eigenschappen van de soort. Dit is een valkuil aangezien het veel ruimte voor vrije interpretatie van de regels laat (Toni et al. 2019). Duidelijke aanbevelingen voor het huisvesten van zebravissen met de bijgaande referenties naar de studies waarop deze aanbevelingen gebaseerd zijn, bieden een manier om de Europese richtlijn met wetenschappelijke correctheid toe te passen (Toni et al. 2019).

Niet alleen het verzorgen van de proefdieren is belangrijk, ook het beoordelen van hun welzijn moet correct kunnen gebeuren. Terwijl de inschatting van het welzijn van zoogdieren in laboratoria goed onderbouwd is, zijn de richtlijnen voor het waarborgen van het welzijn van vissen in proefdierfaciliteiten momenteel veel minder duidelijk en eenduidig, en onvoldoende wetenschappelijk onderbouwd. Om deze op te stellen is een grondige kennis vereist van de fysiologie en ecologie van elke gebruikte vissoort (Toni et al. 2019). Elke soort heeft zijn eigen fysieke en chemische vereisten die resulteren in verschillende optimale parameters op vlak van huisvesting, sociale omgeving en behandeling. Een helder kader om het welzijn van zebravissen in de praktijk te waarborgen en op te volgen ontbreekt. Omdat de zebravis het meest gebruikte vismodel ter wereld is, werd al veel onderzoek gedaan naar de specifieke vereisten en karakteristieken van deze soort die belangrijk zijn voor de huisvesting en het welzijn. Bij het starten van een onderzoeksproject hebben onderzoekers echter vaak de tijd niet om zich in deze welzijnsliteratuur in te werken, en wordt er vooral gefocust op het wetenschappelijk onderzoeksdomein. Verder zijn een deel van de richtlijnen die in omloop zijn voor zebravissen niet rechtstreeks gestoeld op wetenschappelijk onderzoek. Het is belangrijk zich bewust te zijn van welke zaken effectief wetenschappelijk onderbouwd zijn, en over welke richtlijnen er nog onduidelijkheid bestaat. Ten slotte zijn richtlijnen in zebravisfaciliteiten doorgaans gebaseerd op persoonlijke ervaringen en worden ze doorgegeven tussen verschillende onderzoekers en verzorgers, met als gevolg dat er discrepanties kunnen zijn tussen de faciliteiten. Zowel in het belang van het dierenwelzijn als de kwaliteit van het wetenschappelijk onderzoek moet dit zo veel mogelijk vermeden worden.

Deze leidraad vat de bestaande literatuur samen en probeert aan de hand daarvan aanbevelingen en “good practices” naar voor te schuiven die wetenschappelijk onderbouwd zijn. Een deel van deze aanbevelingen kunnen ook inspiratie bieden voor het verbeteren van het welzijn in visfaciliteiten die met andere vismodellen werken, maar een gelijkaardige set kenmerken vertonen. Kleine tropische vissen zoals medaka of killivissen komen hiervoor bijvoorbeeld in aanmerking. Uiteraard moet er steeds nagegaan worden of er geen soortspecifiek onderzoek bestaat, dat in bepaalde opzichten waardevollere inzichten kan bieden.

1.2 OPBOUW VAN DE LEIDRAAD

Deze leidraad bestaat uit verschillende hoofdstukken:

- Hoofdstukken 2-4: Informatieve hoofdstukken
  - Hfst 2: Beschrijving van het kader waarbinnen deze leidraad werd opgesteld
  - Hfst 3: Cijfers over het gebruik van de zebravis als proefdier in Vlaanderen
  - Hfst 4: Theoretisch kader rond dierenwelzijn, pijn en de detectie ervan, toegepast op de zebravis
- Hoofstukken 5-7: Thematische hoofdstukken, bestaande uit hoofdthema's en subthema's
  - Overzicht van de bestaande literatuur en beschrijving van de hiaten
  - Aanbevelingen voor faciliteiten op basis van deze literatuur
- Hoofdstuk 8: Monitoring
  - Aanreiken van methodes om het welzijn in de faciliteit op te volgen

1.3 LIJST VAN AFKORTINGEN

3V	Vervanging, vermindering en verfijning
BCS	Body condition score
dGh	Degrees of general hardness
dpf	Dagen post fertilisatie
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
FOD	Federale overheidsdienst
GFP	Green fluorescent protein
KB	Koninklijk besluit
KH	Carbonaathardheid
L/D	Licht-donker regime
MS-222	Tricaine methanesulfonate
OBR	Opercular beat rate
OECD	Organisation for Economic Co-operation and Development
RO	Reverse osmosis
TL	Tube Light (fluorescentielamp)
UV	Ultraviolet

HOOFDSTUK 2: KADER VAN DEZE LEIDRAAD

Deze leidraad is het eindproduct van een project rond de bevordering van het welzijn van zebravissen in proefdierfaciliteiten, gefinancierd door de Vlaamse overheid, dat op 1/9/2020 startte (besteknummer DO/SID/DWZ/OO/19/07). De doelstelling was een wetenschappelijk onderbouwde leidraad met aanbevelingen op te stellen, met vooral aandacht voor huisvesting en verzorging, dagelijkse handelingen, anesthesie en humaan doden. Dit document kan daarom gebruikt worden bij het opzetten of bijsturen van een zebravisfaciliteit, om parameters voor zebravishuisvesting te raadplegen en advies te verzamelen over dagelijkse handelingen. Voor de opvolging van dit project werd een stuurgroep samengesteld bestaande uit experten uit verschillende vakgebieden. De stuurgroep werd nauw betrokken bij beslissingen en mijlpalen in het project.

In een eerste fase van het project werd een uitgebreide literatuurstudie uitgevoerd om de bestaande kennis over de effecten van de mogelijke stressoren voor zebravissen in proefdierfaciliteiten te inventariseren en te analyseren. Op basis van deze literatuurstudie werden de belangrijkste hiaten in de huidige kennis geïdentificeerd. Verder werd er een enquête afgenomen bij de onderzoekslaboratoria in Vlaanderen die zebravissen als proefdier inzetten om inzicht te krijgen in de dagdagelijkse huisvestingspraktijk. Nadien werden feedbackgesprekken georganiseerd om de resultaten van de enquête grondiger te analyseren en te duiden. Op basis van deze enquête werden verbeterpunten en prioriteiten geïdentificeerd die het welzijn van de dieren op een realistische manier zouden kunnen verhogen. Ten slotte werden ook de prioriteiten van de stuurgroep bepaald via een bevraging. Op basis van de literatuurstudie en de enquête werden prioritaire hiaten geïdentificeerd die in het project verder onderzocht worden aan de hand van een beperkte set gerichte experimenten.

Met behulp van alle verzamelde en gegenereerde informatie werd de leidraad opgesteld. Deze leidraad bevat wetenschappelijk onderbouwde en praktisch realiseerbare aanbevelingen om het welzijn van zebravissen in proefdierfaciliteiten te bevorderen. Het doel is voornamelijk aanbevelingen mee te geven om het welzijn tijdens dagelijkse huisvesting te optimaliseren. Deze kunnen echter ook gebruikt worden om in bepaalde experimentele huisvestingen keuzes te maken die het welzijn van de vissen bevordert, om het experiment zo te verfijnen.

HOOFDSTUK 3: DE ZEBRAVIS ALS PROEFDIER

De zebravis was in 2020 het derde meest gebruikte proefdier in Vlaanderen (7.3%), na muizen (57.7%) en kippen (18.1%). In de periode tussen 2015 en 2020 varieerde het aandeel vissen (inclusief hergebruik) in het totale proefdiergebruik in Vlaanderen tussen 9 en 24% (Tabel 1, Statistieken Proefdieren Vlaanderen). Zebravissen vormen hierin het grootste aandeel, met 55 tot 87% van alle vissen. Het gebruik van zebravissen situeert zich vooral in fundamenteel onderzoek en in translationeel en toegepast onderzoek (Statistieken Proefdieren Vlaanderen).

Tabel 1: Aantal gebruikte proefdieren inclusief hergebruik in Vlaanderen over de periode 2015-2020 (bron: Statistieken Proefdieren Vlaanderen)

	2015	2016	2017	2018	2019	2020
Zebravissen	36616 (64%*, 15%$)	34307 (81%*, 14%$)	24440 (77%*, 9%$)	16941 (55%*, 7%$)	30182 (87%*, 12%$)	16121 (86%*, 7%$)
Andere vissoorten	20222	8294	7299	13980	4647	2682
Alle vissoorten	56838 (24%$)	42601 (17%$)	31739 (12%$)	30921 (12%$)	34829 (14%$)	18803 (9%$)
Alle diersoorten	241221	245758	263575	262479	253433	220609

* percentage van alle vissoorten, $ percentage van alle diersoorten

In heel België varieert het aandeel vissen in het totale proefdiergebruik, afhankelijk van het jaar, tussen 10% en 20% (EU-statistieken België). In 2020 was dit uitzonderlijk maar 6,4%. Verder bestond het gebruik van vissen in België in 2020 voor 81% uit zebravissen en voor 19% uit andere vissoorten. Ook op het niveau van de Europese unie is de zebravis de derde meest gebruikte diersoort als proefdier, na muizen en ratten (Mocho and Pereira 2022).

Zebravissen zijn zeer geschikt als modelorganisme in onderzoek omwille van verschillende redenen. Allereerst zijn het kleine vissen, die bovendien niet agressief van aard zijn. Daardoor kunnen ze aan relatief hoge densiteiten gehouden worden zonder veel plaats in te nemen. Er zijn commerciële huisvestingssystemen beschikbaar om dit te optimaliseren. Ze zijn gemakkelijk te kweken (Lawrence 2007) en produceren veel embryo's die op synchrone en gestandaardiseerde wijze op korte tijd ontwikkelen tot larvale vissen. Aangezien het embryo een doorzichtige eischaal heeft, kan de volledige ontwikkeling in detail opgevolgd worden. Zebravissen worden beschermd door de wetgeving op proefdieren vanaf de 5^{e} dag na de bevruchting of vanaf de leeftijd van 120 uur (Directive 2010). Er wordt al verschillende decennia onderzoek gedaan op deze soort, waardoor een goed bestudeerde biochemische en genetische achtergrond beschikbaar is (Gronquist and Berges 2013). Het genoom vertoont een grote homologie met het menselijk genoom, hetgeen interessant is voor toepassingen in de medische onderzoekswereld (Barbazuk et al. 2000). Ten slotte zijn er verschillende zebravislijnen beschikbaar. De meest gebruikte wildtype lijnen zijn TU, AB, WIK en "Tupfel long fin" (Nasiadka and Clark 2012). Mutante lijnen zijn lijnen die één of meer mutaties dragen, zoals de casper lijn waarin twee mutaties voorkomen die zich uiten in een fenotype met hypopigmentatie, waardoor de huid en schubben bijna transparant zijn (Harper and Lawrence 2016). Transgene lijnen bezitten DNA van een andere soort dat opzettelijk in hun genoom werd geïntegreerd. Veel transgene lijnen gebruiken fluorescerende reportergenen, zoals groen fluorescerend eiwit (GFP), om specifieke cel- of weefseltypen te labelen (Harper and Lawrence 2016).

In Vlaanderen, zoals nagegaan in een enquête uitgevoerd tijdens dit project, worden zebravissen als proefdier gebruikt in onderzoek naar medische toepassingen (ziektemodellering), (eco)toxicologie, neurobiologie, ontwikkelingsbiologie… De volledige enquête kan geraadpleegd worden in Appendix 1.

HOOFDSTUK 4: DIERENWELZIJN

4.1 NOODZAAK VAN DIERENWELZIJN IN ONDERZOEK

Het welzijn van een vis weerspiegelt de interne staat van het dier. Het omvat zowel het fysieke als het mentale welbehagen. Een vis moet dus gezond zijn, maar ook mentaal gestimuleerd worden om het gedrag te kunnen uitoefenen waarvoor een hoge interne motivatie bestaat (Mellor 2016). In de recente literatuur wordt steeds meer aangetoond dat vissen, net als knaagdieren, gevoelig zijn aan stress en pijn, doordat ze pijnreceptoren bezitten (Brown 2015, Deakin et al. 2019b). De neuro-endocriene as, waarvan het bestaan bij zebravissen werd aangetoond, zorgt er voor dat prikkels doorgestuurd worden naar het brein, waardoor vissen pijn kunnen voelen (Deakin et al. 2019b). Elke handeling die pijn of nadelige effecten vermijdt of minimaliseert, op elk moment tijdens het leven, verbetert het welzijn (Buchanan-Smith 2005). Daarnaast wordt ook het belang van positieve ervaringen voor het proefdier steeds meer erkend (Mellor 2016).

Het is wettelijk verplicht om het welzijn van proefdieren te garanderen en te maximaliseren. Dit op basis van de Richtlijn 2010/63/EU van het Europees parlement (Directive 2010), de Dierenwelzijnswet (FOD Volksgezondheid 2012) en het KB van 29 mei 2013 (FOD Volksgezondheid 2013). Een aspect hiervan is dat experimenten met proefdieren volgens het 3V-principe moeten verlopen. 'Vervangen' heeft als doel zo veel mogelijk manipulaties of experimenten met proefdieren te vervangen door alternatieven (vb. in vitro of in silico modellen) (Infopunt-proefdieronderzoek 2022) 'Verminderen' is het verminderen van het aantal proefdieren, door bijvoorbeeld met behulp van wetenschappelijk onderbouwde poweranalyses het minimum aantal benodigde proefdieren te laten berekenen waarmee resultaten statistisch aangetoond kunnen worden (RE-Place). De laatste V staat voor 'Verfijnen'. Een experiment met proefdieren verfijnen betekent dat (potentiële) vormen van pijn, angst en letsels dat tijdens het leven van het betrokken dier kunnen optreden, vermeden of geminimaliseerd worden. Het is daarbij belangrijk dat dit van toepassing is op elke fase van het experimenteel proces: huisvesting, experiment en nabehandeling (Gazzano and Mariti 2019). Recent werd naast de 3V's ook "Culture of Care" aangestipt als belangrijke parameter voor het bewaken van het dierenwelzijn. Binnen deze visie wordt veel belang gehecht aan opleiding van en open communicatie tussen proefdiergebruikers, evenals evaluaties van projecten en experimenten. Op die manier kunnen nieuwe ideeën en inzichten met betrekking tot het welzijn van de proefdieren zo snel mogelijk gecommuniceerd en geïmplementeerd worden.

Naast het wettelijk kader is er binnen de wetenschappelijke wereld consensus over het belang van welzijns-monitoring en opvolging om een bijkomende reden. Verminderd welzijn van een dier kan de resultaten van een studie beïnvloeden, aangezien stress kan inwerken op verschillende organismale niveaus, gaande van fysiologie, tot levensgeschiedeniskenmerken en gedrag. Het welzijn van het dier heeft dus een rechtstreekse invloed op de kwaliteit en betrouwbaarheid van de wetenschappelijke resultaten tijdens experimenten (Van de Weerd et al. 2002). Ook voor langetermijnhuisvesting is dierenwelzijn belangrijk, omdat verminderd welzijn langdurende gevolgen kan hebben, bijvoorbeeld door effecten die zich pas in de volgende generatie manifesteren (Aleström et al. 2020).

4.2 WELZIJNSINDICATOREN

Voor het beoordelen van dierenwelzijn kunnen verschillende benaderingen gevolgd worden. Een eerste deelt welzijn op in drie categorieën (Huntingford et al. 2006). Het functioneel welzijn gaat na of het dier goed kan functioneren in zijn omgeving en in de daar geldende huisvestingscondities. Ten tweede kan welzijn gedragsmatig onderzocht worden, door te bestuderen of de omgevings- en huisvestingsomstandigheden het normaal/natuurlijk gedrag van de soort bevorderen. Ten slotte kan

er geëvalueerd worden hoe de vis zichzelf hierbij voelt (gevoelens). Een andere benadering is het vijfdomeinenmodel, waarbij naast interne functionele toestanden, ook subjectieve ervaringen beschouwd worden voor de algehele welzijnsstaat van het dier. De eerste vier domeinen ("Voeding", "Omgeving", "Gezondheid" en "Gedrag") vertegenwoordigen de functionele toestand. Het vijfde domein omvat de subjectieve ervaringen op factoren in de andere domeinen en wordt "*Mental State*" genoemd (Mellor 2016). Factoren, zoals trillingen, densiteit, voeding, … kunnen het welzijn in een positieve of negatieve manier beïnvloeden. Men kan nagaan ('meten') hoe het dier een bepaalde toestand, veroorzaakt door een factor, ervaart. Dit kan met duidelijk meetbare parameters (vb. cortisolgehalte), of indicatoren, die van nature vaak minder objectief kwantificeerbaar zijn (vb. visuele observaties of gedragingen). Welzijn is een moeilijk te scoren toestand, aangezien de vele factoren die het beïnvloeden niet rechtstreeks kwantificeerbaar zijn. Geen enkele parameter of indicator is bovendien betrouwbaar als die als enige gemeten wordt (Ashley, 2007). De beste inschatting van welzijn bekomt men daarom door een multivariate analyse van verschillende metingen uit te voeren (Huntingford et al. 2006).

Er is voornamelijk nood aan een helder kader en gevoelige eindpunten voor viswelzijn. Het welzijn moet indirect gemeten worden aan de hand van veranderingen in uiterlijk, gedrag en fysiologie. Een lijst aan indicatoren kan hierbij helpen, waarbij ook aandacht moet gaan naar gestandaardiseerde terminologie binnen het vakgebied (Goodwin et al. 2016). Het bepalen van referentiewaarden voor de indicatoren van stress is een belangrijke stap in het kwantificeren van dierenwelzijn en stress. Referentiewaarden zijn soortspecifiek, en kunnen, in het geval van de zebravis, zelfs lijn- en laboratoriumspecifiek zijn. Het is echter uitdagend om de referentiewaarden in niet-gestresseerde vissen te bepalen, zeker wanneer het gaat om fysiologische metingen waarvoor men de vis moet vangen en manipuleren. Reeds na één minuut zijn de effecten van stress bijvoorbeeld merkbaar in het cortisolgehalte (Tran et al. 2014).

Naast indicatoren die aantonen dat het dierenwelzijn verminderd is in een experimentele opstelling of tijdens de huisvesting, is er een algemene tendens tot het meten van positieve welzijnsindicatoren, die zowel de mentale als fysieke toestand van het dier kunnen weerspiegelen. Men moet hierbij verder gaan dan wat nodig is om te overleven of voortplanting mogelijk te maken (Gonçalves-de-Freitas et al. 2019). Een voorbeeld is het promoten van cognitieve betrokkenheid, dat recent sterk in de belangstelling kwam. Dat kan door visuele stimulatie, introductie van nieuwe objecten en mogelijkheid tot interactie met soortgenoten. Een ander voorbeeld zijn studies naar het type voedsel dat de vis verkiest (onafhankelijk van de nutritionele waarde), zodat er toename is van zintuiglijk genot. Ten slotte kan er ook onderzocht worden welke structuren de nieuwsgierigheid van de vis prikkelen om zo een juiste keuze van verrijking te kunnen maken (Fife-Cook and Franks 2019).

In de volgende deelhoofdstukken wordt het nagaan van het welzijn van zebravissen op verschillende organismale niveaus toegelicht.

4.2.1 Overleving

Een zeer objectieve parameter voor (slecht) welzijn, is mortaliteit. Voor embryo's van zebravissen is overleving voorlopig één van de meest geschikte criteria om het welzijn te scoren. In elke vissoort is er sprake van natuurlijke uitval doorheen de levensstadia. Een overleving van 80-95% van 0-21 dpf wordt als normaal aanzien (Matthews et al. 2002). Andere bronnen spreken van een overleving van 87% ± 10% op 30 dpf en 82% ± 14% op 90 dpf (Martins et al. 2016a). Mortaliteit bij adulten ligt lager (± 1% over 3 maanden (Castranova et al. 2011)).

Wanneer frequent dode vissen worden aangetroffen zonder duidelijke aanleiding zoals ziekte, kan dit wijzen op welzijnsproblemen veroorzaakt door onder andere de huisvesting, het kweekprogramma, of bepaalde handelingen. Het analyseren van mortaliteitsdata om effecten van de zebravislijn, locatie

(unit) of andere criteria na te gaan kan zinvol zijn om bijvoorbeeld inteelt of nadelige huisvestingsparameters in een unit aan het licht te brengen (Mocho and von Krogh 2022). Dit geldt zowel voor mortaliteitsdata van volwassen vissen, als van larven en embryo's.

Hoewel overleving een objectieve parameter is, zal er voorafgaand aan mortaliteit steeds een zekere mate van lijden zijn. Aangezien welzijn betrekking heeft op de ervaringen van het levend dier, moet welzijn dus zo veel mogelijk voor het ontstaan van mortaliteit opgevolgd en bijgestuurd worden.

4.2.2 Levensgeschiedenis

Lengte en groei van vissen kunnen indicatoren zijn van hun welzijn. Juveniele vissen die een goede huisvesting genieten en zich goed voelen, zullen tijdens een standaard tijdsinterval (bijvoorbeeld 0-21 dpf) snel uitgroeien tot een bepaalde lengte (1-1,5 cm), met weinig onderlinge variatie (Matthews et al. 2002). Voor vissen van 30 dpf worden standaardlengtes gerapporteerd van 1,8 ± 0,2 cm. Op 60 dpf zouden ze gegroeid moeten zijn tot 2,5 ± 0,2 cm (Martins et al. 2016a). Er moet echter rekening mee gehouden worden dat een snelle toename in lengte niet noodzakelijk een teken is van verhoogd welzijn, aangezien vissen ook compenserende groei kunnen vertonen na periodes van verhoogde stress (Jia et al. 2018).

Een geïntegreerde meting van lengte en gewicht, zoals de conditiefactor is nog interessanter om te gebruiken als welzijnsindicator (Huntingford et al., 2006). Hierbij moet echter rekening gehouden worden met het geslacht van de vis, aangezien de lichaamsbouw kan verschillen (Lee et al. 2019). Uiteraard moet hiernaast ook visuele indicatoren in acht genomen worden. Een vis met ei-retentie zal ook een hoge conditiefactor hebben, maar verkeert in een mindere staat van welzijn. Een nadeel is dat voor het meten en wegen van een vis geregelde manipulaties vereist zijn, die op zich stress kunnen veroorzaken. Bovendien worden zebravissen meestal in groep gehouden en zijn er weinig morfologische verschillen, waardoor het moeilijk is ze individueel doorheen de tijd op te volgen.

Voor volwassen vissen kunnen maturatietijd, geslachtsratio van de populatie en kweeksucces een welzijnsindicator zijn. Stress kan een gewijzigde energie-allocatie veroorzaken, met een negatieve invloed op de snelheid van maturatie en/of de reproductieve parameters (aantal eieren, aantal bevruchte eieren, aantal overlevende embryo's, …). De stabiliteit van deze parameters is daarom een indirecte meting van een succesvolle huisvesting (Matthews et al. 2002). Zebravissen kunnen seksueel matuur worden vanaf 60-75 dpf (Cartner et al. 2019). Een geslachtsverdeling met 60-70% vrouwtjes is daarbij voor de meeste lijnen normaal (Martins et al. 2016a). Weinig faciliteiten rapporteren de reproductieparameters van hun lijnen. Martins et al. (2016) rapporteerde een succesratio van 80% voor 140 broedparen. 20% daarvan produceerden minder dan 100 bevruchte eitjes per paar, 30% produceerde 100-300 bevruchte eieren en 30% produceerde meer dan 300 bevruchte eitjes (Martins et al. 2016a).

4.2.3 Gedrag

Het is belangrijk om de ethologie van de soort te begrijpen vooraleer gedrag als eindpunt gebruikt wordt om welzijn te kwantificeren (Gonçalves-de-Freitas et al. 2019). Gedrag kan zowel individueel als in groep geobserveerd worden. Het gedrag van een vis in rust kan opgemeten worden door de vis te observeren in een omgeving die het meest op zijn gekende huisvesting lijkt. Als de vis hiervoor verplaatst moet worden, is het belangrijk acclimatisatietijd te voorzien. Ook reacties op natuurlijke stressfactoren, zoals reactie op predatoren, kunnen worden gebruikt als welzijnsindicator.

Een belangrijke valkuil is dat de observator zelf het gedrag van de vissen beïnvloedt door ze te stresseren (Toms et al., 2010). Het is daarom interessant het gedrag op te nemen en automatisch te analyseren met behulp van videosoftware (Toni et al. 2019). Een ander belangrijk aspect om te

beschouwen is dat gedragsparameters sterk kunnen fluctueren doorheen de tijd en per individu (in functie van de persoonlijkheid van de vis (Buenhombre et al. 2021)).

Wanneer het sociaal gedrag van een vis onderzocht wordt, kijkt men naar agressieparameters (Gerlai et al. 2000) en de positie van een vis ten opzichte van de soortgenoten (schoolgedrag) (White et al. 2017, Wong et al. 2019). Opnieuw is inzicht in de normale gedragingen van de soort hierbij belangrijk. Zo wordt agressief gedrag van nature bij zebravissen geobserveerd tijdens het voederen (Grant and Kramer 1992), bij lage densiteiten (Paull et al. 2008) en in aanwezigheid van structurele verrijking (Woodward et al. 2019). Verder kunnen mannetjes agressief zijn tijdens de korte tijdsspanne (± 1 u) dat ze zich voortplanten, maar vertonen ze daarbuiten en onder de juiste huisvestingsparameters weinig tot geen agressief gedrag (Spence and Smith 2005). Agressie komt daarnaast bij zowel mannelijke als vrouwelijke zebravissen met een grotere lichaamslengte voor (Paull et al. 2010, Cartner et al. 2019).

De voorkeuren van zebravissen voor bepaalde omgevingsfactoren kunnen bestudeerd worden met behulp van preferentietesten, die onder andere voorkeuren op sociaal vlak (Ogi et al. 2021), kleur (Oliveira et al. 2015) en verrijking (Collymore et al. 2015) kunnen aantonen. Voorkeurstesten hebben echter een heel aantal valkuilen. Zo weet het dier niet dat het een keuze maakt en zijn er mogelijks nog andere situaties die het dier meer zou verkiezen. Een keuze voor een bepaalde situatie betekent niet dat deze situatie altijd de voorkeur geniet (op korte en op lange termijn) (Kirkden and Pajor 2006). Wanneer onderzocht moet worden hoe belangrijk een situatie voor een dier is, zijn motivatietesten meer betekenisvol. Een motivatietest voor zebravissen werd recent gevalideerd, waarin de vissen ambigue stimuli moeten evalueren (kleuren die meestal, maar niet altijd, geassocieerd worden aan positieve of negatieve ervaringen). Een dergelijke motivatietest onderzoekt hoe het besluitvormingsproces beïnvloed wordt door de affectieve toestand van het dier (pessimistisch of optimistisch). Dit geeft inzicht in de emotionele toestand van de vis en de manier waarop de vis zijn omgeving ervaart (Espigares et al. 2021).

Het effect van stress op de activiteit van een vis kan worden gemeten als de weerzin om te bewegen, het eetgedrag en het zwemgedrag (bv. positie in de waterkolom). Hiervoor zijn verschillende gedragstesten beschikbaar. Tijdens de Novel tank test wordt een vis in een nieuwe omgeving gebracht en wordt de verkennende activiteit en voortbeweging gemeten (Levin et al. 2007). In normale omstandigheden zal de vis naar de bodem 'duiken' en geleidelijk de rest van de tank verkennen in de loop van een proef van 5-6 minuten (Fontana et al. 2021). De licht-donker-test wordt gebruikt om angst- en angstachtige reacties te beoordelen door de natuurlijke neiging van zebravissen te onderzoeken om fel verlichte omgevingen te vermijden (Blaser and Rosemberg 2012). Larvale stadia hebben echter een natuurlijke voorkeur voor licht, dus voor dit levensstadium worden proefopstellingen gebruikt waar ze actief het donker kunnen vermijden (Champagne et al. 2010). De licht-donker-test, waarin voorkeur voor veel of weinig licht wordt gemeten, geeft niet dezelfde resultaten als de zwart-wit-test, waarin voorkeur voor een witte of zwarte achtergrond wordt gemeten (Facciol et al. 2019). De '*Fish behaviour index*' en analyse van 3D-beelden via '*fractal dimension*' zijn geautomatiseerde metingen die de activiteit en de complexiteit van het zwemgedrag voor en na een manipulatie zoals vinclippen of taggen vergelijken, om zo de impact op het welzijn te onderzoeken (Deakin et al. 2019a, Deakin et al. 2019b).

Ook in deze gedragstesten kan de persoonlijkheid van de vis impact hebben op de stressrespons. Reactieve vissen zullen vaker in de onderste zone van het aquarium blijven en minder activiteit vertonen dan proactieve vissen (Wong et al. 2019). Algemeen geldt dat repetitief gedrag een teken is van verminderd welzijn. Verder kan het gedrag ook beïnvloed worden door parasieten, zoals het microsporidium *P. neurophilia* dat zich in het brein van zebravissen ophoopt nabij de regio's die instaan voor gedrag en angstbeleving (Midttun et al. 2020).

4.2.4 Fysiologie

Fysiologische stress is niet hetzelfde als lijden en hoeft geen teken van verminderd welzijn te zijn. Soms kan een korte periode van stress gunstig zijn voor een vis (Muniandy 2018). De stressrespons van een vis kan in drie stadia worden opgedeeld. Tijdens de primaire stressrespons verhogen de niveaus aan corticosteroïden en catecholamines (Schreck and Tort 2016). Deze primaire respons zorgt voor een cascade aan effecten tijdens de secundaire respons. Op metabolisch vlak is er een verhoging van glucose- en lactaatgehaltes en een daling van glycogeengehalte in de weefsels. Er vinden ook cellulaire veranderingen plaats (verhoging van concentratie van *heat shock proteïn*), de osmoregulatie wordt verstoord, er zijn hematologische veranderingen en ook het immuunsysteem wordt beïnvloed (Schreck and Tort 2016). Al deze kortetermijneffecten resulteren uiteindelijk in de tertiaire respons, waarbij de groei, de ziekteresistentie en het gedrag beïnvloed worden (Schreck and Tort 2016).

De primaire cortisolrespons is de meest gebruikte merker voor fysiologische stress in vissen en is daarom een geschikte welzijnsindicator (Ellis et al. 2012). Het wordt bij andere vissoorten vooral opgemeten in het bloedplasma. Aangezien zebravissen klein van gestalte zijn, is het volume bloed dat geprikt kan worden zonder de vis te doden echter vaak te klein (15 µL) (Zang et al. 2015) om individuele cortisolniveaus in het plasma te meten. Enkel bij voorafgaand humaan doden en het collecteren van het volledige bloedvolume kunnen stalen individueel geanalyseerd worden (Davis et al. 2015). Daarom wordt voor zebravis vaker de totale cortisolconcentratie in het lichaam (Ramsay et al. 2006) of de romp (wanneer er ook breinanalyses moeten gebeuren) gemeten (Pavlidis et al. 2013). Ook meer gedetailleerde analyses van glucocorticoïd profielen zijn mogelijk om de stressrespons te onderzoeken (Aerts 2018).

a) Cortisol in lichaam/bloed

Er is nog te weinig onderzoek gedaan naar de referentiewaarde voor cortisol in controledieren (Aleström et al. 2020). In de literatuur variëren deze erg tussen verschillende studies en meettechnieken (0,05-0,3 ng/g (Canavello et al. 2011); 1-4 ng/g (Quadros et al. 2021) en 5-25 ng/g (Ramsay et al. 2006)). Na blootstelling aan stressvolle omstandigheden is er een latentietijd van ongeveer 1-2 minuten waarna de cortisolwaarden sterk stijgen (Lawrence et al. 2018) tot een maximumniveau na ongeveer 15 minuten (Pavlidis et al. 2013, Wong et al. 2019)), gevolgd door een trage daling tot basisniveau. Het vergelijken van cortisolresponsen (amplitude, tijd tot herstel) tussen organismen die blootgesteld worden aan een stressor versus controle-organismen kan een objectieve manier zijn om welzijn/stress te kwantificeren.

Zowel effecten van acute stress als chronische stress kunnen op deze manier gemeten worden. Een studie toonde echter wel dezelfde respons aan na 2 uur blootstelling aan een stressor dan na 5 dagen blootstelling. Afhankelijk van de stressor kan dit betekenen dat 2 uur continue blootstelling vergelijkbaar is met chronische stress (Pavlidis et al. 2013).

b) Cortisol in water

Een niet-invasieve manier om de cortisolrespons te kwantificeren is de cortisolconcentratie in het water te meten (Pavlidis et al. 2013). De stijging in het bloedplasma en in het water zijn gecorreleerd (r = 0,68), omdat cortisol vanuit de bloedsomloop via de kieuwen in het water diffundeert (Félix et al. 2013). Verder werd ook een correlatie aangetoond tussen cortisol in het lichaam en cortisol in het water (r = 0,97) (White et al. 2017). Door het niet-invasieve karakter van de techniek kunnen meerdere meetpunten van hetzelfde individu gemeten worden. Dit verbetert de kwaliteit van de data en vermindert het aantal vissen dat nodig is voor een fysiologische tijdsreeks (White et al. 2017). Een nadeel is dat de cortisolconcentratie in het water het excretieprofiel van de volledige groep vissen in dat aquarium weergeeft, waardoor enkel conclusies op populatieniveau kunnen gemaakt worden (pers. Comm. J. Aerts). Deze techniek kan

wel nuttig zijn om de stressrespons van een individuele vis te meten in opstellingen met een klein watervolume (zoals een zwemtunnel of tijdens anesthesie). Wanneer cortisol in het water van een recirculerend systeem opgemeten wordt, moet de watertoevoer een half uur voor de meting afgesloten worden (White et al. 2017). Dit is de diffusietijd die nodig is om het cortisolgehalte in het water te laten overeenstemmen met het cortisolgehalte in het bloed (White et al. 2017).

Andere weinig invasieve methoden zijn het meten van cortisol in de huid, schubben en slijm (Gesto et al. 2015). Omdat cortisol langdurig wordt opgeslagen in de groeiende schubben, kan deze meting als indicator van chronische stress doorheen de tijd gebruikt worden (Aerts et al. 2015)

c) Factoren die het cortisolgehalte beïnvloeden

Naast factoren die stress kunnen veroorzaken, zoals suboptimale densiteit en ondervoeding (Ramsay et al. 2006), wordt het cortisolgehalte ook beïnvloed door voorgaande ervaringen van vissen, alsook door hun persoonlijkheid. Men spreekt van reactieve en proactieve vissen, die een verschillende cortisolrespons vertonen bij stress (Wong et al. 2019). Ook geslacht, grootte en dominantie kunnen een rol spelen. Hierbij hebben dominante vissen een veel lager cortisolgehalte in rust dan ondergeschikte vissen in dezelfde condities (Ramsay et al. 2006). Ten slotte zijn er dagelijkse, seizoenale, omgevingsgerelateerde en genetische factoren die het cortisolniveau doen schommelen.

d) Hiaten in cortisolonderzoek bij zebravissen

Het zou interessant zijn zowel de verschillende staalname- als meettechnieken voor cortisol in zebravissen met elkaar te vergelijken. Hieruit zou een duidelijk referentiekader ontstaan waarmee stress door welzijnsvermindering, acute stress en chronische stress vergeleken kunnen worden.

Enkelvoudige metingen van cortisolspiegels kunnen geen onderscheid maken tussen adaptieve en maladaptieve responsen, en zijn daarom mogelijk slechte indicatoren voor het welzijn van vissen (Ellis et al. 2012). Het zou daarom interessant zijn om het effect van verschillende stressoren op een aantal vastgelegde eindpunten te vergelijken, om zo types stressoren met pieken in cortisolconcentraties te associëren (Grzelak et al. 2017). Eventueel kan ook multivariate analyse een hulpmiddel zijn om na te gaan of de gestegen cortisolwaarde samenvalt met veranderingen in andere eindpunten die op verminderd welzijn wijzen.

4.3 CONCLUSIE

Er is nog veel experimenteel onderzoek nodig om effecten van verschillende factoren op het welzijn van zebravissen in faciliteiten te karakteriseren, te begrijpen en om te zetten in duidelijke richtlijnen (Toni et al. 2019). Elke meting heeft voor- en nadelen en geen enkele parameter is op zichzelf een goede voorspeller van het welzijn. Daarom worden verschillende welzijnsmetingen best gecombineerd.

HOOFDSTUK 5: HUISVESTING IN ZEBRAVISFACILITEITEN

5.1 FYSIEKE HUISVESTING

5.1.1 Type huisvestingssysteem

De faciliteit is het geheel van installaties waarin zebravissen worden gehouden en omvat zowel vissen die voor onderzoeks- als kweekdoeleinden worden gehouden. In proefdierfaciliteiten wordt vooral gebruik gemaakt van twee systemen voor de huisvesting van zebravissen. Een gecentraliseerd, recirculerend aquacultuursysteem is een systeem waarbij het watervolume centraal gefilterd wordt, waarbij verschillende waterparameters automatisch gemeten en bijgestuurd kunnen worden (hierna systeem genoemd). Er is een constante doorstroming, waarbij alle aquaria continu bevoorraad worden van gefilterd water uit een gemeenschappelijke bron. Daarnaast gebeurt waterverversing automatisch en kan ingesteld worden hoeveel % er ververst moet worden. In dit type huisvestingssysteem kunnen vissen gemakkelijk in kleine groepen of individueel geplaatst worden, naargelang de noden voor het onderzoek of de kweek.

In faciliteiten zonder recirculerend, semi-automatisch systeem wordt gebruik gemaakt van individueel gefilterde aquaria. Aquaria zijn opstellingen waarin vissen worden gehouden met minder automatische opvolging dan in systemen. Vaak worden deze niet continu voorzien van vers water, maar worden ze regelmatig ververst. De watervolumes in aquaria zijn vaak groter dan deze van de tanks in recirculerende rekken. Werken met aquaria is budgetvriendelijk en laagdrempelig. Een nadeel is dat de waterkwaliteit tussen verschillende eenheden sterk kan fluctueren.

Verder bestaan er ook niet-recirculerende doorstroomsystemen waarin het water continu ververst wordt. Dit heeft als voordeel dat alle aquaria aparte entiteiten zijn die toch voortdurend door vers water bevoorraad worden en waarin de waterparameters relatief constant blijven. Hier wordt in deze leidraad niet verder op ingegaan.

5.1.2 Eigenschappen van de aquaria

Een eerste belangrijke eigenschap is dat aquaria gemakkelijk te reinigen moeten zijn. In het beste geval zijn ze zo ontworpen dat er een systeem bestaat voor het (automatisch en) efficiënt verwijderen van vaste stoffen (Newell and Brocca 2022), zoals een aflopende groeve onderaan het aquarium die achteraan afgezogen wordt.

Wat materiaalkeuze betreft is het enerzijds voor de ergonomie van het personeel belangrijk dat de aquaria op zichzelf niet te zwaar zijn, gezien het watervolume het gewicht al snel doet toenemen. Plastics met een lage densiteit zoals polycarbonaten of polysulfon zijn hiervoor aangewezen (Newell and Brocca 2022). Voor experimenten waar inerte aquaria noodzakelijk zijn, zoals bepaalde toxicologische proeven, worden glazen aquaria aangewezen.

Wanneer keuzes gemaakt moeten worden over het volume van aquaria, moet men rekening houden met de grootte en leeftijd van de vissen, de (variatie in) waterkwaliteit en het voederregime (Matthews et al. 2002). Ook kan de keuze van het volume afhankelijk zijn van de noden van het onderzoek. Zo lenen kleine aquaria zich er goed toe genotypes te scheiden. Wanneer dit niet noodzakelijk is, is het minder arbeidsintensief grote groepen vissen in grote volumes te houden. Dit is ook in het voordeel van de vissen, aangezien zebravissen scholende dieren zijn.

5.1.3 Eigenschappen van de ruimte

Wanneer de faciliteit gebruik maakt van een gecentraliseerd systeem, staat dit meestal in een daarvoor aangepaste ruimte opgesteld. Deze ruimte is bij voorkeur geklimatiseerd, waardoor het

systeem de temperatuur van het water maar weinig moet bijsturen en een koeling op het systeem niet nodig is. In niet-geklimatiseerde ruimtes kan een groot watervolume in de aquaria fungeren als stabiele thermische massa, waardoor de temperatuur in de ruimte minder kan fluctueren.

De vochtigheid van de ruimte moet minstens 70% bedragen om verdamping uit de aquaria tegen te gaan (Cartner et al. 2019). Bij te hoge verdamping zakt de temperatuur en moet er meer water aan het systeem toegevoegd worden. Er moet echter opgelet worden dat de vochtigheid in de ruimte niet voor schimmel zorgt. Daarom moet er een goede ventilatie aanwezig zijn (type HVAC: *heating, ventilation and air conditioning*).

5.2 WATER

5.2.1 Introductie

Waterkwaliteit heeft een rechtstreekse invloed op de fysiologie en het immuunsysteem van vissen. Het is daarmee één van de belangrijkste factoren voor de gezondheid en het welzijn van zebravissen in proefdierfaciliteiten (Lawrence and Mason 2012). In vergelijking met vogels of zoogdieren staan vissen ook veel meer in contact met hun omgeving (water) wegens de grote oppervlakte van hun kieuwen. Ze zijn daarom gevoeliger aan slechte waterkwaliteit en verontreinigende stoffen in het water (Huntingford et al. 2006).

De kwaliteit van het water wordt onder andere bepaald door de temperatuur, pH, saliniteit, opgeloste gassen, gehalte aan stikstofhoudende componenten, ... Waterparameters moeten meermaals per week tot dagelijks opgemeten en bijgestuurd worden. In faciliteiten waar het systeem deze parameters automatisch meet is het belangrijk de metingen regelmatig met een extern apparaat te controleren.

5.2.2 Filters

5.2.2.1 Mechanische filtratie

Mechanische filtratie is het verwijderen van vaste deeltjes zoals feces, voedsel en ander organisch en anorganisch materiaal. Mechanische filters zijn in verschillende vormen beschikbaar, zoals sponzen elementen, filterdoeken, schermen met verschillende maaswijdte of filtertrommels. Afhankelijk van de filters kunnen ze deeltjes tegenhouden >50 µm tot >0,5 mm. Ze bevorderen zo de helderheid van het water en remmen de groei van bacteriën en pathogenen in het aquarium (Newell and Brocca 2022). Hiervoor is het niet enkel belangrijk dat de deeltjes gevangen worden, maar dat de filters snel genoeg uitgespoeld/vervangen worden (Newell and Brocca 2022).

5.2.2.2 Biologische filtratie

Tijdens de biologische filtratie wordt het water over structuren gestuwd die gekoloniseerd zijn door chemo-autotrofe bacteriën. Deze oxideren de stikstofhoudende afvalstoffen (ammoniak/ammonium) en andere organische stoffen tot nitriet (NO_2^-) en verder tot nitraat (NO_3^-).

$$NH_3/NH_4^+ \xrightarrow[\substack{Nitrosomonas \\ Nitrosococcus}]{} NO_2^- \xrightarrow[Nitrobacter]{} NO_3^-$$

Het is belangrijk dat deze bacteriële gemeenschap ook in de beste omstandigheden kan groeien en functioneren. Daarom moeten bepaalde waterparameters zoals opgeloste zuurstof of pH ook voor de biofilter zo optimaal mogelijk afgesteld worden (zie 5.2.3).

5.2.2.3 UV

Door het bestralen van kleine volumes water met ultraviolet licht (200-280 nm) wordt het DNA van micro-organismen, schimmels, algen, … aangetast. Hoewel niet alle micro-organismen hierdoor verdwijnen, zakt de microbiële lading wel significant (Newell and Brocca 2022). Het water wordt meestal door lange buizen gestuwd waarin één of meerdere UV-lampen opgesteld zijn. Het is belangrijk dat deze jaarlijks vervangen worden, omdat de werking ervan doorheen de tijd afneemt en dit niet zichtbaar is met het blote oog (Collymore et al. 2015, Geisler et al. 2016).

5.2.2.4 Chemische filtratie

Tijdens chemische filtratie worden bepaalde chemische stoffen uit het water verwijderd door adsorptie, katalyse en oxidatie. De meest gebruikte is een actieve koolfilter die onder andere chloor uit het water absorbeert. Deze filter moet regelmatig ververst worden omdat hij anders snel verzadigd is. Vooral in faciliteiten met aquaria die kraanwater als basis gebruiken kan dit type filtratie nuttig zijn, in tegenstelling tot faciliteiten met systemen waar de basis van het water vaak 'reverse osmose' water is (dit water is tijdens de omzetting naar 'reverse osmose' water in het reverse-osmose-systeem al over een actieve koolfilter gezuiverd). Om verstopping van deze filter zo lang mogelijk uit te stellen is het belangrijk deze na de mechanische filter te plaatsen (Newell and Brocca 2022).

5.2.3 Waterparameters

5.2.3.1 Watervernieuwing en -toevoer

Onder watervernieuwing verstaan we het vervangen van oud aquariumwater met volledig nieuw aquariumwater (dus niet de aanvoer vanuit de vergaarbak in systemen). De hoeveelheid watervernieuwing in een biologisch gefilterd systeem wordt afgestemd op de nitraatproductie in het water (Cartner et al. 2019), met als doel de nitraatwaarden onder de norm te houden. Dit is enkel van toepassing wanneer er een goede biologische filter aanwezig is die de stikstofverbindingen omzet (zie later). Ook in faciliteiten met aquaria is nitraat de indicator om te bepalen hoe vaak en hoeveel water er moet ververst worden.

De watertoevoer in een recirculerend aquarium bestaat voor het grootste deel uit gefilterd (hergebruikt) water. Hier is de aanbeveling om naar 3-5 volledige aquariumverversingen per uur te streven (Schroeder et al. 2014, Cartner et al. 2019). De instroom van het water in het aquarium moet aangepast zijn aan het levensstadium van de vissen. Zo kan het water bij larven van 5-29 dpf hoogstens traag binnendruppelen. Bij een leeftijd van 30-59 dpf kan het wel sneller druppelen, zolang de waterstroming geen extra bron van energieverbruik wordt. Wanneer de vissen voldoende gegroeid zijn om een constante stroom aan te kunnen, kan dit toegepast worden (Lee et al. 2019).

5.2.3.2 Samenstelling

In systemen wordt het water bereid op basis van RO-water waar de nodige zouten aan toegevoegd worden tot de gewenste conductiviteit bereikt is.

In faciliteiten die aquaria gebruiken kan dit ook zo gebeuren. Wanneer echter geen RO-installatie voorhanden is, wordt kraantjeswater gebruikt dat eventueel verder aangevuld wordt met de nodige zouten. Dit kraantjeswater wordt best steeds gedechloreerd door het te laten doorborrelen met zuurstof en chemische filtratie aan de aquaria toe te voegen om zo veel mogelijk sporenelementen uit het water te verwijderen.

5.2.3.3 Temperatuur

Temperatuur heeft een rechtstreekse invloed op tal van biologisch belangrijke parameters, zoals ontwikkelingssnelheid, voedselopname, groei en gedrag (Tsang et al. 2017). Hoewel zebravissen van nature voorkomen in een groot bereik aan temperaturen gaande van 6.7°C tot 41.7°C (Cortemeglia and Beitinger 2005, Schaefer and Ryan 2006), zullen ze in een proefdierfaciliteit niet gedijen in de

buitengrenzen van dit bereik. In een laboratoriumcontext kunnen zebravissen zich aanpassen aan dalende of stijgende temperaturen wanneer de verandering geleidelijk gebeurt. Hun temperatuurtolerantie, beschreven als het kritische thermisch minimum en maximum (CTmin en CTmax) kan dan opschuiven (Cortemeglia and Beitinger 2005, Schaefer and Ryan 2006). Omdat plotse temperatuurschommelingen stress kunnen veroorzaken, is het belangrijk ervoor te zorgen dat de temperatuur van het instromend water gelijk is aan die van het aquarium (Reed and Jennings 2011). Ook de temperatuur van de ruimte is belangrijk, zeker in geval vissen uit het systeem worden gehaald wanneer ze bijvoorbeeld geïsoleerd worden voor eiproductie of in experimentele opstellingen buiten het systeem verblijven. Van kleine vissen (1g) is onderzocht dat ze aan 1,8°C per minuut kunnen afkoelen wanneer de temperatuur van het water lager is dan hun lichaamstemperatuur, waardoor het metabolisme snel beïnvloed wordt (Cartner et al. 2019). Wanneer de temperatuur gradueel afneemt (bijvoorbeeld in een systeem waar de temperatuurregulatie stukgaat maar dat in een klimaatkamer opgesteld staat), kunnen zebravissen temperaturen tot 22-23°C verdragen zonder dat hun metabolisme sterk aangetast wordt (Matthews et al. 2002).

Het effect van temperatuur op de ontwikkeling van larven is goed onderzocht. Binnen het zebravis onderzoek wordt veel gebruik gemaakt van de gestandaardiseerde ontwikkeling gedurende de eerste 120 uur bij een constante temperatuur van 28.5°C (Kimmel et al. 1995). In een studie waar het effect van temperatuur en temperatuurcycli op groei werd onderzocht, vonden onderzoekers dat larven het snelst groeien bij een constante temperatuur van 28° (Villamizar et al. 2012). Zebravissen die bij >30°C opgroeien hebben een versneld levenstempo (*pace of life*), hetgeen wilt zeggen dat ze gemiddeld sneller matureren en een kortere levensduur hebben (Sfakianakis et al. 2011). Nog hogere temperaturen zorgen ten slotte voor verstoorde ontwikkeling of mortaliteit. Larven die opgroeiden bij 32°C vertoonden meer afwijkingen dan larven die bij 28,5°C en 30,5°C opgroeiden. Bij blootstelling aan temperaturen vanaf 34,5°C was er >25% mortaliteit na 96 uur (Pype et al. 2015).

Ook de geslachtsratio van de populatie wordt door temperatuur beïnvloed. Lage temperaturen (22°C) zorgen voor een groter aandeel aan mannetjes, terwijl hogere temperaturen (31°C) in een groter aandeel aan vrouwtjes resulteren. Ook thermocycli, waarbij de temperatuur niet constant gehouden wordt maar fluctueert naargelang het lichtregime geven aanleiding tot meer vrouwtjes (Villamizar et al. 2014). Verder werd aangetoond dat een temperatuurstijging van 3°C de gonadosomatische index (gewicht van de gonaden/totale lichaamsgewicht) verlaagt, wat de reproductieve fitness aantast (Quintaneiro et al. 2019).

In de praktijk kiezen faciliteiten vaak voor een constante watertemperatuur van 28.5°C voor larven (Aleström et al. 2020), hoewel ook temperaturen van 26°C en 27°C gebruikt worden, hetgeen respectievelijk ondersteund wordt door de richtlijnen van de OECD test nr. 236 (*Fish Embryo Acute Toxicity test*) en nr. 234 (*Fish Sexual Development test*) (OECD 2011, 2013). Voor adulten zijn er ook twee stromingen binnen het onderzoek. Veel faciliteit volgen de referentiewerken voor zebravissen en houden adulten in water van 26-29°C en meestal 28°C (Westerfield 1993, Cartner et al. 2019). Andere faciliteiten volgen de OECD testrichtlijnen zoals de "*Fish Acute Toxicity test*" of de "*Fish Sexual Development Test*" (OECD 2011, OECD 2019), waarin staat dat adulte zebravissen respectievelijk bij 21-25°C of 26 ± 2°C moeten gehouden worden. 21-24°C wordt beschouwd als een laag temperatuurbereik en wordt meestal niet gebruikt in zebravisfaciliteiten. Wanneer men zebravissen in hogere temperatuur houdt, moet men er dan weer mee rekening houden dat de oplosbaarheid van zuurstof bij deze temperaturen veel lager ligt. Vooral in statische systemen met aquaria kan dit een probleem zijn. Een FELASA werkgroep over zebravis huisvesting en verzorging nam het standpunt in dat de temperatuur in zebravisfaciliteiten typisch binnen het bereik van 24-29°C ligt (Aleström et al. 2020).

5.2.3.4 Conductiviteit, hardheid en alkaliniteit

De homeostase van vissen wordt rechtstreeks beïnvloed door het zoutgehalte van het water, aangezien het water het hele lichaam van de vis omringt en in rechtstreeks contact staat met het grote oppervlak van de kieuwen (Hoshijima and Hirose 2007). Ook op vlak van conductiviteit kunnen zebravissen zich aan een breed bereik aanpassen. Meer ontwikkelde vissen zijn toleranter voor verhoogde conductiviteit. Het optimum voor de gezondheid van de vis en de tolereerbare snelheid van verandering is echter nog niet bepaald (Tsang et al. 2017).

Verschillende onafhankelijke waterparameters zijn relevant om het zoutgehalte in water te beschrijven, waaronder conductiviteit, totale hardheid en alkaliniteit (of carbonaat hardheid). Conductiviteit wordt bepaald door zowel alkaliniteit als hardheid, en daarom wordt aanbevolen om alkaliniteit en hardheid afzonderlijk te bepalen om een nauwkeuriger beeld te krijgen van de waterkwaliteit in een bepaald systeem (Cartner et al. 2019).

Conductiviteit wordt in RO-gebaseerd water vooral bepaald door natrium en chloor ionen, die aanwezig zijn door het toegevoegde zeezout. In kraantjeswater bepalen vooral de calcium- en carbonaationen de conductiviteit. Aleström et al. raadde een conductiviteit tussen 150 en 1700 µS/cm aan (Aleström et al. 2020). Dit is een breed bereik aan conductiviteitswaarden en deze variëren ook tussen faciliteiten. Sommige bronnen situeren zich tussen 180 en 350 µS/cm (Brand et al. 2002, Geisler et al. 2016, Tsang et al. 2017), terwijl veel faciliteiten 500-600 µS/cm gebruiken (Collymore et al. 2015, Varga 2016). Na een enquête bij 19 zebravisfaciliteiten werd vastgesteld dat een gemiddelde conductiviteit van 800 µS/cm (600-1000 µS/cm) gebruikt werd (Lawrence 2007). Hoewel er geen onderzoek werd gedaan naar de optimale conductiviteit voor zebravissen, wordt een beperkter bereik van 180 tot 600 µS/cm toegepast. In sommige gevallen kan het nuttig zijn de conductiviteit te verhogen, namelijk tijdens transport en wanneer er in de faciliteit een uitbraak van ziekte is. Door de hogere conductiviteit moeten de vissen dan minder energie aan osmoregulatie besteden. Hierdoor is er meer energiereserve voor het immuunsysteem en de stressrespons. Ook zijn pathogenen zelf minder bestand tegen hoge conductiviteit (Harper and Lawrence 2016).

De (totale) hardheid van het water (GH) geeft de concentratie aan divalente metaalionen (Ca^{2+}/Mg^{2+}) weer. Deze zijn voornamelijk belangrijk in de ontwikkeling van de larvale stadia. Hardheidsgrenzen zijn 3-8 dGH (*degrees of general hardness*), maar meestal 4-5 dGH (Aleström et al. 2020). Bij lage hardheid worden opgeloste metalen, zoals koper, zink en aluminium toxischer voor de vissen (Sfakianakis et al. 2015). De alkaliniteit (carbonaat hardheid – KH) van het water is een maat voor de CO_3^- concentratie (CO_3^{2-} en HCO_3^-), en wordt vaak uitgedrukt in mg/L $CaCO_3$. Het is een belangrijke parameter voor de buffercapaciteit van het water. Wanneer de alkaliniteit zakt kan ook de pH zeer snel zakken, waardoor de gezondheid en het welzijn van de vissen in gevaar komt. In een rondvraag bij 19 faciliteiten wereldwijd werd een gemiddelde alkaliniteit van 90 mg/L (47-133 mg/L) $CaCO_3$ gevonden (Lawrence et al. 2016).

Wanneer hardheid en/of alkaliniteitswaarden te hoog worden, kan een deel van het water ververst worden met RO-water om het te stabiliseren. Wanneer het te laag wordt, kan $NaHCO_3$ of $CaCO_3$ toegevoegd worden (Cartner et al. 2019). Het is daarbij wel belangrijk steeds de waarde voor totale conductiviteit en pH te blijven bewaken.

5.2.3.5 pH

Zebravissen worden in de natuur blootgesteld aan een breed bereik van pH waarden (5.9-9.8) (Engeszer et al. 2007, Arunachalam et al. 2013). In een aquatisch systeem kan de pH snel dalen door onder andere oxidatie van ammoniak, respiratie en verval van organische materialen (Newell and Brocca 2022). Hoewel het optimale pH bereik voor zebravissen in proefdierfaciliteiten niet bekend is, weet men wel dat het belangrijk is te streven naar een constante pH. Zoals ook geldt voor andere waterparameters (vb. temperatuur), is de stabiliteit van de pH waarden belangrijker voor de

gezondheid en het welzijn van de vissen dan de absolute waarde van de pH (Tsang et al. 2017). Het toevoegen van een buffer (zoals $NaHCO_3$) zorgt ervoor dat de pH stabiliseert, maar het is even belangrijk de bron van de verzuring te lokaliseren en aan te pakken (bv. veel organisch afval, te lage verversingsgraad). Ten slotte beïnvloedt de pH het evenwicht tussen het zeer toxische NH_3 en het minder toxische NH_4^+ (zie volgende sectie). In de biologische filter worden ook de bacteriën blootgesteld aan de pH-waarden en fluctuaties uit het systeem. Voor de optimale werking van deze organismen is een pH van 7 tot 8 aangeraden (Tsang et al. 2017, Aleström et al. 2020).

5.2.3.6 Stikstofverbindingen

Een goed werkende biofilter moet ervoor zorgen dat de totale ammoniak- (NH_3 + NH_4^+), nitriet- en nitraatconcentratie respectievelijk onder de 0,1 mg/L, 0,3 mg/L en 25 mg/L blijven (Aleström et al. 2020). Een andere bron geeft 0,02 mg/L als maximale veilige concentratie NH_3 voor aquatische dieren (Harper and Lawrence 2016).

Het evenwicht tussen het zeer toxische NH_3 en het minder toxische NH_4^+ wordt sterk bepaald door pH en temperatuur, en in mindere mate door conductiviteit. Hoe hoger de pH en de temperatuur en hoe lager de conductiviteit, hoe meer toxisch NH_3 aanwezig is (Harper and Lawrence 2016).

Nitriet is toxischer dan nitraat en moet steeds zo laag mogelijk gehouden worden. Nitraat zelf is veel minder toxisch, maar moet afgevoerd worden omdat het niet verder bacterieel afgebroken wordt. In afwezigheid van planten kan enkel waterverversing de nitraatwaarden doen dalen (Harper and Lawrence 2016).

5.2.3.7 Zuurstof

Meestal wordt in recirculerende systemen een concentratie aan opgeloste zuurstof van 6-8 mg/L aangeraden (Collymore et al. 2015, Cartner et al. 2019), hetgeen neerkomt op een bijna volledige saturatie van het water bij 28°C. Europese richtlijnen raden een minimumdrempel van 60% saturatie aan (Directive 2010). Voor een optimale groei van de bacteriën in de biologische filter is minimaal 2 mg/L zuurstof noodzakelijk (Tsang et al. 2017). Het kan nodig zijn hiervoor de biofilter ter plaatse van zuurstof te voorzien.

De opgeloste zuurstof in de tanks wordt beïnvloed door temperatuur, visdensiteit en microbiële lading. De concentratie kan snel zakken wanneer er geen waterinstroom (meer) is. Dit is belangrijk te beseffen wanneer men kleine aquaria met hoge densiteiten aan vissen tijdelijk uit een recirculerend systeem haalt voor experimenten, schoonmaak, … Micro-organismen die op de wanden en het organische afval in de tank groeien verbruiken ook zuurstof. Daarom is het belangrijk op regelmatige tijdstippen de tanks schoon te maken (Cartner et al. 2019). Supersaturatie (>100% DO) kan ook voorkomen, bijvoorbeeld door lekken aan het pompsysteem of door snelle veranderingen in temperatuur. Supersaturatie kan leiden tot "*Gas Bubble Disease*" (Murray et al. 2020).

In statische opstellingen en experimentele opstellingen zonder recirculatie moet het gehalte aan opgeloste zuurstof steeds >60% bedragen (OECD 203, OECD 210).

5.2.4 AANBEVELINGEN: WATER

- Waterparameters moeten dagelijks tot meermaals per week opgemeten en bijgestuurd worden. In faciliteiten waar het systeem deze parameters automatisch meet is het belangrijk de metingen geregeld met een extern apparaat te controleren.
- Het moet duidelijk zijn wat er moet gebeuren wanneer waterparameters afwijken van de opgelegde waarden. Zo kan er snel opgetreden worden om het welzijn van de vissen te waarborgen.
- De combinatie van verschillende filters met complementaire werkingen (mechanisch, biologisch, UV, chemisch) is noodzakelijk voor een gezonde waterfiltratie en stabiel evenwicht op lange termijn.
- De waterparameters en inloop van het water in het aquarium moeten aangepast zijn aan het levensstadium van de vissen.
- Stabiliteit van de waterparameters is vaak belangrijker dan de eigenlijke waarde.
- Bij gebeurtenissen waarbij de biologische filter beschadigingen kan oplopen, zoals stroomuitval, verhoogde pH of conductiviteit, moet men er rekening mee houden dat de bacteriële populatie in de biofilter kleiner kan geworden zijn. De stikstofparameters moeten daarom in de dagen nadien op dagelijkse basis nagekeken en goed opgevolgd worden.

Waterparameter	Aanbevelingen	Meetfrequentie[1]	Bron
Temperatuur	0-29 dpf: 26-28.5°C >30 dpf: 24-28 °C	Dagelijks	(Villamizar et al. 2012, Aleström et al. 2020)
Conductiviteit	180-600 µS	Dagelijks	(Collymore et al. 2015, Geisler et al. 2016)
pH	7-8	Dagelijks[2], of afhankelijk van waterverversing[3]	(Tsang et al. 2017, Aleström et al. 2020)
Stikstofverbindingen	NH_3/NH_4^+ <0,1 mg/L NO_2^- <0,3 mg/L NO_3^- <25 mg/L	Wekelijks[2], of afhankelijk van waterverversing[3]	(Aleström et al. 2020)
Opgeloste zuurstof	6-8 mg/L	Wekelijks[2], of afhankelijk van waterverversing[3]	(Collymore et al. 2015, Cartner et al. 2019)

[1] Bron: (SILO 2009), [2] In recirculerende of doorstroomsystemen, [3] In statische systemen

5.3 LICHT

5.3.1 Fotoperiode

De lichtcyclus regelt verschillende biochemische, fysiologische, neurobiologische ritmes en kan daarom een belangrijke invloed hebben op tal van niveaus, gaande van embryonale ontwikkeling tot gedrag. Verder bepaalt de fotoperiode ook de interne lichaamsklokken van de zebravis, die cruciaal is voor succesvol paaien (Tsang et al. 2017). Hierover wordt meer informatie gegeven in sectie 7.2.4.

Het is zeer belangrijk dat de fotoperiode in een zebravisfaciliteit constant gehouden wordt (Villamizar et al. 2014). De meest gebruikte fotoperiodes zijn 14/10 L/D (Brand et al. 2002, Matthews et al. 2002) en 12/12 L/D (Lawrence 2007). Daarbij is het vooral belangrijk dat de donkere fase volledig donker is (geen storend licht van apparaten in de buurt). Dit kan namelijk de eiproductie beïnvloeden (Adatto et al. 2016). Verder toont onderzoek aan dat een verstoorde fotoperiode tijdens de ontwikkeling

vertraagde en/of verminderde ontwikkeling van het zicht veroorzaakt. Constant licht tijdens de eerste 6 dpf is daarbij nefaster dan constant duister in dezelfde periode (Bilotta 2000).

5.3.2 Intensiteit

De invloed van lichtintensiteit op het welzijn is in het algemeen weinig onderzocht (Lidster et al. 2017). Zo werd er geen literatuur gevonden over de invloed op cortisolniveaus of op levensgeschiedeniskenmerken. Wat wel geweten is, is dat een hoge lichtintensiteit een negatieve invloed heeft op de melatonineconcentratie, wat dan weer invloed kan hebben op gedrag, met vissen die zich voornamelijk agressiever gedragen. Dit is zeker het geval in vissen die goed zien en zich in doorzichtige aquaria bevinden waar het water helder is (Gonçalves-de-Freitas et al. 2019). Te veel licht bespoedigt ook de groei van algen, waardoor het zicht van de vissen belemmerd wordt, hetgeen een belangrijke factor is voor het dierenwelzijn.

Voor embryo's en jonge vissen worden waarden van 500-1100 lux aanbevolen (OECD 203, OECD 236). De algemene aanbeveling voor volwassen vissen is 54-334 lux aan het wateroppervlak (Matthews et al. 2002). Langdurige blootstelling aan licht van meer dan 300 lux zou nefast zijn voor adulte zebravissen (Cartner et al. 2019). Een intensiteit van 300 lux centraal tussen de huisvestingssystemen, op 1 m hoogte, zou ideaal zijn. Hoewel aangeraden wordt het licht zo uniform mogelijk te verdelen, worden de meeste systemen met zebravissen van bovenuit belicht, hetgeen voor een gradiënt in intensiteit zorgt. Ook tussen de systemen onderling kunnen er grote verschillen zijn (Lieggi et al. 2019). Indien dit het geval is, kan de plaatsing van de systemen ten opzichte van de lichtbronnen opnieuw geëvalueerd worden zodat het licht zo uniform mogelijk verdeeld wordt (Cartner et al. 2019). Gerichte belichting op de aquaria of led-strip gemonteerd op de systemen kunnen zorgen voor optimaal gestandaardiseerde lichtintensiteit.

Andere studies onderzochten hoe lichtintensiteit het gedrag in de licht-donker-test beïnvloedt, een test die gebruikt wordt om angstgedrag te scoren. Nadat tegengestelde voorkeuren werden gevonden in verschillende studies, toonde Stephenson et al. (2011) aan dat lichtintensiteit een grote invloed heeft op de resultaten van licht-donker-testen (Stephenson et al. 2011). Ook in de zwart-wit-test, een maat voor angst, werden verschillende resultaten gevonden wanneer vissen onder verschillende lichtintensiteiten (of dieptes) werden geëvalueerd (Cordova, 2016). Een andere studie toonde grote variatie aan in lichtintensiteit tussen de huisvestings- en experimentele aquaria, waarbij deze laatste gemiddeld 50% meer verlicht zijn, hetgeen het gedrag tijdens het experiment kan beïnvloeden (Lieggi et al. 2019).

5.3.3 Golflengte

Hoewel ook deze parameter in het algemeen weinig onderzocht is (Matthews et al. 2002), werden verschillende golflengtes aan licht wel getest. Hierbij werd geen invloed op het welzijn van de vissen vastgesteld, gemeten als verandering in gedrag en cortisol (Gronquist and Berges 2013).

Larvale zebravissen vertonen van nature fototactisch gedrag, waarbij ze in keuzetesten naar de locatie met het meeste zichtbare licht zwemmen (Guggiana-Nilo and Engert 2016). Studies toonden verder aan dat wit licht [400-700], alsook blauw en paars licht [400-500] in een contante fotoperiode zorgen voor optimale ontluiking van embryo's, groei van larven en het verminderen van malformaties (Villamizar et al. 2014). Ook adulten kiezen in voorkeurstesten eerder voor kleuren met een lagere golflengte, zoals paars en blauw, gevolgd door groen (Bault et al. 2015).

Wanneer bepaalde handelingen in het donker moeten uitgevoerd worden, gebruiken onderzoekers soms rood licht. Hier moet echter mee opgepast worden, want verstoring van de donkere fase kan de circadiaanse klok van de vissen verstoren (Adatto et al. 2016).

Ten slotte kunnen ook de gebruikte lichtbronnen een invloed hebben op zebravissen. Wanneer de faciliteit belicht wordt met TL (of andere fluorescerende lichtbronnen), moet men oppassen voor een te hoge ballast (i.e. sterkte van het licht) en geflikker van de lampen (Cartner et al. 2019). Wanneer LED verlichting wordt gebruikt, zorgt dit voor het vermengen van alle kleur spectra om wit licht te genereren (Cartner et al. 2019). Men moet in dit geval de kleurtemperatuur bewaken zodat deze rond de 5000-6500 K is, hetgeen ervoor zorgt dat kleuren en contrasten goed worden weergegeven onder water (Newell and Brocca 2022).

5.3.4 Graduele verandering licht

Over het effect van gradueel aan- en uitgaan van het licht op dierenwelzijn is ook zeer weinig onderzoek gebeurd (Stevens et al. 2021). Het invoeren van schemer en dageraad zou ervoor zorgen dat vissen minder schrikken (*startle reflex*) wanneer het licht plots aan of uit gaat (Lidster et al. 2017). Nadien volgt er een periode van verminderde activiteit ten opzichte van het basisactiviteitsniveau, beter gekend als de "*freeze*-respons" (Emran 2008). Deze responsen gaan gepaard met een energetische kost en kunnen psychologische stress veroorzaken (Stevens et al. 2021). Ook in de Europese regelgeving voor dierproeven, sectie vissen, staat dat abrupte veranderingen in licht vermeden moeten worden (Eu 2007).

Hoewel het onderzoek naar het nut van deze vorm van omgevingsverrijking nog geen duidelijke resultaten heeft opgeleverd, is het wel een gemakkelijk in te voeren maatregel om een potentiële stressor te vermijden, zonder interferentie met andere aspecten van de verzorging of het welzijn van de zebravissen (Stevens et al. 2021). Een aantal publicaties geven aan deze overgangen te implementeren, met tijden die variëren tussen 20 minuten (Wilkes et al. 2012) en 40 minuten (Woodward et al. 2019).

5.3.5 AANBEVELINGEN: LICHT

- In publicaties wordt met uitzondering van het L/D patroon, weinig info gegeven over de verlichtingsbron, intensiteit en golflengte (Toni et al. 2019). Aangezien veel lichtparameters invloed kunnen hebben op het gedrag en de fysiologie van zebravissen, is het aangeraden de parameters van zowel standaard huisvesting alsook experimentele opstellingen steeds duidelijk te rapporteren.
- Voor lichtintensiteit worden waarden tussen 54 en 300 lux aan het wateroppervlak aangeraden, met een zo homogeen mogelijke verdeling overheen en binnen de systemen.
- Zebravissen kunnen alle golflengten verdragen die resulteren in wit licht, met een voorkeur voor de lageren golflengten.
- De meest gebruikte fotoperiode is 14/10 L/D, waarbij het vooral belangrijk is dat de donkerfase écht donker is (zonder storende verlichtingsbronnen, zoals lichtjes van apparatuur) en dat deze fotoperiode tijdens het leven van het dier constant blijft.
- Ten slotte kan het invoeren van graduele lichtovergangen een gemakkelijk in te voeren vorm van omgevingsverijking zijn die dichter aanleunt bij het natuurlijk milieu van de vissen dan het plots aan- en uitgaan van het licht.

5.4 TRILLINGEN

5.4.1 Het gehoor van zebravissen

Vissen voelen trillingen met behulp van verschillende structuren, namelijk de laterale lijn, de zwemblaas en de otolieten (gehoorsteentjes in het evenwichtsorgaan) (Doğankaya et al. 2020). In

tegenstelling tot de meeste vissoorten die enkel trillingen kunnen waarnemen binnen een frequentiebereik van minder dan 1000 Hz, zijn zebravissen gehoorspecialisten, met een bereik van 100 tot 4000 Hz (Cartner et al. 2019, Doğankaya et al. 2020). De reden hiervoor is dat ze beschikken over een Weberiaans apparaat dat de zwemblaas verbindt met het binnenoor, waardoor trillingen beter worden doorgegeven (Lara and Vasconcelos 2019). De verbening van het Weberiaans apparaat gebeurt vanaf 22 dpf tot 56 dpf (Cartner et al. 2019).

Zebravissen horen het best bij geluiden met frequenties tussen 600 en 1000 Hz (Lara and Vasconcelos 2019), met een gevoeligheidspiek rond 800 Hz (Higgs et al. 2002). Deze frequenties worden optimaal waargenomen bij een geluidssterkte van 127 Db onder water (Higgs et al. 2002). Dit komt overeen met ongeveer 70 Db geluidssterkte in de lucht (Slabbekoorn et al. 2010).

5.4.2 Omgevingsgeluiden

In natuurlijke zebravishabitats komen vooral frequenties van <3000 Hz en geluidssterkte tussen 98-126 dB voor. Onderzoek toonde verder aan dat er stillere geluidsvensters voorkomen daar waar de soort het beste kan horen. Ze zijn dus goed aangepast aan hun natuurlijke omgeving (Lara and Vasconcelos 2019).

De omgevingsgeluiden die in zebravisfaciliteiten werden opgemeten zijn heel anders van aard. Deze worden geproduceerd door apparatuur, zoals water en luchtpompen, filtratiesystemen, onderhoudsapparatuur, … Filters en pompen produceren typisch geluiden met een lage frequentie, terwijl de instroom van water aan het oppervlak een hoge geluidsfrequentie genereert (Gutscher et al. 2011). In faciliteiten met systemen werd vastgesteld dat alleenstaande systemen in het water meer geluid genereren dan systemen die in serie staan en dat de afstand tot de pomp/filters dus een grote factor is (Lara and Vasconcelos 2019). Algemeen bevindt het standaard omgevingsgeluid zich tussen de 50-55 Db (Barcellos et al. 2018), maar geluidspieken kunnen veel luider zijn (122-143 dB), en de frequentie is vooral <1000 Hz, hetgeen de perceptie van natuurlijke geluiden zou kunnen beïnvloeden (auditieve maskering) (Lara and Vasconcelos 2019).

Geluid is voor vissen belangrijk in functie van overleving en voortplanting (Neo et al. 2015). Wanneer het omgevingsgeluid in faciliteiten te sterk is, kan dit interfereren met biologisch belangrijke signalen en gedragsveranderingen veroorzaken (Sabet et al. 2016). Zeer luide trillingen kunnen dan weer fysiologische stress, tijdelijke of permanente gehoorschade en zelfs fysieke verwondingen veroorzaken (Sabet et al. 2016). Het is daarom nuttig belangrijke geluidsbronnen op te sporen en te minimaliseren. Wanneer geluiden niet stiller kunnen gezet worden, kan muzikale verrijking eventueel helpen om het achtergrondgeluid te maskeren en het welzijn te verbeteren (zie sectie 6.1.4). Verder is het ook nuttig de amplitude van het omgevingsgeluid tijdens experimenten te rapporteren, iets dat tot nu toe weinig gedaan wordt (Toni et al. 2019).

5.4.3 AANBEVELINGEN: TRILLINGEN

- Zebravissen zijn gehoorspecialisten en horen dus zeer goed. Minimaliseer daarom fysieke- en geluidstrillingen in de faciliteit als dit mogelijk is.
- Muzikale verrijking kan helpen om achtergrondgeluiden te maskeren als deze het welzijn van de vissen vermindert.

5.5 DENSITEIT

5.5.1 Introductie

De densiteit geeft weer hoeveel zebravissen er in een bepaald aquarium gehuisvest worden. Meestal wordt deze parameter uitgedrukt in aantal vissen per liter water. Hoewel het over het algemeen als een duidelijke eenheid en richtlijn wordt beschouwd, houdt het geen rekening met verschillende levensstadia (massa van de vis) of het totale volume van het aquarium. Het effect van densiteit op het welzijn van de vissen wordt namelijk vooral bepaald door het lichaamsgewicht (of metabole massa) per liter, eerder dan het aantal per liter (Aleström et al. 2020). Verder zullen vissen ook sneller beperkt worden in hun welzijn in een kleiner dan een groter aquarium (onafhankelijk van het aantal vissen dat erin gehuisvest is). Zelfs wanneer de waterkwaliteit wordt gehandhaafd, is een minimaal watervolume vereist voor het welzijn van de zebravis (Cartner et al. 2019). Onderzoek naar het minimaal watervolume per vis in elk van de levensstadia ontbreekt voorlopig nog (Andersson and Kettunen 2021).

Daarom is het uitdrukken van densiteit in zowel aantal/L als totaal volume belangrijk en zou er onderzoek moeten gebeuren naar het optimaal aantal vissen per volume water, eerder dan de optimale densiteit per liter water. Ook de andere huisvestingsparameters, zoals frequentie van waterverversing zijn hierbij belangrijk in beschouwing te nemen. De overwegingen die hieronder gegeven worden gaan er daarom altijd van uit dat de waterkwaliteit gegarandeerd worden.

5.5.2 Larvale densiteit

Gezien hun lage lichaamsgewicht en kleine lichaamsgrootte, kunnen embryo's (<5 dpf) en larven (6-90 dpf) in hogere densiteiten gehouden worden dan adulte zebravissen (>90 dpf). De densiteit is echter te hoog wanneer het invloed heeft op bepaalde levensgeschiedeniskenmerken, zoals de groei van de vissen. Voor embryo's (<5 dpf) wordt in de richtlijnen van de OESO aangeraden om per embryo 2.5-5 mL water te voorzien (OECD 2013). Voor larven vanaf 6 dpf werd het effect van densiteit op groei vaak bestudeerd, zij het met verschillende resultaten. Wanneer een hoge densiteit zorgt voor vertraagde groei (en er gecorrigeerd wordt voor gemiddeld gelijke voedselinname) kan een oorzaak zijn dat er verschillende voedselinname is door dominantie (Andersson and Kettunen 2021). Een andere studie spreekt deze hypothese echter tegen omdat ook bij hoge densiteiten de variatie in de groeicurves van de verschillende vissen klein is (Leibold and Hammerschmidt 2015). Dit toont aan dat er weinig verschillen zijn tussen de vissen onderling, en er dus waarschijnlijk geen verschillende voedselinname door dominantie is. Een andere reden kan zijn dat hoge densiteiten zorgen voor een verhoogd stressgehalte (hogere cortisol), hetgeen een rechtstreeks effect kan hebben op groei (Andersson and Kettunen 2021).

Experimenteel werd aangetoond dat een densiteit van 40 larven per liter tot 5 weken na fertilisatie aangehouden kan worden zonder effect op de groei of variatie op lengte in de populatie. Dit geldt enkel wanneer er geen voedselschaarste is, doordat de hoeveelheid voedsel berekend wordt op het aantal vissen in het aquarium. Vanaf 60/L werd de variatie in lichaamsgroei tussen zebravissen groter, hetgeen een aanwijzing kan zijn dat er ongelijke voedselinname optreedt of stress is door hoge densiteit (Krug 2019). Ribas et al. (2017) kon aantonen dat densiteiten vanaf 37/L tussen 6-90 dpf een negatieve invloed hadden op overleving en groei. Bij een densiteit van 19/L of lager kon dit niet aangetoond worden (Ribas et al. 2017). Ook Martini et al. (2021) toonde aan dat 32/L een te hoge densiteit is tussen 30-90 dpf, aangezien de vissen deformaties van het skelet ontwikkelden (Martini et al. 2021). Delomas et al. (2017) besloot dat een densiteit van 12-22/L tussen 5-21 dpf zou zorgen voor de beste groeicurve (Delomas and Dabrowski 2017).

Densiteit zou ook de geslachtsratio kunnen beïnvloeden. Volgens de studie van Krug zou een voedselstressrespons door te hoge densiteiten (vanaf 60/L of 40/L langer dan 4 weken) voor een hoger cortisolgehalte zorgen, hetgeen kan resulteren in een scheefgetrokken geslachtsratio met meer mannetjes. Hier is echter veel discussie over en andere experimentele studies spreken dit tegen. De geslachtsdeterminatie wordt door vele factoren beïnvloed, zoals waterkwaliteit, lichtcyclus en voeding. Een belangrijke factor bij het opzetten van experimenten hieromtrent is het feit dat de genetische variatie binnen broedkoppels ook voor een verschil in geslachtsratio kan zorgen. Hiervoor moet dus in experimenten gecontroleerd worden, door nageslacht te verdelen over verschillende treatment groepen. Wanneer hiervoor gecorrigeerd wordt, kan het potentieel verband tussen densiteit en geslachtsratio vaak niet meer aangetoond worden (Delomas and Dabrowski 2017).

De hierboven beschreven resultaten suggereren dat een densiteit van ongeveer 20/L voor zebravissen van een maand oud geen invloed zou hebben op de onderzochte parameters. Deze densiteit komt omgerekend overeen met ongeveer 2 g/L (natgewicht/watervolume).

5.5.3 Adulte densiteit

5.5.3.1 Sociale isolatie

In de literatuur wordt beschreven dat volwassen vissen die in sociale isolatie leven een lager basaal cortisolniveau hebben dan vissen die in groep leven (Parker et al. 2012). De geïsoleerde vissen vertonen ook minder angstgedragingen en hebben lagere serotonine levels (Shams et al. 2017). Dit geldt echter enkel voor vissen die geïsoleerd opgroeien. Hoewel het dus mogelijk is dat vissen die opgroeien in isolatie minder stress ondervinden dan hun soortgenoten in groep, moeten er vanuit welzijnsperspectief echter ook andere zaken in rekening gebracht worden, zoals de mogelijkheid om zich natuurlijk te gedragen. Dit kan enkel wanneer vissen kunnen interageren in groep. Recent werd een mechanisme blootgelegd waarbij sociale isolatie zorgt voor het afremmen van de transcriptie van een kleine set genen (Anneser et al. 2020). Omgekeerd werden biologisch belangrijke genen, zoals pth2 opgereguleerd bij sociale interactie. Hoe meer soortgenoten aanwezig zijn, hoe meer het gen afgeschreven wordt. De onderzoekers konden aantonen dat de opregulatie enkel plaatsvond bij mechanische interactie tussen de larven (via een specifiek trillingspatroon rond de laterale lijn). Dit impliceert dat visuele interactie tussen vissen niet voldoende is, maar dat het belangrijk is dat vissen elkaar kunnen aanraken.

Een belangrijk punt om te beschouwen rond sociale isolatie is dat de mogelijke nadelige effecten ook tot uiting kunnen komen tijdens gedragsobservaties waarin vissen individueel gescoord worden. De afwezigheid van soortgenoten zou hierbij het gedrag van de vis kunnen beïnvloeden.

5.5.3.2 Te lage densiteit

Om aan de natuurlijke behoeften van de soort te voldoen is het nodig om een bepaald aantal vissen in het beschikbare watervolume te huisvesten. Een te lage densiteit kan er bijvoorbeeld voor zorgen dat het natuurlijk schoolgedrag wegvalt, hetgeen nefast is voor het welzijn van de zebravissen.

Bij lage densiteiten kan agressie ontstaan omdat de mannelijke vissen een dominantiehiërarchie proberen bepalen rond de broedplaats. Wanneer er een beperkt aantal broedplaatsen zijn, hebben dominante mannetjes een voordeel bij lage densiteiten. In het experiment van Paull et al. werden zebravissen gedurende 5 dagen per 4, per 12 en per 24 in 15 L aquaria met een broedplaats gehouden en werd hun gedrag onderzocht. Ze vonden dat wanneer vissen in lage densiteit worden gehouden, er steeds een dominantie wordt gevestigd, hetgeen gepaard gaat met veel agressief en territoriaal gedrag. Hoe hoger de densiteit, hoe minder agressieve gedragingen werden vastgesteld (Paull et al. 2010). In deze gevallen wordt het gebruik van structurele verrijking aangeraden, om minder dominante vissen de kans te geven te schuilen. Deze strijd om dominantie vermindert wanneer de

densiteit hoger wordt en het voor de dominante mannetjes onhoudbaar wordt de paaiplaats als territorium op te eisen. Er zal dan overgegaan worden tot groepsreproductie. Deze manier van reproduceren komt veel voor in recirculerende systemen, waarbij er door volumebeperking geen duidelijke paaiplaatsen zijn en waarbij elke vis dus de kans krijgt bij te dragen aan de reproductie.

Het effect van lage densiteiten op agressieparameters kan echter niet altijd aangetoond worden. De experimentele setup van Gronquist en Berges kon geen verschil aantonen in agressief gedrag bij densiteiten van 0,13/L, 0,3/L en 1,2/L na 10 dagen huisvesting (Gronquist and Berges 2013).

Een lage densiteit kan ten slotte ook invloed hebben op het herstel na een handeling of verdoving. Vissen die in isolatie of per twee gehuisvest worden, hervatten minder snel hun natuurlijk gedrag na een handeling of verdoving, in vergelijking met vissen in hogere densiteiten (White et al. 2017). In een proefdierfaciliteit waar handelingen veelvoorkomend zijn is het dus van groot belang een optimale densiteit te voorzien in het beschikbare volume.

5.5.3.3 Optimale densiteit bij adulten

Om de optimale densiteit voor adulte vissen te onderzoeken, kan men kijken naar het effect op reproductie. Een eerste studie vond dat vissen die gedurende 1 maand bij een densiteit van 6.6/L (in 1,8 L tanks) gehuisvest worden kleinere embryo's produceerden, die echter resulteerden in grotere larven dan vissen bij een densiteit van 3,3/L. Er was geen verschil in productie of overleving tussen beide densiteiten (Kolb et al. 2018). Een andere studie onderzocht het verschil in reproductieparameters tussen densiteiten van 3/L, 6/L en 12/L (in 1,8-3 L tanks) bij vissen die gedurende 1 maand bij deze omstandigheden werden gehuisvest. Ze vonden geen verschil in productie, overleving of % succesvolle broedkoppels (Castranova et al. 2011).

Verder moet er ook rekening gehouden worden met het effect van densiteit op stressniveau (cortisol). Dit is echter sterk afhankelijk van de omstandigheden van de studie. Zo toonden Ramsay et al. (2006) aan dat vissen die in een groot volume (76 L) gehuisvest worden aan hoge densiteit (40/L) een hoger cortisolniveau hebben dan wanneer ze slechts bij 0,2/L worden gehouden. Deze verhoging in cortisolniveau werd echter niet gevonden in een kleiner volume (4 L), waar vissen bij 40/L gelijkaardige cortisolniveaus vertoonden dan vissen met 4/L (Ramsay et al. 2006). Gronquist en Berges opteerden voor een experimentele setup met tanks van 45 L die door fijnmazige netten kleiner gemaakt konden worden om de densiteit te veranderen. Het totale watervolume in het aquarium bleef daarbij hetzelfde. Ze vonden na 10 dagen blootstelling geen verschil in cortisolconcentratie in het water tussen densiteiten van 0,13/L; 0,30/L en 1,2/L (Gronquist and Berges 2013). Pavlidis onderzocht de acute stressrespons van verschillende densiteiten. In een eerste experiment werden verschillende aantallen vissen in 0,5 L aquaria gedurende 2 uur gehouden. Alle groepen vertoonden dezelfde stijging in cortisolniveau ten opzichte van de controle (vissen uit een 250 L tank). In een tweede experiment werden 10 vissen telkens in verschillende volumes (0,25 tot 2 L) gehouden gedurende 2 uur. Een verhoogd cortisolniveau kon aangetoond worden in aquaria van 1 L of kleiner. Er werd dus een optimum gevonden bij intermediaire densiteit van 10 vissen in 2 L (Pavlidis et al. 2013). Deze densiteit van 5/L voor adulte zebravissen is ongeveer gelijk aan een densiteit van 1,8 g/L (natgewicht/watervolume).

Hoewel er veel experimentele studies rond het effect van densiteit op een variatie aan parameters bestaan, is er vooralsnog weinig te vinden over densiteiten in volumes die voor een proefdierfaciliteit relevant zijn (zoals de standaardmaten van tanks in een recirculerend rek). Vissen kunnen ook tijdelijk bij densiteiten hoger of lager dan het optimum gehouden worden, maar het is onduidelijk hoe lang dit kan. Verder kunnen vissen negatieve effecten ondervinden van het abrupt veranderen van de densiteit of hiërarchische groep binnen het aquarium.

5.5.3.4 Te hoge densiteit

Een hoge densiteit van 40/L heeft naast effect op andere hogerop besproken parameters, ook een negatieve invloed op de algemene waterkwaliteit (Pavlidis et al. 2013). Bovendien kan de combinatie van een slechte waterkwaliteit en de nauwe interactie tussen de vissen er voor zorgen dat er meer kans is op het verspreiden van bacteriële infecties (Murray et al. 2011). Dit werd al vastgesteld vanaf een densiteit van 4.9/L. Een verhoogde frequentie van schoonmaken van de tanks kan daarom aanbevolen worden.

5.5.4 AANBEVELINGEN: DENSITEIT

- Volgens de literatuur zou de optimale densiteit voor zowel vissen van 1 maand als voor volwassen vissen optimaal zijn rond 2 g/L (natgewicht/watervolume).
- We raden daarom voor larven tot 30 dpf een maximale densiteit van 20/L aan. Voor larven van 60 dpf zou de optimale densiteit omgerekend ongeveer 10/L zijn. Deze aanbevelingen gelden enkel in een recirculerend systeem of een systeem met regelmatige verversing en zijn gebaseerd op studies die het effect op groei en mortaliteit beschouwden (Delomas and Dabrowski 2017, Ribas et al. 2017, Martini et al. 2021).
- Voor adulten is het belangrijk intermediaire densiteiten aan te houden waarbij het natuurlijk gedrag van de soort tot uiting kan komen, maar er geen invloed is op reproductie of stressparameters door te hoge densiteiten. In recirculerende systemen worden in verschillende bronnen 5 vissen per liter aangeraden als optimale densiteit (Matthews et al. 2002, Cartner et al. 2019, Aleström et al. 2020). Voor statische, grote aquaria waar het water geregeld ververst wordt, is de aanbeveling 2/L (Brand et al. 2002). Dit kan gerijmd worden met de literatuur rond effecten van deze densiteiten op gedrag, reproductie en waterkwaliteit.

HOOFDSTUK 6: VERZORGING IN ZEBRAVISFACILITEITEN

6.1 VERRIJKING

Verrijking kan worden gedefinieerd als een combinatie van levenloze en sociale stimulatie, aangeboden om het welzijn van de vis te verbeteren (Manuel et al. 2015a). Door het aquarium te verrijken tijdens de huisvesting kan een vis mentaal en fysiologisch gestimuleerd worden om zich natuurlijker te gedragen. Hierdoor vergroot de kans dat ze natuurlijke responsen vertonen in studies en experimenten, waardoor de resultaten betrouwbaarder worden en de reproduceerbaarheid stijgt. Verrijking is daarom van wetenschappelijk belang. Er gaan echter vaak (andere) wetenschappelijke, economische en efficiëntiebeperkingen mee gepaard, en het empirisch onderzoek naar verrijking geeft soms nog geen sluitende antwoorden (Aleström et al. 2020).

Verrijking kan aangeboden worden in verschillende vormen, die elk op een andere manier kunnen bijdragen aan het welzijn van de zebravissen en gecombineerd kunnen worden. De meest voorkomende vormen worden hieronder toegelicht.

6.1.1 Structurele verrijking

Structurele verrijking wordt aangebracht om de ruimtelijke complexiteit van een aquarium te verhogen, waardoor het psychologisch welzijn van de dieren verbetert (Collymore et al. 2015). Deze verrijking kan in verschillende vormen aangeboden worden, zoals planten of namaakplanten. Ook van andere structuren werd aangetoond dat ze angstparameters positief kunnen beïnvloeden, zoals drijvende transparante nylon draden, die overhangende aquatische vegetatie nabootsen (Soares et al. 2020). Substraat, in de vorm van zand of kiezels wordt ook gebruikt, om zo de habitats na te bootsen waar zebravissen van nature voorkomen (Stevens et al. 2021). Niet elke structuur zorgt echter voor een positief effect. Zo kon er voor het gebruik van ondoorzichtige glazen staven geen verbetering van het dierenwelzijn worden aangetoond (Wilkes et al. 2012).

Het gebruik van structurele verrijking kan ook het effect van stressoren verminderen, en dit zowel voor acute (Giacomini et al. 2016), als chronische stressoren (Marcon et al. 2018). Verder kunnen structuren in het aquarium ook fungeren als impuls om eieren af te zetten, waardoor er dagelijkse eiproductie is (Aleström et al. 2020), hetgeen meer bij de natuurlijke ecologie van de soort aanleunt. Er zou daarbij geen invloed zijn op het fertilisatiesucces van de geproduceerde eieren (Woodward et al. 2019). Ook de geslachtsratio van opgroeiende zebravissen zou niet beïnvloed worden door structurele verrijking (Lee et al. 2019).

Onderzoek naar het effect van structurele verrijking op groei van zebravissen toonde geen eenduidige resultaten, met studies die een positief effect op groei aantoonden (Spence et al. 2011), terwijl anderen een negatief effect beschreven (Lee et al. 2019, Woodward et al. 2019).

Het effect van structurele verrijking op gedrag is goed onderzocht, al zijn de resultaten ook niet altijd eenduidig. Vissen die opgroeien in een verrijkte omgeving zouden minder angstgedrag en meer exploratiegedrag vertonen (Manuel et al. 2015b, Lee et al. 2019). Ook werd beschreven dat vissen in verrijkte omgevingen sneller reageren op het toedienen van voedsel dan vissen uit kale omgevingen (von Krogh et al. 2010). Ten slotte werd met doolhofproeven ook aangetoond dat het leervermogen van vissen uit structureel complexe omgevingen beter is (Spence et al. 2011). Voorkeurstesten tonen vaak aan dat vissen verrijkte omgevingen met een substraat (en dan vooral kiezels en planten) verkiezen boven lege compartimenten in aquaria (Kistler et al. 2011, Schroeder et al. 2014). Deze voorkeur wordt echter niet altijd gevonden wanneer andere factoren (zoals dominantie) effecten op het gedrag hebben (Lee et al. 2019) (maar zie ook bedenkingen bij voorkeurstesten in 4.2.3). Het is

evenwel belangrijk te vermelden dat zelf als de populatie onverschillig is ten opzichte van verrijking in termen van voorkeur, de praktische voordelen van de verrijking (vb. verhoogde eiproductie) kunnen blijven gelden.

Er zijn echter een aantal redenen waarom het gebruik van structurele verrijking onder proefdiergebruikers omstreden is. Vanuit welzijnsperspectief is de belangrijkste reden om niet aan structurele verrijking te doen het feit dat het mogelijks agressie en risicogedrag in zebravissen promoot (Woodward et al. 2019). Vissen kunnen zich territoriaal opstellen om de toegevoegde structuur te monopoliseren. Dit kan door het scholend karakter van de soort en de dominantiehiërarchie binnen de populatie voor wrevel zorgen (Woodward et al. 2019). Verder kan de spontane eiproductie door de aanwezigheid van structurele verrijking ook nadelig zijn tijdens geïnduceerde eiproductie voor proeven. Daarnaast kunnen valse planten en structurele verrijkingselementen in het algemeen ook een belangrijke bron voor bacteriegroei zijn en kunnen er biofilms op ontstaan. Het effect op hygiëne en waterparameters is momenteel echter onvoldoende onderzocht (Cartner et al. 2019). Ten slotte kunnen plastic planten, die momenteel de meest gebruikte structurele verrijking zijn, een toxicologisch risico vormen doordat ze additieven als bisfenol A bevatten. Deze kunnen in het water diffunderen, alsook rechtstreeks opgenomen worden door de vissen wanneer ze aan de structuren bijten (Aleström et al. 2020). Om deze reden is het belangrijk na te gaan of de gebruikte structurele verrijkingselementen inert zijn.

6.1.2 Nutritionele verrijking

Bepaalde soorten voeding kunnen gedefinieerd worden als verrijking op voorwaarde dat het basisdieet reeds alle nutritionele behoeften vervult (Stevens et al. 2021). De extra voeding, vooral in de vorm van levend voeder, kan dan belangrijk zijn omdat de toevoeging ervan het natuurlijk predatiegedrag van de soort stimuleert. Het effect van levend voeder op welzijnsparameters zoals gedrag werd echter nog niet wetenschappelijk onderzocht.

Naast het type voedsel kan de frequentie van voederen ook implicaties hebben op het welzijn. Zo vertoonden vissen die twee maal per dag gevoederd werden minder angstgedragingen dan degenen die slechts één keer per dag gevoederd werden (Dametto et al. 2018).

6.1.3 Visuele verrijking

Visuele verrijking is erg in trek in proefdierfaciliteiten omdat er geen gevaar tot contaminatie is en het gemakkelijker in onderhoud is dan structurele verrijking. Een studie toonde aan dat zebravissen die kunnen kiezen tussen een kale of een verrijkte ondergrond steeds een verrijkte ondergrond kiezen, maar daarbij bijna even vaak voor stickers van kiezels kiezen dan voor echte kiezels. Zebravissen kunnen ook visueel verrijkt worden als ze elkaar kunnen zien doorheen aquaria. Schoolgedrag werd ook tussen tanks geobserveerd, dus het kan stressverlagend werken als tanks transparant zijn. Bovendien wordt het zicht op soortgenoten door zebravissen ervaren als belonend (Al-Imari and Gerlai 2008). Dit kan belangrijk zijn als een vis in quarantaine moet gezet worden, maar zich op deze manier toch minder geïsoleerd voelt.

Ten slotte blijken zebravissen ook gevoelig aan de kleuren in en rond hun aquarium. Onderzoek hiernaar kan echter nog geen eenduidig antwoord geven over welke kleur dan het beste is op vlak van welzijn. Dit is vooreerst afhankelijk van de structuur die gekleurd wordt (achtergrond (Oliveira et al. 2015) of kiezels (Avdesh et al. 2012)). Verder werd het effect van kleuren op verschillende manieren onderzocht: door voorkeurstesten (Avdesh et al. 2012, Oliveira et al. 2015), als onderdeel van een leerproces (Roy et al. 2019) of door effecten op angstgedrag en fysiologie na te gaan (de Abreu et al. 2020), met conflicterende resultaten tussen studies. Ten slotte trachtte Siregar et al. (2020) de kleurvoorkeur te onderzoeken door te corrigeren voor verschillende parameters (densiteit, leeftijd,

verlichting, lijn). Uit deze studie bleek dat zebravissen rood en blauw verkiezen boven groen en geel, en dat geel steeds gemeden wordt. Er zou echter veel invloed zijn van omstandigheden als opgroeiomgeving (vb. kleur van het originele aquarium), en kleur van het voedsel (Siregar et al. 2020). Larvale zebravissen vertonen een voorkeur voor lichtrijke omgevingen, terwijl adulten eerder lichtschuw zijn (in functie van predatierisico) (Kysil et al. 2017).

6.1.4 Auditieve verrijking

Er bestaan een aantal studies die het effect van muziek op het welzijn van zebravissen onderzoeken. Zo bleken vissen rustiger en minder angstig te zijn wanneer ze gedurende 15 dagen werden blootgesteld aan 4 uur klassieke muziek per dag (Barcellos et al. 2018). Deze vorm van verrijking kan daarom ook nuttig zijn wanneer isolatie van vissen noodzakelijk is voor wetenschappelijke doeleinden (Marchetto et al. 2021).

6.1.5 Sociale verrijking

Wanneer zebravissen de keuze wordt gegeven tussen een structureel verrijkt compartiment, of één met soortgenoten, zullen ze vaker het laatste kiezen (Collymore et al. 2015). In deze studie werd verder ook aangetoond dat vissen die geïsoleerd worden van de groep en in een barre omgeving gehuisvest worden, meer angstgedragingen vertonen. Interessant hierbij is dat, wanneer het echt noodzakelijk is een vis alleen te huisvesten, het toevoegen van structurele verrijking ervoor kan zorgen dat de vis minder angstig is (Collymore et al. 2015).

Er zijn oplossingen om het sociale welzijn te verbeteren, zonder de mogelijkheid om bepaalde vissen te identificeren te verliezen. Zo kunnen bijvoorbeeld duidelijk te onderscheiden vissen (van een andere lijn, of met een tag) toegevoegd worden aan het aquarium (Cartner et al. 2019).

6.1.6 AANBEVELINGEN: VERRIJKING

- De keuze voor verrijking moet rekening houden met de wetenschappelijke doeleinden waarvoor de zebravissen gebruikt worden, in combinatie met de ecologische noden van de soort (zoals het stimuleren van natuurlijk gedrag).
- Gezien de voor- en nadelen van structurele verrijking moet er afgewogen worden of het nuttig kan zijn deze aan te bieden, afhankelijk van het gedrag van de lijn/soort, densiteit, leeftijd, duur van de studie, … (Toni et al. 2019).
- Wanneer vissen in isolatie moeten gezet worden, is het zeker voordelig (een combinatie van) structurele, visuele (zicht op andere vissen) of auditieve verrijking aan te bieden.
- Nutritionele verrijking in de vorm van levend voedsel, afwisselend voedsel of hogere frequentie aan voedingsbeurten is aangeraden ter verbetering van het welzijn van zebravissen die gedurende lange tijd in de proefdierfaciliteit worden gehouden (niet-experimentele vissen).

6.2 VOEDING

In een natuurlijke context zijn zebravissen generalisten, die zich voeden met een brede waaier aan soorten insectenlarven, wormen en kleine schaaldieren (Lawrence 2007). In een proefdierfaciliteit is voeding daarom een complex gegeven. Er moet vooreerst beslist worden wat zebravissen aan nutritionele input per dag moeten krijgen. De nutritionele vereisten van larvale en adulte zebravissen zijn tot op heden echter nog onduidelijk (Cartner et al. 2019). Verder moet er beschouwd worden hoe die nutriënten moeten toegediend worden (via welk type voeding). Ten slotte is ook de verdeling van de nutritionele behoeften doorheen de dag een belangrijke parameter (frequentie). Al deze

voedingsparameters hebben een rechtstreeks effect op alle organismale niveaus en moeten daarom goed opgevolgd worden om het dierenwelzijn te garanderen.

6.2.1 Hoeveelheid

Er worden verschillende methodes gebruikt om te bepalen hoeveel voeding vissen in faciliteiten moeten krijgen. De eerste is ad libitum, hetgeen impliceert dat de vissen meer eten toegediend krijgen dan ze nodig hebben. De vis kan dan zelf kiezen hoeveel hij ervan eet. Het voordeel van deze methode is dat alle vissen altijd verzadigd zijn (ook de minder dominante). De waterkwaliteit verslechtert echter sneller door het overtollig voedsel en het is ook een financiële kost aangezien er meer eten moet aangekocht worden.

In een andere methode wordt de tijd vastgelegd binnen dewelke de vissen al het eten moeten opgegeten hebben. Een voorbeeld is dat al het eten binnen de 5-15 minuten opgegeten moet zijn (Cartner et al. 2019). Het voordeel van deze methode is dat de regel gemakkelijk toepasbaar is (weinig voorbereiding, begrijpelijk) en er geen overtollig voedsel achterblijft. Het nadeel is dat het subjectief en weinig gestandaardiseerd is, waardoor het niet aangeraden wordt bij experimenten waar voeding een invloed kan hebben op de resultaten. Ten slotte is het voor drijvend voedsel een moeilijk toepasbare regel, omdat vissen een voorkeur hebben om in de waterkolom en op de bodem te foerageren (Cartner et al. 2019).

De laatste methode is de hoeveelheid voedsel te berekenen op basis van het lichaamsgewicht van de vissen, bijvoorbeeld 2-3% van het lichaamsgewicht per dag (Martins et al. 2019, Zarantoniello et al. 2021). Als vissen in groep gehuisvest zijn, wordt het gemiddelde lichaamsgewicht van de groep berekend of geschat op basis van het gewicht van een aantal vissen. Deze methode is wetenschappelijk zeker de meest gestandaardiseerde en daarom interessant wanneer voeding een belangrijke factor is in een experimentele setting. Er kan op die manier exact gerapporteerd worden hoeveel voeding er toegediend werd. Het grote nadeel van deze methode is dat het heel arbeidsintensief is omdat zowel de vissen regelmatig (en per aquarium), als de voeding moeten gewogen worden.

Het overvoeden van vissen kan ervoor zorgen dat ze leververvetting en andere obesitas-gerelateerde symptomen ontwikkelen. Een studie naar het effect van obesitas op reproductie toonde aan dat de embryoproductie constant bleef, maar dat er een slechtere overleving was bij larvale zebravissen, waarbij er vooral veel mortaliteit was vanaf de leeftijd van 6 weken (Virote et al. 2020). Om overvoeden tegen te gaan kan het interessant zijn om vissen die lange tijd in de faciliteit worden bijgehouden zonder dat ze embryo's moeten produceren, minder voeding per lichaamsgewicht te geven (Brand et al. 2002). Reproductie kan opnieuw op peil gebracht worden door de vissen gedurende een aantal weken vettere voeding te geven (Howells and Betts 2009).

6.2.2 Soorten voeding

Type voeding en frequentie van voederbeurten kunnen effecten hebben op de groei van jonge vissen, maturatietijd (Farias and Certal 2016), reproductieve output en gedrag. De meeste faciliteiten voederen een combinatie van levend voeder en droogvoeder (Lawrence et al. 2016).

Er werden al een aantal commerciële zebravisvoeders ontwikkeld die als droogvoer toegediend worden. De meest gebruikte commerciële diëten zijn ontwikkeld vanuit een bepaalde ratio aan nutriënten (Vb. Zebrafeed (Sparos), Gemma (Skretting)). Anderen zijn gemaakt met een specifieke basis, vb. larven van de zwarte soldatenvlieg *Hermetia illucens* (Zarantoniello et al. 2020). Bij de ontwikkeling van droogvoer wordt erop gelet dat het eigenschappen heeft waardoor het zo lang mogelijk in suspensie blijft, zodat zebravissen het in de waterkolom kunnen tegenkomen (Cartner et

al. 2019). Dit is vooral belangrijk in de vroege levensstadia, wanneer er nog niet actief gejaagd en gezocht wordt naar voedsel.

Een vergelijkende studie tussen Zebrafeed (Sparos) en GemmaMicro (Skretting) toonde aan dat voederen met Zebrafeed (Sparos) tijdens de larvale fase (5-90 dpf) resulteerde in een lagere mortaliteit en een betere leefbaarheid van de embryo's geproduceerd door de jongvolwassen vissen (>90 dpf) (Monteiro et al. 2018). Anderzijds zorgde het voederen met GemmaMicro (Skretting) dan weer voor een snellere groei (Monteiro et al. 2018).

Levend voeder is vooral belangrijk voor zebravissen in de eerste levensstadia. Larven moeten snel gevoederd worden nadat ze hun positie in de waterkolom kunnen houden en actief rondzwemmen, omdat hun energiereserves uit de dooier op dat moment snel opgebruikt worden (Cartner et al. 2019). Om een snelle groei te bewerkstelligen is het bovendien nodig een bijna continue aanwezigheid van vers voedsel te hebben. Daarnaast is het door hun kleine lichaamslengte ook belangrijk dat de voedseldeeltjes klein genoeg zijn. De aanwezigheid van levende voedselbronnen van kleine afmetingen die in het aquarium blijven rondzwemmen kan aan deze beide eisen voldoen. Er werd aangetoond dat levend voeder een positief effect heeft op de groei (Markovich et al. 2007, Dabrowski and Miller 2018) en generatietijd van zebravissen (Martins et al. 2016a). Voorlopig is er nog geen droogvoerdieet gevonden dat de nood aan levende voeding elimineert tijdens deze jonge levensstadia. Er wordt wel veel onderzoek naar gedaan, omdat dit de standaardisatie ten goede zou komen (Cartner et al. 2019). Het grote nadeel van het toedienen van levend voeder is dat het een hoger risico vormt voor de verspreiding van pathogenen dan droogvoer (Martins et al. 2016a).

Paramecium was het eerste levend voer dat in grote faciliteiten werd toegediend aan zebravissen. Na jaren intensief gebruik werd echter duidelijk dat er nadelen aan verbonden zijn, zoals het feit dat de kweek zeer arbeidsintensief is en dat diezelfde kweek een belangrijke vector kan zijn voor infecties. Ondertussen wegen de voordelen van andere levende voeders, zoals *Artemia* en rotiferen (Cartner et al. 2019) op tegen de nadelen van het gebruik van *Paramecium*. Rotiferen zijn zeer klein en kunnen aan de eerste levensstadia van zebravissen gevoederd worden. De rotiferencysten kunnen bovendien gecultiveerd en ontsmet worden. *Artemia* zijn eerder geschikt voor iets grotere larven (vanaf 10 dpf) en adulte vissen, omdat ze groter zijn en sneller zwemmen (Lawrence 2007). *Artemia* en rotiferen hebben een hoog proteïnegehalte en zijn zeer verteerbaar (Cartner et al. 2019). Er moet bij jonge vissen opgelet worden zo weinig mogelijk niet-uitgekomen artemiacystes te voederen. Voeding moet zeer verteerbaar zijn aangezien het verteringssysteem van de larven nog eenvoudig is. Artemiacysten kunnen de darm blokkeren of andere schadelijke effecten veroorzaken (Martins et al. 2016a).

In het adulte stadium suggereert de literatuur en ervaring voorlopig dat het op nutritioneel vlak voldoende is om zebravissen droogvoer te geven (Lawrence, 2016). Het toevoegen van levend voedsel aan het dieet van zebravissen in proefdierfaciliteiten kan echter van belang zijn voor het dierenwelzijn aangezien ze op die manier natuurlijk jaaggedrag kunnen uitoefenen (Aleström et al. 2020). Bepaalde studies geven ook aan dat levend voeder een positief effect heeft op reproductie (Markovich et al. 2007). Dit kan te wijten zijn aan het hoge lipidengehalte in bepaalde soorten levend voer. De balans tussen de nutritionele, fysiologische nood en psychologische nood aan jagen is niet voldoende doorgrond (Lidster et al. 2017).

Vriesvoer, zoals *Daphnia* of *Chironomus* larven, wordt minder vaak toegediend in zebravisfaciliteiten (Lidster et al. 2017) en is vooral nuttig bij wijze van afwisseling tussen verschillende voedselbronnen (dus als nutritionele verrijking). Deze voedselbronnen kunnen gekweekt zijn of geoogst worden. Wanneer ze geoogst worden uit milieus waar andere vissen aanwezig zijn, bestaat er een risico dat pathogenen worden doorgegeven (Brand et al. 2002). Dit is niet het geval bij bevroren *Artemia*, omdat deze bij zeer hoge zoutconcentraties gekweekt worden.

6.2.3 Voedingsschema

Zebravissen in proefdierfaciliteiten worden gemiddeld 2 à 3 keer per dag gevoederd (Lawrence et al. 2016). De frequentie van voederen kan effect hebben op verschillende parameters, zoals de groei, de reproductie en het dierenwelzijn. Op vlak van dierenwelzijn werd aangetoond dat één keer per dag voederen zorgde voor meer angstgedragingen (minder tijd in bovenste zone van het aquarium) bij adulte zebravissen (Dametto et al. 2018). Twee keer per dag voederen (ten opzichte van 4x en 6x per dag) resulteerde in het meest exploratieve gedrag, met meer tijd in de bovenste zone van het aquarium (Dametto et al. 2018). Een studie van Lawrence et al. (2012) toonde verder aan dat vissen het snelst groeien wanneer ze 1-5x per dag voedsel krijgen, maar dat het voor reproductieve parameters als embryoproductie en succesvolle broedpogingen beter is om 1-3x voeding te krijgen.

De EU-richtlijn 2010/63/EU verplicht proefdierfaciliteiten om alle vissen minimum eenmaal per dag te voederen (behalve tijdens of voorafgaand aan bepaalde procedures, zoals de dag voor een transport). Een nadeel van slechts eenmaal per dag eten te geven, is dat de volledige portie voeder van één dag op dat moment moet gegeven worden, waardoor niet alles opgegeten wordt en de kwaliteit van het water kan verslechteren. Los van de frequentie van het voederen is het belangrijk steeds ongeveer op hetzelfde tijdstip te voederen, aangezien de metabolische genen een cyclische expressie vertonen die gereguleerd wordt door klokgenen (Paredes et al. 2015)

Er zijn geen studies die het effect van verschillende weekendregimes onderzoeken. Dit is zonder twijfel echter een belangrijke factor in reproduceerbaarheid en standaardisatie van experimentele resultaten. Het is daarom aangeraden om deze informatie steeds duidelijk te rapporteren.

6.2.4 AANBEVELINGEN: VOEDING

Voedingsschema per levensstadium.

Leeftijd	Frequentie per dag		Samenstelling	Bron
	Week	Weekend		
5-30 dpf	3-5	2	Levend + droog	(Gonzales and John 2012, Collymore et al. 2015, Farias and Certal 2016, Geisler et al. 2016, Monteiro et al. 2018, Printzi et al. 2021)
31-60 dpf	3	1-2	Levend + droog	(Geisler et al. 2016, Monteiro et al. 2018)
60-90 dpf	2-3	1	Droog (+ levend)	(Geisler et al. 2016, Monteiro et al. 2018)
> 90 dpf	Functie-afhankelijk*	1	Droog (+ levend/vries)**	(Dametto et al. 2018)
> 1 jaar	1-2	0-1***	Droog (+ levend/vries)	

***** Gemiddeld 2x per dag. Voor optimale reproductie: 2x per dag, Voor optimale groei: 3x per dag.
** Voor optimale reproductie: belangrijk om ook levend voeder aan het dieet toe te voegen.
*** Minimaal één keer om de twee dagen

6.3 HYGIËNE EN GEZONDHEIDSMONITORING

6.3.1 Hygiëne

Hygiëne in de proefdierfaciliteit is belangrijk voor de gezondheid en het welzijn van zowel proefdieren als het personeel. In een aquatische proefdierfaciliteit is het vooral belangrijk biofilms, algen en organisch afval te verwijderen om zoönotische (d.w.z. overdraagbaar van dier op mens) en besmettelijke infecties te voorkomen (Martins et al. 2016a, Newell and Brocca 2022). Ook de fysieke ruimte waarin de faciliteit opgesteld staat, moet proper gehouden worden. De tafels moeten na gebruik steeds proper gemaakt worden en gemorste voeding moet steeds verwijderd worden. Eenmaal per maand kan er tijdens een algemeen schoonmaakmoment gezorgd worden dat alle systemen, tafels, goten, … schoongemaakt worden, en de vloer gedweild wordt.

Aquaria moeten regelmatig gepoetst worden (bv. 1x per week of 2x per maand). Het materiaal kan gewassen worden in een speciaal ontworpen wasmachine (vb. "*rack washer*"), maar hiervoor kunnen ook huishoudelijke wasmachines gebruikt worden, zolang deze over een programma beschikken waarmee op >60°C kan gewassen worden. Hierbij wordt bij voorkeur geen zeep gebruikt. Wanneer er geen wasmachine voorhanden is, moeten de tanks manueel gekuist worden. Een nadeel hiervan is dat dit het oppervlak van de aquaria kan beschadigen, waardoor er nadien nog sneller algengroei optreedt (Newell and Brocca 2022). Een aantal onderdelen van de commerciële zebravistanks, zoals de sifons/hevels kunnen niet in de wasmachine gewassen worden, omdat ze uit rubber bestaan. Uit onderzoek blijkt dat een sonicatie- of autoclaafstap aan het schoonmaakproces moet toegevoegd worden om biofilms op deze onderdelen te elimineren (Martins et al. 2016a). Na alle was- en ontsmettingsstappen dient het materiaal steeds grondig met water afgespoeld te worden (Newell and Brocca 2022).

In faciliteiten waar losstaande aquaria gebruikt worden (vaak van een groter volume), worden aquaria anders schoongemaakt. Bij een grondige schoonmaakbeurt worden alle vissen (en eventuele slakken) eerst overgezet naar een ander aquarium, zodat het origineel aquarium volledig schoongemaakt kan worden. In andere gevallen worden de vissen in het aquarium gelaten, terwijl een groot deel van het water uit het aquarium gezogen wordt en de algengroei van wanden en deksel wordt afgekuist. In beide gevallen blijft de biologische filter behouden door deze tijdens de schoonmaak nat te bewaren. Nadat het organische materiaal op de bodem gezakt is, wordt de bodem met een sifon-systeem proper gezogen. Wanneer er algen in de waterinlaat groeien, worden deze buizen vervangen (Geisler et al. 2016). Nadien wordt het water opnieuw aangevuld. Er werd aangetoond dat deze kuisroutine voor stress zorgt bij de vissen, maar deze is slechts van korte duur is, want na een minuut herstelt het gedrag zich terug naar de normale conditie (Powell et al. 2021). In deze gevallen kan men dus beter overwegen de vissen niet te verplaatsen.

Boven op de hygiënische voordelen van regelmatig poetsen kan dit ook een belangrijk moment zijn om aan extra welzijnsmonitoring te doen, aangezien vissen van bovenuit kunnen geobserveerd worden. Op die manier worden vissen met abnormale skeletgroei of gezwellen beter opgemerkt.

Naast de schoonmaak van de aquaria zelf, moeten systemen op geregelde tijdsstippen (afhankelijk van de bezetting om de maand of om de twee maand) volledig schoongemaakt en onderhouden worden. Dit omvat het schoonmaken van de goten en vergaarbak, vervangen van filters en het doorspoelen van de kraantjes.

Het personeel kan persoonlijke beschermingsmiddelen dragen, zoals handschoenen (nitril, poedervrij), labojassen, … Schoenkapjes kunnen in een aquatische faciliteit een risico zijn door de gladheid van de ondergrond. Contact tussen de blote handen en het water kunnen gevaarlijk zijn voor mens en vis. De zepen en lotions aanwezig op menselijke huid kunnen de slijmlaag van de zebravissen

aantasten (Harper and Lawrence 2016). Anderzijds komen er in faciliteiten verschillende pathogenen voor met zoönotische eigenschappen die dus van vissen op mensen kunnen overslaan (zie 6.3.2).

6.3.2 Gezondheidsmonitoring

Het doel van regelmatige gezondheidsmonitoring is het detecteren en voorkomen van de verspreiding van potentieel schadelijke pathogenen (Martins et al. 2016a). Hoewel deze pathogenen infecties kunnen veroorzaken zonder klinische verschijnselen, is er steeds het gevaar dat experimentele resultaten beïnvloed worden, of data verkeerd geïnterpreteerd wordt (Collymore et al. 2016b).

Om infecties te voorkomen is een eerste belangrijke stap stabiele omgevingscondities in de faciliteit te voorzien, zodat het immuunsysteem van de vissen optimaal functioneert. Verder is het verminderen van pathogene belasting door reiniging, desinfectie en verwijdering van zieke/dode dieren cruciaal (Mocho and Pereira 2022). Gemiddeld gezien komen ziektes vaker voor bij vissen vanaf één jaar oud, omdat ze meer tijd en kans hebben besmet te worden én omdat ze door de ouderdom een verminderde werking van het afweersysteem vertonen. Om pathogeenverspreiding te vermijden kan het daarom interessant zijn deze vissen tijdig uit de populatie te verwijderen, of in een aparte circulatie te huisvesten (Collymore et al. 2016b).

Om het binnenkomen van infecties in de faciliteit te minimaliseren kan er gevraagd worden om voor elk dier dat binnenkomt een gezondheidsrapport te voorzien. Wanneer vissen geïmporteerd worden als embryo's kunnen ze ontsmet worden met bleekwater, al geeft dit geen volledige garantie op slagen aangezien intracellulaire parasieten in de eitjes aanwezig kunnen zijn (Chang et al. 2016). Larven en adulten moeten steeds in een quarantaine-unit verblijven. Dit is best een aparte ruimte, maar wanneer dit niet voorhanden is kan er gekozen worden voor een apart aquarium met circulatie dat volledig gescheiden is van het andere systeem. Al het materiaal van de faciliteit en de quarantaine unit moet gescheiden blijven (netjes, pipetten, voederlepels, …). Ook zonder het binnenkomen van nieuwe vissen is het interessant om verschillende systemen met een aparte circulatie volledig van elkaar te scheiden, door ook het gebruikte materiaal te scheiden. Nageslacht dat in verschillende units geproduceerd werd, kan enkel na ontsmetting van de embryo's eventueel samengevoegd worden in dezelfde unit (Mocho and Pereira 2022).

Om pathogenen te detecteren en te identificeren, kunnen verschillende methodes gebruikt en gecombineerd worden. De eerste stap is de dagelijkse welzijnsmonitoring (zie hfst 8), waarbij uitbraken van ziektes met klinische symptomen kunnen worden vastgesteld. Wanneer deze vissen of andere vissen tijdens de halfjaarlijkse monitoring campagne onderzocht worden, is de meest gebruikte methode PCR-detectie, waarbij specifieke deeltjes van het DNA worden vermenigvuldigd om verschillende pathogenen te identificeren. Men kan ook histopathologische analyses uitvoeren, een methode die interessant is in het geval van zebravissen omdat een doorsnede van de volledige vis mogelijk is. Deze analyse kan onder andere infectieziekten confirmeren (Marancik et al. 2020). Ten slotte kan op kadavers een necropsie uitgevoerd worden, waarbij de slijmlaag van de huid, de schubben of kleine stukken orgaan onderzocht worden.

De frequentie van externe pathogeenmonitoring verschilt erg tussen faciliteiten, omdat het een voorzorgsmaatregel is die kosten met zich meebrengt. Dit moet echter gezien worden als een investering in de toekomst van de faciliteit, aangezien de kosten die met een infectie-uitbraak en het afbreken van experimenten gepaard gaan, veel hoger zijn. In de literatuur wordt een minimumfrequentie van 2 keer per jaar voorgesteld (Collymore et al. 2016b, Mocho and Pereira 2022) als richtlijn. Voor het opsporen van sommige pathogenen zoals *P. tomentosa en P. neurophilia* (zie lager) wordt zelfs 4x per jaar aangeraden (Collymore et al. 2016b).

Verschillende bronnen binnen de faciliteit kunnen onderzocht worden op de aanwezigheid van pathogenen. Afhankelijk van de bron varieert de slaagkans op het detecteren van de pathogenen die in het systeem aanwezig zijn. Het doel moet uiteraard zijn deze kans te maximaliseren. Wanneer vissen uit de kolonie onderzocht worden, hangt het van de pathogeenverspreiding en het aantal

onderzochte vissen af of pathogenen gevonden worden (zie later). Om de kans te vergroten kunnen gedurende een lange tijd (bv. drie maanden) een aantal sentinelvissen gehouden worden. Deze worden best voor het filtersysteem, of in rechtstreekse verbinding met de vergaarbak geplaatst. Eventueel kan het ook nuttig zijn vissen te gebruiken die net voor, én net na het filtersysteem zitten. Zo kan de werking van het systeem en de UV-lamp onderzocht worden. Ook vissen die al lang in het systeem gehuisvest zijn en niet meer voor andere doeleinden gebruikt worden, kunnen hiervoor gebruikt worden. Ten slotte is het ook een optie om kadavers te onderzoeken.

Naast de vissen zelf kan ook de omgeving een bron van pathogenen zijn. Om dit te onderzoeken kunnen de biofilms, het slib of de waterfilters onderzocht worden. Eieren van parasieten zullen zich bijvoorbeeld vooral in het slib bevinden. Ook het levend voedsel kan een belangrijke bron van pathogenen zijn, en moet daarom geregeld onderzocht worden.

Het aantal vissen dat geanalyseerd wordt tijdens een gezondheidsscreening zal bepalen hoe groot de kans is om pathogenen aan het licht te brengen. Idealiter moet dit aantal zo hoog zijn dat er ≥95% zekerheid is om minstens één geïnfecteerde vis te vinden, wanneer een pathogeen bij ≥5% van de vissen voorkomt (AFS-FHS 2010). Wanneer de pathogeenprevalentie laag is, en er weinig vissen in een lot zitten, is het moeilijk de pathogenen succesvol te screenen (Marancik et al. 2020). Zo zouden er uit een lot van 100 vissen 45 moeten gescreend worden, terwijl dit voor een lot van 500 vissen slechts 55 vissen zijn (AFS-FHS 2010, Sergeant 2018)). Deze informatie toont aan dat zelfs geregelde gezondheidsmonitoring met een aantal vissen uit de kolonie gelimiteerd is en mogelijk niet alle pathogenen zal detecteren.

Een screening moet steeds afzonderlijk per LOT vissen gebeuren. Wat betreft leeftijd en genetische status is de keuze van te analyseren vissen afhankelijk van de strategie van de faciliteit. Er moet goed nagedacht worden over welke vissen beschermd moeten worden, en de screeningsvissen moeten in die context gekozen worden zodat de steekproef de beoogde te beschermen populatie zo goed mogelijk vertegenwoordigt.

Eén van de meest voorkomende bacteriële genera in zebravisfaciliteiten is *Mycobacterium* (Mocho and von Krogh 2022). Binnen dit genus worden minstens 8 soorten aangetroffen, die afzonderlijk met een PCR-analyse te detecteren zijn. Daarmee is dit de tweede meest voorkomende pathogeen in faciliteiten (Collymore et al. 2016b). *Mycobacterium* wordt het gemakkelijkst in omgevingsstalen, zoals detritus en gefilterd systeemwater geïdentificeerd (Crim et al. 2017). Omdat de bacteriën onder andere in biofilms sterk aanwezig zijn, moeten deze zo snel en veilig mogelijk verwijderd worden om zoönose te voorkomen (Mocho and Pereira 2022). Dit genus van bacteriën veroorzaakt voornamelijk subklinische infecties. Maar omdat het zo veel voorkomend is in aquatische milieus, is het moeilijk een volledige faciliteit hiervan te vrijwaren. Er wordt dan eerder gekozen om de gevaarlijkste soorten, zoals *M. chelonae* en *M. marinum* te bestrijden.

Een ander soort pathogeen en tweede meest voorkomende in zebravisfaciliteiten is de nematode *Pseudocapillaria tomentosa* (Mocho and von Krogh 2022). De eieren van deze parasiet kunnen in het slib teruggevonden worden, en de darmen van vissen kunnen met de wormen geïnfecteerd zijn. Uit onderzoek blijkt dat deze pathogeen beter in visstalen, detritus en feces geïdentificeerd worden dan in gefilterd water (Crim et al. 2017).

Een derde te vermelden pathogeen is *Pseudoloma neurophilia*, een microsporidium (ééncellige parasiet) die met PCR kan geïdentificeerd worden(Mocho and von Krogh 2022). Het zou de meest voorkomende pathogeen zijn in zebravisfaciliteiten en wordt geassocieerd met verminderde groei en reproductie (Collymore et al. 2016b). Deze parasiet heeft als extra bijzondere eigenschap dat deze het gedrag van geïnfecteerde vissen kan aantasten. De transmissie van de parasiet verloopt onder andere via kannibalisme, waardoor het erg belangrijk is dode vissen zo snel mogelijk uit het aquarium te verwijderen. Daarnaast is er ook verticale transmissie waarbij de embryo's geïnfecteerd kunnen worden. Bij een uitbraak van dit pathogeen heeft ontsmetting van oppervlakken daarom geen nut.

Tijdens een screening wordt deze parasiet gemakkelijker in visstalen dan in omgevingsstalen gevonden (Crim et al. 2017)

Wanneer er een ziekte uitbraak in de faciliteit wordt vastgesteld moet men eerst de bron proberen te achterhalen. Nadat de bron uit het systeem verwijderd is, kan de doorstroom opgevoerd worden, zodat er meer water langs de UV-filter loopt. Ook het tijdelijk verhogen van de conductiviteit kan helpen, aangezien de meeste pathogenen weinig tolerant zijn aan hoge zoutconcentraties (Martins et al. 2016a).

Er zijn weinig behandelingen voorhanden voor zebravissen met infecties, daarom wordt er vaak tot humaan doden van de geïnfecteerde vis overgegaan (Mocho and Pereira 2022).

6.3.3 AANBEVELINGEN: HYGIËNE EN GEZONDHEIDSMONITORING

- Aquaria worden regelmatig gereinigd (bv. 1x per week of 2x per maand)
- Kleine aquaria worden het best gereinigd in een afwasmachine zonder zeep
- Wanneer dieren in de faciliteit worden binnengebracht, moet er een gezondheidsrapport meegeleverd worden en moeten de dieren in quarantaine verblijven. Enkel hun nageslacht kan eventueel later met de originele viskolonie gemengd worden.
- Het voorzien van een aantal individuele eenheden met afzonderlijke watercirculatie en materialen is interessant om pathogeenverspreiding in te perken.
- Er moet minimaal 1x per jaar en liefst 2x per jaar een gezondheidsmonitoring plaatsvinden, waarbij voldoende vissen, alsook diverse bronnen (detritus, feces) onderzocht worden.

HOOFDSTUK 7: HANDELINGEN IN ZEBRAVISFACILITEITEN

7.1 VANGEN EN VERPLAATSEN VAN VISSEN

Onafhankelijk van het doel waarvoor ze gehuisvest worden, moeten zebravissen in een proefdierfaciliteit op verschillende momenten gevangen (en verplaatst) worden. Dit kan gebeuren tijdens het schoonmaken van aquaria, experimentele handelingen, het opzetten van broedparen, of wanneer ze geïsoleerd moeten worden van de groep door ziekte of welzijnsproblemen. In zebravisfaciliteiten worden vissen voornamelijk gevangen met een net, dat al dan niet aangepast is aan de vorm van het aquarium.

Het vangen van vissen kan worden opgedeeld in verschillende handelingen. Eerst moet er met een net op de vis gejaagd worden. Dit is een mechanische stressor, die niet enkel inwerkt op de vis waarop gejaagd wordt, maar bij de volledige groep vissen in het aquarium een ontsnappingsreactie veroorzaakt. De stress zou zelfs doorgegeven kunnen worden aan vissen in aangrenzende aquaria wanneer er visueel contact is (Faustino et al. 2017, Silva et al. 2019). Studies beschrijven verhogingen in het cortisolgehalte na 120 seconden achtervolging door een net (Abreu et al. 2014, Giacomini et al. 2015, Mezzomo et al. 2019). Ook op gedragsparameters, zoals zwemafstand, aantal transities tussen zones en tijd in de onderste zone werden effecten gevonden die gerelateerd kunnen worden aan angstgedrag (Mocelin et al. 2015).

Nadat de vis gevangen is in het net, wordt deze (meestal kort) uit het water gehaald. Deze blootstelling aan de lucht is vooral een fysiologische stressor. Literatuur toont duidelijk aan dat dit bijna onmiddellijk stress veroorzaakt bij zebravissen. Effecten na 30 seconden blootstelling aan de lucht werden opgemeten als een verhoging in cortisolgehalte (Ramsay et al. 2009, Tran et al. 2014, Cortés et al. 2018, Oh et al. 2020), als een toename in angstgedragingen zoals verminderde snelheid, minder afgelegde afstand, meer tijd in de onderste zone in de Novel Tank test (Oh et al. 2020), en tenslotte als verminderde voedselinname (Guillot et al. 2016). Ook bij kortere, realistischere blootstelling aan de lucht van 10 seconden werd een verhoging van het cortisolgehalte gemeten (Philippe et al., in prep.).

De cortisolniveaus na het jagen en/of netten zijn 15 minuten na het toedienen van de stressor op hun maximum. De cortisolrespons vertoont nadien een daling, waarbij het cortisolniveau zich meestal normaliseert na 60 minuten (Ramsay et al. 2009, Abreu et al. 2014). In twee studies duurde het langer dan 60 minuten voor de niveaus zich normaliseerden, nadat de vissen 5 maal 3 minuten blootgesteld werden aan de lucht (Cortés et al. 2018) en nadat de vissen 4 minuten bejaagd en 1 minuut aan de lucht blootgesteld werden (Pavlidis et al. 2013). Regelmatige handelingen kunnen dus zowel op korte als op lange termijn stress veroorzaken, hetgeen de experimentele resultaten kan beïnvloeden. Men moet er daarom rekening mee houden dat, afhankelijk van de intensiteit van de stressor, de fysiologie en het gedrag van vissen 60 minuten of langer beïnvloed kunnen zijn.

Op de vraag of zebravissen gewenning aan deze handelingen kunnen vertonen is het antwoord voorlopig onduidelijk. Vissen die geregeld gevangen worden zouden minder angstig zijn (DePasquale et al. 2016). Bovendien zou het jagen met een net het leervermogen van de vissen kunnen verbeteren, zij het enkel in aanwezigheid van tankverrijking (DePasquale et al. 2016). Anderzijds kon een studie die deze specifieke vraag over gewenning onderzocht geen signalen van gewenning aantonen op vlak van cortisolniveaus en cortisolresponsen, reproductie of gedrag en dit na 4 weken geregelde blootstelling aan deze handelingen (Philippe et al., in prep)

Niet alleen het soort handeling, maar ook de persoon die de actie uitvoert kan een effect hebben op het stressniveau dat de vis ervaart. Geroutineerd personeel, zoals de dagelijkse verzorgers, zijn

ervaren in het zo snel en soepel mogelijk vangen van een vis. Onervaren personeel, zoals nieuwe onderzoekers of studenten, kunnen nerveuzer en minder zelfzeker zijn, waardoor het vangen meer tijd in beslag neemt en de stress bij de vissen toeneemt.

Het verplaatsen van vissen kan ook zeer verschillend verlopen tussen types faciliteiten. In faciliteiten met systemen moeten aquaria uit het systeem worden gehaald om een vis te vangen. De achtervolging zal over het algemeen kort zijn (hoewel afhankelijk van de uitvoerder) en blootstelling aan lucht ook, aangezien de tanks naast elkaar worden geplaatst om blootstelling aan lucht tot een minimum te beperken. In faciliteiten met opstellingen bestaande uit grote aquaria, kan het jagen veel langer duren vanwege het volume van het aquarium en het totale aantal vissen. Ook blootstelling aan lucht kan langer duren, omdat de aquaria te zwaar zijn om op te tillen en te vervoeren, waardoor de vissen in het net doorheen de ruimte worden verplaatst. Ten slotte worden grote aquaria ook heel anders schoongemaakt.

7.1.1 AANBEVELINGEN: VANGEN EN VERPLAATSEN VAN VISSEN

- Gebruikers van zebravissen moeten zich ervan bewust zijn dat zelfs korte handelingen een cortisolrespons veroorzaken. Het is daarom nuttig na te denken over een systeem waarbij vissen zo weinig mogelijk gevangen moeten worden tijdens de gebruikelijke routines.
- Experimentele resultaten op vlak van fysiologie en gedrag kunnen beïnvloed worden wanneer vissen gevangen werden, en dit gedurende 60 minuten of langer (afhankelijk van de intensiteit van de stressor)
- We raden aan de duur van het opjagen te minimaliseren, bijvoorbeeld door het gebruik van een net aan dat aangepast is aan de vorm van het aquarium.
- De duur van de blootstelling aan de lucht kan geminimaliseerd worden door de aquaria waartussen de vis verplaatst moet worden zo dicht mogelijk bij elkaar te plaatsen.

7.2 REPRODUCTIE

Zebravissen zijn vissen die regelmatig ovuleren (asynchrone vissen), waardoor ze in staat zijn om vanaf maturatie bijna dagelijks embryo's te produceren (Lawrence 2007). Tijdens het paargedrag achtervolgen de mannetjes de vrouwtjes en wrijven ze tegen het vrouwelijk lichaam om ze te stimuleren hun eitjes los te laten. Vrouwtjes produceren op dat moment verschillende eitjes tegelijk (legsels). Het sperma wordt geactiveerd door osmotische druk en is dan minder dan 2 minuten leefbaar. Eitjes en sperma worden zeer dicht bij elkaar gelost, waarna er externe bevruchting optreedt (Cartner et al. 2019). De eitjes liggen afzonderlijk op de bodem en er is geen parentale zorg (Nasiadka and Clark 2012).

7.2.1 Hormonale stimulatie

Feromonen zorgen ervoor dat het paargedrag gesynchroniseerd wordt tussen mannetjes en vrouwtjes. Mannetjes scheiden via de gonaden glucuroniden (steroïden) af (Nasiadka and Clark 2012), die bij vrouwtjes ovulatie induceren (Lawrence 2007). Dit kan verschillende uren duren, en vrouwtjes ovuleren daarom vaak tijdens de donkere fase (Nasiadka and Clark 2012). Na de ovulatie scheiden vrouwtjes hormonen af die mannetje aantrekken en paargedrag induceren, waardoor eitjes kunnen afgezet en bevrucht worden (Lawrence 2007, Nasiadka and Clark 2012). Vrouwtjes die blootgesteld worden aan mannelijke hormonen produceren meer eitjes, die bovendien van betere kwaliteit zijn dan niet-blootgestelde vrouwtjes (Nasiadka and Clark 2012). Dominante vrouwelijke vissen kunnen ook feromonen uitscheiden die de reproductie van ondergeschikte vrouwtjes afremt (Gerlach 2006). Verhoogde chemische filtratie en waterverversing kan dit tegengaan (Lawrence 2007).

7.2.2 Eigenschappen van broedaquaria

Substraat is niet noodzakelijk om vrouwtjes te stimuleren eitjes af te zetten, maar onderzoek heeft uitgewezen dat er een voorkeur is voor artificiële paaiplaatsen, zoals kiezels en planten (Reed and Jennings 2011). Als de eitjes verzameld moeten worden voor kweek of onderzoeksdoeleinden, is het noodzakelijk een ondergrond te voorzien waarbij de volwassenen gescheiden worden van de embryo's om kannibalisme te voorkomen. Dit kan door de broedtank te bedekken met een substraat zoals kiezels of knikkers waar de eitjes tussen vallen, of door gebruik te maken van de hiervoor ontwikkelde kweekaquaria. Deze hebben kleine gleuven of gaatjes in de bodem waar de eitjes doorvallen, zodat ze niet opgegeten worden en later gemakkelijk verzameld kunnen worden. Er bestaan speciaal voor zebravis ontwikkelde broedaquaria waarin de bodem een helling maakt, hetgeen paargedrag zou initiëren (Osborne et al. 2016).

Ook het volume van de broedtank kan effect hebben op de eiproductie. Onderzoek toonde aan dat het minimale volume om een goede eiproductie te hebben 200 ml is voor zes adulte zebravissen (Goolish et al. 1998). Deze kleine volumes kunnen echter beperkend werken op het paargedrag van snel zwemmende zebravissen, en ook waterparameters zullen sneller fluctueren in een beperkt volume. Dit kan zowel nefast zijn voor de adulte vissen als de ontwikkeling van de vers geproduceerde embryo's (Tsang et al. 2017).

Ten slotte is het ook belangrijk de waterparameters in de broedaquaria nauwkeurig en frequent op te volgen. Om sterk schommelingen en bijhorende fysiologische schokken te vermijden, moeten de parameters van de broedtank overeenstemmen met deze van het embryo medium waarin de embryo's worden opgegroeid (Tsang et al. 2017).

7.2.3 Samenstelling broedgroep

Zebravissen kunnen per paar geïsoleerd worden om controle te hebben over de genetische achtergrond van de nakomelingen (Brand et al. 2002). Wanneer dit geen vereiste is, wordt er vaker gekozen om reproductie in groepen van drie of meer vissen te laten gebeuren. Groepsreproductie heeft meerdere voordelen. Allereerst gebeurt de fertilisatie efficiënter, waardoor er uiteindelijk meer embryo's geproduceerd worden. Verder gebeuren er meer kruisingen van genetische achtergronden, hetgeen de genetische variatie van de resulterende embryo's ten goede komt. Ten slotte leunt groepsreproductie ook het meest aan bij de ecologie van de soort (Tsang et al. 2017).

Een vaak gebruikte broedgroep bestaat uit twee vrouwtjes en drie mannetjes of één vrouwtje met twee mannetjes. Het extra mannetje is daarbij voordelig voor de fertilisatie, maar het kan ook zorgen voor agressieve interacties tussen de mannetjes, of interferentie van agressief gedrag met het paargedrag. Wanneer dit geobserveerd wordt, is het aangeraden de ratio om te draaien en meer vrouwtjes met minder mannetjes te laten paren (Tsang et al. 2017).

7.2.4 Effect van fotoperiode

Zebravissen planten zich meestal voort tijdens de eerste uren van de lichtcyclus. Er worden echter ook broedgevallen gemeld tijdens de laatste uren van de dag, net voor het uitgaan van het licht. Om tegemoet te komen aan de ochtendlijke reproductie, worden broedparen best opgezet tijdens de namiddag of vroege avond voorafgaand aan de ochtend wanneer er eitjes verzameld moeten worden. Op deze manier worden de vissen nadien zo weinig mogelijk gestoord (Nasiadka and Clark 2012). Wanneer het belangrijk is dat alle verzamelde embryo's op hetzelfde moment geproduceerd worden (bijvoorbeeld om de ontwikkeling op te volgen), kunnen de vrouwtjes en mannetjes tijdens de nacht voor de embryoproductie gescheiden worden door een tussenschot. Het is echter wel belangrijk dat feromonen via het water uitgewisseld kunnen worden. Embryo's worden pas geproduceerd na het verwijderen van het tussenschot (Nasiadka and Clark 2012). Wanneer bepaalde broedgroepen geen

embryo's geproduceerd hebben, kan er worden geprobeerd productie te initiëren door de broedkoppels in vers en ondiep water over te brengen (Nasiadka and Clark 2012).

7.2.5 Embryoproductie

Gemiddeld produceert een gezond vrouwtje honderd eitjes (Reed and Jennings 2011, Aleström et al. 2020), die in verschillende kleinere legsels van 5-20 eitjes worden afgezet (Nasiadka and Clark 2012). Op die manier is het mogelijk om tijdens één paaisessie embryo's te verkrijgen van verschillende mannetjes (Nasiadka and Clark 2012).

Hoewel vrouwtjes in staat zijn tijdens korte periodes bijna elke dag eitjes te produceren (Lawrence 2007), wordt het aangeraden om 7-10 dagen tussen broedpogingen te laten. Op deze manier kunnen eicellen regenereren en matureren (Aleström et al. 2020), hetgeen de productie en overleving van de embryo's verbetert (Tsang et al. 2017). Wanneer vrouwelijke zebravissen te weinig mogelijkheden krijgen hun eicellen af te zetten, resorberen deze vanzelf (Nasiadka and Clark 2012). Er is daarbij echter steeds het risico dat de resorptie niet volledig succesvol is, waardoor het oviduct kan verstoppen (Cartner et al. 2019). Als minimale reproductiefrequentie wordt daarom éénmaal per maand aangeraden, waarbij vissen ondertussen in gemengde groepen in het aquarium verblijven, om zo natuurlijke eiproductie toe te laten en ei-retentie te voorkomen (Nasiadka and Clark 2012).

Vrouwtjes kunnen eitjes produceren vanaf 60 dpf (Cartner et al. 2019), maar de kwaliteit van deze eerste legsels is vaak laag. Vanaf 3 maanden breekt een periode aan waarbij de eitjes van topkwaliteit zijn. Nadien neemt de kwaliteit en daarmee de reproductieve parameters af (Nasiadka and Clark 2012). Mannetjes hebben de grootste concentratie aan sperma wanneer ze ongeveer 10 maanden oud zijn (Nasiadka and Clark 2012). De optimale reproductietijd voor vissen van dezelfde leeftijd ligt daarom tussen 6 maand en 1 jaar (Nasiadka and Clark 2012). De meeste zebravisfaciliteiten kweken niet met zebravissen ouder dan 12-15 maanden (Tsang et al. 2017).

Om de genetische diversiteit van de populatie hoog te houden is het belangrijk reproductie tussen verwante vissen te vermijden (Aleström et al. 2020). Wanneer er slechts weinig vissen aanwezig zijn van een bepaalde genetische lijn moet er gecontroleerd uitgekruist worden om de genetische diversiteit zo hoog mogelijk te houden. In het algemeen geldt dat het beter is verschillende kleine groepen vissen te laten uitkruisen, dan één grote reproductiegroep te maken waarin vooral de dominante vissen hun genetische informatie zullen doorgeven (Nasiadka and Clark 2012).

7.2.6 AANBEVELINGEN: REPRODUCTIE

- Mannetjes en vrouwtjes worden best aan elkaars hormonen blootgesteld in de uren voor embryoproductie. Dit kan door ze 's nachts van elkaar te scheiden door een geperforeerd tussenschot. Nadat het licht aan gaat, wordt het tussenschot verwijderd en tijdens de eerste lichtperiode kunnen de eitjes afgezet worden.
- De waterparameters in de broedtank moeten zo veel mogelijk overeenkomen met deze van het water waarin de embryo's zullen ontwikkelen.
- Wanneer het geen vereiste is controle te hebben over de genetische achtergrond van de nakomelingen worden zebravissen best in broedgroepen geplaatst.
- Voor een optimale fertilisatie is het beter een groter aandeel aan mannetjes te voorzien. Wanneer deze echter agressieve gedragingen vertonen, is het beter meer vrouwtjes te voorzien.
- Er moet 7-10 dagen tussen geïnitieerde broedpogingen gelaten worden om de kwaliteit van de eitjes te garanderen.
- Praktisch gezien is het interessant om de eitjes in de broedtank automatisch fysiek te scheiden van de volwassen vissen om kannibalisme te voorkomen.

7.3 PIJNSTILLING, VERDOVING EN HUMAAN DODEN

7.3.1 Pijnstilling of analgesie

Het toedienen van pijnstilling bij zebravissen is relatief nieuw. Het is een manier om stress en pijn te verminderen tijdens of na manipulaties zoals beeldvorming, injecties, … (Köhler and Valentim 2022). Analgetica onderdrukken de mentale perceptie van pijn zonder het bewustzijn en de daadwerkelijke perceptie van pijn aan te tasten. Ze werken in op de signaaloverdracht en modulatie van pijnprikkels door de hersenen (Strykowski and Schech 2015, Köhler and Valentim 2022). Pijnstilling draagt niet enkel bij aan het welzijn van de vissen, maar het kan ook vermijden dat pijn of stress invloed heeft op fysiologische of gedragsparameters (Martins et al. 2016b). Hoewel het zowel voor als na een behandeling toegediend kan worden, wordt pijnstilling vooral gebruikt om het comfort en welzijn van de vis na de behandeling te verbeteren (Wilson et al. 2009, Strykowski and Schech 2015, Köhler and Valentim 2022).

Voor zebravissen worden verschillende soorten pijnstillers gebruikt. De meest gebruikte zijn lokale anesthetica zoals lidocaïne, die zowel voor als na een procedure toegediend worden. Wanneer deze middelen als pijnstillers gebruikt worden, is de concentratie lager dan als ze als verdoving gebruikt worden (Martins et al. 2016b). Andere soorten pijnstillers zijn opioïden (bv. Morfine) (Stevens , Wilson et al. 2009, Schroeder and Sneddon 2017) en NSAID's (nonsteroidal anti-inflammatory drugs of niet-steroïde ontstekingsremmers), zoals ketoprofen en acetylsalicylzuur (Schroeder and Sneddon 2017, Köhler and Valentim 2022). Ook aniline derivaten, zoals paracetamol, worden gebruikt bij zebravissen (Köhler and Valentim 2022).

Pijnstillende middelen worden voornamelijk toegediend door onderdompeling, waardoor de middelen via de kieuwen en de bloedsomloop het lichaam binnenkomen (Martins et al. 2016b). Het intramusculair of intraperitoneaal toedienen van pijnstillers is enkel zinvol in combinatie met het toedienen van anesthesie, aangezien een prik van de naald steeds verdoving vereist (Köhler and Valentim 2022).

Tot op heden zijn slechts enkele pijnstillers, zoals morfine en ketoprofen, geëvalueerd naar hun effect op vissen, en bovendien enkel in andere vissoorten dan de zebravis (Council 2009). Bijwerkingen van de pijnstillers zijn dus nog vaak ongekend (Köhler and Valentim 2022).

7.3.2 Verdoving of anesthesie

Verdoving moet worden toegediend wanneer de pijndrempel van het inbrengen van een naald overschreven wordt (Hawkins et al. 2011). Verder wordt het ook gebruikt om vissen te immobiliseren en te vrijwaren van pijn tijdens procedures zoals bloedafname, afstrijken, taggen, vinclippen, experimenteel toedienen van verwondingen, … (Martins et al. 2016b, Köhler and Valentim 2022). Verdoving onderdrukt net als analgetica het pijngevoel, maar induceert verder ook onbeweeglijkheid of bewustzijnsverlies door het onderdrukken van het centrale zenuwstelsel. Dit moet steeds een omkeerbaar proces zijn, zonder langdurige fysiologische en immunologische effecten of gedragsveranderingen. Een goede verdoving moet snel inwerken (<3 minuten) en weer uitwerken (<5 minuten) wanneer de vis in een hersteltank overgezet wordt (Köhler and Valentim 2022). Vissen die verdoofd moeten worden, worden best op voorhand niet gevoederd. Ze kunnen onwel worden van verdoving en braaksel kan in de kieuwen blijven hangen, hetgeen de zuurstofopname zal verminderen (Köhler and Valentim 2022).

Verdovende middelen kunnen door inhalatie of intraveneus opgenomen worden, maar voor kleine tropische vissen wordt meestal gebruik gemaakt van inhalatie tijdens onderdompeling in een bad van de gewenste concentratie. De stof wordt zo via de kieuwen opgenomen (Martins et al. 2016b, Köhler

and Valentim 2022). Om waterparameters zo veel mogelijk constant te houden, wordt aangeraden de middelen op te lossen in systeemwater. De diepte van verdoving (i.e. verdoving, immobiliteit en/of pijnstilling) hangt af van het gekozen product en de concentratie. Onder chirurgische verdoving wordt verstaan dat de vis evenwichtsverlies heeft en geen respons vertoont op licht stimuli en pijn (Martins et al. 2016b). Aangezien de resterende stof en metabolieten via de kieuwen, nieren of huid worden uitgestoten, is er een risico voor stijgende concentraties aan verdovende middelen of hun metabolieten wanneer verschillende vissen na elkaar in hetzelfde bad verdoofd worden. Ook kan het nodig zijn om zuurstof aan het bad toe te voegen wanneer de seriële verdoving lange tijd duurt (Köhler and Valentim 2022).

Tricaïne of MS-222 is het meest gebruikte verdovingsmiddel bij zebravissen (Lidster et al. 2017). Het werkt systemisch (over het hele lichaam) door de natriumkanalen te blokkeren, waardoor de signaaloverdracht in het centraal zenuwstelsel geremd wordt en de centrale neuronen geblokkeerd worden (Köhler and Valentim 2022). Kaliumkanalen worden in mindere mate ook geaffecteerd. Actiepotentialen en spontane contracties in de spieren worden geëlimineerd, waardoor ook alle zintuigen en reflexen stilvallen (Matthews and Varga 2012). Meteen na onderdompeling in MS-222 zullen zebravissen eerst meer bewegingen van het gehele lichaam én van de kieuwdeksels vertonen (ze ademen sneller). Nadien verliezen ze hun evenwicht en stoppen de bewegingen van het lichaam (Matthews and Varga 2012). Bij toediening door onderdompeling is het zo dat de diepte van verdoving toeneemt met toenemende tijd. Een gevaar daarbij is dat vissen sterven aan een overdosis (Martins et al. 2016b). Aangezien de stof leidt tot spierontspanning zal ook de hartactiviteit verminderen. Dit zorgt voor symptomen van hypoxie en metabole verzuring die zullen toenemen met de tijd dat de vis in het bad ondergedompeld wordt. Alarmsignalen hiervoor zijn het vertragen van het bewegen van de kieuwdeksels of een verkleuring van de kieuwen (bleke kieuwen wijzen op te weinig zuurstof, donkerrode kieuwen wijzen op een interne bloeding) (Köhler and Valentim 2022). Het herstel na de verdoving moet snel gaan (< 5 minuten). Het kan daarbij nuttig zijn de vis in het herstelaquarium lichtjes te doen bewegen, zodat het vers water over de kieuwen gestuwd wordt (i.e., *gill flushing*).

Andere gebruikte stoffen om zebravissen te verdoven zijn benzocaïne, lidocaïne (hydrochloride), propofol, eugenol (kruidnagelolie of *clove oil*), 2-phenoxyethanol en etomidaat (Martins et al. 2016b, White et al. 2017, Jorge et al. 2021, Ferreira et al. 2022b, Köhler and Valentim 2022). Verdovende middelen kunnen tijdens de inductie van de verdoving echter stress veroorzaken bij de dieren, doordat ze aversief werken (Martins et al. 2016b). De literatuur in verband met aversie ten opzichte van MS-222 is voorlopig niet consistent. In voorkeurstesten met korte acclimatisatietijd zouden adulte zebravissen reeds aversieve gedragingen vertonen bij een dosis van 50 mg/L MS-222 (Readman et al. 2013). In een andere gedragstest, waarbij de vissen eerst twee dagen in de opstelling verbleven en er dan een preferentietest werd uitgevoerd, kon geen aversie aangetoond worden (Ferreira et al. 2022b). Deze studie toonde wel aan dat etomidaat even aversief werkte dan de positieve controle met waterstofchloride (Ferreira et al. 2022b). Naast MS-222 zou de combinatie van enerzijds lidocaïne en propofol en anderzijds kruidnagelolie geen aversie opwekken (Ferreira et al. 2022b).

Het is verder ook belangrijk dat de stoffen na afloop van de verdoving geen aversie meer veroorzaken. Bij verdoving met 168 mg/L MS-222 werden geen effecten waren op gedragsparameters aangetoond, en dit 5 minuten na het herwinnen van het evenwicht (Nordgreen et al. 2014). Ook verschillende andere protocollen werden uitgetest, maar konden na afloop van de verdoving geen effect aantonen op gedrags- of fysiologische parameters (Jorge et al. 2021).

Aan jonge levensstadia van zebravissen moeten hogere concentraties verdovende middelen toegediend worden, omdat ze nog geen volledig ontwikkelde kieuwen hebben en de stoffen via de huid minder snel door het lichaam opgenomen worden (Rombough 2007, Köhler and Valentim 2022). Rombough et al. (2007) kon een toename in gevoeligheid vaststellen in larven van 3 dpf tot 9 dpf,

aangezien tijdens dit levensstadium de kieuwen en lever nog aan het ontwikkelen zijn (Rombough 2007).

7.3.3 Humaan doden

7.3.3.1 Introductie

Humaan doden wordt gedefinieerd als het doden van een dier volgens de snelste en minst pijnlijke methode. De methode moet een snel bewustzijnsverlies en snelle dood induceren die onomkeerbaar is (Collymore et al. 2016a). Er moet nagegaan worden of vissen voor het optreden van bewustzijnsverlies lijden (i.e. de methode moet humaan zijn). Als de methode aversie/weerstand/afkeer opwekt, moet er nagedacht worden over manieren om dit te minimaliseren (bv. pijnstilling toedienen). Verder worden er tijdens het toepassen van het humaan doden een minimaal aantal handelingen uitgevoerd en moet de procedure veilig zijn voor het personeel (AVMA 2020). Ten slotte is het belangrijk ook de effecten van de procedure op de postmortem analyse te beschouwen (Köhler and Valentim 2022). Het bepalen van de meest geschikte methode moet daarom geval per geval bekeken worden, waarbij dierenwelzijn een hoge prioriteit moet krijgen.

In de Europese unie worden drie methoden voor humaan doden van vissen toegelaten: Overdosis anesthesie, percuterende slag op de kop en elektrische bedwelming. Een percuterende slag op de kop is moeilijk bij zebravissen omdat het kleine formaat van de schedel niet toestaat het daarvoor ontwikkelde apparaat exact genoeg te richten om bewustzijnsverlies te induceren. Hoewel een toestel voor de elektrische bedwelming van larvale stadia recent werd ontwikkeld (Mocho et al. 2022), bestaan er nog geen voldoende onderzochte en goedgekeurde toestellen voor adulte zebravissen (Köhler et al. 2017). Voor zebravissen in een terminaal experiment, die niet meer bij bewustzijn komen voor ze gedood worden (bv. na een experimentele handeling onder verdoving) wordt een uitzondering toegelaten en kunnen andere methoden toegepast worden (Köhler and Valentim 2022).

In tegenstelling tot zoogdieren is de aanwezigheid van een hartslag geen goede indicator om te bepalen of de vis nog in leven is. Bij afwezigheid van hartslag is het toch mogelijk dat vissen terug herstellen wanneer ze terug in controle medium gebracht worden. Vooral bij larven is het kloppen van het hart niet essentieel, omdat de diffusie van zuurstof doorheen de huid voldoende kan zijn als zuurstofvoorziening. Omgekeerd kan het hart, dankzij het hoge glycogeengehalte, lang blijven kloppen bij het wegvallen van zuurstofopname of een functioneel centraal zenuwstelsel (Köhler and Valentim 2022). Omdat er dus geen objectieve manier is om de dood vast te stellen, is het belangrijk na elke methode voor humaan doden de dood te bevestigen, bijvoorbeeld door onthoofden.

7.3.3.2 Overdosis anesthesie

De meest gebruikte methode in de EU is het toedienen van een overdosis anesthesie, meestal MS-222 (Collymore et al. 2016a, Thurman et al. 2019). Er zijn een aantal nadelen verbonden aan het gebruik van een overdosis anesthesie. Zebravissen kunnen aversie hebben van de hoge concentratie van het product en hierdoor stress ondervinden tot ze het bewustzijn verliezen (Wilkes et al. 2012, Collymore et al. 2016a). De methode werkt ook relatief traag (Wilson et al. 2009, Collymore et al. 2016a). Er moet in sommige gevallen tot 20 minuten na het stilstaan van de kieuwdeksels gewacht worden om zeker te zijn dat de dood ingetreden is (Wilson et al. 2009, Collymore et al. 2016a). Onderzoek toonde wel aan dat het gebruik van een overdosis anesthesie bij volwassen vissen (benzocaïne 250 mg/L en MS-222 400 mg/L) geen effect heeft op het cortisolgehalte in het plasma waaruit kan opgemaakt worden dat er geen stressrespons is (Thurman et al. 2019).

Recent werd er meer onderzoek gedaan naar alternatieven voor MS-222 als methode voor humaan doden door overdosis anesthesie. Lidocaïne hydrochloride (gebufferd met $NaHCO_3$ en ethanol) zou sneller werken dan andere immersieve methodes en vissen vertonen tijdens deze methode ook

minder aversief gedrag (von Krogh et al. 2021). Verder werd ook propofol onderzocht, hetgeen nog sneller en minder aversief zou werken dan lidocaïne hydrochloride (Chu et al. 2020). Deze stof wordt momenteel echter in weinig zebravisfaciliteiten gebruikt.

Een overdosis anesthesie is niet geschikt als methode voor humaan doden van larvale zebravissen, omdat chemische producten in dit levensstadium opgenomen worden via diffusie door de huid, aangezien de kieuwen nog niet voldoende ontwikkeld zijn. Hierdoor zijn hogere concentraties nodig, met het blijvend gevaar dat de methode nog omkeerbaar kan zijn en bovendien erg lang kan duren (Strykowski and Schech 2015, Collymore et al. 2016a, AVMA 2020). Er is voorlopig geen experimentele literatuur beschikbaar over het humaan doden met MS-222 van larven tussen 28 en 90 dpf.

Een laatste nadeel van de overdosis anesthesie voor het humaan doden van zowel adulte als larvale vissen is dat de methode kan interfereren met de postmortem analyses (histologie, fysiologie, transcriptie, …) (Köhler and Valentim 2022).

7.3.3.3 Snelle afkoeling

Een andere veelgebruikte methode is het doden door snelle afkoeling (Wilson et al. 2009, Matthews and Varga 2012, Köhler and Valentim 2022). Dit gebeurt door de vissen onder te dompelen in ijswater (2-4°C (Wilson et al. 2009) of 0-4°C (Strykowski and Schech 2015, Köhler and Valentim 2022)). Hoewel de Europese wetgeving (2010/63/EU Annex IV) deze methode voorlopig niet aanvaardt, kregen veel Europese landen de toelating om zebravissen door snelle afkoeling te doden. Om die reden wordt op Europees niveau momenteel een algemene toelating voor deze methode voorbereid en is de toepassing ervan in Vlaanderen mogelijk mits aanvraag bij de Afdeling Dierenwelzijn.

Er wordt gedebatteerd over het gegeven dat het doden van adulte zebravissen met ijswater humaner zou zijn dan een overdosis anesthesie (Wilson et al. 2009). Voordelen van het gebruik van ijswater kunnen in twee categorieën opgedeeld worden. Op vlak van dierenwelzijn werd aangetoond dat de methode sneller werkt dan een overdosis anesthesie en dat ze vaker onomkeerbaar is (Wilson et al. 2009, Strykowski and Schech 2015, Wallace et al. 2018, Thurman et al. 2019). Praktische voordelen zijn dat 1) veel vissen op hetzelfde moment (met weinig handelingen) kunnen geëuthanaseerd worden, 2) het een eenvoudige methode is, waardoor er minder risico is op het verkeerd uitvoeren van de methode (concentraties, …) en 3) het een veilige methode is voor het personeel om uit te voeren (Wilson et al. 2009).

Er heerst nog onduidelijkheid over de pijnperceptie tijdens het humaan doden in ijswater. Het is onduidelijk of er pijnreceptoren zijn voor koude en of vissen dus wel pijn door koude kunnen voelen (Wilson et al. 2009). Daarnaast zou pijn in het algemeen enkel optreden wanneer een weefsel ontdooit, maar niet tijdens het vriesproces zelf (Köhler et al. 2017). Verder is het aannemelijk dat de lage temperaturen er ook voor zorgen dat de zenuwgeleidingssnelheid afneemt (Wilson et al. 2009). Het gebruik van snelle afkoeling als methode voor humaan doden heeft geen effect of een vergelijkbaar effect op het cortisolgehalte in plasma vergeleken met overdosis anesthesie (Thurman et al. 2019, Ferreira et al. 2022a).

Een belangrijke voorwaarde om deze methode succesvol uit te voeren is dat er geen contact is met het ijs (enkel ijswater) (AVMA 2020). De methode is niet geschikt voor larven van 14 dpf of jonger, omdat ze dan te traag werkt. Rond de leeftijd van 14-15 dpf vindt er een transitie plaats en de methode van snelle afkoeling is effectief vanaf de leeftijd van 16 dpf (Wallace et al. 2018).

7.3.4 AANBEVELINGEN: PIJNSTILLING, VERDOVING, HUMAAN DODEN

Specifieke aanbevelingen voor het humaan doden per leeftijdscategorie:

DE TOEPASSING VAN SNELLE AFKOELING IS IN VLAANDEREN MOGELIJK MITS AANVRAAG BIJ DE AFDELING DIERENWELZIJN.

0-4 dpf

- 1 g/L lidocaïne hydrochloride (HCl) gebufferd met 2 g/L $NaHCO_3$ en gemengd met 50 mL/L ethanol is de meest geschikte methode waarbij geen aversief gedrag werd vastgesteld (Mocho et al. 2022).
- 0.1% eugenol (kruidnagelolie) is ook effectief voor het doden van dit levensstadium, maar larven van 4 dpf vertonen aversie tegen de stof (Mocho et al. 2022).
- Immersie in ijswater (1 uur) of 1g/L MS-222 (1 uur) zijn niet voldoende om de embryo's en larven humaan te doden (Mocho et al. 2022).

Aanbeveling: 1 g/L lidocaïne hydrochloride (HCl) gebufferd met 2 g/L $NaHCO_3$ + 50 mL/L ethanol.

5-15 dpf

- De effectiviteit en aversie van 1 g/L lidocaïne hydrochloride (HCl) gebufferd met 2 g/L $NaHCO_3$ + 50 mL/L ethanol werd nog niet experimenteel vastgesteld.
- MS-222 is geen goede methode voor deze levensstadia, aangezien ze nog omkeerbaar is na 30 min onderdompeling in 900 mg/L MS-222 (Strykowski and Schech 2015).
- Ijswater alleen is niet geschikt als methode, aangezien deze pas effectief is wanneer de larven 12 uur in het ijswater ondergedompeld worden (Wallace et al. 2018).
- Een combinatie van 20 min ijswater gevolgd door toevoeging van bleekwater ≥ 1.2% werd gesuggereerd door Strykowski and Schech (2015) en overgenomen door de National Institutes of Health (NIH 2009).

Aanbeveling: ijswater om bewustzijnsverlies te induceren, nadien bleekwater om te doden.

16-89 dpf

- Geen omkeerbaarheid na 5 min onderdompeling in ijswater (Wallace et al. 2018). Het stoppen van beweging van het operculum kan tot 60 seconden duren (Thurman et al. 2019).
- MS-222: Geen experimentele literatuur beschikbaar over humaan doden met MS-222 tussen 28 en 90 dpf.
- Een combinatiemethode waarbij eerst bewustzijnsverlies geïnduceerd wordt zoals hogerop beschreven kan gebruikt worden.

Aanbeveling: ijswater met minstens 5 min onderdompeling.

Vanaf 90 dpf

- 1 g/L lidocaïne hydrochloride (HCl) gebufferd met 2 g/L $NaHCO_3$ + 50 mL/L ethanol is een effectieve en snelle methode waartegen zebravissen weinig aversie vertonen (von Krogh et al. 2021).
- De ijswater-methode (minstens 30 seconden onderdompeling) is ook effectief en snel (Wallace et al. 2018).
- 250 mg/L MS-222 is effectief, maar traag (gemiddeld 500 seconden tot het stoppen van beweging van de kieuwdeksels) (Wilson et al. 2009).

Aanbeveling: ijswater gedurende 30 seconden als absolute minimum maar veiligheidshalve wordt ook hier 5 min aanbevolen, of gebufferde lidocaïne hydrochloride met ethanol.

Na elke methode

- **Dood vaststellen door verlies van reflexen of klinische tekenen (ademhaling, hart gestopt)**
- **Dood bevestigen met een extra methode zoals decapitatie**

Pijnstilling: Er kunnen geen specifieke aanbevelingen geformuleerd worden omdat bijwerkingen nog onvoldoende onderzocht werden.

Verdoving: Vissen mogen voor het toedienen van verdovende middelen niet gevoederd worden. De tijdsspanne in het verdovend bad wordt zo kort mogelijk gehouden. De concentratie van het verdovend middel moet aan het levensstadium van de vis aangepast worden. Het herstel na de verdoving kan bevorderd worden door, wanneer de vis opnieuw in vers water wordt gebracht, voorzichtig met het water te bewegen, zodat het water over de kieuwen van de vis gestuwd wordt.

HOOFDSTUK 8: MONITORING EN EVALUATIE WELZIJN

8.1 DAGELIJKSE WELZIJNSCONTROLE

Volgens de Europese richtlijn moeten proefdieren ten minste éénmaal per dag door een competent persoon gecontroleerd worden om gewonde, zieke of dode dieren te detecteren. Voor deze welzijnscontrole kan een scoreblad of checklist gebruikt worden, die logisch, consequent, specifiek en gemakkelijk in gebruik is. Deze gestandaardiseerde checklist bestaat uit visuele, niet invasieve observaties, zoals kleurveranderingen (oog en huid), gezwellen en wonden, abnormale lichaamshoudingen, verminderd drijfvermogen, openstaande schubben, versnelde ademhalingsfrequentie, overmatige slijmproductie, gedragsparameters, …. De categorieën en beschrijvingen moeten gevoelig genoeg zijn om subtiele veranderingen in het welzijn kenbaar te maken. Kritische drempels en alarmniveaus moeten duidelijk beschreven zijn. Verder kan de invloed van bepaalde factoren zoals leeftijd of genetische achtergrond op klinische symptomen in rekening gebracht worden. Zo moeten opgroeiende vissen of vissen van >18 maanden oud anders beoordeeld worden op fysiek uiterlijk dan vissen van 4 maanden oud. Wanneer het welzijn van larvale zebravissen wordt gecontroleerd moet er vooral gelet worden op de ontwikkeling van de zwemblaas, misvormingen (vb. skeletvergroeiingen), sterke vermagering, kleurveranderingen en abnormaal zwemgedrag (Cartner et al. 2019, Printzi et al. 2021).

De observaties die tijdens de dagelijkse welzijnscontrole gebeurd zijn worden best in een welzijnsdagboek bijgehouden. Dit is een gemeenschappelijk dagboek voor de volledige faciliteit, waarin naast de observaties ook de protocollen kunnen worden gebundeld die gevolgd moeten worden bij observaties van verminderd welzijn. Het is belangrijk dat er een duidelijk actieplan bestaat dat afhankelijk van de welzijnsimpact van de symptomen en de ernst ervan aangeeft welke actie ondernomen moet worden (Mocho and Pereira 2022).

Het dagelijks monitoren van gezondheid en welzijn stelt de faciliteit in staat trends doorheen de tijd op te volgen. Kleine misvormingen die systematisch terugkomen (bv. missend kieuwdeksel), kunnen wijzen op een genetisch defect in de lijn, zoals inteelt (Mocho and Pereira 2022). Meer ernstige symptomen, zoals gezwellen of het geregeld voorkomen van problemen met het drijfvermogen of zelfs mortaliteit, kunnen wijzen op een beginnende infectie of gebrekkige huishouding (waterparameters, externe stressoren, densiteit, …) (Mocho and Pereira 2022).

De persoon die de dagelijkse welzijnscontrole uitvoert kan een onderzoeker, een dierenverzorger, een technieker of een dierenarts zijn, zolang deze goed opgeleid is in het herkennen van klinische ziekteverschijnselen en atypisch gedrag. Het kan interessant zijn om dit door verschillende onderzoekers en technisch personeel te laten uitvoeren, aangezien dit complementaire observaties oplevert (Aleström et al. 2020).

Tijdens een welzijnscontrole is het mogelijk dat vissen humane eindpunten vertonen. Dit is de eerste indicatie in een dierexperiment van potentiële pijn en/of ongerief die, binnen de context van de te behalen wetenschappelijke eindpunten, gebruikt kan worden voor het ondernemen van acties, zoals humaan doden van het dier of het wegnemen of verlichten van de pijnlijke en/of stressvolle procedures (Hendriksen and Morton 1999).

De actie na het observeren van een humaan eindpunt hangt af van de context waarin de vis gehouden wordt. In een experiment moet de actie bestaan uit het beëindigen of verlichten van de pijn en het

leed (Hendriksen and Morton 1999). Dit kan door stopzetting van het experiment als het leed omkeerbaar is, of door humaan doden als het leed onomkeerbaar is. Experimenten moeten zo opgesteld worden dat het bereiken van humane eindpunten vermeden wordt, en dat de wetenschappelijke doelen bereikt zijn voor het optreden van de humane eindpunten. In een context van kweek zal het observeren van een humaan eindpunt gemakkelijker leiden tot humaan doden omdat het vaak geen wetenschappelijke doelen in de weg staat.

8.2 SCORINGSMETHODES

Er bestaan verschillende scoringsmethodes om op dagelijkse of wekelijkse basis welzijnscontroles uit te voeren en informatie te krijgen over de algemene gezondheid van de individuele vissen. Een eerste voorbeeld is het scoren van de lichaamsconditie ('*body condition score*', BCS) van de vis. Onderzoek toonde aan dat de breedte van een adulte vis een goede indicator is voor de BMI en de Fulton K parameter. Hierdoor kan een vis snel gescoord worden op een vijfdelige schaal van zeer dun (BCS 1) tot obees (BCS 5) (Clark et al. 2018).

Een tweede voorbeeld is een uitgebreid scoreblad waar voor verschillende categorieën (uiterlijk, voedselconsumptie, activiteit, …) duidelijke beschrijvingen worden gegeven, die steeds een score krijgen van 0 (goed) tot 3 (heel slecht). Deze beschrijvingen zijn uiterst belangrijk, ze maken duidelijk wat met de verschillende parameters bedoeld wordt en hoe ze gescoord moeten worden. Voor parameters die niet in cijfers uit te drukken zijn, kan men voorbeelden geven.

De totaalsom van alle scores geeft een actiecategorie weer. Deze gaat van monitoring en waterkwaliteit nagaan (bij een lage score), over het raadplegen van een dierenarts (bij een hogere score), tot humaan doden en het herdenken van de experimentele condities (bij een zeer hoge score) (Martins et al. 2016b). Wanneer er in een bepaalde categorie (m.u.v. gedragseindpunten) de hoogste score wordt gehaald, wordt sowieso aangeraden de vis te doden. Bij bepaalde scores wordt aangeraden de vis op te volgen. Wanneer binnen een bepaalde termijn geen verbetering zichtbaar is, moet de vis humaan gedood worden. Een uitgebreid voorbeeld van een scoreblad en het gebruik ervan wordt beschreven in Appendix 2. Deze methode werd gebaseerd op verschillende andere systemen (Humane-Endpoints , Martins et al. 2016b, Clark et al. 2018).

Er moet nagedacht worden of kweekvissen op dezelfde manier gecontroleerd (en behandeld) worden ten opzichte van experimentele vissen. Dit moet zeer duidelijk gecommuniceerd worden naar alle medewerkers van de faciliteit die welzijnscontroles uitvoeren. Binnen experimentele visgroepen is het verder soms nodig een onderscheid te maken tussen gekende en ongekende procedures. Vissen die blootgesteld worden aan ongekende procedures moeten nauwlettend opgevolgd worden, omdat de gevolgen van de procedure op het welzijn van de vis ook ongekend is. Tenslotte moet er ook met meer zorg gekeken worden naar vissen in quarantaine en vissen die opgevolgd moeten worden na een procedure.

8.3 PERFORMANTIE MONITORING

Om de gezondheid van de populatie op te volgen kunnen ook verschillende performantie-parameters, zoals groei of embryoproductie doorheen de tijd opgevolgd worden. Door deze parameters op vaste tijdsstippen op te meten, kunnen afwijkingen van het gemiddelde in de faciliteit snel vastgesteld worden. Het wegen van de vissen kan per groep en zonder pijnstilling of verdoving gebeuren. Ook

embryoproductie en andere reproductieve parameters zoals overleving kunnen opgevolgd worden (zie hoofdstuk 4) (Mocho and Pereira 2022).

Een vereiste hiervoor is dat de gemiddelde waarde van parameters zoals groei, embryoproductie, … gekend zijn, met idealiter aparte data voor verschillende leeftijdscategorieën van de specifieke lijnen die in de faciliteit gekweekt worden. Afwijkingen van de gemiddelde waarden voor de faciliteit kunnen mogelijks wijzen op problemen in de huishouding, een pathogeeninfectie, of genetisch verval (Mocho and Pereira 2022).

8.4 AANBEVELINGEN: WELZIJNSCONTROLE

- Er moet dagelijks een gezondheidscontrole gebeuren, het liefst in een roterend systeem met verschillende hiertoe opgeleide medewerkers uit de faciliteit.
- Het is handig hiervoor een scoringslijst als houvast te gebruiken, maar ook observaties buiten deze parameters moeten gerapporteerd kunnen worden. De scoringslijst moet eenduidig zijn en de beschrijvingen uitgebreid genoeg. Een voorbeeld is beschikbaar in Appendix 2.
- Naast de dagelijkse controles is het nuttig ook de groei van de jonge vissen op te volgen tijdens de kritieke groeifase (juveniele fase). Dit kan door bijvoorbeeld om de twee weken eenzelfde tank vissen te wegen en het gemiddelde nat gewicht te rapporteren.
- Tijdens de adulte fase kunnen parameters van de reproductie gedeeltelijk inzicht geven in de gezondheid van de populatie.

REFERENTIES

Abreu, M. S. d., G. Koakoski, D. Ferreira, T. A. Oliveira, J. G. S. d. Rosa, D. Gusso, A. C. V. Giacomini, A. L. Piato, and L. J. G. Barcellos. 2014. Diazepam and fluoxetine decrease the stress response in zebrafish. PloS one **9**:e103232.

Adatto, I., L. Krug, and L. I. Zon. 2016. The red light district and its effects on zebrafish reproduction. Zebrafish **13**:226-229.

Aerts, J. 2018. Quantification of a glucocorticoid profile in non-pooled samples is pivotal in stress research across vertebrates. Frontiers in Endocrinology:635.

Aerts, J., J. R. Metz, B. Ampe, A. Decostere, G. Flik, and S. De Saeger. 2015. Scales tell a story on the stress history of fish. PloS one **10**:e0123411.

AFS-FHS, U. a. 2010. Section 2.2, Procedures for the detection and identification of certain finfish and shellfish pathogens.*in* U. S. F. a. W. S. a. A. F. S.-F. H. Section, editor.

Al-Imari, L., and R. Gerlai. 2008. Sight of conspecifics as reward in associative learning in zebrafish (Danio rerio). Behavioural brain research **189**:216-219.

Aleström, P., L. D'Angelo, P. J. Midtlyng, D. F. Schorderet, S. Schulte-Merker, F. Sohm, and S. Warner. 2020. Zebrafish: Housing and husbandry recommendations. Laboratory animals **54**:213-224.

Andersson, M., and P. Kettunen. 2021. Effects of Holding Density on the Welfare of Zebrafish: A Systematic Review. Zebrafish **18**:297-306.

Anneser, L., I. C. Alcantara, A. Gemmer, K. Mirkes, S. Ryu, and E. M. Schuman. 2020. The neuropeptide Pth2 dynamically senses others via mechanosensation. Nature **588**:653-657.

Arunachalam, M., M. Raja, C. Vijayakumar, P. Malaiammal, and R. L. Mayden. 2013. Natural history of zebrafish (Danio rerio) in India. Zebrafish **10**:1-14.

Avdesh, A., M. Chen, M. T. Martin-Iverson, A. Mondal, D. Ong, S. Rainey-Smith, K. Taddei, M. Lardelli, D. M. Groth, and G. Verdile. 2012. Regular care and maintenance of a zebrafish (Danio rerio) laboratory: an introduction. JoVE (Journal of Visualized Experiments):e4196.

AVMA. 2020. AVMA guidelines for the euthanasia of animals: 2020 edition. Pages 2020-2021 Retrieved on March.

Barbazuk, W. B., I. Korf, C. Kadavi, J. Heyen, S. Tate, E. Wun, J. A. Bedell, J. D. McPherson, and S. L. Johnson. 2000. The syntenic relationship of the zebrafish and human genomes. Genome research **10**:1351-1358.

Barcellos, H. H., G. Koakoski, F. Chaulet, K. S. Kirsten, L. C. Kreutz, A. V. Kalueff, and L. J. Barcellos. 2018. The effects of auditory enrichment on zebrafish behavior and physiology. PeerJ **6**:e5162.

Bault, Z. A., S. M. Peterson, and J. L. Freeman. 2015. Directional and color preference in adult zebrafish: Implications in behavioral and learning assays in neurotoxicology studies. Journal of Applied Toxicology **35**:1502-1510.

Bilotta, J. 2000. Effects of abnormal lighting on the development of zebrafish visual behavior. Behavioural brain research **116**:81-87.

Blaser, R. E., and D. B. Rosemberg. 2012. Measures of anxiety in zebrafish (Danio rerio): dissociation of black/white preference and novel tank test. PloS one **7**:e36931.

Brand, M., M. Granato, and C. Nüsslein-Volhard. 2002. Keeping and raising zebrafish. Zebrafish: a practical approach:7-37.

Brown, C. 2015. Fish intelligence, sentience and ethics. Animal cognition **18**:1-17.

Buenhombre, J., E. A. Daza-Cardona, P. Sousa, and A. Gouveia Jr. 2021. Different influences of anxiety models, environmental enrichment, standard conditions and intraspecies variation (sex, personality and strain) on stress and quality of life in adult and juvenile zebrafish: A systematic review. Neuroscience & Biobehavioral Reviews **131**:765-791.

Canavello, P. R., J. M. Cachat, E. C. Beeson, A. L. Laffoon, C. Grimes, W. A. Haymore, M. F. Elegante, B. K. Bartels, P. C. Hart, and S. I. Elkhayat. 2011. Measuring endocrine (cortisol) responses of zebrafish to stress. Pages 135-142 Zebrafish neurobehavioral protocols. Springer.

Cartner, S., J. S. Eisen, S. F. Farmer, K. J. Guillemin, M. L. Kent, and G. E. Sanders. 2019. The Zebrafish in Biomedical Research: Biology, Husbandry, Diseases, and Research Applications. Academic Press.

Castranova, D., A. Lawton, C. Lawrence, D. P. Baumann, J. Best, J. Coscolla, A. Doherty, J. Ramos, J. Hakkesteeg, and C. Wang. 2011. The effect of stocking densities on reproductive performance in laboratory zebrafish (Danio rerio). Zebrafish **8**:141-146.

Champagne, D. L., C. C. Hoefnagels, R. E. de Kloet, and M. K. Richardson. 2010. Translating rodent behavioral repertoire to zebrafish (Danio rerio): relevance for stress research. Behavioural brain research **214**:332-342.

Chang, C. T., J. D. Amack, and C. M. Whipps. 2016. Zebrafish embryo disinfection with povidone–iodine: evaluating an alternative to chlorine bleach. Zebrafish **13**:S-96-S-101.

Chu, D. K., K. Jampachaisri, and C. Pacharinsak. 2020. High dose propofol effectively euthanizes zebrafish (Danio rerio). The Thai Journal of Veterinary Medicine **50**:13-16.

Clark, T. S., L. M. Pandolfo, C. M. Marshall, A. K. Mitra, and J. M. Schech. 2018. Body condition scoring for adult zebrafish (Danio rerio). Journal of the American Association for Laboratory Animal Science **57**:698-702.

Collymore, C., E. K. Banks, and P. V. Turner. 2016a. Lidocaine hydrochloride compared with MS222 for the euthanasia of zebrafish (Danio rerio). Journal of the American Association for Laboratory Animal Science **55**:816-820.

Collymore, C., M. J. Crim, and C. Lieggi. 2016b. Recommendations for health monitoring and reporting for zebrafish research facilities. Zebrafish **13**:S-138-S-148.

Collymore, C., R. J. Tolwani, and S. Rasmussen. 2015. The behavioral effects of single housing and environmental enrichment on adult zebrafish (Danio rerio). Journal of the American Association for Laboratory Animal Science **54**:280-285.

Cortemeglia, C., and T. L. Beitinger. 2005. Temperature tolerances of wild-type and red transgenic zebra danios. Transactions of the American Fisheries Society **134**:1431-1437.

Cortés, R., M. Teles, M. Oliveira, C. Fierro-Castro, L. Tort, and J. M. Cerdá-Reverter. 2018. Effects of acute handling stress on short-term central expression of orexigenic/anorexigenic genes in zebrafish. Fish physiology and biochemistry **44**:257-272.

Council, N. R. 2009. Effective Pain Management. Recognition and Alleviation of Pain in Laboratory Animals. National Academies Press (US).

Crim, M. J., C. Lawrence, R. S. Livingston, A. Rakitin, S. J. Hurley, and L. K. Riley. 2017. Comparison of antemortem and environmental samples for zebrafish health monitoring and quarantine. Journal of the American Association for Laboratory Animal Science **56**:412-424.

Dabrowski, K., and M. Miller. 2018. Contested paradigm in raising zebrafish (Danio rerio). Zebrafish **15**:295-309.

Dametto, F. S., D. Fior, R. Idalencio, J. G. S. Rosa, M. Fagundes, A. Marqueze, R. E. Barreto, A. Piato, and L. J. Barcellos. 2018. Feeding regimen modulates zebrafish behavior. PeerJ **6**:e5343.

Davis, D. J., J. Klug, M. Hankins, H. M. Doerr, S. R. Monticelli, A. Song, C. H. Gillespie, and E. C. Bryda. 2015. Effects of clove oil as a euthanasia agent on blood collection efficiency and serum cortisol levels in Danio rerio. Journal of the American Association for Laboratory Animal Science **54**:564-567.

de Abreu, M. S., A. C. Giacomini, R. Genario, B. E. Dos Santos, L. Marcon, K. A. Demin, and A. V. Kalueff. 2020. The impact of housing environment color on zebrafish anxiety-like behavioral and physiological (cortisol) responses. General and comparative endocrinology **294**:113499.

Deakin, A. G., J. Buckley, H. S. AlZu'bi, A. R. Cossins, J. W. Spencer, W. Al'Nuaimy, I. S. Young, J. S. Thomson, and L. U. Sneddon. 2019a. Automated monitoring of behaviour in zebrafish after invasive procedures. Scientific reports **9**:1-13.

Deakin, A. G., J. W. Spencer, A. R. Cossins, I. S. Young, and L. U. Sneddon. 2019b. Welfare challenges influence the complexity of movement: fractal analysis of behaviour in zebrafish. Fishes **4**:8.

Delomas, T. A., and K. Dabrowski. 2017. The importance of controlling genetic variation–remarks on 'Appropriate rearing density in domesticated zebrafish to avoid masculinization: links with the stress response'. Journal of Experimental Biology **220**:4078-4078.
DePasquale, C., T. Neuberger, A. Hirrlinger, and V. Braithwaite. 2016. The influence of complex and threatening environments in early life on brain size and behaviour. Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences **283**:20152564.
Directive, E. 2010. Directive 2010/63/EU Of The European Parliament and of the Council of 22 September 2010 On the Protection of Animals used for Scientific Purposes. Official Journal of the European Union **L276**:33– 79.
Doğankaya, L., T. Gültekin, T. Coşkun, and E. Alptekin. 2020. Binaural beat stimulation-a non-invasive method for inducing zebrafish growth. Iranian Journal of Fisheries Sciences **19**:2308-2321.
Ellis, T., H. Y. Yildiz, J. López-Olmeda, M. T. Spedicato, L. Tort, Ø. Øverli, and C. I. Martins. 2012. Cortisol and finfish welfare. Fish physiology and biochemistry **38**:163-188.
Engeszer, R. E., L. B. Patterson, A. A. Rao, and D. M. Parichy. 2007. Zebrafish in the wild: a review of natural history and new notes from the field. Zebrafish **4**:21-40.
Espigares, F., D. Abad-Tortosa, S. Varela, M. Ferreira, and R. Oliveira. 2021. Short telomeres drive pessimistic judgement bias in zebrafish. Biology Letters **17**:20200745.
Facciol, A., M. Iqbal, A. Eada, S. Tran, and R. Gerlai. 2019. The light-dark task in zebrafish confuses two distinct factors: Interaction between background shade and illumination level preference. Pharmacology Biochemistry and Behavior **179**:9-21.
Farias, M., and A. C. Certal. 2016. Different feeds and feeding regimens have an impact on zebrafish larval rearing and breeding performance. Int J Marine Biol Res **1**:1-8.
Faustino, A. I., A. Tacão-Monteiro, and R. F. Oliveira. 2017. Mechanisms of social buffering of fear in zebrafish. Scientific reports **7**:1-10.
Félix, A. S., A. I. Faustino, E. M. Cabral, and R. F. Oliveira. 2013. Noninvasive measurement of steroid hormones in zebrafish holding-water. Zebrafish **10**:110-115.
Ferreira, J. M., S. Jorge, L. Félix, G. M. Morello, I. A. S. Olsson, and A. M. Valentim. 2022. Behavioural Aversion and Cortisol Level Assessment When Adult Zebrafish Are Exposed to Different Anaesthetics. Biology **11**:1433.
Fife-Cook, I., and B. Franks. 2019. Positive welfare for fishes: rationale and areas for future study. Fishes **4**:31.
FOD Volksgezondheid, v. v. d. v. e. l. 2012. Wet houdende diverse bepalingen inzake dierenwelzijn, CITES, dierengezondheid en bescherming van de gezondheid van de gebruikers. Belgisch staatsblad.
FOD Volksgezondheid, v. v. d. v. e. l. 2013. Koninklijk besluit van 29 mei 2013 betreffende de bescherming van proefdieren.
Fontana, B. D., N. Alnassar, and M. O. Parker. 2021. The impact of water changes on stress and subject variation in a zebrafish (Danio rerio) anxiety-related task. Journal of Neuroscience Methods **363**:109347.
Gazzano, A., and C. Mariti. 2019. Refinement of laboratory animal welfare. Biomedical Science and Engineering.
Geisler, R., N. Borel, M. Ferg, J. V. Maier, and U. Strähle. 2016. Maintenance of zebrafish lines at the European Zebrafish Resource Center. Zebrafish **13**:S-19-S-23.
Gerlach, G. 2006. Pheromonal regulation of reproductive success in female zebrafish: female suppression and male enhancement. Animal Behaviour **72**:1119-1124.
Gerlai, R., M. Lahav, S. Guo, and A. Rosenthal. 2000. Drinks like a fish: zebra fish (Danio rerio) as a behavior genetic model to study alcohol effects. Pharmacology Biochemistry and Behavior **67**:773-782.
Gesto, M., J. Hernández, M. A. López-Patiño, J. L. Soengas, and J. M. Míguez. 2015. Is gill cortisol concentration a good acute stress indicator in fish? A study in rainbow trout and zebrafish.

Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology **188**:65-69.
Giacomini, A. C. V., M. S. Abreu, R. Zanandrea, N. Saibt, M. T. Friedrich, G. Koakoski, D. Gusso, A. L. Piato, and L. J. Barcellos. 2016. Environmental and pharmacological manipulations blunt the stress response of zebrafish in a similar manner. Scientific reports **6**:1-6.
Giacomini, A. C. V. V., M. S. de Abreu, G. Koakoski, R. Idalêncio, F. Kalichak, T. A. Oliveira, J. G. S. da Rosa, D. Gusso, A. L. Piato, and L. J. G. Barcellos. 2015. My stress, our stress: Blunted cortisol response to stress in isolated housed zebrafish. Physiology & behavior **139**:182-187.
Gonçalves-de-Freitas, E., M. C. Bolognesi, A. C. d. S. Gauy, M. L. Brandão, P. C. Giaquinto, and M. Fernandes-Castilho. 2019. Social Behavior and Welfare in Nile Tilapia. Fishes **4**:23.
Gonzales, J., and M. John. 2012. Preliminary evaluation on the effects of feeds on the growth and early reproductive performance of zebrafish (Danio rerio). Journal of the American Association for Laboratory Animal Science **51**:412-417.
Goodwin, N., N. A. Karp, S. Blackledge, B. Clark, R. Keeble, C. Kovacs, K. N. Murray, M. Price, P. Thompson, and J. Bussell. 2016. Standardized welfare terms for the zebrafish community. Zebrafish **13**:S-164-S-168.
Goolish, E. M., R. Evans, K. Okutake, and R. Max. 1998. Chamber volume requirements for reproduction of the zebrafish *Danio rerio*. North American Journal of Aquaculture **60**:127-132.
Grant, J. W., and D. L. Kramer. 1992. Temporal clumping of food arrival reduces its monopolization and defence by zebrafish, Brachydanio rerio. Animal Behaviour **44**:101-110.
Gronquist, D., and J. A. Berges. 2013. Effects of aquarium-related stressors on the zebrafish: a comparison of behavioral, physiological, and biochemical indicators. Journal of aquatic animal health **25**:53-65.
Grzelak, A. K., D. J. Davis, S. M. Caraker, M. J. Crim, J. M. Spitsbergen, and C. E. Wiedmeyer. 2017. Stress leukogram induced by acute and chronic stress in zebrafish (Danio rerio). Comparative Medicine **67**:263-269.
Guggiana-Nilo, D. A., and F. Engert. 2016. Properties of the visible light phototaxis and UV avoidance behaviors in the larval zebrafish. Frontiers in behavioral neuroscience **10**:160.
Guillot, R., R. Cortés, S. Navarro, M. Mischitelli, V. García-Herranz, E. Sánchez, L. Cal, J. C. Navarro, J. M. Míguez, and S. Afanasyev. 2016. Behind melanocortin antagonist overexpression in the zebrafish brain: a behavioral and transcriptomic approach. Hormones and behavior **82**:87-100.
Gutscher, M., L. E. Wysocki, and F. Ladich. 2011. Effects of aquarium and pond noise on hearing sensitivity in an otophysine fish. Bioacoustics **20**:117-136.
Harper, C., and C. Lawrence. 2016. The laboratory zebrafish. Crc Press.
Hawkins, P., N. Dennison, G. Goodman, S. Hetherington, S. Llywelyn-Jones, K. Ryder, and A. Smith. 2011. Guidance on the severity classification of scientific procedures involving fish: report of a Working Group appointed by the Norwegian Consensus-Platform for the Replacement, Reduction and Refinement of animal experiments (Norecopa). Laboratory animals **45**:219-224.
Hendriksen, C. F., and D. B. Morton. 1999. Humane endpoints in animal experiments for biomedical research.*in* International Conference on Humane Endpoints in Animal Experiments for Biomedical Research (1998: Zeist, Netherlands). Royal Society of Medicine Press.
Higgs, D. M., M. J. Souza, H. R. Wilkins, J. C. Presson, and A. N. Popper. 2002. Age-and size-related changes in the inner ear and hearing ability of the adult zebrafish (Danio rerio). Journal of the Association for Research in Otolaryngology **3**:174-184.
Hoshijima, K., and S. Hirose. 2007. Expression of endocrine genes in zebrafish larvae in response to environmental salinity. Journal of Endocrinology **193**:481-491.
Howells, L., and T. Betts. 2009. A beginner's guide to the zebrafish (Danio rerio). Animal Technology and Welfare **8**:117-163.

Humane-Endpoints. Score sheets for zebrafish.
Huntingford, F. A., C. Adams, V. Braithwaite, S. Kadri, T. Pottinger, P. Sandøe, and J. Turnbull. 2006. Current issues in fish welfare. Journal of fish biology **68**:332-372.
Infopunt-proefdieronderzoek. 2022. Vermindering, verfijning, vervanging.
Jia, J., Y. Zhang, X. Yuan, J. Qin, G. Yang, X. Yu, B. Wang, C. Sun, and W. Li. 2018. Reactive oxygen species participate in liver function recovery during compensatory growth in zebrafish (Danio rerio). Biochemical and biophysical research communications **499**:285-290.
Jorge, S., J. Ferreira, A. Olsson, and A. M. Valentim. 2021. Adult zebrafish anaesthesia: a study of efficacy and behavioural recovery of different anaesthetics. bioRxiv.
Kimmel, C. B., W. W. Ballard, S. R. Kimmel, B. Ullmann, and T. F. Schilling. 1995. Stages of embryonic development of the zebrafish. Developmental dynamics **203**:253-310.
Kirkden, R. D., and E. A. Pajor. 2006. Using preference, motivation and aversion tests to ask scientific questions about animals' feelings. Applied Animal Behaviour Science **100**:29-47.
Kistler, C., D. Hegglin, H. Würbel, and B. König. 2011. Preference for structured environment in zebrafish (Danio rerio) and checker barbs (Puntius oligolepis). Applied Animal Behaviour Science **135**:318-327.
Köhler, A., C. Collymore, K. Finger-Baier, R. Geisler, L. Kaufmann, K. C. Pounder, S. Schulte-Merker, A. Valentim, Z. M. Varga, and J. Weiss. 2017. Report of workshop on euthanasia for zebrafish—a matter of welfare and science. Zebrafish **14**:547-551.
Köhler, A., and A. M. Valentim. 2022. Analgesia, anesthesia, and euthanasia in zebrafish. Pages 119-137 Laboratory Fish in Biomedical Research. Elsevier.
Kolb, A., F. Hildebrandt, and C. Lawrence. 2018. Effects of diet and social housing on reproductive success in adult zebrafish, Danio rerio. Zebrafish **15**:445-453.
Krug, L. A. 2019. The Effect of Increased Feeding in Proportion to Density on Sex Ratios in Zebrafish (Danio rerio). Harvard University.
Kysil, E. V., D. A. Meshalkina, E. E. Frick, D. J. Echevarria, D. B. Rosemberg, C. Maximino, M. G. Lima, M. S. Abreu, A. C. Giacomini, and L. J. Barcellos. 2017. Comparative analyses of zebrafish anxiety-like behavior using conflict-based novelty tests. Zebrafish **14**:197-208.
Lara, R. A., and R. O. Vasconcelos. 2019. Characterization of the natural soundscape of zebrafish and comparison with the captive noise conditions. Zebrafish **16**:152-164.
Lawrence, C. 2007. The husbandry of zebrafish (Danio rerio): a review. Aquaculture **269**:1-20.
Lawrence, C., J. S. Eisen, and Z. M. Varga. 2016. Husbandry and health program survey synopsis. Zebrafish **13**:S-5-S-7.
Lawrence, C., and T. Mason. 2012. Zebrafish housing systems: a review of basic operating principles and considerations for design and functionality. ILAR journal **53**:179-191.
Lawrence, M. J., S. Jain-Schlaepfer, A. J. Zolderdo, D. A. Algera, K. M. Gilmour, A. J. Gallagher, and S. J. Cooke. 2018. Are 3 minutes good enough for obtaining baseline physiological samples from teleost fish? Canadian Journal of Zoology **96**:774-786.
Lee, C. J., G. C. Paull, and C. R. Tyler. 2019. Effects of environmental enrichment on survivorship, growth, sex ratio and behaviour in laboratory maintained zebrafish Danio rerio. Journal of fish biology **94**:86-95.
Leibold, S., and M. Hammerschmidt. 2015. Long-term hyperphagia and caloric restriction caused by low-or high-density husbandry have differential effects on zebrafish postembryonic development, somatic growth, fat accumulation and reproduction. PloS one **10**:e0120776.
Levin, E. D., Z. Bencan, and D. T. Cerutti. 2007. Anxiolytic effects of nicotine in zebrafish. Physiology & behavior **90**:54-58.
Lidster, K., G. D. Readman, M. J. Prescott, and S. F. Owen. 2017. International survey on the use and welfare of zebrafish Danio rerio in research. Journal of fish biology **90**:1891-1905.
Lieggi, C., A. V. Kalueff, C. Lawrence, and C. Collymore. 2019. The Influence of behavioral, social, and environmental factors on reproducibility and replicability in aquatic animal models. ILAR journal **60**:270-288.

Manuel, R., M. Gorissen, M. Stokkermans, J. Zethof, L. O. Ebbesson, H. v. d. Vis, G. Flik, and R. v. d. Bos. 2015a. The effects of environmental enrichment and age-related differences on inhibitory avoidance in zebrafish (Danio rerio Hamilton). Zebrafish **12**:152-165.

Manuel, R., J. Zethof, G. Flik, and R. van den Bos. 2015b. Providing a food reward reduces inhibitory avoidance learning in zebrafish. Behavioural processes **120**:69-72.

Marancik, D., J. Collins, J. Afema, and C. Lawrence. 2020. Exploring the advantages and limitations of sampling methods commonly used in research facilities for zebrafish health inspections. Laboratory animals **54**:373-385.

Marchetto, L., L. J. Barcellos, G. Koakoski, S. M. Soares, A. Pompermaier, V. C. Maffi, R. Costa, C. G. da Silva, N. R. Zorzi, and K. A. Demin. 2021. Auditory environmental enrichment prevents anxiety-like behavior, but not cortisol responses, evoked by 24-h social isolation in zebrafish. Behavioural brain research **404**:113169.

Marcon, M., R. Mocelin, R. Benvenutti, T. Costa, A. P. Herrmann, D. L. de Oliveira, G. Koakoski, L. J. Barcellos, and A. Piato. 2018. Environmental enrichment modulates the response to chronic stress in zebrafish. Journal of Experimental Biology **221**:jeb176735.

Markovich, M. L., N. V. Rizzuto, and P. B. Brown. 2007. Diet affects spawning in zebrafish. Zebrafish **4**:69-74.

Martini, A., A. Huysseune, P. E. Witten, and C. Boglione. 2021. Plasticity of the skeleton and skeletal deformities in zebrafish (Danio rerio) linked to rearing density. Journal of fish biology **98**:971-986.

Martins, G., P. Diogo, W. Pinto, and P. J. Gavaia. 2019. Early transition to microdiets improves growth, reproductive performance and reduces skeletal anomalies in zebrafish (Danio rerio). Zebrafish **16**:300-307.

Martins, S., J. F. Monteiro, M. Vito, D. Weintraub, J. Almeida, and A. C. Certal. 2016a. Toward an integrated zebrafish health management program supporting cancer and neuroscience research. Zebrafish **13**:S-47-S-55.

Martins, T., A. M. Valentim, N. Pereira, and L. M. Antunes. 2016b. Anaesthesia and analgesia in laboratory adult zebrafish: a question of refinement. Laboratory animals **50**:476-488.

Matthews, M., B. Trevarrow, and J. Matthews. 2002. A virtual tour of the guide for zebrafish users. Resource **31**:34-40.

Matthews, M., and Z. M. Varga. 2012. Anesthesia and euthanasia in zebrafish. ILAR journal **53**:192-204.

Mellor, D. J. 2016. Updating animal welfare thinking: Moving beyond the “Five Freedoms” towards “a Life Worth Living”. Animals **6**:21.

Mezzomo, N. J., B. D. Fontana, T. E. Müller, T. Duarte, V. A. Quadros, J. Canzian, A. Pompermaier, S. M. Soares, G. Koakoski, and V. L. Loro. 2019. Taurine modulates the stress response in zebrafish. Hormones and behavior **109**:44-52.

Midttun, H. L., M. A. Vindas, L. E. Nadler, Ø. Øverli, and I. B. Johansen. 2020. Behavioural effects of the common brain-infecting parasite Pseudoloma neurophilia in laboratory zebrafish (Danio rerio). Scientific reports **10**:1-9.

Mocelin, R., A. P. Herrmann, M. Marcon, C. L. Rambo, A. Rohden, F. Bevilaqua, M. S. de Abreu, L. Zanatta, E. Elisabetsky, and L. J. Barcellos. 2015. N-acetylcysteine prevents stress-induced anxiety behavior in zebrafish. Pharmacology Biochemistry and Behavior **139**:121-126.

Mocho, J.-P., F. Lang, G. Valentin, S. Bedu, R. McKimm, J. Ramos, Y. Saavedra Torres, S. E. Wheatley, J. Higgins, and M. E. Millington. 2022. A Multi-Site Assessment of Anesthetic Overdose, Hypothermic Shock, and Electrical Stunning as Methods of Euthanasia for Zebrafish (Danio rerio) Embryos and Larvae. Biology **11**:546.

Mocho, J.-P., and N. Pereira. 2022. Health monitoring, disease, and clinical pathology. Pages 81-100 Laboratory Fish in Biomedical Research. Elsevier.

Mocho, J.-P., and K. von Krogh. 2022. A FELASA Working Group Survey on Fish Species Used for Research, Methods of Euthanasia, Health Monitoring, and Biosecurity in Europe, North America, and Oceania. Biology **11**:1259.
Monteiro, J. F., S. Martins, M. Farias, T. Costa, and A. C. Certal. 2018. The impact of two different cold-extruded feeds and feeding regimens on zebrafish survival, growth and reproductive performance. Journal of developmental biology **6**:15.
Muniandy, Y. 2018. The use of larval zebrafish (Danio rerio) model for identifying new anxiolytic drugs from herbal medicine. Zebrafish **15**:321-339.
Murray, K. N., J. Bauer, A. Tallen, J. L. Matthews, M. Westerfield, and Z. M. Varga. 2011. Characterization and management of asymptomatic Mycobacterium infections at the Zebrafish International Resource Center. Journal of the American Association for Laboratory Animal Science **50**:675-679.
Murray, K. N., D. Lains, and S. T. Spagnoli. 2020. Water quality and idiopathic diseases of laboratory zebrafish. Pages 463-477 The Zebrafish in Biomedical Research. Elsevier.
Nasiadka, A., and M. D. Clark. 2012. Zebrafish breeding in the laboratory environment. ILAR journal **53**:161-168.
Neo, Y. Y., L. Parie, F. Bakker, P. Snelderwaard, C. Tudorache, M. Schaaf, and H. Slabbekoorn. 2015. Behavioral changes in response to sound exposure and no spatial avoidance of noisy conditions in captive zebrafish. Frontiers in behavioral neuroscience **9**:28.
Newell, B., and M. Brocca. 2022. Housing and maintenance of zebrafish, new technologies in laboratory aquatic systems and considerations for facility design. Pages 23-62 Laboratory Fish in Biomedical Research. Elsevier.
Nordgreen, J., F. M. Tahamtani, A. M. Janczak, and T. E. Horsberg. 2014. Behavioural effects of the commonly used fish anaesthetic tricaine methanesulfonate (MS-222) on zebrafish (Danio rerio) and its relevance for the acetic acid pain test. PloS one **9**:e92116.
OECD. 2011. Test No. 234: Fish Sexual Development Test.
OECD. 2013. OECD Test 236: Fish embryo acute toxicity (FET) test. OECD Guidelines for the Testing of Chemicals **2**:1-22.
OECD, T. N. 2019. 203: Fish, Acute Toxicity Test. OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section **2**.
Ogi, A., R. Licitra, V. Naef, M. Marchese, B. Fronte, A. Gazzano, and F. M. Santorelli. 2021. Social preference tests in zebrafish: a systematic review. Frontiers in Veterinary Science **7**:590057.
Oh, J., D. H. Kim, G.-y. Kim, E.-J. Park, J. H. Ryu, J. W. Jung, S. J. Park, G.-W. Kim, and S. Lee. 2020. Hydrangeae dulcis folium attenuates physical stress by supressing ACTH-induced cortisol in zebrafish. Chinese journal of integrative medicine **26**:130-137.
Oliveira, J., M. Silveira, D. Chacon, and A. Luchiari. 2015. The zebrafish world of colors and shapes: preference and discrimination. Zebrafish **12**:166-173.
Osborne, N., G. Paull, A. Grierson, K. Dunford, E. M. Busch-Nentwich, L. U. Sneddon, N. Wren, J. Higgins, and P. Hawkins. 2016. Report of a meeting on contemporary topics in zebrafish husbandry and care. Zebrafish **13**:584-589.
Paredes, J., J. López-Olmeda, F. Martínez, and F. Sánchez-Vázquez. 2015. Daily rhythms of lipid metabolic gene expression in zebra fish liver: Response to light/dark and feeding cycles. Chronobiology international **32**:1438-1448.
Parker, M. O., M. E. Millington, F. J. Combe, and C. H. Brennan. 2012. Housing conditions differentially affect physiological and behavioural stress responses of zebrafish, as well as the response to anxiolytics. PloS one **7**:e34992.
Paull, G. C., A. L. Filby, H. G. Giddins, T. S. Coe, P. B. Hamilton, and C. R. Tyler. 2010. Dominance hierarchies in zebrafish (Danio rerio) and their relationship with reproductive success. Zebrafish **7**:109-117.
Paull, G. C., K. J. Van Look, E. M. Santos, A. L. Filby, D. M. Gray, J. P. Nash, and C. R. Tyler. 2008. Variability in measures of reproductive success in laboratory-kept colonies of zebrafish and

implications for studies addressing population-level effects of environmental chemicals. Aquatic Toxicology **87**:115-126.
Pavlidis, M., N. Digka, A. Theodoridi, A. Campo, K. Barsakis, G. Skouradakis, A. Samaras, and A. Tsalafouta. 2013. Husbandry of zebrafish, Danio rerio, and the cortisol stress response. Zebrafish **10**:524-531.
Powell, C., M. A. von Keyserlingk, and B. Franks. 2021. Tank cleaning temporarily increases stress and decreases affiliative behavior in zebrafish. Applied Animal Behaviour Science **242**:105414.
Printzi, A., C. Kourkouta, S. Fragkoulis, A. Dimitriadi, G. Geladakis, M. Orfanakis, D. Mazurais, J. L. Zambonino-Infante, and G. Koumoundouros. 2021. Balancing between Artemia and microdiet usage for normal skeletal development in zebrafish (Danio rerio). Journal of Fish Diseases **44**:1689-1696.
Pype, C., E. Verbueken, M. A. Saad, C. R. Casteleyn, C. J. Van Ginneken, D. Knapen, and S. J. Van Cruchten. 2015. Incubation at 32.5 C and above causes malformations in the zebrafish embryo. Reproductive Toxicology **56**:56-63.
Quadros, V. A., L. V. Rosa, F. V. Costa, G. Koakoski, L. J. Barcellos, and D. B. Rosemberg. 2021. Predictable chronic stress modulates behavioral and neuroendocrine phenotypes of zebrafish: Influence of two homotypic stressors on stress-mediated responses. Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology **247**:109030.
Quintaneiro, C., A. M. Soares, D. Costa, and M. S. Monteiro. 2019. Effects of PCB-77 in adult zebrafish after exposure during early life stages. Journal of Environmental Science and Health, Part A **54**:478-483.
Ramsay, J. M., G. W. Feist, Z. M. Varga, M. Westerfield, M. L. Kent, and C. B. Schreck. 2006. Whole-body cortisol is an indicator of crowding stress in adult zebrafish, Danio rerio. Aquaculture **258**:565-574.
Ramsay, J. M., G. W. Feist, Z. M. Varga, M. Westerfield, M. L. Kent, and C. B. Schreck. 2009. Whole-body cortisol response of zebrafish to acute net handling stress. Aquaculture **297**:157-162.
RE-Place. 3V principe.
Readman, G. D., S. F. Owen, J. C. Murrell, and T. G. Knowles. 2013. Do fish perceive anaesthetics as aversive? PloS one **8**:e73773.
Reed, B., and M. Jennings. 2011. Guidance on the housing and care of zebrafish danio rerio. Guidance on the housing and care of zebrafish Danio rerio.
Ribas, L., A. Valdivieso, N. Díaz, and F. Piferrer. 2017. Appropriate rearing density in domesticated zebrafish to avoid masculinization: links with the stress response. Journal of Experimental Biology **220**:1056-1064.
Rombough, P. J. 2007. Ontogenetic changes in the toxicity and efficacy of the anaesthetic MS222 (tricaine methanesulfonate) in zebrafish (Danio rerio) larvae. Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology **148**:463-469.
Roy, T., P. S. Suriyampola, J. Flores, M. López, C. Hickey, A. Bhat, and E. P. Martins. 2019. Color preferences affect learning in zebrafish, Danio rerio. Scientific reports **9**:1-10.
Sabet, S. S., D. Van Dooren, and H. Slabbekoorn. 2016. Son et lumiere: Sound and light effects on spatial distribution and swimming behavior in captive zebrafish. Environmental Pollution **212**:480-488.
Schaefer, J., and A. Ryan. 2006. Developmental plasticity in the thermal tolerance of zebrafish Danio rerio. Journal of fish biology **69**:722-734.
Schreck, C. B., and L. Tort. 2016. The concept of stress in fish. Pages 1-34 Fish physiology. Elsevier.
Schroeder, P., S. Jones, I. S. Young, and L. U. Sneddon. 2014. What do zebrafish want? Impact of social grouping, dominance and gender on preference for enrichment. Laboratory animals **48**:328-337.
Schroeder, P. G., and L. U. Sneddon. 2017. Exploring the efficacy of immersion analgesics in zebrafish using an integrative approach. Applied Animal Behaviour Science **187**:93-102.

Scott, G. R., and I. A. Johnston. 2012. Temperature during embryonic development has persistent effects on thermal acclimation capacity in zebrafish. Proceedings of the National Academy of Sciences **109**:14247-14252.

Sergeant, E. 2018. Epitools Epidemiological Calculators.*in* Ausvet, editor.

Sfakianakis, D., E. Renieri, M. Kentouri, and A. Tsatsakis. 2015. Effect of heavy metals on fish larvae deformities: a review. Environmental research **137**:246-255.

Sfakianakis, D. G., I. Leris, A. Laggis, and M. Kentouri. 2011. The effect of rearing temperature on body shape and meristic characters in zebrafish (Danio rerio) juveniles. Environmental biology of fishes **92**:197-205.

Shams, S., D. Seguin, A. Facciol, D. Chatterjee, and R. Gerlai. 2017. Effect of social isolation on anxiety-related behaviors, cortisol, and monoamines in adult zebrafish. Behavioral neuroscience **131**:492.

SILO. 2009. Zebrafish Workshop:Water Quality Parameters and Fish Disease.

Silva, P. F., C. G. de Leaniz, and A. C. Luchiari. 2019. Fear contagion in zebrafish: a behaviour affected by familiarity. bioRxiv:521187.

Siregar, P., S. Juniardi, G. Audira, Y.-H. Lai, J.-C. Huang, K. H.-C. Chen, J.-R. Chen, and C.-D. Hsiao. 2020. Method standardization for conducting innate color preference studies in different zebrafish strains. Biomedicines **8**:271.

Slabbekoorn, H., N. Bouton, I. van Opzeeland, A. Coers, C. ten Cate, and A. N. Popper. 2010. A noisy spring: the impact of globally rising underwater sound levels on fish. Trends in ecology & evolution **25**:419-427.

Soares, S. M., K. Kirsten, A. Pompermaier, V. C. Maffi, G. Koakoski, M. Woloszyn, R. E. Barreto, and L. J. G. Barcellos. 2020. Sex segregation affects exploratory and social behaviors of zebrafish according to controlled housing conditions. Physiology & behavior **222**:112944.

Spence, R., A. E. Magurran, and C. Smith. 2011. Spatial cognition in zebrafish: the role of strain and rearing environment. Animal cognition **14**:607-612.

Spence, R., and C. Smith. 2005. Male territoriality mediates density and sex ratio effects on oviposition in the zebrafish, Danio rerio. Animal Behaviour **69**:1317-1323.

Stephenson, J. F., K. E. Whitlock, and J. C. Partridge. 2011. Zebrafish preference for light or dark is dependent on ambient light levels and olfactory stimulation. Zebrafish **8**:17-22.

Stevens, C. H., B. T. Reed, and P. Hawkins. 2021. Enrichment for laboratory zebrafish—a review of the evidence and the challenges. Animals **11**:698.

Stevens, E. D. “Pain” and analgesia in fish: What we know, what we do not know, and what.

Strykowski, J. L., and J. M. Schech. 2015. Effectiveness of recommended euthanasia methods in larval zebrafish (Danio rerio). Journal of the American Association for Laboratory Animal Science **54**:81-84.

Thurman, C. E., S. Rasmussen, and K. A. Prestia. 2019. Effect of 3 Euthanasia Methods on Serum Yield and Serum Cortisol Concentration in Zebrafish (Danio rerio). Journal of the American Association for Laboratory Animal Science **58**:823-828.

Toni, M., A. Manciocco, E. Angiulli, E. Alleva, C. Cioni, and S. Malavasi. 2019. Assessing fish welfare in research and aquaculture, with a focus on European directives. animal **13**:161-170.

Tran, S., D. Chatterjee, and R. Gerlai. 2014. Acute net stressor increases whole-body cortisol levels without altering whole-brain monoamines in zebrafish. Behavioral neuroscience **128**:621.

Tsang, B., H. Zahid, R. Ansari, R. C.-Y. Lee, A. Partap, and R. Gerlai. 2017. Breeding Zebrafish: a review of different methods and a discussion on standardization. Zebrafish **14**:561-573.

Van de Weerd, H. A., E. L. Aarsen, A. Mulder, C. L. Kruitwagen, C. F. Hendriksen, and V. Baumans. 2002. Effects of environmental enrichment for mice: variation in experimental results. Journal of Applied Animal Welfare Science **5**:87-109.

Varga, Z. 2016. Aquaculture, husbandry, and shipping at the Zebrafish International Resource Center. Pages 509-534 Methods in Cell Biology. Elsevier.

Villamizar, N., L. Ribas, F. Piferrer, L. M. Vera, and F. J. Sánchez-Vázquez. 2012. Impact of daily thermocycles on hatching rhythms, larval performance and sex differentiation of zebrafish. PloS one **7**:e52153.

Villamizar, N., L. M. Vera, N. S. Foulkes, and F. J. Sánchez-Vázquez. 2014. Effect of lighting conditions on zebrafish growth and development. Zebrafish **11**:173-181.

Virote, B. d. C. R., A. M. S. Moreira, J. G. da Silva Souza, T. F. D. Castro, N. Melo, W. F. Carneiro, C. D. Drummond, A. R. d. C. B. Vianna, and L. D. S. Murgas. 2020. Obesity induction in adult zebrafish leads to negative reproduction and offspring effects. Reproduction **160**:833-842.

von Krogh, K., J. Higgins, Y. Saavedra Torres, and J.-P. Mocho. 2021. Screening of anaesthetics in adult zebrafish (Danio rerio) for the induction of euthanasia by overdose. Biology **10**:1133.

von Krogh, K., C. Sørensen, G. E. Nilsson, and Ø. Øverli. 2010. Forebrain cell proliferation, behavior, and physiology of zebrafish, Danio rerio, kept in enriched or barren environments. Physiology & behavior **101**:32-39.

Wallace, C. K., L. A. Bright, J. O. Marx, R. P. Andersen, M. C. Mullins, and A. J. Carty. 2018. Effectiveness of rapid cooling as a method of euthanasia for young zebrafish (Danio rerio). Journal of the American Association for Laboratory Animal Science **57**:58-63.

Westerfield, M. 1993. The zebrafish: a guide for the laboratory use of zebrafish (Brachydanio reriro). Inst. of Neuroscience, University of Oregon.

White, L. J., J. S. Thomson, K. C. Pounder, R. C. Coleman, and L. U. Sneddon. 2017. The impact of social context on behaviour and the recovery from welfare challenges in zebrafish, Danio rerio. Animal Behaviour **132**:189-199.

Wilkes, L., S. F. Owen, G. D. Readman, K. A. Sloman, and R. W. Wilson. 2012. Does structural enrichment for toxicology studies improve zebrafish welfare? Applied Animal Behaviour Science **139**:143-150.

Wilson, J. M., R. M. Bunte, and A. J. Carty. 2009. Evaluation of rapid cooling and tricaine methanesulfonate (MS222) as methods of euthanasia in zebrafish (Danio rerio). Journal of the American Association for Laboratory Animal Science **48**:785-789.

Wong, R. Y., J. French, and J. B. Russ. 2019. Differences in stress reactivity between zebrafish with alternative stress coping styles. Royal Society open science **6**:181797.

Woodward, M. A., L. A. Winder, and P. J. Watt. 2019. Enrichment increases aggression in zebrafish. Fishes **4**:22.

Zang, L., Y. Shimada, Y. Nishimura, T. Tanaka, and N. Nishimura. 2015. Repeated blood collection for blood tests in adult zebrafish. Journal of visualized experiments: JoVE.

Zarantoniello, M., B. Randazzo, G. Cardinaletti, C. Truzzi, G. Chemello, P. Riolo, and I. Olivotto. 2021. Possible dietary effects of insect-based diets across zebrafish (Danio rerio) generations: a multidisciplinary study on the larval phase. Animals **11**:751.

Zarantoniello, M., B. Randazzo, G. Gioacchini, C. Truzzi, E. Giorgini, P. Riolo, G. Gioia, C. Bertolucci, A. Osimani, and G. Cardinaletti. 2020. Zebrafish (Danio rerio) physiological and behavioural responses to insect-based diets: A multidisciplinary approach. Scientific reports **10**:1-16.

APPENDIX 1: HUISHOUDING EN WELZIJN VAN ZEBRAVISSEN IN VLAAMSE FACILITEITEN

Inleiding

Dit document beschrijft de resultaten van een enquête die in het voorjaar van 2021 werd afgenomen bij gebruikers van zebravissen als proefdieren in Vlaanderen. De enquête maakt deel uit van een project rond het opstellen van een leidraad ter bevordering van het welzijn van zebravissen in proefdierfaciliteiten, gefinancierd door de Vlaamse overheid (DO/SID/DWZ/OO/19/07).

Het doel van deze enquête is inzicht te krijgen in de opbouw en werking van verschillende zebravisfaciliteiten in Vlaanderen. Daarnaast zullen deze resultaten ook gebruikt worden om te bepalen welke parameters en omstandigheden prioritair aan bod dienen te komen in de leidraad, en/of in welke domeinen bijkomend onderzoek nodig is om goede aanbevelingen te kunnen formuleren.

Respondenten

De enquête werd verstuurd naar de grootste gebruikers van zebravissen in Vlaanderen en werd door respondenten uit negen zebravisfaciliteiten ingevuld. In drie van de negen faciliteiten werd de enquête door één persoon ingevuld. In zes van de negen faciliteiten werd de bevraging door twee personen ingevuld. Dat waren steeds een dierenverzorger en een onderzoeker, op één faciliteit na waar beide respondenten onderzoekers waren.

1 FUNCTIE ZEBRAVISFACILITEIT

1.1 ZEBRAVISLIJNEN

Alle faciliteiten die bestaande zebravislijnen houden, kweken deze ook. De AB-lijn wordt in acht van de negen faciliteiten gehouden, waarbij zes faciliteiten aangeven de lijn ook zelf te kweken. De WIK-lijn wordt in twee van de negen faciliteiten gehouden. Reporterlijnen worden in vijf van de negen faciliteiten gehouden. Drie hiervan ontwikkelen ook reporterlijnen. Transgene lijnen worden in drie van de negen faciliteiten gehouden. Twee faciliteiten ontwikkelen ook transgene lijnen.

Twee faciliteiten leveren zebravissen, en dit zowel aan interne als externe partners.

1.2 EXPERIMENTEN

Faciliteiten werden bevraagd naar de levensstadia die gebruikt worden in experimenten. Drie van de negen faciliteiten geven aan enkel experimenten uit te voeren met embryo's. Drie andere faciliteiten gebruiken alle levensstadia van de vissen in experimenten. Eén faciliteit voert enkel experimenten uit met adulten en een andere faciliteit enkel met embryo's en juvenielen. Tenslotte is er één faciliteit die geen experimenteel werk uitvoert, maar enkel instaat voor het houden, kweken en leveren van bestaande zebravislijnen.

2 TYPE SYSTEEM

Zebravissen kunnen in verschillende systemen gehouden en gekweekt worden. De meest voorkomende zijn de (half)-automatische systemen en de opstellingen met individuele aquaria. In een (half)-automatisch systeem wordt het inkomende water meestal eerst via omgekeerde osmose gefilterd ("reverse osmosis" of "RO"). Nadien worden er stoffen aan toegevoegd om de gewenste waterparameters te bekomen. Er bestaan ook systemen die kraantjeswater als basis gebruiken. Waterparameters zoals temperatuur, conductiviteit en pH worden voortdurend gemonitord en automatisch bijgestuurd. Het systeem voorziet verschillende filters (mechanisch, biologisch en UV) die het volledige watervolume filteren om de waterkwaliteit zo goed mogelijk te houden. Voedingen en schoonmaak gebeuren doorgaans manueel. In een systeem met individuele aquaria worden de aquaria voorzien van individuele filters (meestal mechanisch, biologisch en actieve kool), maar het volledige watervolume gaat er niet standaard doorheen. Temperatuur wordt zo constant mogelijk gehouden met behulp van verwarmers. De andere waterparameters zoals conductiviteit en pH worden zo juist mogelijk benaderd tijdens de verversingen van de aquaria, maar kunnen nadien variëren tot de aquaria opnieuw ververst worden.

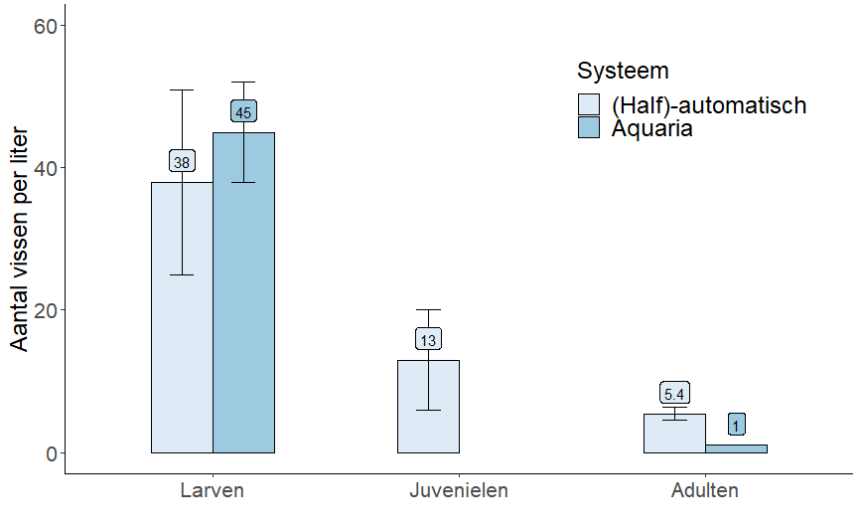
Vijf van de negen faciliteiten geven aan met een (half-)automatisch systeem te werken. Zowel vrijstaande systemen, als systemen met rekken in serie worden gebruikt. De totale capaciteit (uitgedrukt in aantal tanks van 3.5 L) varieert van 130 tot 1000 tanks.

Vier van de negen faciliteiten werken met individuele aquaria. De grootte van de meest gebruikte aquaria varieert van 10 L tot 60 L. Het aantal aquaria varieert van 1 (60 L) tot 25 (10 L) aquaria. De meeste aquaria zijn gemaakt van glas, maar kleinere aquaria (10 L) kunnen ook van plastic zijn.

3 PARAMETERS

3.1 DENSITEIT

De respondenten werden gevraagd wat voor hen de meest wenselijke densiteit aan vissen in hun systemen bedraagt. Figuur 1 geeft de wenselijke densiteit in aantal vissen per liter water weer per type faciliteit en per levensstadium. Er was te weinig data om een datapunt toe te voegen over de densiteit van juvenielen in faciliteiten met aquaria.



Figuur 1: Wenselijke densiteit uitgedrukt in vissen per liter voor larven (0-20 dpf), juvenielen (21-90 dpf) en adulten (> 90 dpf) in twee types faciliteiten. Foutenvlaggen duiden de SD aan. Bovenaan de balk wordt de gemiddelde densiteit weergegeven.

De densiteit daalt wanneer vissen opgroeien. Ook is er een verschil waarneembaar tussen de densiteit aan adulten in faciliteiten met (half)-automatische systemen en aquaria. In (half)-automatische systemen worden gemiddeld 5.4 vissen per liter water gehouden. Er is weinig variatie tussen de antwoorden van de respondenten in deze categorie. In tanks van 3.5 L vertaalt zich dit naar gemiddeld 17-18 vissen per tank. Wanneer gevraagd wordt naar de maximale densiteit in (half)-automatische systemen, is het gemiddelde voor adulten 7.4/L, wat neerkomt op 26 vissen in een 3.5 L tank. In aquaria wordt er unaniem geantwoord dat de optimale densiteit 1 vis per liter is. In een aquarium van 20 L, komt dat overeen met 20 vissen. De maximale densiteit voor adulten in aquaria bedraagt volgens de respondenten 1.5/L, hetgeen overeen komt met 30 vissen in een 20 L aquarium.

3.2 WATER

In alle faciliteiten met (half)-automatische systemen recirculeert het water. Faciliteiten met aquaria hebben water dat over interne filters wordt gestuwd en regelmatig (gedeeltelijk of volledig) ververst wordt.

3.2.1 Watersamenstelling

Het water wordt in zes faciliteiten (vijf faciliteiten met (half)-automatische systemen en één met aquaria) gemaakt op basis van RO water. Hier worden zeezout en natriumbicarbonaat ($NaHCO_3$) aan toegevoegd om de gewenste conductiviteit en pH te verkrijgen. De primaire parameter die faciliteiten hanteren om de ionsamenstelling van het water te bewaken is de conductiviteit. Hardheid, bepaald door de keuze van het toegevoegde zout, wordt minder gemonitord.

In de andere drie faciliteiten met aquaria worden de vissen in kraantjeswater gehouden, waarbij de zuurtegraad en conductiviteit niet aangepast wordt. Één van deze faciliteiten geeft aan voor larvale stadia (0-20 dpf) gestandaardiseerd viswater aan te maken op basis van RO water, met toevoeging van zeezout en $NaHCO_3$.

3.2.2 Waterkwaliteit

Zuurstof
In vier van de vijf faciliteiten met (half)-automatische systemen wordt het water belucht in de vergaarbak, vaak ter hoogte van de biologische filter. In de faciliteiten met aquaria wordt het water belucht via de individuele filters.

Filtratie
In (half)-automatische systemen wordt het water gefilterd door een mechanische filter, een biologische filter, een actieve koolfilter en een UV-filter. Van de vier faciliteiten met aquaria zijn er twee waar het water mechanisch gefilterd wordt, waarvan één ook een biologische filter gebruikt. In een andere faciliteit wordt er enkel biologisch (en niet mechanisch) gefilterd. Actieve kool wordt in elke faciliteit met aquaria gebruikt. Geen van deze faciliteiten gebruikt UV-filters. Biologische filters worden in de helft van de faciliteiten opgegroeid met behulp van commerciële enten, en in de andere helft natuurlijk opgegroeid in aanwezigheid van vissen.

Indicaties van waterkwaliteit
Volgende indicaties van waterkwaliteit worden in het grootste deel van de faciliteiten dagelijks opgevolgd: troebelheid van het water, vuil op de bodem van aquarium/tank, bacteriële laag op het oppervlak en fysicochemische parameters water. De stikstofparameters worden wekelijks tot maandelijks opgevolgd. Er wordt actie ondernomen om problemen op te lossen wanneer voor één van de waterparameters de alarmdrempel overschreden is, als het gedrag van de vissen merkbaar gewijzigd is of als er te veel vuil op de bodem van het aquarium ligt. Als er zich een bacteriële laag aan het oppervlak voordoet, wordt er in zeven van de negen faciliteiten actie ondernomen.

3.2.3 Waterparameters

De respondenten werd gevraagd de richtwaarde, de maximale geobserveerde afwijking, de alarmdrempel en de meetfrequentie per week van verschillende waterparameters op te geven. Tabellen 1-6 vatten deze informatie samen voor de verschillende types faciliteiten. Wanneer er geen antwoord gegeven werd, wordt er NA weergegeven. Tussen haakjes (x/y) wordt de frequentie weergegeven dat dit antwoord werd gegeven Hardheid en percentage opgeloste zuurstof werden eveneens bevraagd. Deze parameters worden echter weinig gemeten in de Vlaamse zebravisfaciliteiten.

Tabel 1: Temperatuurparameters in verschillende types faciliteiten.

Type faciliteit	Richtwaarde temperatuur (°C) (frequentie antwoord)	Maximale afwijking (°C)	Alarmdrempel (°C)	Meetfrequentie (# per week)
(Half)-automatisch	28 (5/5)	1-2	<26, >29-30	7
Aquaria	28 (2/4) 26 (1/4) 24 (1/4)	0.5-4	<23, >30	5-7

Tabel 2: Conductiviteitsparameters in verschillende types faciliteiten

Type faciliteit	Conductiviteit (µS) (frequentie antwoord)	Maximale afwijking (µS)	Alarmdrempel (µS)	Meetfrequentie (# per week)
(Half)-automatisch	500 (2/5) 550 (2/5) 660 (1/5)	470-700	<400, >700	7
Aquaria	400 (1/4) 500-560 (1/4) 700 (1/4) NA (1/4)	[-100,+100]	<300, >1000	0-7

Tabel 3: pH-parameters in verschillende types faciliteiten

Type faciliteit	pH (frequentie antwoord)	Maximale afwijking	Alarmdrempel	Meetfrequentie (# per week)
(Half)-automatisch	7.5 (3/5) 7.4 (2/5)	7.4-8	<7, >8	7
Aquaria	7 (1/4) 7.4 (1/4) 7.8 (1/4) NA (1/4)	7-8	<6, >8	1-6

Tabel 4: Ammonium- en ammoniakparameters in verschillende types faciliteiten

Type faciliteit	NH_3/NH_4^+ (mg/L) (frequentie antwoord)	Maximale afwijking (mg/L)	Alarmdrempel (mg/L)	Meetfrequentie (# per week)
(Half)-automatisch	0 (3/5) NA (2/5)	0.25	0.25-0.5	0-2
Aquaria	0 (2/4) 0.5 (1/4) NA (1/4)	NA	NA	1-2

Tabel 5: Nitraatparameters in verschillende types faciliteiten

Type faciliteit	NO_3^- (mg/L) (frequentie antwoord)	Maximale afwijking (mg/L)	Alarmdrempel (mg/L)	Meetfrequentie (# per week)
(Half)-automatisch	0 (3/5) 12.5 (1/5) NA (1/5)	25-50	25-50	0-2
Aquaria	0 (2/4) 12.5 (1/4) NA (1/4)	25	50	1-2

Tabel 6: Nitrietparameters in verschillende types faciliteiten

Type faciliteit	NO_2^- (mg/L) (frequentie antwoord)	Maximale afwijking (mg/L)	Alarmdrempel (mg/L)	Meetfrequentie (# per week)
(Half)-automatisch	0 (4/5) NA (1/5)	0.3	0-0.5	0-2
Aquaria	0 (1/4) 0.05 (1/4) 0.3 (1/4) NA (1/4)	NA	NA	1-2

Temperatuur in het lokaal
Vier van de vijf faciliteiten met (half)-automatische systemen maken gebruik van een geklimatiseerde kamer (soms enkel airco) en verwarmers in het systeem om de temperatuur in het water constant te houden. Één faciliteit gebruikt zowel koeling als verwarmers in het systeem. In faciliteiten met aquaria wordt de kamertemperatuur in drie van de vier gevallen niet geregeld (m.u.v. een airconditioninginstallatie). Aquaria worden dan afzonderlijk met verwarmers opgewarmd tot de gewenste temperatuur. De vierde faciliteit beschikt wel over een geklimatiseerde kamer.

Opvolging en onderhoud (half)-automatische systemen
(Half)-automatische systemen worden standaard éénmaal per jaar onderhouden, inclusief de meettoestellen voor waterparameters. Één faciliteit geeft aan elke week na te kijken of het systeem nog correcte waarden aangeeft. De andere faciliteiten meten dit enkel na bij problemen met de parameters.

3.3 LICHT

Verlichting
In alle vijf faciliteiten met (half)-automatische systemen worden de systemen verlicht door lampen die aan het plafond hangen en niet specifiek op de systemen gericht zijn. In faciliteiten met aquaria geven twee van de vier aan dat er lampen net boven of in het aquarium hangen, terwijl de andere twee verlichting aan het plafond hebben hangen.

Gradueel aan- en uitgaan van het licht
Slechts in één faciliteit gaat het licht gradueel aan en uit, en dit gedurende 15 minuten.

Fotoperiode
De lichtcyclus wordt ingesteld op 14 uur licht en 10 uur donker (14/10 LD) in alle (half)-automatische systemen. Dit is ook zo in twee van de vier faciliteiten met aquaria. De andere twee faciliteiten hebben een lichtcyclus van 16/8 LD en 10/14 LD.

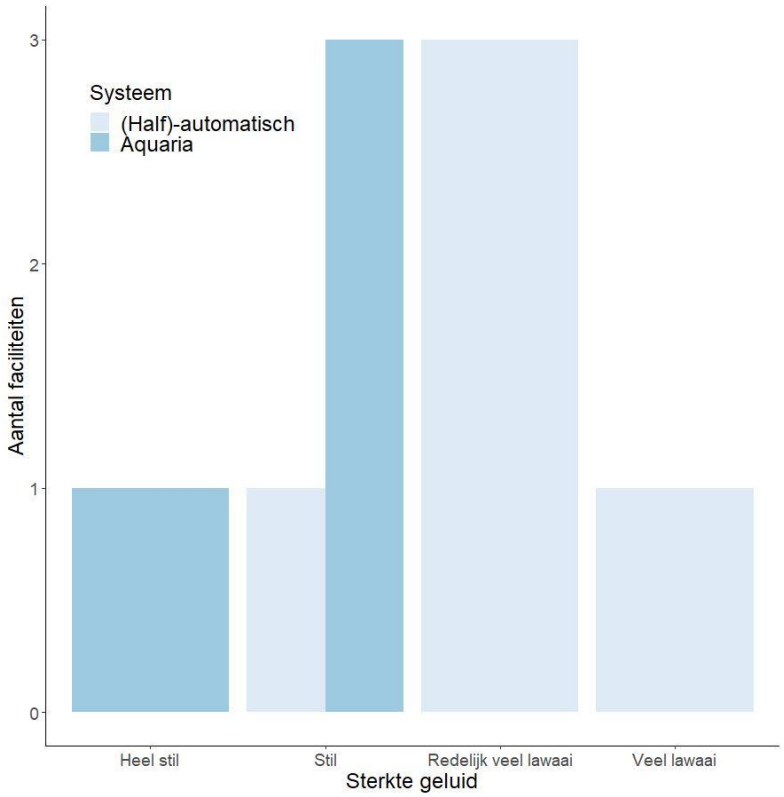
Lichtpollutie
In alle vijf faciliteiten met (half)-automatische systemen kan er mogelijk beperkte lichtpollutie zijn tijdens de donkerfase door displays van apparatuur (oranje of azuurblauwe schermen) of wachtlampjes van computers. In faciliteiten met aquaria is deze lichtpollutie tijdens de donkerfase niet aanwezig.

3.4 GELUID EN TRILLINGEN

3.4.1 Standaard omgevingsgeluid

Faciliteiten met aquaria zijn over het algemeen vrij van storend omgevingsgeluid. Geluidsbronnen zijn de motoren van individuele aquariumfilters, pompen en mogelijke andere apparaten die in het lokaal staan, zoals incubatoren. De respondenten geven aan dat het er stil (3/4) of zelfs heel stil is (1/4).

In (half)-automatische faciliteiten is er meer omgevingsgeluid, komende van pompen, installaties voor artemiakweek, mechanische filters, RO installaties en incubatoren. De respondenten geven aan dat er relatieve stilte (1/5), redelijk veel lawaai (3/5) en veel lawaai (1/5) is. Figuur 2 geeft deze resultaten grafisch weer.



Figuur 2: Standaard omgevingsgeluid in faciliteiten met (half)-automatische systemen en faciliteiten met aquaria.

3.4.2 Occasionele geluiden

Onder deze categorie vallen geluiden die niet voortdurend voorkomen, zoals muziek, praten, alarmen, … Het opzetten van muziek in zebravisfaciliteiten varieert sterk. In vier van de negen faciliteiten wordt bewust nooit muziek opgezet. In twee van de negen faciliteiten wordt er zeer sporadisch muziek opgezet. In twee van de negen faciliteiten wordt er regelmatig muziek opgezet (2 uur per dag en 8 uur per dag). Tenslotte geeft één faciliteit aan 24 uur per dag muziek af te spelen. Faciliteiten die 8 uur of meer per dag muziek aanzetten doen dit bewust, om omgevingsgeluiden te compenseren.

Wanneer er muziek wordt afgespeeld, is dit tijdens het schoonmaken (3/9), de voeding en verzorging (2/9), experimenten (2/9) en embryoproductie (1/9). Naast de specifieke taak kan de aanwezigheid van muziek ook afhangen van de onderzoeker of dierenverzorger die al dan niet muziek wenst op te zetten.

Respondenten geven aan 5 tot 200 minuten per dag te praten in het bijzijn van de vissen.

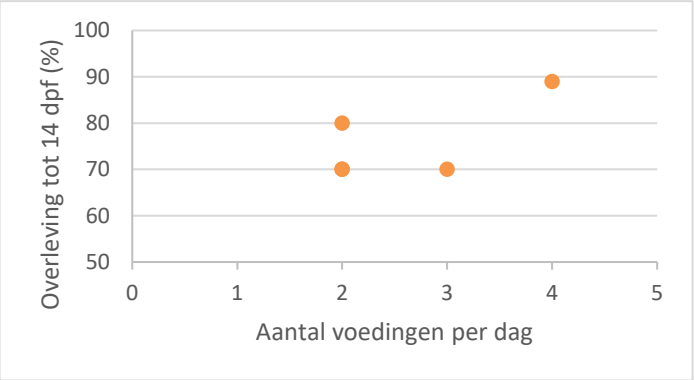
Brandalarmen gaan één tot vier keer per jaar af, maar zijn vaak nauwelijks hoorbaar in het lokaal waar de vissen gehuisvest worden. Andere alarmen die in de faciliteit kunnen afgaan zijn alarmen van toestellen (verwarmapparaten, incubatoren, …) of het inbraakalarm. Verder wordt er ook aangegeven dat er soms occasionele geluiden zijn door verbouwingen elders in het gebouw, met een frequentie van éénmaal per jaar.

De frequentie van open- en toegaan van de deur varieert sterk tussen faciliteiten (<10 tot >25 keer) in zowel aquaria- als (half)-automatische faciliteiten. Vaak zijn de deuren van de faciliteit wel voorzien van een gewicht en/of rubber. Verder is er ook een faciliteit waarbij de deuren van de kweekkamers overdag worden opgezet om minder verstoring van open- en toegaan van de deur te hebben. Hierbij zijn ook de gang en andere verbonden kamers geklimatiseerd.

4 VOEDSEL

4.1 FREQUENTIE

Het voedingsschema varieert sterk tussen faciliteiten. Sommige faciliteiten geven jonge zebravissen frequent voedsel, om later af te bouwen. Andere faciliteiten houden doorheen de levensstadia een constante frequentie voedingen aan en nog anderen geven steeds vaker voeding naarmate de vissen ouder worden. Gemiddeld worden in faciliteiten met (half)-automatische systemen alle levensstadia twee tot drie keer per dag gevoederd. In figuur 3 wordt de overleving van larven tot 14 dagen uitgezet ten opzicht van het aantal voedingen in (half)-automatische faciliteiten. Er kan geen verband geobserveerd worden tussen voedingsfrequentie en overleving van larven.



Figuur 3: Percentage overlevende larven na 14 dagen, afhankelijk van de voedingsfrequentie per dag. Data komen enkel uit faciliteiten met (half)-automatische systemen.

In faciliteiten met aquaria worden larven (5-21 dpf) twee keer per dag gevoederd. Oudere levensstadia worden 1-2 keer per dag gevoederd.

4.2 SAMENSTELLING VOEDSEL

Larvale stadia worden in alle faciliteiten met droogvoer gevoederd. Enkel in (half)-automatische faciliteiten (4/5) wordt dit dieet aangevuld met levend voedsel. Ook juveniele stadia worden in alle faciliteiten met droogvoer gevoederd. Dit wordt in alle (half)-automatische faciliteiten en één aquariumfaciliteit aangevuld met levend voedsel. Adulte zebravissen worden gevoederd met een variërend dieet, bestaande uit droogvoer (7/9), levend voedsel (5/9) en bevroren voedsel (4/9).

4.3 WEEKENDREGIME

In het weekend krijgen alle vissen minstens éénmaal per dag eten. De samenstelling van het voedsel varieert sterk tussen faciliteiten. Soms krijgen alle vissen levend voer, soms is het afhankelijk van het levensstadium, en soms wordt er enkel droogvoer gegeven.

5 WELZIJN

5.1 MONITORING

Het welzijn van de dieren wordt minstens elke weekdag gecontroleerd. In zes van de negen faciliteiten gebeurt dit ook in het weekend. De monitoring wordt ofwel door de dierenverzorger (3/9) of onderzoeker (1/9) gedaan, ofwel wordt er een rotatiesysteem opgezet tussen verschillende personeelsleden (5/9). De monitoring wordt gedaan op basis van de richtlijnen vanuit de faciliteit (7/9), een checklist (6/9) of de wetenschappelijke literatuur (5/9). Sommige faciliteiten kiezen ervoor net geen richtlijnen of checklists te gebruiken, om te verzekeren dat alle personeelsleden in het rotatiesysteem op een unieke manier en met een open geest naar de vissen kijken.

5.2 SIGNALEN VERMINDERD WELZIJN

De respondenten werden gevraagd aan te geven hoe belangrijk volgende signalen voor verminderd welzijn aanzien worden in hun faciliteit. Tabel 7 geeft de signalen weer in volgorde van belangrijkheid als indicator voor verminderd welzijn. Daarnaast werd ook gevraagd welke actie er in de desbetreffende gevallen werd ondernomen (geen actie, behandeling, quarantaine, euthanasie). Wanneer de actie in de meeste faciliteiten dezelfde was, wordt deze weergegeven, samen met het percentage faciliteiten dat deze actie uitvoert. Wanneer er verdeeldheid is (i.e. wanneer geen enkele optie duidelijk vaker gekozen wordt), wordt dit aangegeven met 'verdeeld' en wordt de meest gekozen optie weergegeven. In de lichtblauwe zone kan worden opgemerkt dat de rangschikking in ernst en de bijhorende actie op sommige plaatsen niet altijd overeen komt.

Tabel 7: Signalen voor verminderd welzijn gerangschikt van belangrijke indicatoren tot minder belangrijke indicatoren, met bijhorende actie. Wanneer er verdeeldheid heerst tussen de respondenten (<7/12) wordt verdeeldheid weergegeven.

Belangrijk

indicator verminderd welzijn

Onbelangrijk

Signaal verminderd welzijn	Verdeeldheid?	Meest voor-komende actie	Percentage
Vis heeft afwijkend zwemgedrag (bv. schroevendraaier)		Euthanasie	67%
Vis heeft gezwellen		Euthanasie	77%
Vis kan de positie in de waterkolom niet behouden		Euthanasie	75%
Vis heeft openstaande schubben	Verdeeld	Euthanasie	45%
Vis heeft opvallend gewichtsverlies	Verdeeld	Quarantaine	42%
Vis heeft een gezwollen oog	Verdeeld	Euthanasie	50%
Vis heeft een gekromde ruggengraat		Euthanasie	69%
Vis komt niet naar voedsel wanneer het wordt toegediend		Niets	67%
Vis heeft verkleuringen op de buik	Verdeeld	Niets	42 %
Vis heeft ei-retentie		Niets	58%
Vis heeft opvallend verlaagde activiteit		Niets	50%
Er ontbreekt een kieuwdeksel		Niets	62%
Vis schoolt niet mee		Niets	83%
Vis heeft gewijzigde pigmentatie		Niets	58%

5.3 VANGEN VAN DE VISSEN

Zebravissen worden het vaakst overgezet door de aquaria waartussen de vissen moeten verplaatst worden naast elkaar te zetten. Dit minimaliseert de tijd dat de vissen aan de lucht blootgesteld worden. Een tweede overzetmethode is het overgieten van de vissen van het ene naar het andere aquarium. Dit wordt vooral toegepast bij het kuisen van de aquaria, waarbij de volledige groep vissen van een vuile naar een propere tank wordt verplaatst. Vissen worden soms ook verplaatst door ze te vangen in een net en met het net tot aan het nieuwe aquarium te lopen. Dit is vooral het geval wanneer aquaria moeilijk te verplaatsen zijn. Een iets minder gebruikte methode is dat de vissen eerst gevangen worden met een net, in een beker met water worden verplaatst, en zo in het nieuwe aquarium worden gegoten. Het onder water vangen van de vissen en verplaatsen met een beker, waarbij geen blootstelling aan de lucht voorkomt, wordt amper gedaan.

5.4 VERRIJKING

Het zicht op andere vissen als een vorm van visuele verrijking is de meest voorkomende vorm van verrijking. In alle faciliteiten kunnen adulten elkaar zien, en vaak geldt dat ook voor de larvale stadia (7/9).
Als tweede meest voorkomende vorm van verrijking volgt het structureel verrijken van aquaria met plastic planten. Vier van de negen faciliteiten geven aan dit te gebruiken bij adulten, drie tijdens de embryoproductie en één tijdens de larvale stadia. Eén faciliteit geeft aan plastic planten te gebruiken bij juvenielen van lijnen die een moeilijke opgroei kennen. Deze kunnen dienen als niche. Er wordt door respondenten aangegeven dat plastic planten in de broedtanks een positief effect hebben op het bevruchtingspercentage van de eitjes. Ook beweren respondenten dat een structuur van groene plastic draad (als een soort kunstgras) een gunstig effect heeft wanneer het gebruikt wordt bij broedkoppels.
Ook echte planten worden soms gebruikt, al is dit maar in twee van de negen faciliteiten het geval voor adulten. Dit gebeurt dan vooral in grote aquaria (60 L), waarin ook de bodem bedekt is met grind en slakken in het aquarium zitten die de algen opeten. Sporadisch worden ook aquaria met larvale stadia (1/9) of voor embryoproductie (1/9) verrijkt met echte planten.
Andere structurele verrijkingen zoals plastic buizen die kunnen dienen als schuilplaats, worden in twee faciliteiten aan adulten gepresenteerd, en in één faciliteit aan de larvale stadia. De opmerking dat deze structuren snel vuil worden, komt geregeld terug. Een faciliteit probeerde bodemstickers uit, maar oordeelde dat de vissen hier weinig op reageerden.

5.5 PARAMETERS WELZIJN

Volgens de respondenten is de minimale groepsgrootte om een school te vormen 8.3±3.4 vissen.
De gemiddelde geslachtsratio varieert sterkt tussen faciliteiten. In drie van de negen faciliteiten zijn er meer vrouwtjes dan mannetjes, in twee faciliteiten is het ongeveer gelijk, en in drie faciliteiten zijn er meer mannetjes dan vrouwtjes. Één faciliteit beantwoordde deze vraag niet.
Bepaalde faciliteiten kiezen ervoor de geslachten te scheiden vanaf het moment dat dit zichtbaar wordt. Deze gescheiden huisvesting zou de embryoproductie verbeteren. Volgens de respondenten zouden er geen problemen, zoals eiretentie, optreden wanneer deze vissen wekenlang gescheiden blijven zonder kans om eitjes af te zetten. Na een dergelijke pauze is het wel mogelijk dat vissen een tijdje moeten wennen aan reproductie en minder produceren, tot ze weer op het normale productieniveau komen.

Wanneer vissen in quarantaine moeten, zijn er verschillende standpunten over het gebruik van een *buddy*. Sommige faciliteiten voorzien altijd een gezelschapsvis. Anderen laten dit enkel toe als de quarantaine langdurig is, en op voorwaarde dat de gezelschapsvis duidelijk te onderscheiden is. Er zijn faciliteiten die geen gezelschapsvis toestaan wanneer de quarantaine door ziekte van de vis moet opgelegd worden. Tenslotte zijn er faciliteiten die vissen altijd alleen in quarantaine zetten.

5.6 ANESTHESIE EN EUTHANASIE

Voor verdoving wordt in alle faciliteiten MS-222 (Tricaïne) gebruikt. Gebruikers geven aan vissen voor de volgende handelingen te verdoven:
- Wegen en meten (drie faciliteiten)
- Afstrijken (drie faciliteiten)
- Vinclip (twee faciliteiten)
- Bloedafname (twee faciliteiten)
- Invasieve ingrepen (vier faciliteiten)

Euthanasie van juveniele en adulte vissen, gebeurt dit op volgende manieren:
- Overdosis MS-222 (één faciliteit)
- Overdosis ander (drie faciliteiten, één met benzocaïne, twee niet gespecifieerd)
- Overdosis MS-222 + decapitatie (twee faciliteiten)
- Overdosis MS-222 + decapitatie + *snap freeze* (één faciliteit)
- Overdosis MS-222 <u>of</u> ijswater (één faciliteit)
- Overdosis MS-222 <u>of</u> ijswater + decapitatie + destructie hersenen (één faciliteit)

6 GEZONDHEID EN HYGIËNE

6.1 GEZONDHEIDSANALYSE

Alle faciliteiten houden gezondheidscontroles. Het merendeel van de faciliteiten (6/9) laat enkel een gezondheidsanalyse uitvoeren bij problemen. De overige faciliteiten (3/9) doen dit standaard éénmaal per jaar. Het aantal vissen dat opgestuurd wordt ter controle is gemiddeld 8.1 ± 9.9. Dit zijn vooral adulten, behalve één faciliteit dat enkel embryo's laat onderzoeken. Juveniele stadia worden enkel gescreend wanneer er zich in deze leeftijdscategorie problemen voordoen. Twee van de negen faciliteiten geven aan sentinelvissen te gebruiken. Dit zijn in sommige gevallen vissen die in de vergaarbak van het (half)-automatische systeem opgroeiden.

Er worden geen probiotica gebruikt in de door ons bevraagde faciliteiten.

6.2 SCHOONMAAK

6.2.1 (Half)-automatische faciliteiten

In (half)-automatische faciliteiten worden de tanks en deksels eenmaal per maand tot eenmaal per week gewassen. Dit wordt in alle faciliteiten, behalve één, regelmatig tot vaak aangevuld met beperktere schoonmaakroutines zoals het afsiffoneren van het bezonken vuil op de bodem van de tanks. Het wassen zelf gebeurt met water bij temperaturen van <60°C (vijf faciliteiten), op 60°C (vier faciliteiten) en sporadisch door de tanks te autoclaveren, bovenop het wassen bij 60°C (één faciliteit).

Sommige faciliteiten kijken op het zicht of tanks gekuist moeten worden. Zo kan er rekening gehouden worden met algengroei die sneller optreedt in tanks aan de bovenkant en zijkant van het systeem. De hevels van (half)-automatische faciliteiten worden in de helft van de faciliteiten gesteriliseerd/geautoclaveerd. Anderen geven aan de hevels te wassen wanneer het water van de tank te hoog staat en hierbij geen zeep of ontsmetting te gebruiken. Visnetjes, tussenschotten en broedaquaria worden in enkele faciliteiten sporadisch ontsmet met bleekwater.

6.2.2 Faciliteiten met aquaria

In faciliteiten met aquaria worden de aquaria meestal deels ververst, met een frequentie van 1x per week voor kleine aquaria tot 1x per maand voor grotere aquaria. Één van de faciliteiten gebruikt slakken om de aquaria proper te houden.

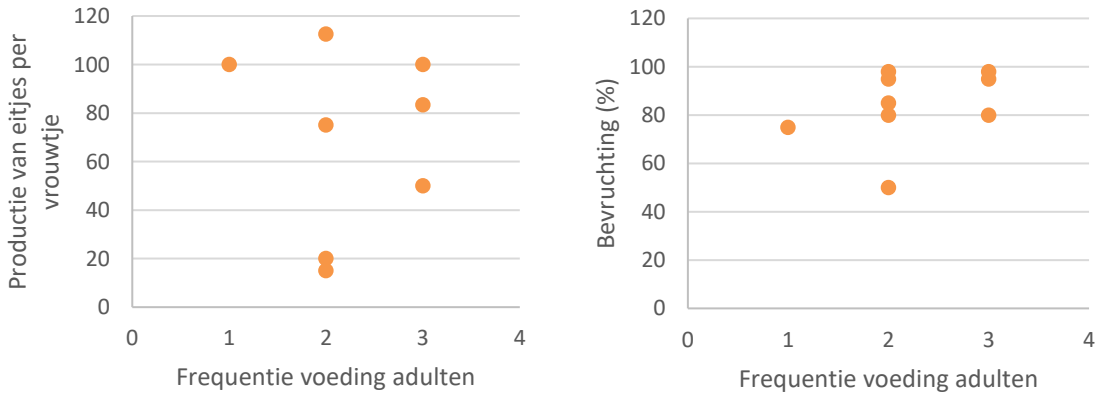
7 FECUNDITEIT

Broedparen worden in zes van de acht faciliteiten met een net naar het broedaquarium verplaatst. In twee faciliteiten worden de vissen soms ook overgegoten naar de broedaquaria, om blootstelling aan de lucht te vermijden.

De samenstelling van de kweekgroepen is zeer verschillend. Drie van de negen faciliteiten maken kweekgroepen waar vrouwtjes in de minderheid zijn (1V-2M of 2V-3M). Er wordt aangegeven dat dit experimenteel bepaald werd in hun faciliteit en dat het zorgt voor minder uitputting bij de mannetjes. In twee faciliteiten worden de kweekgroepen met gelijke aantallen mannetjes en vrouwtjes gevormd (2V+2M, 6V+6M, 25V+25M). De andere vier faciliteiten kiezen voor een meerderheid aan vrouwtjes (6V+4M, 5V+2M, 2V+1M). Argumenten voor deze keuze zijn dat mannetjes territoriaal gedrag zouden kunnen vertonen en de vrouwtjes minder opgejaagd zouden worden wanneer er minder mannetjes zijn. Ook hier wordt aangegeven dat het empirisch bepaald is door de faciliteit.

Vrouwtjes produceren gemiddeld 67 ± 36 eitjes per vis. Daarvan wordt gemiddeld 80.6 ± 14.5 % bevrucht. Figuur 4 toont geen duidelijk verband tussen de voedingsfrequentie per dag en de productie (Figuur 4A) of bevruchting van eitjes (Figuur 4B). De gemiddelde overleving na 14 dagen is 70.8 ± 23.7% van het aantal geproduceerde eitjes.

Na de embryoproductie kunnen vrouwtjes gedurende één week rusten. In één faciliteit is dat vijf dagen.



Figuur 4 A) Productie van eitjes per vrouwtje bij verschillende voederfrequenties per dag. B) Bevruchtingspercentage van eitjes bij verschillende voederfrequenties per dag.

8 PERSONEEL

8.1 TAAKVERDELING

Faciliteiten hebben gemiddeld één tot twee dierenverzorgers, die gemiddeld 80% van het takenpakket van de verzorging op zich nemen. Taken (kunnen) bestaan uit: het onderhoud van de systemen en het lokaal, voeding, reproductie, verzamelen van embryo's en opgroei van jonge vissen, observatie voor de welzijnsanalyse, algemene monitoring, schoonmaak en weekenddienst.

Gemiddeld zijn er per faciliteit twee tot drie onderzoekers, die het volgende takenpakket kunnen uitvoeren: onderhoud faciliteit, voeding en verzorging als dierenverzorger het te druk heeft (back-up verzorging), reproductie en opgroei, observatie voor welzijnsanalyse, manipulaties (vinclips, operaties, …), experimenten, management kweek (planning), weekenddienst, aansturen dierenverzorgers, en advies bij problemen.

Wanneer externen de faciliteit betreden, kan dit zijn om volgende taken uit te voeren: reproductie, observatie, schoonmaak + voeding, experimenten en inspectie van de vissen door interne en externe inspectiediensten.

8.2 HYGIËNISCHE MAATREGELEN

Voor het betreden van de visfaciliteit worden de handen gewassen (8/9). Één faciliteit geeft ook aan de handen te laten ontsmetten. In vier van de negen faciliteiten moet verplicht een labojas gedragen worden. Handschoenen worden in vijf van de negen faciliteiten vermeld als verplichte maatregel. Schoenkapjes worden slechts in één faciliteit gebruikt. Een andere faciliteit gaf aan deze maatregel net afgevoerd te hebben voor de veiligheid (uitschuiven op natte vloer).

9 VERBETERINGEN

De respondenten konden m.b.v. een waardeschaal aangeven welke parameters in de zebravisfaciliteiten beter gestandaardiseerd moeten worden. Tabel 8 toont de sortering volgens aflopende noodzaak aan standaardisatie.

Tabel 8: Aflopende Rangschikking van parameters die volgens de gebruikers beter gestandaardiseerd zouden moeten worden.

Sortering	Parameter
1	Omgevingsparameters faciliteit (licht, geluid, …)
2	Verrijking
3	Reproductie
4	Densiteit, Hygiëne, Gezondheidsanalyse
5	Observatie van afwijkend dierenwelzijn
6	Waterparameters, Voeding

APPENDIX 2: SCORETABEL DAGELIJKSE WELZIJNSCONTROLE

Volgens de Europese richtlijn moeten proefdieren ten minste éénmaal per dag door een competent persoon gecontroleerd worden om gewonde, zieke of dode dieren te detecteren. De hieronder beschreven scoretabel kan gebruikt worden als basis voor het uitwerken van een systeem voor de goede werking en opvolging van de dagelijkse welzijnscontrole. Deze methode werd gebaseerd op verschillende andere systemen (Humane-Endpoints , Martins et al. 2016b, Clark et al. 2018). Dit voorbeeld dient vooral voor de opvolging van het welzijn van wild-type zebravissen die op dat moment niet gebruikt worden in een experiment. Het houdt namelijk geen rekening met eigenschappen van verschillende (transgene of mutante) zebravislijnen en is ook niet van toepassing op vissen die deel uitmaken van een experiment waar eventuele morfologische of gedragsmatige wijzigingen verwacht worden.

Wanneer tijdens de dagelijkse welzijnscontrole een vis wordt geobserveerd die zich niet normaal gedraagt of morfologische abnormaliteiten vertoont, wordt de tank met vissen uit het rek gehaald (indien van toepassing). De vis wordt dan van naderbij bekeken en gescoord op alle categorieën die in de scoretabel vermeld worden. Per vis wordt een rij in het overzichtsblad ingevuld. Er kan worden aangeduid welke observaties er werden gedaan en welke acties hierop gevolgd zijn of moeten volgen. De opvolgingskolom maakt duidelijk welke vissen tijdens de volgende welzijnscontroles in het bijzonder opgevolgd moeten worden.

De scoretabel voor zowel morfologische (Tabel A2.1), als gedragsmatige kenmerken (Tabel A2.2) is best op papier aanwezig in de faciliteit, zodat deze gemakkelijk geconsulteerd kan worden tijdens de welzijnscontrole. Ook de acties en het overzichtsblad worden best op een duidelijk zichtbare plaats opgehangen.

Het is aangeraden om de scoretabel in het Engels beschikbaar te maken (Tabel A2.3 en Tabel A2.4) en ook het overzichtsblad in het Engels in te vullen, zodat de dagelijkse welzijnscontrole door iedereen die in de faciliteit werkt kan worden uitgevoerd, ook internationale studenten en bezoekers.

Tabel A2.1: Scoretabel voor morfologische kenmerken (NL)

	0	1	2	3
Vorm (BCS*)	BCS3	BCS2, BCS4	BCS4 (door eiretentie)	BCS1, BCS5
Vinnen		Verkorte vin(nen)		Geen staartvin
Kieuwen	Normaal	1 operculum ontbreekt of staat open		2 ontbrekende opercula, gezwollen kieuwen
Schubben/huid	Normale pigmentatie (verminderd in oudere vissen)	Huidtumor zonder bloeding, kleine oppervlakkige wond, lichte depigmentatie	Rode vlekken	Openstaande schubben, huidlesie, abnormaal slijm, volledige depigmentatie, tumor, zuurstofbellen onder huid
Ogen		Blind aan 1 zijde		Uitpuilend oog, volledig blind
Hoofd		Onderontwikkelde boven- of onderkaak		Abnormaal klein hoofd, tumoren
Skelet	Normaal (of kleine kromming bij oude vissen)	Kleine kromming met klein effect op zwemgedrag	Kromming met effect op zwem- en eetgedrag	Volledige scoliose rug en zeer abnormaal gedrag

*BCS: Body condition score (Figuur A1)

Tabel A2.2: Scoretabel voor gedragskenmerken (NL)

	0	1	2	3
Ademhaling	Normaal	hapt aan oppervlakte of watertoevoer	Trage, lethargische of zeer snelle ademhaling (OBR*)	Zeer trage OBR* (of bijna geen)
Voedselinname	Normaal	Geen foerageergedrag (1 dag)	Geen foerageergedrag (2 dagen)	Geen foerageergedrag (≥ 3 dagen)
Activiteit	Actief, met perioden van rust, zwemt in gehele waterkolom	Overmatig actief, geëxciteerd of net hypoactief, ontsnappingsgedrag of verstoppen	Reageert niet op externe stimuli (vb. voeding), zwemt enkel boven of onder, wrijft zichzelf tegen tankoppervlak (jeuk)	Ongecontroleerd zwemgedrag (vb. kurkentrekker)
Sociale interactie	Schoolt mee	Agressie, tekenen van stress	Afzondering van de school	
Evenwicht	Normaal	Occasioneel verlies van evenwicht	Frequent verlies van evenwicht	Volledig verlies van evenwicht
Drijfvermogen	Normaal	Vis zwemt occasioneel omhoog of omlaag om bij te sturen	Vis zwemt frequent omhoog of omlaag om bij te sturen	Vis ligt op de bodem van de tank of drijft aan wateroppervlak

*OBR Opercular beat rate: snelheid van het bewegen van de kieuwdeksel

Table A2.3: Score table for morphological features (ENG)

	0	1	2	3
Shape (BCS*)	BCS3	BCS2, BCS4	BCS4 (caused by egg retention)	BCS1, BCS5
Fins		Short fin(s)		No tail fin
Gills	Normal	1 operculum missing or open		2 missing opercula, swollen gills
Scales/skin	Normal pigmentation (decreased in older fish)	Skin tumour without bleeding, small superficial lesion, light depigmentation	Red spots	Open scales, skin lesions, abnormal mucus, depigmentation, tumour, gas bubbles under skin
Eyes		Blind on 1 side		Pop-eye, fully blind
Head		Underdeveloped upper or lower jaw		Abnormally small head, tumours
Skeleton	Normal (or limited curvature for older fish)	Small curvature with limited effect on swimming behaviour	Curvature with effect on swimming and feeding behaviour	Scoliosis and aberrant behaviour

*BCS: Body condition score, Figure A1

Table A2.4: Score table for behavioural features (ENG)

	0	1	2	3
Breathing	Normal	Gulping at the surface or water supply	Slow, lethargic or very fast breathing (OBR*)	Very slow OBR* (or almost absent)
Food intake	Normal	No foraging behaviour (1 day)	No foraging behaviour (2 days)	No foraging behaviour (≥ 3 days)
Activity	Active, with periods of resting, occupying entire water column	Overly active, agitated or hypoactive, escape behaviour or hiding	Not responding to stimuli (e.g., food), only swimming in top or bottom part, rubbing against tank surface	Uncontrolled swimming behaviour (e.g., corkscrew)
Social interaction	Schooling	Aggression, signs of stress	Isolation from school	
Equilibrium	Normal	Occasional loss of equilibrium	Frequent loss of equilibrium	Complete loss of equilibrium
Buoyancy	Normal	Occasionally swimming up or downwards to regulate buoyancy	Frequently swimming up or downwards to regulate buoyancy	Lying on the bottom or floating at the water surface

*OBR Opercular beat rate: speed of the opercular movements

Actielijst gebruik makend van de totaalscore

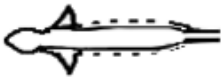
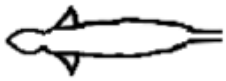
- **Score 0**: Geen pijn, stress of lijden

- **Score 1**: Lage ernst
  - Volg tijdens volgende dagen nauwgezet op
  - Gedrag: Pas densiteit aan (om isolatie, te hoge densiteit of dominantiehiërarchie aan te passen)
  - Wonden: Volg genezing op
  - Verminderde groei: Volg wekelijks op
  - Blindheid aan één oog is op zich geen probleem, als de vis hier geen last van heeft
    → let op de aanwezigheid van extra andere parameters (BCS, gedrag) om het welzijn te scoren
  - Zwellingen/tumoren: gebruik andere parameters om het welzijn te scoren

- **Score 2-3**: Gemiddelde ernst
  - Optimaliseer huisvesting
    - Optimaliseer voeding (meer/minder)
    - Optimaliseer densiteit (isoleer agressieve vissen)
  - Quarantaine in geval van afwijkingen aan de schubben/huid of plotse gewichtsafname (morfologie)
  - Quarantaine in geval van lethargische ademhaling en sterk verminderde voedselopname (gedrag)
  - Verbetering moet mogelijk zijn, en moet binnen de twee dagen (score 2) of binnen 24h (score 3) geobserveerd worden, anders moet de vis humaan gedood worden.
  - Verwittig projectleider of dierenarts
  - Als vis oud is (>1,5 jaar) en niet meer deelneemt aan kweekprogramma: humaan doden

- **Score ≥4**: Ernstig
  - Verwittig projectleider of dierenarts
  - Zo snel mogelijk overgaan tot humaan doden

Figuur A1: Body condition score

Adult Zebrafish BCS		
	Lateral View	Dorsal View
BCS 1: • Head larger than body (big head) • Lateral- concave ventral surface between head and abdomen (narrow abdomen) • Dorsal- body is more narrow than head and linear • **Fish is thin (emaciated)**		
BCS 2: • Head and body equal size • Lateral- flat ventral surface between head and abdomen • Dorsal- head and width of abdomen are equal • **Fish is underconditioned**		
BCS 3: • Body larger than head • Lateral- slight convex ventral surface • Dorsal- head is slight smaller to a fusiform body • **Fish is well-conditioned**		
BCS 4: • Body significantly larger than head • Lateral- body moderately convex ventral surface • Lateral- Symmetrical ventral surface • Dorsal- head visually smaller to a moderately distended abdomen • **Fish is over-conditioned**		
BCS 5: • Body significantly larger than head • Lateral- body significantly convex ventral surface • Lateral- Symmetrical or asymmetrical ventral surface • Dorsal- head visually smaller to a significantly distended abdomen • **Fish is obese (large)**		

Uit: Clark, T. S., L. M. Pandolfo, C. M. Marshall, A. K. Mitra, and J. M. Schech. 2018. Body condition scoring for adult zebrafish (Danio rerio). Journal of the American Association for Laboratory Animal Science 57:698-702

Overzichtsblad

- Datum observatie
- Naam observator
- Tank vis + geslacht
    - Het geslacht kan helpen de vis sneller te herkennen wanneer opvolging tijdens de volgende dagen nodig is
- Observatie(s)
    - In deze kolom worden alle observaties genoteerd, zo veel mogelijk gebruikmakend van de terminologie die in de scoresheet gebruikt wordt.
    - De individuele scores van elke observatie kunnen hier ook aangegeven worden
- Totaalscore
    - De som van de individuele scores, die de actie bepalen die moet genomen worden
- Actie/Opmerking
    - Actie die op basis van de totaalscore moet genomen worden
    - Onzekerheden of observaties die niet in de scoresheet passen kunnen hier ook vermeld worden
- Opvolging
    - De lege vakken in deze kolom tonen de gebruikers in één oogopslag welke vissen van nabij opgevolgd moeten worden
    - Wanneer het probleem van de vis verholpen is, of wanneer de vis humaan gedood werd, wordt "OK" + datum in de kolom ingevuld.

Voorbeeld overzichtsblad

Date	Name	Tank (+ sex)	Observation (+ score)	Total score	Action Remarks	Follow-up (+ date)
26/10	Anna	3C3 M	Continuously tries to swim down (3)	3	If not improved in 1 day -> humane killing	Ok, got better (27/10)
28/10	Louis	2B6 M	Body condition score 2 (1)	1	Follow up	See below (30/10)
29/10	Eva	1D8 V	Frequent loss of equilibrium (2)	2	If not improved in 2 days --> humane killing	Humane killing (31/10)
30/10	Anna	2B6 M	Body condition score 1 (3)	3	Worsened compared to 28/10 --> Humane killing	Humane killing (30/10)
31/10	Yang	3A5 M	Blind on one side (1), pop-eye (3), aggression (1)	5	Humane killing	Humane killing (31/10)

Referenties scoretabellen

Clark, T. S., L. M. Pandolfo, C. M. Marshall, A. K. Mitra, and J. M. Schech. 2018. Body condition scoring for adult zebrafish (Danio rerio). Journal of the American Association for Laboratory Animal Science **57**:698-702.

Humane-Endpoints. Score sheets for zebrafish.

Martins, T., A. M. Valentim, N. Pereira, and L. M. Antunes. 2016. Anaesthesia and analgesia in laboratory adult zebrafish: a question of refinement. Laboratory animals **50**:476-488.