

Aan de staatssecretaris van
Infrastructuur en Waterstaat
drs. V.L.W.A. Heijnen
Postbus 20901
2500 EX Den Haag

DATUM 22 april 2022
KENMERK CGM/220422-01
ONDERWERP Advies huisvesting gg-zebravissen

Geachte mevrouw Heijnen,

Naar aanleiding van een adviesvraag betreffende het ATV verzoek IG 22-057_atv-000, getiteld 'Huisvesting van genetisch gemodificeerde zebravissen; ontheffing van werkvoorschrift 9.1.4.1.2.2.f van de Regeling GGO 2013, ingediend door de Universiteit Leiden, deelt de COGEM u het volgende mee.

Samenvatting:

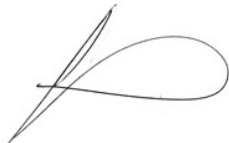
De COGEM is gevraagd om te adviseren over een ontheffingsverzoek bij werkzaamheden met genetisch gemodificeerde zebravissen. Dit ontheffingsverzoek betreft het verbod op gezamenlijke huisvesting van mannelijke en vrouwelijke dieren, omdat daardoor onbeoogde paring kan plaatsvinden. De aanvrager wenst de vissen gezamenlijk te huisvesten vanuit het oogpunt van dierenwelzijn en omdat de maatregel paring ook niet kan voorkomen,

Zebravissen zijn sociale dieren die van nature in scholen leven. Zebravismvrouwtjes produceren eieren en hebben de directe aanwezigheid van een mannetje nodig om deze te kunnen lozen. Bevruchting vindt na de lozing plaats. Als de vrouwtjes hun eieren niet regelmatig kunnen lozen, verstopt en ontsteekt de eileider wat de dood tot gevolg kan hebben. Het moment dat het geslacht van zebravissen bepaald kan worden, valt samen met het moment waarop de vissen geslachtsrijp zijn. Hierdoor kan er voor het scheiden van mannelijke en vrouwelijke vissen al paring hebben plaatsgevonden. De meeste geloosde eieren worden door de zebravissen direct opgegeten. Resterende eieren die via het afvalwater worden afgevoerd, worden door een filtersysteem afgevangen.

Al het bovenstaande in overweging nemende, kan de COGEM op basis van de aangeleverde onderbouwing van de aanvrager instemmen met de vervangende voorschriften voor activiteiten met gg-zebravissen.

De door de COGEM gehanteerde overwegingen en het hieruit voortvloeiende advies treft u hierbij aan als bijlage.

Hoogachtend,



Prof. dr. ing. Sybe Schaap
Voorzitter COGEM

c.c.

- Drs. Y de Keulenaar, Hoofd Bureau ggo
- Ministerie van IenW, Directie Omgevingsveiligheid en milieurisico's, DG Milieu en Internationaal

Met het oog op eventuele belangenverstrengeling, is COGEM lid prof. dr. J. Memelink niet betrokken geweest bij de besluitvorming over dit advies.

Dit advies is mede tot stand gekomen met inbreng van dr. J.R. Metz van de Radboud Universiteit.

Gezamenlijke huisvesting van mannelijke en vrouwelijke genetisch gemodificeerde zebravissen

COGEM advies CGM/220422-01

1. Inleiding

De COGEM is gevraagd te adviseren over een ATV verzoek van de Universiteit Leiden (IG 22-057) betreffende de ontheffing van het werkvoorschrift 9.1.4.1.2.2.f van Bijlage 9 van de Regeling genetisch gemodificeerde organismen (Regeling ggo).¹ Dit werkvoorschrift luidt “Het houden van dieren in het verblijf geschiedt op zodanige wijze dat geen paring kan plaatsvinden, tenzij deze door de gebruiker wordt beoogd”. Het ontheffingsverzoek van de aanvrager betreft activiteiten met genetisch gemodificeerde zebravissen die zijn gehuisvest in een als D-I verblijf ingerichte aquariumruimte. De aanvrager geeft aan dat hij niet aan het werkvoorschrift 9.1.4.1.2.2.f kan voldoen, en verzoekt zebravismannetjes en -vrouwtjes samen in een tank te huisvesten, waardoor paring kan plaatsvinden en zebraviseitjes en -embryo's ontstaan.

2. Zebravissen (*Danio rerio*)

De zebravis *Danio rerio* (synoniem *Brachydanio rerio*) is een zoetwatervissoort die behoort tot de familie, *Cyprinidae* (eigenlijke karpers), order *Cypriniformes* (karperachtigen).² De soort is aan het begin van de 19^e eeuw in India voor het eerst beschreven.³ Zebravissen komen oorspronkelijk voor in Zuid-Azië in vijvers, sloten en andere zachtstromende tot stilstaande wateren zoals rijstvelden, vanwaar de zebravis *Danio rerio* ook zijn naam ontleent (*Danio* stamt af van het Bengaalse ‘*dhani*’, wat ‘van het rijstveld’ betekent).^{3,4,5} De temperaturen in deze aquatische leefgebieden variëren van tot onder de 10°C tot aan 40°C. De optimale temperatuur voor het huisvesten van zebravissen is ongeveer 28,5°C.⁵ Zebravissen verblijven van nature in scholen en isolement veroorzaakt stress en verhindert het leervermogen.^{3,6}

2.1 Gebrek aan paring leidt tot ontsteking van de eileider, onvruchtbaarheid, en mogelijk de dood.

Zebravissen zijn een van de belangrijkste modelorganismen voor onderzoek naar gewervelden, met name voor ontwikkelingsbiologie en genetisch onderzoek. Genetisch gemodificeerde zebravissen worden veelvuldig gebruikt voor onderzoek naar de functie van genen en genetische afwijkingen. Voor het continueren van de gebruikte lijnen bij het onderzoek, is reproductie noodzakelijk.⁵ Aanwezigheid van mannelijke zebravissen stimuleert ovulatie bij vrouwelijke zebravissen.⁵ De eieren zijn gemiddeld ongeveer 0,7 mm (700 µm) in diameter na fertilisatie.^{3,7} De directe nabijheid van een mannetje is noodzakelijk voor het vrouwtje om de eieren te kunnen lozen.^{3,5,8} Per keer is een enkel vrouwtje in staat om honderden eieren te lozen.^{3,8} Bevruchting van de eitjes vindt extern plaats, na de lozing. De (bevruchte) eieren zakken naar de bodem en de embryo's komen bij een watertemperatuur van 28,5°C 48 tot 72 uur na fertilisatie uit de eieren, waarna de larven zich aan harde oppervlakten hechten en zich verder ontwikkelen.⁷ De lengte van een volwassen zebravis is zelden groter dan 40mm.³

Onder laboratoriumomstandigheden zijn de larven tussen 2,5 en 3 maanden geslachtsrijp. Het is niet geheel duidelijk welke factoren het geslacht van de larven bepaalt. Zebravissen hebben geen duidelijke

geslachtschromosomen, waardoor geslachtsbepaling op basis van fenotypische kenmerken zoals lichaamsvorm en kleur plaatsvindt.⁸ De ontwikkeling van de secundaire geslachtskenmerken is omstreeks 3 maanden voltooid. Het bepalen van het geslacht is bij zebravissen niet eenvoudig of altijd foutloos vast te stellen, aangezien volwassen zebravissen geen sterke geslachtsdimorfie kennen.^{3,8}

Onder natuurlijke omstandigheden is de reproductie bij zebravissen meer seizoensgebonden en vindt voornamelijk plaats onder specifieke omstandigheden. Het Indiase subcontinent, waar de zebravis oorspronkelijk vandaan komt, heeft een moessonklimaat. Het paren en lozen van de eieren volgt een licht-donker cyclus, en vindt plaats vlak voor het begin van de moesson, direct na blootstelling aan licht na een periode van duisternis.³ Onder laboratoriumomstandigheden worden deze condities nagebootst wanneer paring wordt beoogd, en kan de reproductie het hele jaar door plaatsvinden.¹⁰

Als paring niet regelmatig genoeg plaatsvindt, worden de eieren geresorbeerd. Vrouwelijke zebravissen die voor een langere periode niet worden blootgesteld aan mannelijke zebravissen, ontwikkelen hierdoor een prop van necrotische, samengeklonterde eieren, wat de eileider blokkeert en kan ontsteken, en lozing van de eieren onmogelijk maakt.³ Dit kan de dood voor het vrouwtje tot gevolg hebben.³ Ook is aangetoond dat paring bij zebravissen de 'alarmreactie' onderdrukt en mogelijk angst zou kunnen verminderen.⁹ De optimale paringsfrequentie bedraagt ongeveer elke 10 dagen.^{8,10} Een gezamenlijke werkgroep voor de huisvesting van zebravissen met leden van de 'European Society for Fish Models in Biology and Medicine' (EUFishBioMed) en de 'European Laboratory Animal Science Associations' (FELASA) hebben richtlijnen opgesteld waarin wordt aangeraden volwassen zebravissen in gemengde geslachtsgroepen te huisvesten, ook als deze niet voor embryoproductie worden gebruikt. Hierdoor kan het natuurlijk broedgedrag worden uitgeoefend en wordt ontsteking van de eileider voorkomen.⁵

3. Voorstel tot inschaling

In onderhavige aanvraag is de aanvrager op twee locaties voornemens werkzaamheden uit te voeren waarbij gg-zebravissen in groepen van gemengd geslacht worden gehuisvest. De aanvrager wil hiervoor ontheffing voor het werkvoorschrift 9.1.4.1.2.2.f van Bijlage 9 van de Regeling ggo aanvragen.¹ De aanvrager onderbouwt het ontheffingsverzoek door aan te geven dat het in het kader van dierenwelzijn niet wenselijk is zebravismannetjes en -vrouwtjes apart te huisvesten: zebravissen leven van nature in scholen; vrouwtjes hebben voor het lozen van de eieren de directe nabijheid van een mannetje nodig, en het niet regulier lozen van de eieren brengt ongerief voor het vrouwtje met mogelijk de dood tot gevolg. Bovendien stelt de aanvrager dat het niet praktisch uitvoerbaar is om de mannetjes en vrouwtjes apart te huisvesten, omdat de geslachtsbepaling pas kan plaatsvinden wanneer de vissen geslachtsrijp zijn en er meestal al paring heeft plaatsgevonden. Er wordt voorgesteld de werkzaamheden uit te voeren onder toepassing van de volgende voorschriften:

- Het houden van de dieren in het verblijf geschiedt op zodanige wijze dat er paring kan plaatsvinden;
- Het afvalwater uit de aquaria wordt gefilterd met een gevalideerde methode, waarbij eventuele eitjes dan wel embryo's worden afgevangen, alvorens het wordt afgevoerd;

- De filters of een gelijkwaardige voorziening zijn zodanig geconstrueerd dat de verspreiding van genetisch gemodificeerde organismen langs deze weg wordt tegengegaan.

3.1 Verspreidingsmaatregelen van de aanvrager

Door de aanvrager wordt er op twee verschillende locaties verschillende maatregelen genomen die beiden als doel hebben verspreiding van zebra-visembryo's en -eieren in het milieu te voorkomen.

3.1.1 Verspreidingsmaatregelen op locatie 1

Het water dat door de vistanks loopt, wordt gerecirculeerd en deels afgevoerd. Het afgevoerde water wordt door een drumfilter gehaald (een mechanisch, zelfreinigend filter) dat zich in een grote bak bevindt waarbij vuildeeltjes (waaronder ongewenste embryo's) neerslaan. Door de drumfilter (het filterdoek) worden vuildeeltjes groter dan 40 µm gescheiden van het water. Het gefilterde water stroomt langs een UV lamp, voordat het wordt hergebruikt.

Het gecontamineerde water met de door de drumfilter opgevangen vuildeeltjes wordt, als de bak vol is, geloosd op een afvalwaterafvoer. Dit afvalwater komt in een bak met een uitzakfilter (UltraSieve MIDI zeefilter met 300 µm RVS zeefblad) terecht, waarna het water zich naar een bak met filterwatten begeeft alvorens het water in het riool geloosd wordt. De aanvrager stelt dat de zebra-viseieren en -embryo's groter zijn dan 500 µm en hierdoor door het UltraSieve MIDI zeefilter worden tegengehouden. Dit filter wordt wekelijks gereinigd in een bak met desinfectans, en het filtermateriaal en watten-filter worden weggegooid in een ggo-afvalbak.

3.1.2 Verspreidingsmaatregelen op locatie 2

Het water in dit systeem wordt gerecirculeerd op een wijze die niet is beschreven in de aanvraag. De aanvrager stelt dat het vuile water na filtering in bakken in een omgekeerde Y buis met filter terechtkomt, en dat al het afvalwater door het filter gaat voordat het op het riool wordt geloosd. Het filter betreft een RVS zeef met een filtermaas van 0,01 mm (10 µm), welke volgens de aanvrager veel fijner is dan de grootte van een zebra-visei of -embryo. Het filter wordt wekelijks gereinigd in een bak met desinfectans en het filtermateriaal wordt weggegooid in een ggo-afvalbak.

4. Overweging en advies

De COGEM is gevraagd te adviseren over de ontheffing van werkvoorschrift 9.1.4.1.2.2.f van de Regeling ggo¹. Hierbij is de COGEM gevraagd of zij op basis van de aangeleverde argumenten van de aanvrager en het dierenwelzijn kan instemmen met de vervangende voorschriften, zoals genoemd in sectie 3, voor activiteiten met gg-zebravissen.

Zebravissen zijn sociale dieren die van nature in scholen leven.^{3,5} Vrouwelijke zebravissen produceren eieren die ze alleen kunnen lozen in de directe nabijheid van mannelijke zebravissen, waarbij ook bevruchting van de eieren plaats kan vinden.^{3,5,8,10} Het niet lozen van de eieren veroorzaakt een prop van necrotische, samengeklonterde eieren in de eileider van het vrouwtje, waardoor verdere lozing onmogelijk wordt. Dit kan leiden tot een ontsteking van de eileider en mogelijk de dood van het vrouwtje.³

Het moment waarop geslachtsbepaling bij zebravissen mogelijk is, valt ongeveer samen met het moment waarop de vissen geslachtsrijp zijn. Hierdoor heeft er mogelijk al paring plaatsgevonden wanneer de mannetjes en vrouwtjes van elkaar gescheiden worden. Wegens het ontbreken van duidelijke secundaire geslachtskenmerken, geschiedt het onderscheiden van zebravismannetjes en -vrouwtjes niet foutloos.⁵ Als gevolg garandeert het gescheiden huisvesten van de geïdentificeerde mannetjes en vrouwtjes mogelijk niet dat er geen paring plaatsvindt.

Het bovenstaande in overweging nemende, is de COGEM van oordeel dat het gescheiden huisvesten van zebravismannetjes en -vrouwtjes gepaard gaat met praktische uitdagingen, de lozing en bevruchting van eieren niet geheel voorkomt, en ongerief voor de zebravismannetjes met zich meebrengt.

In het geval er paring optreedt, wordt een groot deel van de (bevruchte) eieren door de zebravissen opgegeten, wanneer er geen maatregelen worden genomen om dit te voorkomen.^{8,10} Om te voorkomen dat resterende eieren of embryo's via het afvalwater in het milieu terecht komen, kunnen er filters worden gebruikt. De aanvrager geeft aan dat het afvalwater door een UltraSieve MIDI zeefilter met 300 µm RVS zeefblad of een RVS zeef met een filtermaas van 0,01 mm (10 µm) wordt gehaald alvorens het water in het riool terecht komt. Zebraviseieren en -embryo's zijn groter dan 500µm in diameter.⁷ De COGEM acht de kans verwaarloosbaar klein dat zebraviseieren en -embryo's door filters met deze maasgrootte in het rioolwater terechtkomen.

Zebravissen zijn gemakkelijk te houden en populaire aquariumvissen die al sinds het begin van de twintigste eeuw gehouden worden. Desondanks is er nooit melding geweest dat dieren in Nederlandse wateren zijn aangetroffen.¹¹ De COGEM acht de kans verwaarloosbaar klein dat zebravissen, hun eieren of embryo's, gezien de optimale watertemperatuur voor huisvesting van de zebravissen en de gemiddelde temperatuur in Nederland, voor een langere periode kunnen overleven in het Nederlandse rioolwater.

Samenvattend is de COGEM van oordeel dat de kans op uitsleep van gg-zebravissen verwaarloosbaar klein is, indien de voorgestelde maatregelen van de aanvrager gehanteerd worden. Tevens juicht zij het gebruik van vervangende maatregelen toe indien dit het dierwelzijn kan verbeteren. Zij stemt derhalve in met de vervangende voorschriften en is van oordeel dat de risico's voor mens en milieu van de voorgenomen werkzaamheden verwaarloosbaar klein zijn.

5. Signalerende opmerking

Werkvoorschrift 9.1.4.1.2.2.f van Bijlage 9 van de Regeling ggo¹ luidt: "Het houden van dieren in het verblijf geschiedt op zodanige wijze dat geen paring kan plaatsvinden, tenzij deze door de gebruiker wordt beoogd". Bij werkzaamheden met gg-zebravissen waarbij paring niet wordt beoogd, zouden de mannelijke en vrouwelijke zebravissen derhalve volgens dit werkschrift gescheiden gehuisvest moeten worden, zodat paring niet kan plaatsvinden. Het voorkomen van paring brengt echter lijden, stress en blijvende schade voor zebravismannetjes met zich mee. In de wet op de dierproeven artikel 1d, lid 3, staat: "Het fokken, de huisvesting en de verzorging van dieren en de in dierproeven gebruikte methoden worden verboden, zodat elke vorm van pijn, lijden, angst en blijvende schade die de dieren kunnen

ondervinden, wordt voorkomen of tot het minimum wordt beperkt.”¹² De COGEM signaleert dat in de onderhavige situatie de paring als beoogd kan worden beschouwd, omdat paring noodzakelijk is voor het dierenwelzijn en dat het werkvoorschrift 9.1.4.1.2.2.f van Bijlage 9 van de Regeling ggo in dergelijke situaties niet van toepassing is.

Referenties

1. Regeling ggo milieubeheer 2013. wetten.nl - Regeling - Regeling genetisch gemodificeerde organismen milieubeheer 2013 - BWBR0035072 (overheid.nl) (bezocht: 13 april 2022)
2. Barman RP (1991). A taxonomic revision of the Indo-Burmese species of *Danio rerio*. Rec. Zool. Surv. India, Occ. Paper. 137: 1-91
3. Spence S *et al.* (2008). The behaviour and ecology of the zebrafish, *Danio rerio*. Biol. Rev. 83: 13-34
4. Talwar PK & Jhingran AG (1991). Inland fishes of India and adjacent countries. Oxford & IBH Publishing, Calcutta
5. Aleström P *et al.* (2020). Zebrafish: housing and husbandry recommendations. Lab. Anim. 54: 213-224
6. Whiteley AR *et al.* (2011). Population genomics of wild and laboratory zebrafish (*Danio rerio*). Mol. Ecol. 20: 4259-5276
7. Kimmel CB *et al.* (1995). Stages of embryonic development of the zebrafish. Devel. Dyn. 203: 253-310
8. Nasiadka A & Clark MD (2012). Zebrafish breeding in the laboratory environment. ILAR J 53: 161-168
9. Diaz-Verdugo C *et al.* (2019). Mating suppresses alarm response in zebrafish. Curr. Biol. 29: 2541-2546
10. Westerfield, M. (2000). The zebrafish book. A guide for the laboratory use of zebrafish (*Danio rerio*). 4th ed., Univ. of Oregon Press, Eugene.
11. Waarneming.nl <https://waarneming.nl/species/717734/> (bezocht op: 15 april 2022)
12. Wet op de dierproeven 2021. <https://wetten.overheid.nl/BWBR0003081/2021-07-01> (bezocht: 14 april 2022)