

Inventaris Wob-verzoek W23-03		wordt verstrekt				weigeringsgronden				
nr.	document NTS 202216106	reeds openbaar	niet	geheel	deels	5.1, lid 1c	5.1, lid 2e	5.1, lid 2f	5.1, lid 2h	5.2, lid 1
1	Aanvraag projectvergunning, d.d. 08-06-2022				x		x		x	
2	Projectvoorstel bij aanvraag				x				x	
3	Bijlage dierproeven bij aanvraag				x	x			x	
4	NTS bij de aanvraag			x						
5	E-mail aan DEC om advies projectvergunning, d.d. 09-06-2022				x		x		x	
6	DEC-advies, d.d. 14-07-2022				x	x			x	
7	Projectvoorstel na DEC advies				x				x	
8	Bijlage dierproeven na DEC advies				x	x			x	
9	NTS na DEC advies			x						
10	Adviesnota aan CCD, d.d. 14-07-2022				x		x		x	x
11	E-mail CCD aan vergunninghouder over aanvraag, d.d. 15-07-2022				x		x		x	
12	Reactie na vragen CCD				x				x	
13	NTS na vragen CCD en definitieve versie			x	x					
14	Adviesnota aan CCD, d.d. 25-07-2022				x		x		x	x
15	Beschikking, d.d. 25-07-2022				x		x		x	
16	E-mail CCD aan DEC, terugkoppeling over aanvraag projectvergunning, d.d. 28-07-2022				x		x		x	

- Aanvraag  
Projectvergunning Dierproeven  
Administratieve gegevens
- U bent van plan om één of meerdere dierproeven uit te voeren.
  - Met dit formulier vraagt u een vergunning aan voor het project dat u wilt uitvoeren. Of u geeft aan wat u in het vergunde project wilt wijzigen.
  - Meer informatie over de voorwaarden vindt u op de website [www.zbo-ccd.nl](http://www.zbo-ccd.nl) of in de toelichting op de website.
  - Of bel met 0900-2800028 (10 ct/min).

## 1 Gegevens aanvrager

<p>1.1 Heeft u een deelnemernummer van de NVWA? Neem voor meer informatie over het verkrijgen van een deelnemernummer contact op met de NVWA.</p>	<p><input checked="" type="checkbox"/> Ja &gt; Vul uw deelnemernummer in <input type="checkbox"/> Nee &gt; U kunt geen aanvraag doen</p>	<p>5.1 lid2h</p>
<p>1.2 Vul de gegevens in van de instellingsvergunninghouder die de projectvergunning aanvraagt.</p>	<p>Naam instelling of organisatie Naam van de portefeuillehouder of diens gemachtigde KvK-nummer</p>	<p>5.1 lid2h 5.1 lid2h 5.1 lid2h</p>
<p>1.3 Vul de gegevens van het postadres in. Alle correspondentie van de CCD gaat naar de portefeuillehouder of diens gemachtigde en de verantwoordelijke onderzoeker.</p>	<p>Straat en huisnummer Postbus Postcode en plaats Iban Tenaamstelling van het rekeningnummer</p>	<p>5.1 lid2h</p>
<p>1.4 Vul de gegevens in van de verantwoordelijke onderzoeker</p>	<p>(Titel) naam en voorletters Functie Afdeling Telefoonnummer Email adres</p>	<p>5.1 lid2e 5.1 lid2h [ ] Dhr. [ ] Mw.</p>
<p>1.5 (Optioneel) Vul hier de gegevens in van de plaatsvervangende verantwoordelijke onderzoeker.</p>	<p>(Titel) naam en voorletters Functie Afdeling Telefoonnummer Email adres</p>	<p>5.1 lid2e 5.1 lid2e 5.1 lid2h 5.1 lid2e 5.1 lid2e</p>
<p>1.6 (Optioneel) Vul hier de gegevens in van de persoon</p>	<p>(Titel) naam en voorletters</p>	<p>[ ] Dhr. [ ] Mw.</p>

die er verantwoordelijk voor is dat de uitvoering van het project in overeenstemming is met de projectvergunning.

Functie  
Afdeling  
Telefoonnummer  
Email adres

- 1.7 Is er voor deze projectaanvraag een gemachtigde?  
 Ja > Stuur dan het ingevulde formulier Melding Machtiging mee met deze aanvraag  
 Nee

## 2 Over uw aanvraag

- 2.1 Wat voor aanvraag doet u?  
 Nieuwe aanvraag > Ga verder met vraag 3  
 Wijziging op (verleende) vergunning die negatieve gevolgen kan hebben voor het Dierenwelzijn  
Vul uw vergunde projectnummer in en ga verder met vraag 2.2  
 Wijziging op (verleende) vergunning die geen negatieve gevolgen kan hebben voor het Dierenwelzijn  
Vul uw vergunde projectnummer in en ga verder met vraag 2.3
- 2.3 Is dit een wijziging voor een project of dierproef waar al een vergunning voor verleend is?  
 Ja > Beantwoord dan in het projectplan en de niet-technische samenvatting alleen de vragen waarop de wijziging betrekking heeft en onderteken het aanvraagformulier  
 Nee > Ga verder met vraag 3
- 2.4 Is dit een melding voor een project of dierproef waar al een vergunning voor is verleend?  
 Nee > Ga verder met vraag 3  
 Ja > Geef hier onder een toelichting en ga verder met vraag 6

## 3 Over uw project

- 3.1 Wat is de geplande start- en Startdatum  
einddatum van het project?  
1-7-2022  
30-6-2027
- 3.2 Wat is de titel van het project?  
Effect of carbohydrates on digestive functioning and faecal characteristics of yellowtail kingfish (Seriola lalandi)
- 3.3 Wat is de titel van de niet-technische samenvatting?  
Effect van koolhydraten op de verteringskinetiek en mestkwaliteit in geelvintonijn

3.4	Wat is de naam van de Dierexperimentencommissie (DEC) aan wie de instellingsvergunninghouder doorgaans haar projecten ter toetsing voorlegt?	Naam DEC	5.1 lid2h
		Postadres	
		E-mailadres	

#### 4 Betaalgegevens

4.1	Om welk type aanvraag	<input checked="" type="checkbox"/> Nieuwe aanvraag Projectvergunning € 1397
4.2	gaat het?	<input type="checkbox"/> Wijziging €
	Op welke wijze wilt u dit bedrag aan de CCD voldoen. Bij een eenmalige incasso geeft u toestemming aan de CCD om eenmalig het bij 4.1 genoemde bedrag af te schrijven van het bij 1.2 opgegeven rekeningnummer.	<input type="checkbox"/> Via een eenmalige incasso <input checked="" type="checkbox"/> Na ontvangst van de factuur

#### 5 Checklist bijlagen

5.1	Welke bijlagen stuurt u mee?	Verplicht <input checked="" type="checkbox"/> Projectvoorstel inclusief DAP <input checked="" type="checkbox"/> Niet-technische samenvatting
		Overige bijlagen, indien van toepassing <input type="checkbox"/> Melding Machtiging <input checked="" type="checkbox"/> Wurordernummer <span style="background-color: #cccccc; color: red; text-align: center; font-weight: bold;">5.1 lid2h</span>

#### 6 Ondertekening

6.1	Print het formulier uit, onderteken het en stuur het inclusief bijlagen via de beveiligde e-mailverbinding naar de CCD of per post naar:	Ondertekening door de instellingsvergunninghouder of gemachtigde (zie 1.6). De ondergetekende verklaart: <ul style="list-style-type: none"> <li>• dat het projectvoorstel is afgestemd met de Instantie voor Dierenwelzijn.</li> <li>• dat de personen die verantwoordelijk zijn voor de opzet van het project en de dierproef, de personen die de dieren verzorgen en/of doden en de personen die de dierproeven verrichten voldoen aan de wettelijke eisen gesteld aan deskundigheid en bekwaamheid.</li> </ul>
-----	--	---

Centrale Commissie  
Dierproeven  
Postbus 20401  
2500 EK Den Haag

- dat de dieren worden gehuisvest en verzorgd op een wijze die voldoet aan de eisen die zijn opgenomen in bijlage III van richtlijn 2010/63/EU, behalve in het voorkomende geval de in onderdeel F van de bijlage bij het bij de aanvraag gevoegde projectvoorstel gemotiveerde uitzonderingen.
- dat door het ondertekenen van dit formulier de verplichting wordt aangegaan de leges te betalen voor de behandeling van de aanvraag.
- dat het formulier volledig en naar waarheid is ingevuld.

Naam		5.1 lid2e
Functie		gemandateerd vergunninghouder
Plaats	5.1 lid2e	5.1 lid2h
Datum		8-6-2022
Handtekening		

---



Centrale Commissie Dierproeven

## Form

### Project proposal

- This form should be used to write the project proposal for animal procedures.
- The appendix 'description animal procedures' is an appendix to this form. For each type of animal procedure, a separate appendix 'description animal procedures' should be enclosed.
- For more information on the project proposal, see the Guidelines to the project licence application form for animal procedures on our website ([www.centralecommissiedierproeven.nl](http://www.centralecommissiedierproeven.nl)).
- Or contact us by phone (0900-2800028).

### 1 General information

- |     |  |   |
|-----|--|---|
| 1.1 | Provide the approval number of the 'Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority'. | 5.1 lid2h   |
| 1.2 | Provide the name of the licenced establishment.  | 5.1 lid2h   |
| 1.3 | Provide the title of the project.  | Effect of carbohydrates on digestive functioning and faecal characteristics of yellowtail kingfish ( <i>Seriola lalandi</i> ) |

### 2 Categories

- |     |   |  |
|-----|---|--|
| 2.1 | Please tick each of the following boxes that applies to your project. | <input checked="" type="checkbox"/> Basic Research   |
|     |   | <input checked="" type="checkbox"/> Translational or applied research  |
|     |   | <input type="checkbox"/> Regulatory use of routine production  |
|     |   | <input type="checkbox"/> Research into environmental protection in the interest of human or animal health or welfare |
|     |   | <input type="checkbox"/> Research aimed at preserving the species subjected to procedures                            |
|     |   | <input type="checkbox"/> Higher education or training  |
|     |   | <input type="checkbox"/> Forensic enquiries  |
|     |   | <input type="checkbox"/> Maintenance of colonies of genetically altered animals not used in other animal procedures  |

## 3 General description of the project

### 3.1 Background

Describe the project (motivation, background and context) with respect to the categories selected in 2.1.

---

#### Background

Currently, land-based aquaculture is mainly dominated by freshwater species, but marine species are gaining importance (FAO, 2018). One of these marine fish species is yellowtail kingfish (*Seriola lalandi*). Yellowtail kingfish is mainly produced in sea cages in countries like Australia, New Zealand, Spain, Mexico, Japan and Chile (Moran et al., 2009; Soriano et al., 2018). However, more and more efforts are being made to shift the production of yellowtail kingfish in recirculation aquaculture systems (RAS) (e.g. Denmark, Germany, The Netherlands and United States of America) (EUMOFA, 2020). The advantage of a RAS is that waste water can be treated to (partly) remove solid waste and dissolved nutrients from the system and effluent water, allowing the reuse of the water. In literature it is mentioned that the waste discharge from a RAS can be substantially reduced by the factor 100 compared to a classic flow-through system (Amirkolaie, 2011). One of the challenges of farming yellowtail kingfish in RAS is the watery quality of their faeces, due to instable consistency and fine faecal particles. The absence of stable/solid faecal pellets makes it difficult to remove the solid faecal matter from the water, and can result in high concentrations of total suspended solids (TSS) in the RAS and effluent water (Moran et al., 2009). TSS are known to affect animal performance and health, system functioning and environmental eutrophication (Brinker et al., 2005; Brinker and Rösch, 2005; Chen et al., 1999; Moccia et al., 2007; Reid et al., 2009; Schumann et al., 2016; Timmons et al., 2018). Regarding animal performance and health, increasing TSS in the system water may lead to an impaired physiological functioning of the gills, resulting in a reduced oxygen uptake through the gills (observed in juvenile green grouper; Au et al., 2004). On system level, TSS might lead to a suboptimal system functioning (Chen et al., 1993; Schumann et al., 2016; Timmons et al., 2018). High organic loads, as a result of faecal waste, cause an increase in heterotrophic bacterial growth in the biofilter, outcompeting nitrifying bacteria (Schumann et al., 2016; Timmons et al., 2018). Therefore, the biofilter efficiency will be reduced, resulting in increasing ammonia concentrations in the water (Chen et al., 1993; Timmons et al., 2018; Unger and Brinker, 2013). In relation to the environment, discharging water with a high concentration of TSS (nutrient rich) will cause eutrophication and destroys ecosystems of receiving water bodies. Moreover, removing TSS from the system water will as well allow more reuse of water (Amirkolaie, 2011; Moran et al., 2009). Thus, the removal of solids is a key factor in the success of a RAS operation, because of its potential impact on animal performance and health, system functioning, and environmental eutrophication (Amirkolaie, 2011; Brinker et al., 2005; Brinker and Rösch, 2005b; Chen et al., 1993; Fernandes and Tanner, 2008; Schumann et al., 2016; Unger and Brinker, 2013). In RAS operations, solid removal techniques are mostly based on sedimentation and/or filtration. While sedimentation efficiency is mainly determined by faecal particle size and density, filtration efficiency is mainly determined by the particle size and stability (Moccia et al., 2007; Timmons et al., 2018). When particles are too small to settle or to be captured by filtration, they will remain suspended in the water column (Unger and Brinker, 2013). Accordingly, the particles might break down or even further dissolve due to water absorption, shear forces or biological degradation, hindering their removal (Brinker et al., 2005; Unger and Brinker, 2013). Waste management issues could be controlled by reducing the faecal quantity (through improved digestion) or improving the faecal quality (higher and faster removal rate) (Amirkolaie, 2011).

#### Problem statement

The demand for aquaculture and fishery products for human consumption increased by 21.2 million tonnes (16.3%) from 2011 to 2016, due to an increased human population and increased consumption per capita (FAO, 2020). During the past years, the increase in aquaculture production was mainly responsible to meet the increasing demand, since the total fisheries production stagnated (FAO, 2020). This increased aquaculture production goes along with an increasing demand of aquafeeds. Historically, pelleted diets for aquaculture contain fish meal. However, due to the limited availability of fish meal, a shift in the production of aquafeeds to more plant-based diets took place over the past decades (Staessen et al., 2020a). Moreover, pelleted aquafeeds are

nowadays produced by extrusion. This has many advantages such as an improved pellet quality. However, for the production of aquafeeds by extrusion starch needs to be included (8-12%) to maintain the structural integrity of the pellet (Romano and Kumar, 2019). Therefore, both the shift to more plant-based diets and the use of pelleted aquafeeds go along with an increasing carbohydrate (starch, sugar and NSP) inclusion within the diets for yellowtail kingfish. This inclusion of carbohydrate inclusion can affect the faecal waste management by 1) altering the nutrient digestibility (faecal quantity) and/or 2) faecal characteristics (faecal quality) (Meriac et al., 2014; Schneider et al., 2004; Staessen et al., 2020a).

According to literature, the amount of faecal waste produced can be influenced by the carbohydrate content of the diet (Meriac et al., 2014; Staessen et al., 2020a). Therefore, it is expected that an improved carbohydrate digestibility will result in a reduced faecal quantity (especially in carnivorous fish like yellowtail kingfish). This will result in a reduced amount of TSS (Kokou and Fountoulaki, 2018), ultimately positively affecting the animal health, system performance and environmental eutrophication (Brinker et al., 2005; Brinker and Rösch, 2005a; Chen et al., 1999; Moccia et al., 2007a; Reid et al., 2009; Schumann et al., 2016; Timmons et al., 2018). Factors which might lead to an increased digestibility (reduction of faecal waste) are 1) bile acid supplementation and 2) enzyme supplementation. Fish meal contains bile acids, while those are absent in plant ingredients (Staessen et al., 2020a). Bile acids and its precursors taurine and cholesterol are important factors in nutrient digestion processes (Sinha et al., 2011; Staessen et al., 2020b, 2020a) and thus faecal waste production. It is hypothesized that dietary supplementation with bile acids will improve nutrient digestibility. Compared to other monogastric animals, studies on fish using amylase and NSP-degrading enzymes are limited (Zheng et al., 2020). It has been shown that the endogenous amylase activity of yellowtail kingfish is relatively low compared to other fish species (Chen et al., 2006), thus being less able to digest starch. Therefore, it is hypothesized that dietary enzyme supplementation (amylase) may improve nutrient digestibility.

Besides an effect of carbohydrates on faecal quantity, it was shown by studies with Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*), rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and white sturgeon (*Acipenser transmontanus*) that the carbohydrate content within the diet can as well influence the faecal characteristics (Brinker and Friedrich, 2012; Hung et al., 1990; Meriac et al., 2014). For yellowtail kingfish, an instable faecal waste production has been observed by yellowtail kingfish farmers. However, detailed information on factors affecting faecal waste characteristics are absent from published literature for yellowtail kingfish. According to literature, instable faecal waste can be due to the presence of carbohydrates in the gastro intestinal tract (GIT), as they can affect the osmolality, water reabsorption and fermentation processes (Hung et al., 1990; Sinha et al., 2011; Tran-Tu et al., 2018) and thus the faecal waste characteristics/stability. Moreover, carnivorous fish like yellowtail kingfish have a more limited capacity for starch digestion and lower tolerance for free sugars compared to omnivorous fish like carp. The breakdown of starch and degradation of NSP and uptake of free sugars in the intestine (e.g. location and speed) is affected by multiple dietary factors (Hemre et al., 2002). Also factors like feeding frequency can affect how well fish deal with carbohydrates, for example when a lot of feed and thus starch is given at once, this may result in exceeding the capacity of the GIT to handle sugars compared to feeding the same amount spread over a longer time period. It could be that the instable quality of faeces observed in YTK is affected by the amount of free sugars, as the capacity of the GIT to handle may be limited. It is expected that enzymes (targeting starch and NSP) or bile acid supplementation reduce the amount of faeces, but might at the same time improve the quality of faeces. Ultimately, this would result in a reduced amount of TSS load in the system water, positively affecting the animal health, system performance and environmental eutrophication. Therefore, the effect of carbohydrates on digestion kinetics and faecal characteristics are of high relevance. The current project aims to gain insight in the effect of 1) starch and, 2) NSP on digestion kinetics and faecal characteristics and moreover, studies factors that potentially influence the effect of starch and NSP. Two experiments will focus on the effect of starch (experiment A1 and A2) and two experiments will focus on the effect of NSP (experiment B1 and B2).

### **Experiment A1 and A2**

A previous experiment with yellowtail kingfish showed that yellowtail kingfish are less well able to digest starch compared to other species like rainbow trout, European sea bass or Nile tilapia (Burel et al., 2000; Krogdahl et al., 2004; Maas et al., 2019; Peres and Oliva-Teles, 2002). Furthermore, it was shown that high levels of dietary starch reduced the overall digestibility of the diets, increasing the waste production. In regard to the faecal quality, fish fed the diets containing low levels of starch excreted faecal pellets and short strings, which was not observed at the diets containing high levels of starch. It is therefore hypothesized that there is an optimum starch level regarding faecal



recovery. Experiment A1 investigates the effect of starch level and amylase supplementation on the digestion kinetics and faecal characteristics. Experiment A2 investigates the effect of starch type and feeding frequency on the digestion kinetics and faecal characteristics.

### **Experiment B1 and B2**

Literature shows that increasing levels of NSP can increase faecal bile acid losses and its deconjugation. Bile acids and its precursors taurine and cholesterol are important factors in the nutrient digestion processes (in particular fat digestion) (Sinha et al., 2011; Staessen et al., 2020a, 2020b) and thus faecal waste production (amount) and faecal waste composition, which may affect the faeces recovery (quality). According to literature, increasing levels of NSP can affect the digesta viscosity, affecting the mixing of digestive enzymes. In addition, NSP may affect the gut morphology (increased chyme viscosity and binding of water, which can interfere with enzyme functionality and water secretion/absorption and also carbohydrates can bind bile acids, therefore altering the enterohepatic bile acid cycling) and physiology (due to the lower NSP digestibility than protein and fat, the bulk of the chyme will increase, which may alter the size and length of digestive organs and the turnover of intestinal mucosal cells), both effects of NSP may alter the digestion kinetics. Experiment B1 investigates the effect of NSP level and bile acid supplementation on the digestion kinetics and faecal characteristics. Experiment B2 investigates the effect of feeding level and exogenous NSP-degrading enzymes on the digestion kinetics and faecal characteristics.

### **Key publications**

- Amirkolaie, A.K., 2011. Reduction in the environmental impact of waste discharged by fish farms through feed and feeding. *Rev. Aquac.* 3, 19–26. <https://doi.org/10.1111/j.1753-5131.2010.01040.x>
- Au, D.W.T., Pollino, C.A., Wu, R.S.S., Shin, P.K.S., Lau, S.T.F., Tang, J.Y.M., 2004. Chronic effects of suspended solids on gill structure, osmoregulation, growth, and triiodothyronine in juvenile green grouper *Epinephelus coioides*. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 266, 255–264. <https://doi.org/10.3354/meps266255>
- Brinker, A., Friedrich, C., 2012. Fish meal replacement by plant protein substitution and guar gum addition in trout feed. Part II: Effects on faeces stability and rheology. *Biorheology* 49, 27–48. <https://doi.org/10.3233/BIR-2012-0605>
- Brinker, A., Koppe, W., Rösch, R., 2005. Optimised effluent treatment by stabilised trout faeces. *Aquaculture* 249, 125–144. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2004.12.029>
- Brinker, A., Rösch, R., 2005. Factors determining the size of suspended solids in a flow-through fish farm. *Aquac. Eng.* 33, 1–19. <https://doi.org/10.1016/j.aquaeng.2004.10.003>
- Burel, C., Boujard, T., Tulli, F., Kaushik, S.J., 2000. Digestibility of extruded peas, extruded lupin, and rapeseed meal in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and turbot (*Psetta maxima*). *Aquaculture* 188, 285–298. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(00\)00337-9](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(00)00337-9)
- Chen, B.N., Qin, J.G., Kumar, M.S., Hutchinson, W.G., Clarke, S.M., 2006. Ontogenetic development of digestive enzymes in yellowtail kingfish *Seriola lalandi* larvae. *Aquaculture* 260, 264–271. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2006.06.021>
- Chen, S., Timmons, M.B., Aneshansley, D.J., Bisogni, J.J., 1993. Suspended solids characteristics from recirculating aquacultural systems and design implications. *Aquaculture* 112, 143–155. [https://doi.org/10.1016/0044-8486\(93\)90440-A](https://doi.org/10.1016/0044-8486(93)90440-A)
- Chen, Y.S., Beveridge, M.C.M., Telfer, T.C., 1999. Settling rate characteristics and nutrient content of the faeces of Atlantic salmon, *Salmo salar* L., and the implications for modelling of solid waste dispersion. *Aquac. Res.* 30, 395–398. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2109.1999.00334.x>
- EUMOFA, 2020. Recirculating Aquaculture Systems. <https://doi.org/10.2771/66025>
- FAO, 2020. The State of World Fisheries and Aquaculture 2020., Sustainability in action. Rome. <https://doi.org/10.4060/ca9229en>
- FAO, 2018. The State of World Fisheries and Aquaculture 2018 - Meeting the sustainable development goals.
- Hemre, G.I., Mommsen, T.P., Krogdahl, Å., 2002. Carbohydrates in fish nutrition: Effects on growth, glucose metabolism and hepatic enzymes. *Aquac. Nutr.* 8, 175–194. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2095.2002.00200.x>
- Hung, S.S.O., Groff, J.M., Lutes, P.B., Fynn-Aikins, F.K., 1990. Hepatic and Intestinal Histology of Juvenile White Sturgeon Fed Different Carbohydrates. *Aquaculture Volume* 87, 349–360. [https://doi.org/10.1016/0044-8486\(90\)90072-U](https://doi.org/10.1016/0044-8486(90)90072-U)
- Kokou, F., Fountoulaki, E., 2018. Aquaculture waste production associated with antinutrient presence in common fish feed plant ingredients. *Aquaculture* 495, 295–310. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2018.06.003>
- Krogdahl, Å., Sundby, A., Olli, J.J., 2004. Atlantic salmon (*Salmo salar*) and rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) digest and metabolize nutrients differently. Effects of water salinity and dietary starch level. *Aquaculture* 229, 335–360. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(03\)00396-X](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(03)00396-X)
- Maas, R.M., Verdegem, M.C.J., Schrama, J.W., 2019. Effect of non-starch polysaccharide composition and enzyme supplementation on growth performance and nutrient digestibility in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Aquac. Nutr.* 25, 622–632. <https://doi.org/10.1111/anu.12884>
- Meriac, A., Eding, E.H., Schrama, J., Kamstra, A., Verreth, J.A.J., 2014. Dietary carbohydrate composition can change waste production and biofilter load in recirculating aquaculture systems. *Aquaculture* 420–421, 254–261. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2013.11.018>

- Moccia, R., Bevan, D., Reid, G., 2007. Composition of feed and fecal waste from commercial trout farms in Ontario: physical characterization and relationship to dispersion and depositional modelling. *Aquaculture*.
- Moran, D., Pether, S.J., Lee, P.S., 2009. Growth, feed conversion and faecal discharge of yellowtail kingfish (*Seriola lalandi*) fed three commercial diets. *New Zeal. J. Mar. Freshw. Res.* 43, 917–927. <https://doi.org/10.1080/00288330909510050>
- Peres, H., Oliva-Teles, A., 2002. Utilization of raw and gelatinized starch by European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) juveniles. *Aquaculture* 205, 287–299. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(01\)00682-2](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(01)00682-2)
- Reid, G.K., Liutkus, M., Robinson, S.M.C., Chopin, T.R., Blair, T., Lander, T., Mullen, J., Page, F., Moccia, R.D., 2009. A review of the biophysical properties of salmonid faeces: Implications for aquaculture waste dispersal models and integrated multi-trophic aquaculture. *Aquac. Res.* 40, 257–273. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2008.02065.x>
- Romano, N., Kumar, V., 2019. Starch gelatinization on the physical characteristics of aquafeeds and subsequent implications to the productivity in farmed aquatic animals. *Rev. Aquac.* 11, 1271–1284. <https://doi.org/10.1111/raq.12291>
- Schneider, O., Amirkolaie, A.K., Vera-Cartas, J., Eding, E.H., Schrama, J.W., Verreth, J.A.J., 2004. Digestibility, faeces recovery, and related carbon, nitrogen and phosphorus balances of five feed ingredients evaluated as fishmeal alternatives in Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* L. *Aquac. Res.* 35, 1370–1379. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2004.01179.x>
- Schumann, M., Unger, J., Brinker, A., 2016. Floating faeces: Effects on solid removal and particle size distribution in RAS. *Aquac. Eng.* 78, 75–84. <https://doi.org/10.1016/j.aquaeng.2016.10.007>
- Sinha, A.K., Kumar, V., Makkar, H.P.S., De Boeck, G., Becker, K., 2011. Non-starch polysaccharides and their role in fish nutrition - A review. *Food Chem.* 127, 1409–1426. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.02.042>
- Soriano, E.L., Ramírez, D.T., Araujo, D.R., Gómez-Gil, B., Castro, L.I., Sánchez, C.G., 2018. Effect of temperature and dietary lipid proportion on gut microbiota in yellowtail kingfish *Seriola lalandi* juveniles. *Aquaculture* 497, 269–277. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2018.07.065>
- Staessen, T.W.O., Verdegem, M.C.J., Koletsi, P., Schrama, J.W., 2020a. The effect of dietary protein source (fishmeal vs. plant protein) and non-starch polysaccharide level on fat digestibility and faecal bile acid loss in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquac. Res.* 51, 1170–1181. <https://doi.org/10.1111/are.14467>
- Staessen, T.W.O., Verdegem, M.C.J., Weththasinghe, P., Schrama, J.W., 2020b. The effect of dietary non-starch polysaccharide level and bile acid supplementation on fat digestibility and the bile acid balance in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture* 523, 735174. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2020.735174>
- Timmons, M.B., Guerdat, T., Brian, V.J., 2018. *Recirculating aquaculture*, 4th Edition.
- Tran-Tu, L.C., Hien, T.T.T., Bosma, R.H., Heinsbroek, L.T.N., Verreth, J.A.J., Schrama, J.W., 2018. Effect of ingredient particle sizes and dietary viscosity on digestion and faecal waste of striped catfish (*Pangasianodon hypophthalmus*). *Aquac. Nutr.* 24, 961–969. <https://doi.org/10.1111/anu.12632>
- Unger, J., Brinker, A., 2013. Floating feces: A new approach for efficient removal of solids in aquacultural management. *Aquaculture* 404–405, 85–94. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2013.04.015>

## 3.2 Purpose

3.2.1 Describe the project's immediate and ultimate goals. Describe to which extent achieving the project's immediate goal will contribute to achieving the ultimate goal.

- If applicable, describe all subobjectives

The overall research objective of the present project is to investigate 'Effect of carbohydrates on digestive functioning, nutrient digestibility (i.e. amount of faecal waste produced) and faecal characteristics of yellowtail kingfish (*Seriola lalandi*).' The ultimate goal is to improve the sustainability of yellowtail kingfish farming through the diet, by reducing the impact of the waste load on the Recirculating Aquaculture System (and the environment) and at the same time guaranteeing fish health.

The research is both fundamental and translational and applied. It is expected that the outcome of this project contributes to the following immediate goals.

(1) reduce the total waste load by improving the faecal quality (recovery), by:

- studying the effect of both starch and non-starch-polysaccharides on faecal quality
- studying ways to mitigate the effect of both starch and non-starch polysaccharides on faecal quality

(2) reduce the total waste production (improving digestibility) by:

- studying the effect of starch and non-starch polysaccharides on nutrient digestibility and digestion kinetics
- studying ways to mitigate the effect of both starch and non-starch polysaccharides on nutrient digestibility and digestion kinetics.

This all contributes to the overall aim of allowing the transition for more plant-based-diets when farming yellowtail kingfish.

3.2.2 Provide a justification for the project's feasibility.

---

The experiments will be carried out in the designated research facilities, where the staff has long experience in aquacultural nutrition and fish husbandry. Experimental work and laboratory analysis will be conducted in designated laboratories. Previous experiments with yellowtail kingfish in this research facility and unit were performed successfully and all experimental procedures are common (standardized) for the research facilities and the involved researchers, minimizing the possibility of failure. During this project, people with different academic expertise (microbiota, nutrition and RAS) are involved, ensuring relevant expertise prior to this project application.

3.2.3 Are, for conducting this project, other laws and regulations applicable that may affect the welfare of the animals and/or the feasibility of the project?  No  Yes > Describe which laws and regulations apply and describe the effect on the welfare of the animals and the feasibility of the project.

---

### 3.3 Relevance

3.3.1 What is the scientific and/or social relevance of the objectives described above?

---

Scientific relevance: Investigating the digestion mechanisms of starch and NSP will enable to better understand the underlying mechanisms of carbohydrates on nutrient digestion and faecal quality (recovery and production). Additionally, obtained knowledge on the effects of carbohydrate on nutrient digestibility and faecal quality might create opportunities in different finfish species with poor quality faeces (e.g. salmon).

Social relevance: the results of the study will ultimately lead to a reduced amount of TSS in the system and effluent water of RAS improving, allowing an increased inclusion of plant-based ingredients in feed formulation for yellowtail kingfish farming. Both improved waste management and safeguarding fish health through feed formulation for yellowtail kingfish farming will improve the sustainability of the yellowtail kingfish farming. This can have a positive view of society for aquaculture.

3.3.2 Who are the project's stakeholders? Describe their specific interests.

---

- Researcher: enable to better understand the underlying mechanisms of carbohydrates on nutrient digestion and faecal quality (recovery and production) in yellowtail kingfish
- Fish farmers: Improved faecal quality and reduced quantity, leading to reduced TSS in the culture and discharge water will improve animal health and system functioning, whilst reducing water use (including less waste discharge), thereby realizing a more sustainable form of fish farming
- Fish consumer (human population): Improved faecal quality and quantity, consequently improving animal health, system performance and reducing environmental impact (eutrophication), is required to enable the growth of aquaculture production in a more sustainable and socially acceptable way.
- Fish: reduced TSS in the culture water can lead to improved system functioning and better water quality for the fish, safeguarding fish health (welfare). In addition, the nutrition (or the impact of the diet on the fish) can be improved by studying the effect on the digestion kinetics.
- Experimental animals: The experimental animals used during this project will have no benefit in this project.
- Environment: improved waste management can reduce the impact on the environment (i.e. eutrophication) and water use. Improving the nutrient efficiency in the diets (digestibility) will also reduce the pressure (amount) on resources.

### 3.4 Strategy

3.4.1 Provide an overview of the overall design of the project (strategy). If applicable, describe the different phases in the project, the coherence, the milestones, selection points and decision criteria.

---

The experiments are designed to cover the overall aim as described in section 3.2 to evaluate the effect of carbohydrates on digestive functioning and waste characteristics, with the focus on reducing the waste produced (amount) and faecal stability (increasing recovery). The experiments A1 and A2 will focus on the effect of starch and the experiments B1 and B2 will focus on the effect of NSP on digestive functioning. All experiments consist of a feeding trial which are performed according to a comparable setup, whereby the samples taken and animal procedures will be comparable. The experiments will differ in their dietary treatment.

#### Experiment A1:

The first experiment aims at evaluating the effect of starch level, amylase supplementation and their combination on digestive functioning (e.g. viscosity, dry matter content, osmolality, bile acid loss) and faecal waste characteristics. Four experimental diets will be formulated according to a 2 × 2 factorial design. The first factor investigated will be starch level, where diets will be formulated to have contrasting starch levels. The second factor will be the supplementation with or without amylase in the experimental diet. The experiment allows to test the effect of starch level on the measured parameters (described below) and the effect of amylase to improve the breakdown and digestibility of starch, to mitigate the negative effects of starch on faecal waste production and faecal quality.

#### Experiment A2:

Based on the information gathered from experiment A1, a diet which will be optimal (sensitive) for assessing the effect of feeding frequency and starch type on digestive functioning will be formulated. The experiment aims to evaluate the effect of dietary starch type, feeding frequency and their combination on digestive functioning (e.g. viscosity, dry matter content, osmolality, bile acid loss) and faecal waste characteristics. Four experimental diets will be formulated according to a 2 × 2 factorial design. The first factor is dietary starch type, where two diets will be formulated to have comparable levels of starch but different in type (either through processing or ingredient choice). The second factor will be feeding frequency, whereby the diets will be either fed by hand twice a day or more frequently/constantly (e.g. with a belt feeder). Both treatments are expected to have an effect on the digestion kinetics of starch and thus alter chyme characteristics and ultimately faecal characteristics (amount of faeces through digestibility).

#### Experiment B1:

The second experiment aims at evaluating the effect of NSP level, bile acid supplementation and their combination to test their effect on digestive functioning (e.g. nutrient digestibility, viscosity, dry matter content, osmolality and bile acid loss) and faecal waste characteristics. Four experimental diets will be formulated according to a 2 × 2 factorial design. The first factor investigated will be NSP level, formulating two diets contrasting in NSP level. The second factor investigated will be the supplementation with or without bile acids. With the NSP level, the focus is in particular the effect on bile metabolism (and the associated fat digestibility). While with the bile acid supplementation it is investigated whether the effect of NSP on bile loss can be mitigated (improving fat digestibility). Both the NSP level and the bile supplementation are expected to alter the faeces characteristics (through both NSP level and fat digestibility).

#### Experiment B2:

Based on the information gathered from experiment B1, a diet which will be optimal (sensitive) for assessing the effect of NSP inclusion and enzyme supplementation on digestive functioning will be formulated. This experiment aims at evaluating the feeding level, the supplementation of NSP-degrading enzymes, and their combination to test their effect on digestive functioning (e.g. nutrient digestibility, viscosity, dry matter content, osmolality and bile acid loss) and faecal waste characteristics. Four experimental diets will be formulated according to a 2 × 2 factorial design. The first factor investigated will be feeding level, applying two different feeding levels. The second factor investigated will be the supplementation with or without NSP-degrading enzymes. Hereby testing whether NSP-degrading enzymes can successfully be used to reduce the effect of NSP and whether the effect of enzymes is dependent on the level feeding level (and thus the amount of NSP provided).

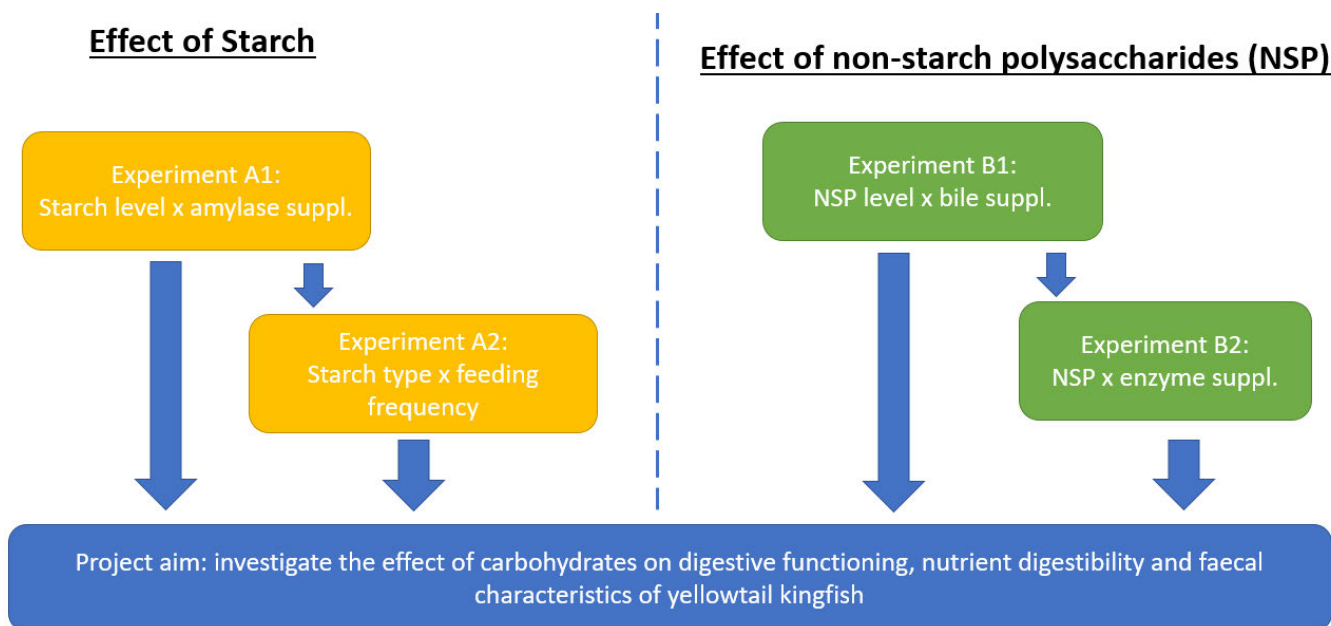
Measurements:

- Faecal material will be collected for apparent digestibility measurements (ADCs). Whole body composition will be measured for each dietary treatment from fish sampled at the start and at the end of the experiment and growth performance indicators (including feed conversion ratio) will be used to compare the effectiveness of, and the differences, between treatments. Nitrogen balances will be calculated based on nutrient digestible intake and body composition (Harter et al., 2013). At the end of the experiment, all animals will be killed and parameters regarding nutrient digestibility (digestion kinetics/progression of digestion throughout the GIT) and faecal characteristics (e.g. osmolality, viscosity, microbiota, or bile acid content) of the chyme will be measured along the gastro intestinal tract (e.g. stomach, proximal, middle, distal intestine). In addition, blood samples will be taken to measure parameters related to digestion of carbohydrates (glucose levels in the blood) and gut samples will be analysed for histology and morphology.

#### 3.4.2 Provide a justification for the strategy described above.

---

The project consists of four experiments. After experiment A1 (decision moment), the acquired information will be used to design the experimental diets (sensitive design) for experiment A2. The diets used in experiment A2 will differ in starch type, differences in starch type will be achieved by difference of processing of the same diet or by the use of ingredient(s) with different starch types. After experiment B1 (decision moment), the acquired information will be used to design the experimental diet (sensitive design for experiment B2). All experiments contribute to the overall aim of evaluating the effect of carbohydrates on digestive functioning (progression of digestion along the GIT), and nutrient digestibility (faecal waste production) and faecal quality. The project can be described as basic research, but also as translational research, as results might give opportunities for fish species with poor faecal quality such as Atlantic salmon or striped catfish.



**Figure 1.** overview project setup.

3.4.3 List the different types of animal procedures. Use a different appendix 'description animal procedures' for each type of animal procedure.

Serial number	Type of animal procedure
1	Faeces quality and quantity measurements



Centrale Commissie Dierproeven

## Appendix

### Description animal procedures

- This appendix should be enclosed with the project proposal for animal procedures.
- A different appendix 'description animal procedures' should be enclosed for each type of animal procedure.
- For more information on the project proposal, see the Guidelines to the project licence application form for animal procedures on our website ([www.centralecommissiedierproeven.nl](http://www.centralecommissiedierproeven.nl)).
- Or contact us by phone (0900-2800028)

#### 1 General information

1.1	Provide the approval number of the 'Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority'.	5.1 lid2h	
1.2	Provide the name of the licenced establishment.	5.1 lid2h	
1.3	List the serial number and type of animal procedure <i>Use the numbers provided at 3.4.3 of the project proposal.</i>	Serial number 1	Type of animal procedure Faeces quality and quantity measurements

#### 2 Description of animal procedures

##### A. Experimental approach and primary outcome parameters

Describe the general design of the animal procedures in relation to the primary outcome parameters. Justify the choice of these parameters.

The project consists of four experiments. All experiments are aimed to investigate the effect of carbohydrates and different dietary co-factors on digestive functioning, such as nutrient digestibility (in particular focusing on the effect of carbohydrates), dry matter, pH, osmolality, viscosity, microbiota composition, and bile acid metabolism and faecal characteristics. Experiments A (A1 & A2) and experiments B (B1 & B2) can be performed independently from each other. After experiment A1, the diets will be formulated for experiment A2 based on the information of experiment A1 (sensitive diets). Experiment A1 aims at evaluating the effect of starch level and amylase supplementation on the above mentioned factors in yellowtail kingfish. Experiment A2 aims to investigate the effect if feeding frequency and starch type (1 diet selected from experiment A1) on digestive functioning of yellowtail kingfish. Experiment B1 aims to investigate the effect of non-starch polysaccharides (NSP) level and bile acid/emulsifier supplementation on digestive functioning of yellowtail kingfish. After experiment B1, the diet will be



formulated for experiment B2 based on the information of experiment B1 (sensitive diets). Experiment B2 aims to investigate the effect of feeding level and NSP-degrading enzyme supplementation on digestive functioning (progression of digestion).

### **Each experiment:**

#### Primary outcome parameters:

- Performance indicators - batch weighing of the fish at the beginning and at the end of the experiment (non-invasive).
- Apparent digestibility coefficients (ADC) - sampling of faeces using a swirl separator (non-invasive)
- Faeces recovery - sampling of faeces using a swirl separator (non-invasive)
- Blood samples - measuring glucose levels.
- Chyme/luminal content for analyses related to digestion kinetics and faecal characteristics, e.g.:
  - o Apparent digestibility coefficients: progression of digestion throughout the gastrointestinal tract (GIT) and mineral availability (not possible to do non-invasive for yellowtail kingfish).
  - o pH
  - o Osmolality
  - o Viscosity
  - o Microbiota composition
  - o Dry matter content.
  - o Bile acid content
    - Blood samples are taken to measure parameters related to the digestion of carbohydrates (e.g. pH, glucose levels). For drawing blood, fish will be first put under anaesthesia, after drawing blood fish will be killed using an overdose of benzocaine before sampling of body tissue (e.g. gills and intestine). 3 fish/tank are used.
    - Whole body composition will be measured for each dietary treatment from fish sampled at the start and at the end of the experiment and growth performance indicators (including feed conversion ratio) will be used to compare the effectiveness of, and the differences, between treatments. Nitrogen balances will be calculated based on nutrient digestible intake and body composition (Harter et al., 2013). At the end of the experiment, all animals will be killed and the pH, osmolality, viscosity, microbiota, DM and bile acid content of the chyme will be measured along the gastrointestinal tract (stomach, proximal, middle, distal intestine). This to elucidate on the reasons for watery/poor quality faeces.
    - The project consists of four experiments. The design/procedures are identical among the different experiments. Each experiment will last for 5 weeks and prior to that 2 weeks of acclimatization. The experimental animal species used will be yellowtail kingfish (*Seriola lalandi*). The duration of the experiment includes 2 weeks of acclimatization which are necessary for the fish to adapt to the feeding method (using commercial feed), temperature, light conditions, the facility environment and to recover from transportation (5.1 lid1c). The experiment will last for 5 weeks, which are needed to collect enough faeces, get a response from the fish to the diet and to collect sufficient amount of chyme at the end of the experiment.
    - At the end of each experiment, chyme, blood and tissue samples will be collected. Both experiments are followed by decision moment to decide on the diets to be used in experiment A2 and B2. For experiment A2: A diet which will be optimal for assessing the effect of feeding frequency and starch type on digestive functioning will be formulated. For experiment B2: A diet which will be optimal for assessing the effect of NSP inclusion and enzyme supplementation on digestive functioning will be formulated.
    - Experiment A (A1->A2) and B (B1->B2) can be performed independent from each other. All experiments will follow the same procedures.

During each experiment, two dietary factors are tested in a 2 × 2 factorial design resulting in four test diets. Each experiment will be set up using 12 tanks, therefore each treatment will be



tested with 3 replicates. Before the start of the experiment, fish will be subjected to 24 hours of fasting to completely empty their gut. At the start of the experiment 20 fish will be killed using an overdose of benzocaine for initial body composition. Subsequently, 24 yellowtail kingfish will be randomly counted, batch weighed and stocked per tank (fish will be sedated). Fish will be fed at least at about 80% of the expected satiation (20g/kg<sup>0.8</sup>). Fish will be fed by hand twice daily (this will deviate for experiment B1, as the factor feeding frequency will involve a different feeding protocol). Faecal matter will be collected continuously overnight, a task that will be accomplished by using swirl separators (non-invasive). During the last week of the experiment, faecal material will be collected continuously for 48 hours to determine faecal recovery. At the end, fish will be sedated using benzocaine and batch weighed per tank. Subsequently, all fish from each tank will be killed by administering an overdose of benzocaine for collecting samples. For drawing blood, fish will be first put under anaesthesia, after drawing blood fish will be killed using an overdose of benzocaine before sampling of body tissues (e.g. gills and intestine), 3 fish per tank are used. All 24 fish per tank, including fish taken for body composition (10 fish/tank) and blood and tissue samples (3 fish/tank) will be used to collect chyme/luminal content in order to minimize the amount experimental animals. Handling of the fish will be avoided as much as possible. When handling is unavoidable (e.g. weighing at the start of the experiment and drawing blood) the fish will be sedated/anaesthetized.

- The present research aims at exploring the effect of carbohydrates and different dietary co-factors on the digestive functioning, nutrient digestibility (in particular in relation to the effect of carbohydrates) and chyme: pH, osmolality, viscosity, microbiota composition, and bile acid and dry matter content. To identify the main effect of carbohydrates (starch and NSP) on digestive functioning of the gastrointestinal tract (progression of digestion throughout the GIT), following factors will be investigated:
  - o Experiment A1: Starch level and amylase supplementation.
  - o Experiment A2: Feeding frequency and starch type.
  - o Experiment B1: NSP level and bile/emulsifier supplementation.
  - o Experiment B2: Feeding level and enzyme supplementation.

Overall, it is aimed to investigate the effect of carbohydrates on digestive functioning, as previous experiments with starch and NSP level resulted in an altered nutrient digestibility and faecal recovery.

#### Experiment A1:

- The experiment is designed to evaluate the effect of starch level and amylase supplementation on digestive functioning such as nutrient digestibility (in particular carbohydrate digestibility), chyme: pH, osmolality, viscosity, microbiota composition, DM and bile acid content and faecal characteristics.
- Four experimental diets will be formulated, according to a 2 × 2 factorial design. The factors under investigation are:
  - o Starch level
  - o Amylase supplementation
    - All diets will be formulated to meet the known nutrient requirements for yellowtail kingfish.
    - Measurements: as described under the primary outcome parameters.

#### Experiment A2:

- The outcome of experiment A1 (information gathered) in regard to the effect of starch level and amylase supplementation on digestive functioning, will be used to optimize the formulation of the diets used in experiment A2 (refinement). The information will be used to formulate dietary conditions that are sensitive for detecting the effect of the factors starch type and feeding frequency (i.e., on the starch level used in the diets and whether to apply amylase or not to all diets). The criteria for optimizing the diet formulation are: organic matter digestibility, faeces recovery and distal chyme characteristics which reflect in intermediate faecal pellet quality.
- The experiment is designed to evaluate the effect of feeding frequency and starch type on digestive functioning such as nutrient digestibility (in particular carbohydrate

digestibility), chyme: pH, osmolality, viscosity, microbiota composition, DM, and bile acid content and faecal characteristics.

- Four experimental diets will be formulated, according to a 2 × 2 factorial design. The factors under investigation are:
  - o Feeding frequency
  - o Starch type (either through processing or ingredients choice).
    - All diets will be formulated to meet the known nutrient requirements for yellowtail kingfish.
    - Measurements: as described under the primary outcome parameters.

#### Experiment B1:

- The experiment is designed to evaluate the effect of NSP level and bile acid/emulsifier supplementation on digestive functioning such as nutrient digestibility (in particular fat and carbohydrate digestibility), chyme: pH, osmolality, viscosity, microbiota composition, DM, and bile acid content and faecal characteristics.
- Four experimental diets will be formulated, according to a 2 × 2 factorial design. The factors under investigation are:
  - o NSP level
  - o Bile acid/Emulsifier supplementation
    - All diets will be formulated to meet the known nutrient requirements for yellowtail kingfish.
    - Measurements: as described under the primary outcome parameter.

#### Experiment B2:

- The outcome of experiment B1 (information gathered) in regard to the effect of NSP level and bile acid/emulsifier supplementation on digestive functioning, will be used to optimize the formulation of the diets used in experiment B2 (refinement). The information will be used to formulate dietary conditions that are sensitive for detecting the effect NSP-degrading enzymes feeding level (i.e., on the NSP level used in the diets). The criteria for optimizing the diet formulation are: organic matter digestibility, faeces recovery and distal chyme characteristics which reflect in intermediate faecal pellet quality.
- The experiment is designed to evaluate the effect of feeding level and NSP-degrading enzyme(s) supplementation on digestive functioning such as nutrient digestibility (in particular fat and carbohydrate digestibility), chyme: pH, osmolality, viscosity, microbiota composition, DM, and bile acid content and faecal characteristics.
- Four experimental diets will be formulated, according to a 2 × 2 factorial design. The factors under investigation are:
  - o Feeding level
  - o Enzyme supplementation
    - All diets will be formulated to meet the known nutrient requirements for yellowtail kingfish.
    - Measurements: as described under the primary outcome parameter.

Describe the proposed animal procedures, including the nature, frequency and duration of the treatment. Provide justifications for the selected approach.

In each experiment, the following animal procedures are applied:

#### *Fasting:*

- The day before the start of the experiment (the day before fish handling: harvesting, counting, sampling, weighing) fish will be subjected to 24 hours of fasting to allow emptying of the gastrointestinal tract. A short-term fasting or feed withdrawal period is applied to get a representative value for biomass weight at the start of the experiment. Fish are exothermic animals and often do not feed for certain periods of time. Therefore, short-term fasting (24 hours) is considered to cause no discomfort to the fish.

#### *Anaesthesia:*

- Fish biomass per tank will be measured by weighing under anaesthesia (sedated) at the start and at the end of the experiment, using benzocaine.
- For drawing blood fish will be put under anaesthesia, after drawing blood (fish will not recover), fish will be killed using an overdose of benzocaine.

*Weighing & counting:*

- For determination of the feeding level and growth performance parameters at the end of the experiment.
- Fish will be weighed in three batches per tank (24 fish/tank).
- 2 x all fish per tank: at the start and at the end of the experiment.

*Body composition:*

- 20 fish at the start of the experiment and 10 fish per tank (12 tanks x 10 fish = 120 fish) at the end of the experiment for a total of 140 fish.
- For proximate body composition analysis to determine fat content and nitrogen balances.

*Blood & tissue sampling:*

- 3 fish at the end of the experiment per tank (12 tanks x 3 fish = 36 fish), blood will be drawn on anaesthetized fish, tissue samples will be taken after the fish are killed using an overdose of benzocaine.
- Blood – glucose
- Tissue – Intestine (+ potential additional samples like gills).

*Chyme/luminal content:*

- All fish at the end of the experiment (24 fish/tank) (including fish taken for body composition (10 fish/tank) and blood and tissue samples (3 fish/tank)) chyme is collected along the GIT (stomach, proximal, middle and distal intestine).
- Measurements include analyses for:
  - o Digestion kinetics: dry matter, ash, N and minerals.
  - o pH, osmolality, viscosity, microbiota composition and bile acid content.

*Fish killed:*

- All fish will be killed to take all the samples required (body composition, tissue and chyme/luminal content), 308 fish per experiment (20 start + 288 end). In total, 1232 (4 experiments x 308 fish) will be killed.

*Non-invasive:*

- Collecting faeces for nutrient digestibility and faecal recovery (during experimental period).

Describe which statistical methods have been used and which other considerations have been taken into account to minimise the number of animals.

**Overview:**

In total (4 experiments) the amount of fish used will be 1232 (308 fish x 4 experiments). The number of fish per experiment is determined by 1) the number of tanks (replicate) per treatment and 2) the minimal amount of fish per tank is determined by the minimum amount of chyme that needs to be collected per tank (replicate) to perform the indicated analyses/measurements. The sampling for body composition, blood and tissue do not influence the number of experimental animals per experiment, as these fish are used and needed to collect sufficient chyme.

**Overview per experiment:**

	Amount	Initial body composition	Final body composition	Blood & Tissue	Chyme
Body composition start	20	X			
Body composition final	120		X		X
Blood and tissue	36			X	X
Chyme (intestinal content)	288				X
Total	<b>308</b>				

#### *Number of tanks per treatment*

The experiments will be set up using 12 tanks. During each experiment, two dietary factors are tested in a 2 × 2 factorial design resulting in 4 test diets. Each treatment will be tested with 3 replicates. 3 replicates per treatment is the minimal number required to perform outlier testing. This results that the minimum number of tanks required per experiment is 12. A two-way ANOVA will be used for statistical analysis related to osmoregulation (chyme, blood and tissue samples), performance data, digestibility, body composition and nutrient balances. For parameters measured at tank level (growth, nutrient digestibility, nitrogen and energy balances and parameter measured on collected chyme), each tank is the experimental unit.

#### *Number of fish for sampling body composition*

For measurement of nitrogen retention, initial and final body composition needs to be determined by proximate analysis. Previous studies showed that it is required to collect at least 20 fish at the beginning and 10 fish/tank at the end of the experiment (Saravanan *et al.*, 2013; Maas *et al.*, 2018) to perform this proximate analysis adequately. Collecting 20 and 10 fish respectively at the beginning and end of the experiment prevents that variation between fish within the same tank (experimental unit) affect the average body composition (protein, fat, minerals) per treatment/experimental unit.

#### *Blood and tissue sampling*

3 fish/tank will be sampled for blood and tissue analysis for a total of 9 fish per treatment. In total, 36 fish per experiment will be sampled for blood and tissue (e.g. intestine) providing sufficient statistical power and degrees of freedom, as shown in a previous study (Magnoni *et al.*, 2018).

#### *Chyme/luminal content*

The chyme/luminal content will be analysed for:

o Digestion kinetics: Ash, DM, N and minerals.

o pH, osmolality, viscosity, microbiota composition, and bile acid content.

per tank are needed. In order to minimize the amount of fish, all 24 fish per tank including fish taken for body composition (10 fish/tank) and blood and tissue samples (3 fish/tank) are used for chyme (digesta content) collection. The sampling of chyme and the parameters we want to measure are quite unique, which makes it difficult to rely on literature for the amount (weight) of fish needed. The chyme content will be collected in the stomach and 3 intestinal segments (proximal, middle and distal). Since information regarding the chyme collection for yellowtail kingfish, the amount of faecal chyme content will be adapted in regard to a recent experiment (2018.W-0010.004) with rainbow trout of approximately 250 g mean final weight. This research showed that from the proximal, middle and distal approximately 22.4 %, 7.5 % and 12.8% of the last meal fed was collected as chyme (on DM basis). So, the mid intestine is the most limiting segment for collecting sufficient chyme. To perform all the indicated analyses, a minimum of 5 g dried digesta is needed per section (DM, ash and minerals, Nitrogen-Dumas, pH, osmolality, viscosity, microbiota composition and bile acid content). In order to collect sufficient amount of faeces from the mid intestine, we need to feed the fish 72 g (5 g / 7 % non-digested feed). The expected final mean weight of the fish is around 200 g. Fish will be fed at 23.75 g/kg<sup>0.8</sup>, meaning that each fish eats 6.0 g/d (200 g / 1000 g \* 23.75 g/kg<sup>0.8</sup>) and thus 3.25 g at their last feeding moment. With each fish consuming 3.25 g of feed, you need a total of 22.15 fish (72 / 3.25 g), having a safety margin of 5 % we need 23.3 (22.15 fish / 95%) and thus 24 fish/tank.

## **References**

- Harter, T. (2013). Isoenergetic replacement of fat by starch in diets for African catfish (*Clarias gariepinus*): effect on chyme characteristics, water fluxes in the gastro intestinal tract and nutrient digestibility.
- López-Luna, J., Vásquez, L., Torrent, F., & Villarroel, M. (2013). Short-term fasting and welfare prior to slaughter in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Aquaculture*, 400, 142-147.

Maas, R. M., Verdegem, M. C., Dersjant-Li, Y., & Schrama, J. W. (2018). The effect of phytase, xylanase and their combination on growth performance and nutrient utilization in Nile tilapia. *Aquaculture*, 487, 7-14.

Magnoni, L. J., Eding, E., Leguen, I., Prunet, P., Geurden, I., Ozório, R. O., & Schrama, J. W. (2018). Hypoxia, but not an electrolyte-imbalanced diet, reduces feed intake, growth and oxygen consumption in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Scientific reports*, 8(1), 4965.

Saravanan, S., Geurden, I., Orozco, Z. G. A., Kaushik, S. J., Verreth, J. A. J., & Schrama, J. W. (2013). Dietary electrolyte balance affects the nutrient digestibility and maintenance energy expenditure of Nile tilapia. *British Journal of Nutrition*, 110(11), 1948-1957.

Waagbø, R., Jørgensen, S. M., Timmerhaus, G., Breck, O., & Olsvik, P. A. (2017). Short term starvation at low temperature prior to harvest does not impact the health and acute stress response of adult Atlantic salmon. *PeerJ*, 5, e3273.

## B. The animals

Specify the species, origin, life stages, estimated numbers, gender, genetic alterations and, if important for achieving the immediate goal, the strain.

Serial number	Species	Origin	Life stages	Number	Gender	Genetically altered	Strain
	89 - Other Fish*	04	juvenile	1232	mix sex	n.a.	Yellowtail kingfish, obtained from a commercial company

## Provide justifications for these choices

### Species

Yellowtail kingfish (*Seriola lalandi*), is a recently cultured fish species in recirculating aquaculture systems (RAS). The demand of Yellowtail kingfish is high and expected to growth, making it an important marine fish in RAS. A challenge of farming yellowtail kingfish in RAS is their poor faecal quality. The instable faecal consistency and fine faecal particles makes it difficult to remove the faecal material from the water, resulting in high concentrations of total suspended solids (TSS) in the RAS and effluent water. This makes yellowtail kingfish the target animal.

### Origin

Yellowtail kingfish: From [5.1 lid1c](#)

### Life stages

Above 60 grams weight of fish individual upon arrival (depending on the availability). The fish are in the juvenile stage when used, this is a stage that is very relevant for development, and is easy to handle for researchers. The size of the fish is of relevance, if the fish have a high initial body weight, the effect of the dietary treatment on body composition (nutrient utilisation) is difficult to detect (dilution). If the fish are too small, high amounts of fish are needed to collect sufficient amount chyme (for digestion kinetics) and faeces for digestibility studies and recovery.

### Number

The number of animals used in each experiment is determined by the number of tanks used (12) and the number of fish per tank (24). A total of 308 fish will be used per experiment which makes a total of 1232 (4 experiments in total). The amount of fish used is the minimum required to collect sufficient samples (chyme) for the needed analyses (see 3 Statistical methods).

Gender
A mixed sex population will be used, common practice

Genetic alterations
Not applicable.

Strain
Not applicable

### C. Accommodation and care

Is the housing and care of the animals used in experimental procedures in accordance with Annex III of the Directive 2010/63/EU?
--

<input type="checkbox"/> Yes
------------------------------

<input checked="" type="checkbox"/> No > If this may adversely affect animal welfare, describe how the animals will be housed and provide specific justifications for these choices.
--

The entire trial will be carried out in the digestibility unit (n = 12 circular tanks) of the research facility. All tanks are connected to a recirculating water treatment system. The volume of each tank is 300L. At the start of the trial, 24 fish will be stocked per tank. Prior to stocking, each individual group of 24 fish will be weighed under anaesthesia in three batches.

Water quality and environmental conditions are maintained for optimal known conditions: Physio-chemical parameters are: photoperiod 20h light, 4h dark; water refreshment of the system according to NO<sub>3</sub>-N limits; water flow in the tank 7 L/min; temperature 23-25 degree; pH 7.3 - 7.6; NH-N <2 mg/L; NH<sub>3</sub>-N <0.06 mg/L; NO<sub>2</sub>-N <1 mg/L; NO<sub>3</sub>-N <100 mg/L; salinity 33 - 35 ppt; dissolved oxygen >5.5 mg/L.

### D. Pain and compromised animal welfare

Will the animals experience pain during or after the procedures?
--

<input type="checkbox"/> No
-----------------------------

<input checked="" type="checkbox"/> Yes > Will anaesthesia, analgesia or other pain relieving methods be used?
--

<input type="checkbox"/> No > Justify why pain relieving methods will not be used.
--

Yes > Indicate what relieving methods will be used and specify what measures will be taken to ensure that optimal procedures are used.

- 1) During handling (e.g. weighing at the start of the experiment), fish will be sedated with benzocaine.
- 2) For determining body composition and collection chyme, fish will be killed using an overdose of benzocaine.
- 3) For drawing blood and sampling body tissues, fish will be anaesthetized using benzocaine and blood will be drawn. After blood sampling, fish will be killed and used for sampling of body tissues (e.g. gills and intestine).

Describe which other adverse effects on the animals welfare may be expected?
--

### Per experiment:

- 20 fish will be killed (initial body composition) at the start of the experiment which will cause mild discomfort.
- 288 fish will be weighed at the start and at the end of the experiment and will experience mild discomfort.
- All 288 fish will be killed (final body composition, chyme, blood and tissue samples) at the end of the experiment, the killing using anaesthesia will cause mild discomfort.
  - 36 fish (of these 288) will be anaesthetized for drawing blood. After drawing blood, fish will be killed using anaesthesia. This will cause mild discomfort.
- No other aspects other than 'mild' discomfort as described above are expected during the execution of the experiments. Diet: all diets will be formulated to meet the known nutrient requirements of yellowtail kingfish.

Explain why these effects may emerge.

Diet: To the best of our knowledge the applied contrast in diet composition have no negative effects. Weighing fish under sedation and killing fish using an overdose of benzocaine is essential in order to determine the indicated outcome parameters (growth, body composition, etc.).

Indicate which measures will be adopted to prevent occurrence or minimise severity.

Diets will be formulated to cover all the known nutrient requirements. Water quality of the system will be checked daily. Weighing of fish: sedation will be used to minimize discomfort. Related to the experimental procedures no HEP's are expected. Fish will be anesthetized when drawing blood, after drawing blood fish will be killed using an overdose of anaesthesia. Before taking samples, fish will be killed using an overdose of anaesthesia.

#### **E. Humane endpoints**

May circumstances arise during the animal procedures which would require the implementation of humane endpoints to prevent further distress?

No > Continue with question F.

Yes > Describe the criteria that will be used to identify the humane endpoints.

Indicate the likely incidence.

#### **F. Classification of severity of procedures**

Provide information on the experimental factors contributing to the discomfort of the animals and indicate to which category these factors are assigned ('non-recovery', 'mild', 'moderate', 'severe'). In addition, provide for each species and treatment group information on the expected levels of cumulative discomfort (in percentages).

No other aspects other than 'mild' discomfort as described under the point '*describe which other adverse effects on the animals' welfare may be expected*' are expected during execution of the experiments.

## G. Replacement, reduction, refinement

Describe how the principles of replacement, reduction and refinement were included in the research strategy, e.g. the selection of the animals, the design of the procedures and the number of animals.

### Replacement

Little is known about the interaction between carbohydrates and their effect on digestive functioning, pH, osmolality, viscosity, DM, microbiota composition and bile acid content for yellowtail kingfish. Studying this requires a whole animal model. No replacement is possible for this complex mechanisms.

### Reduction

Multiple non-invasive experiments were done prior to the project, the reduce the amount of experimental treatments. 24 fish per experimental unit (200 g body weight at the end of each experiment) is the minimal needed for sufficient chyme collection. All other samples (besides chyme) will be taken from fish used for chyme collection.

### Refinement

The experimental diets fed to the fish are complete diets providing all necessary macro and micronutrients nutrient required for yellowtail kingfish. To reduce discomfort of fish during weighing and blood sampling, sedation/anaesthesia will be applied. For tissue and chyme sampling fish will be first killed using an overdose of benzocaine. The system allows to collect faeces using non-invasive methods.

Are adverse environmental effects expected? Explain what measures will be taken to minimise these effects.

No

Yes > Describe the environmental effects and explain what measures will be taken to minimise these effects.

## H. Re-use

Will animals be used that have already been used in other animal procedures ?

No > Continue with question I.

Yes > Explain why re-use is considered acceptable for this animal procedure.

## I. Repetition

Explain for legally required animal procedures what measures have been taken to ensure that the proposed procedures have not already been performed. If applicable, describe why duplication is required.

The experiments proposed have not been executed previously. Feasibility of this project, contribution to knowledge and the scientific merit of this research has been ensured by colleagues working in the same field and extensive literature research.

## J. Location where the animals procedures are performed

Will the animal procedures be carried out in an establishment that is not licenced by the NVWA?

No > Continue with question K.

Yes > Describe this establishment.

Provide justifications for the choice of this establishment. Explain how adequate housing, care and treatment of the animals will be ensured.



## End of experiment

### K. Destination of the animals

Will the animals be killed during or after the procedures?

No > Provide information on the destination of the animals.

Yes > Explain why it is necessary to kill the animals during or after the procedures.

The researched processes and interactions cannot be simulated outside the animal. For taking the specific tissue samples (chyme, tissue, etc.), blood and determining the body composition all 308 fish per experiment need to be killed.

Is the proposed method of killing listed in Annex IV of Directive 2010/63/EU?

No > Describe the method of killing that will be used and provide justifications for this choice.

Yes > Will a method of killing be used for which specific requirements apply?

No > Describe the method of killing.

### Overdose of anaesthesia

Yes > Describe the method of killing that will be used and provide justifications for this choice.

If animals are killed for non-scientific reasons, justify why it is not feasible to rehome the animals.

n.a.

Naam van het project	Effect van koolhydraten op de mestproductie van Geelvintonijn
NTS-identificatiecode	NTS-NL-705471 v.1
Nationale identificatiecode van de NTS <i>Veld wordt niet gepubliceerd.</i>	
Land	Nederland
Taal	nl
Indiening bij EU <i>Veld wordt niet gepubliceerd.</i>	ja
Duur van het project, uitgedrukt in maanden.	60
Trefwoorden	Geelvintonijn Mest kwaliteit Koolhydraten Water kwaliteit Verteeringskinetiek
Doel(en) van het project	Fundamenteel onderzoek: Ethologie/diergedrag/dierbiologie Omzettinggericht en toegepast onderzoek: Diervoeding

## DOELSTELLINGEN EN VERWACHTE VOORDELEN VAN HET PROJECT

Beschrijf de doelstellingen van het project (bijvoorbeeld het aanpakken van bepaalde wetenschappelijke onduidelijkheden, of wetenschappelijke of klinische behoeften).	Het uiteindelijke doel is om de mestkwaliteit (hoeveelheid en consistentie) van vissen in de aquacultuur te verbeteren doormiddel van het voer, in dit project ligt de focus op de koolhydraat fractie (zetmeel en vezels) in het voer. Met de transitie naar meer plantaardige ingrediënten in visvoerders is het belangrijk inzicht te krijgen op de invloed van koolhydraten op verteringskinetiek en mestkwaliteit. Er wordt gekeken in hoeverre geelvintonijn om kan gaan met deze koolhydraten en hoe voer gerelateerde factoren kunnen bijdragen om de mestkwaliteit en verteringskinetiek te verbeteren. Een verbeterde vertering en mestkwaliteit zal een gunstig effect hebben op afvalwaterkwaliteit. Daarnaast kunnen deze inzichten bijdragen aan een verminderd gebruik van vismeel.
Welke potentiële voordelen kan dit project opleveren? Leg uit hoe de wetenschap vooruit kan worden geholpen of mensen, dieren of het milieu uiteindelijk voordeel kunnen hebben bij het project. Maak, waar van toepassing, een onderscheid tussen voordelen op korte termijn (binnen de looptijd van het project) en voordelen op lange termijn (die mogelijk pas worden bereikt nadat het project is afgerond).	Wetenschappelijke relevantie: het onderzoek richt zich op het verkrijgen van wetenschappelijke inzichten in het effect van voeding (verschillende factoren, met focus op factoren gerelateerd aan de transitie naar meer plantaardige ingrediënten in visvoerders) op de mestkwaliteit en de verteringskinetiek. Het effect van de onderzochte factoren op de mestkwaliteit en verteringskinetiek in geelvintonijn is nog niet bekend. Maatschappelijke relevantie: de resultaten van het onderzoek kunnen leiden tot adviezen voor de voeding voor de kweek van Geelvintonijn, wat de voedingsbenutting kan bevorderen en kan bijdragen aan het ontwikkelen van duurzamere visvoerders, waaronder een minder noodzakelijk gebruik van vismeel. Daarnaast draagt het onderzoek bij aan het verbeteren van de waterkwaliteit in de viskwekerij door 1) minder mestproductie en 2) verbeterde mestkwaliteit, wat kan zorgen voor verminderd water gebruik en daardoor verminderde lozing van nutriënten in het milieu.

**VOORSPELDE SCHADE**

<p>In welke procedures worden de dieren gewoonlijk gebruikt (bijvoorbeeld injecties, chirurgische procedures)? Vermeld het aantal en de duur van deze procedures.</p>	<p>Voor het nemen van monsters van onder andere chymus en lichaamssamenstelling zullen de dieren gedood worden. Het afnemen van bloed gebeurt onder verdoving, waarna de dieren direct gedood worden (dieren komen niet meer bij). Daarnaast zullen de dieren gewogen worden onder lichte verdoving, kort vasten en verschillende diëten krijgen. Dit zal hoogstens licht ongerief met zich meebrengen.</p>				
<p>Wat zijn de verwachte gevolgen/nadelige effecten voor de dieren, bijvoorbeeld pijn, gewichtsverlies, inactiviteit/verminderde mobiliteit, stress, abnormaal gedrag, en wat is de duur van die effecten?</p>	<p>Tijdens het wegen zullen de dieren licht verdoofd zijn en tijdens het afnemen van bloed zullen ze verdoofd zijn, daarnaast worden geen nadelige effecten verwacht.</p>				
<p>Welke soorten en aantallen dieren zullen naar verwachting worden gebruikt? Wat zijn de verwachte ernstgraden en de aantallen dieren in elke ernstcategorie (per soort)?</p>	<p>Soort:</p>	<p>Totaal aantal</p>	<p>Geraamde aantallen naar ernstgraad</p>		
<p>Andere vissen (other Pisces)</p>	<p>1232</p>	<p>0</p>	<p>Licht</p> <p>1232</p>	<p>Matig</p> <p>0</p>	<p>Ernstig</p> <p>0</p>
<p>Wat gebeurt er met de dieren die aan het einde van de procedure in leven worden gehouden?</p>	<p>Soort:</p>	<p>Geraamd aantal te hergebruiken, in het habitat-/houderijsysteem terug te plaatsen of voor adoptie vrij te geven dieren</p>			
<p>Geef de redenen voor het geplande lot van de dieren na de procedure.</p>	<p>Hergebruikt</p>	<p>Teruggeplaatst</p>	<p>Geadopteerd</p>		
<p>Voor het nemen van monsters van onder andere chymus, lichaamssamenstelling en weefsels zullen de dieren gedood worden. Deze monsters kunnen alleen verkregen worden door het doden van de dieren.</p>	<p>Voor het nemen van monsters van onder andere chymus, lichaamssamenstelling en weefsels zullen de dieren gedood worden. Deze monsters kunnen alleen verkregen worden door het doden van de dieren.</p>				

## TOEPASSING VAN DE DRIE V'S

<p><b>1. Vervanging</b> Beschrijf welke diervrije alternatieven op dit gebied voorhanden zijn en waarom zij niet voor het project kunnen worden gebruikt.</p>	<p>De onderzochte processen (verteringskinetiek, etc.) zijn alleen te bestuderen in levende dieren en kunnen niet nagebootst worden buiten het dier.</p>
<p><b>2. Vermindering</b> Leg uit hoe de aantallen dieren voor dit project zijn bepaald. Beschrijf de stappen die zijn genomen om het aantal te gebruiken dieren te verminderen en de beginselen die zijn gebruikt bij het opzetten van de studies. Beschrijf, waar van toepassing, de praktijken die gedurende het hele project zullen worden toegepast om het aantal dieren die in overeenstemming met de wetenschappelijke doelstellingen werden gebruikt, tot een minimum te beperken. Deze praktijken kunnen bijvoorbeeld bestaan uit proefprojecten, computermodellen, het delen van weefsel en hergebruik.</p>	<p>De experimenten zijn zo ontworpen dat het minimale aantal proefdieren wordt gebruikt om alle essentiële analyses te kunnen uitvoeren en om tot statistisch onderbouwde resultaten te komen.</p>
<p><b>3. Verfijning</b> Geef voorbeelden van de specifieke maatregelen (bv. verscherpte monitoring, postoperatieve behandeling, pijnbestrijding, training van dieren) die in verband met de procedures moeten worden genomen om de welzijnskosten (schade) voor de dieren tot een minimum te beperken. Beschrijf de mechanismen om gedurende de looptijd van het project nieuwe verfijningstechnieken in gebruik te nemen.</p>	<p>De diëten zijn volwaardige diëten die alle nutriënten voldoende bevatten. Tijdens handelingen zijn de vissen licht verdoofd. Voorafgaand aan het nemen van samples voor lichaamssamenstelling en chymus worden de vissen eerst gedood met een overdosis anesthesie. Mest voor het bepalen van de verteerbaarheid kan gesampled worden op een niet-invasieve manier.</p>
<p>Licht de keuze van de soorten en de bijbehorende levensstadia toe</p>	<p>Geelvintonijn is een zoutwater kweekvis die zijn opkomst maakt in kweeksystemen op het land. De huidige vraag naar geelvintonijn is hoog en wordt verwacht verder toe te nemen in de toekomst. Door de waterige/slechte mestkwaliteit van geelvintonijn is de mest moeilijk te verwijderen uit water, wat de fijne deeltjes (mest) in het water en effluent verhoogd, wat kan leiden tot slechte waterkwaliteit (en omstandigheden van de vis) en hoog waterverbruik (relevantie). Daarnaast kan geelvintonijn als modeldier voor andere soorten met een slechte mestkwaliteit dienen. De vissen bevinden zich bij gebruik in het juveniele stadium (nog niet geslachtsrijp), dit is een stadium dat zeer relevant is voor de fysiologische ontwikkeling en voor onderzoekers gemakkelijk te hanteren is.</p>

**VOOR EEN BEOORDELING ACHTERAF GESELECTEERD PROJECT**

Project geselecteerd voor BA?	nee
Termijn voor BA	
<b>Reden voor de beoordeling achteraf</b>	
Bevat ernstige procedures	
Maakt gebruik van niet-menselijke primaten	
Andere reden	
Toelichting van de andere reden voor de beoordeling achteraf	

**AANVULLENDE VELDEN**

Nationaal veld 1 <i>Veld wordt niet gepubliceerd.</i>	
Nationaal veld 2 <i>Veld wordt niet gepubliceerd.</i>	
Nationaal veld 3 <i>Veld wordt niet gepubliceerd.</i>	
Nationaal veld 4 <i>Veld wordt niet gepubliceerd.</i>	
Nationaal veld 5 <i>Veld wordt niet gepubliceerd.</i>	
Startdatum project <i>Veld wordt niet gepubliceerd.</i>	
Einddatum project <i>Veld wordt niet gepubliceerd.</i>	
Goedkeuringsdatum project <i>Veld wordt niet gepubliceerd.</i>	
ICD-code 1 <i>Veld wordt niet gepubliceerd.</i>	
ICD-code 2 <i>Veld wordt niet gepubliceerd.</i>	
ICD-code 3 <i>Veld wordt niet gepubliceerd.</i>	
Link naar de eerdere versie van de NTS buiten het EC-systeem	

---

**Van:** info@zbo-ccd.nl  
**Verzonden:** donderdag 9 juni 2022 10:46  
**Aan:** 5.1 lid2h  
**Onderwerp:** Verzoek om advies over projectvergunningsaanvraag AVD 5.1 lid2h 202216106  
**Bijlagen:** 2022.W\_0006\_DAP\_2\_os.pdf; 2022.W\_0006\_PP\_3\_os.pdf; 2022.W\_0006\_PV os\_jl.pdf; 2022.W\_0006\_NTS\_os.xlsx

Geachte leden van 5.1 lid2h

De Centrale Commissie Dierproeven (hierna: CCD) verzoekt u in het kader van vergunningverlening advies te geven over het project met als titel: "Effect of carbohydrates on digestive functioning and faecal characteristics of yellowtail kingfish (*Seriola lalandi*)" en aanvraagnummer: AVD 5.1 lid2h 202216106.

Uw commissie wordt verzocht op grond van artikel 10.a.2 van de Wet op de dierproeven de aanvraag te beoordelen en een ethische toetsing uit te voeren waarbij wordt afgewogen of de doelstelling van het project, de verwachte voordelen voor mens, dier of milieu en de haalbaarheid van de doelstellingen, het gebruik van dieren en de schade die zal worden toegebracht aan de dieren in de vorm van lijden, pijn en angst kan rechtvaardigen.

Graag ontvangen wij van u bericht dat deze e-mail goed is ontvangen en wanneer u dit advies in de vergadering gaat bespreken.

Voor het in te dienen advies dient de DEC gebruik te maken van de meest actuele versie van het op de website van de CCD gepubliceerde Format DEC-advies en de toelichting daarbij. U dient deze aanvraag vertrouwelijk te behandelen. Voor de communicatie met de CCD dient u gebruik te maken van FileSecure.

De CCD verzoekt u uiterlijk binnen 20 werkdagen, na 09-06-2022, uw advies bij de CCD in te dienen. Indien de aanvraag door uw commissie niet in behandeling kan worden genomen, dient u dit per ommekeer per e-mail aan de CCD te melden.

Ingeval uw commissie tussentijds aanvullende informatie wil inwinnen bij de aanvrager wordt de termijn opgeschort en geeft u in uw advies aan wanneer dit is geweest. Opschorting van de adviestermijn vindt niet plaats ingeval u ten behoeve van uw advies een onafhankelijk extern expert raadpleegt. Mocht u verwachten door een andere reden dan opschorting uw advies later dan 20 werkdagen na 09-06-2022 bij de CCD in te dienen, dan verzoeken wij u dit direct aan de CCD te melden.

Mocht u vragen hebben, dan kunt u uiteraard contact met ons opnemen.

Met vriendelijke groet,  
Centrale Commissie Dierproeven

[www.centralecommissiedierproeven.nl](http://www.centralecommissiedierproeven.nl)

.....  
Postbus 93118 | 2509 AC | Den Haag  
.....

T: 0800 789 0789  
E: info@zbo-ccd.nl



## A. Algemene gegevens over de procedure

1. Aanvraagnummer: AVD<sup>5.1 lid2h</sup> 202216106
2. Titel van het project: Effect of carbohydrates on digestive functioning and faecal characteristics of yellowtail kingfish
3. Titel van de NTS: Effect van koolhydraten op de mestproductie van Geelvintonijn
4. Type aanvraag: Nieuwe aanvraag projectvergunning
5. Contactgegevens DEC:  
5.1 lid2h
6. Adviestraject:  
Ontvangen door DEC: 9 juni 2022  
Aanvraag compleet: Ja  
In vergadering besproken: 13 juni 2022  
Anderszins behandeld: n.v.t.  
Termijnonderbreking(en): 16 t/m 28 juni 2022  
Besluit van CCD tot verlenging van de totale adviestermijn met max. 15 werkdagen: n.v.t.  
Aanpassing aanvraag: 28 juni 2022 heeft de DEC, met beantwoording van de vragen, een nieuwe versie van de aanvraagdocumenten ontvangen.  
Advies aan CCD: 14 juli 2022
7. De Instantie voor Dierenwelzijn heeft een positief oordeel over de kwaliteit van de aanvraag uitgebracht en de DEC heeft dit in haar overweging betrokken.
8. Eventueel horen van aanvrager: tijdens de bespreking van de aanvraag tijdens de DEC-vergadering van 13-6-2022 is de aanvrager aangesloten om enkele eerste vragen te beantwoorden.
9. Correspondentie met de aanvrager: Na de DEC-vergadering van 13 juni heeft de DEC schriftelijk vragen gesteld aan de aanvrager (hieronder dik gedrukt), waarop op 28 juni antwoord is ontvangen (hieronder cursief). Beantwoording van de vragen heeft geresulteerd in een aanpassing van de aanvraag, welke de DEC ook op 28 juni ontvangen heeft.

### **a. De DEC zou graag meer informatie ontvangen over de dieetsamenstellingen, en welke afwegingen hierbij gemaakt zijn. Zijn er andere alternatieve ingrediënten overwogen (bijvoorbeeld insecten)?**

*The current project's main focus is fundamental research on the impact of different types of carbohydrates on digestive functioning, digestive kinetics and faecal characteristics in marine fish, here yellowtail. In the A experiments the focus is placed on enzymatically-digestible carbohydrates (i.e., starch) and in the B experiments the focus is placed on non-starch polysaccharides (NSP, dietary fibres). Diets will be formulated to have pure contrasts in nutrient contents, in experiment A1 this will be a contrast in starch content, in experiment B1 this will be a contrast in NSP. It is hypothesised that lowering the dietary carbohydrate content will improve faecal pellet stability. To test this hypothesis it is important to use very pure ingredients as protein source and as fat source; ingredients which provide minimal amounts of carbohydrates to the diets. This will make it possible to have carbohydrate contents in the experimental diets lower than commonly applied in fish feeds. Diets will be formulated using the following pure protein sources: soya protein concentrate, pea protein concentrate, wheat gluten, casein and fishmeal. In the experiment A1 and B1 different types of pure carbohydrates will be added to the diets having a low carbohydrate content, in order to create the desired experimental contrasts (as described in the application). A minimal amount of fishmeal will be included into the diets to be sure that the diets will have a good palatability. In other words, for a successful experiment a proper feed intake by the fish is required. Use of alternative/novel ingredients (e.g., algal meal, bacterial meal and insects) would conflict with the aim of the current project to formulate diets with as low as possible carbohydrate content, because such alternative/novel ingredients will introduce substantial amounts of carbohydrates into the diets. Another reason to choose for pure ingredients is to rule out negative impacts related to ingredients on digestive functioning (e.g. presence of anti-nutritional factors). As mentioned in the application, the obtained results of experiment A1 and B1 will be used in the formulation of the diets for experiments A2 and B2. For example to select the proper dietary carbohydrate levels for assessing the research questions addressed in experiments A2 and B2.*

**b. Kunt u daarnaast meer toelichting geven op wat de verwachtingen zijn met betrekking tot de impact van deze veranderingen in voeding op de gezondheid en welzijn van het dier? Op korte en langere termijn?**

*It is expected that the applied diets in the experiments will have no adverse, and rather positive effects on the fish. Stable faecal waste will reduce the water pollution, through less suspended solids (small particles) and less dissolved waste (ammonia, nitrite, nitrate and phosphate) and will result in a better water quality for the fish, which will contribute to better fish welfare and a reduction of the risk of health disorders. To minimize the risks of unknown and potentially adverse effects caused by the diet, very pure protein sources (see comment above) are applied in the diet formulations (without anti-nutritional factors). E.g., all of the applied protein sources have never been reported to induce any form of enteritis in fish, whereas for example higher levels of soybean meal can induce such responses in e.g. salmonids. The carbohydrate fraction, which is not fully or partially digestible can alter the gut microbiota and chyme characteristics, which is the research aim of the current experiment. It is hypothesised that the carbohydrate fraction could be responsible for the instable faeces of yellowtail. We expect that this is also true for salmon in the marine phase of their life, which similar to yellowtail, have instable faecal waste. Recently it has been observed (Horstman et al., submitted) that partially replacing a commercial diet by fresh food (sandeel, squid, krill, smelt) improved faecal stability. Yellowtail fed on those diets showed improved i.e. partially stable faecal pellets. On the longer term, the knowledge on digestive physiology/kinetics of digestion that will be obtained in this project will enable the formulation/production of fish diets that result in more stable faecal waste resulting in better water quality for fish and environment. This obtained knowledge therefore will also be valuable for other marine fish species with instable faecal waste, like salmon.*

**c. In hoeverre is het mogelijk invloed uit te oefenen door filters te verbeteren, of waterhoeveelheden aan te passen, om zo toch de feces beter uit het water te kunnen verwijderen?**

*In current culture of fish in recirculating aquaculture systems or RAS (true also for yellowtail), the drum filters used for solid removal are normally operating at a minimum mesh size of 40 µm. Application of screens with smaller mesh sizes is technically/practically not possible because these would quickly/easily get clogged. For the removal of particles smaller than 30 µm other technologies are applied, like protein skimmer and foam fractionators. However, these methods remove only particles with an electric charge. All these technologies are also applied in a company culturing yellowtail in RAS in the Netherlands. For many years (~20) these limitations of solid removal have not been fully solved, with potential negative effects on health and welfare of the fish in these systems because of sub-optimal water quality. Having stable faecal waste is an important way to improve the removal of faeces from the water and thereby enabling an improved water quality. No matter what technological improvement/breakthrough in solid removal would be available, the production of stable faeces will always be crucial to aquaculture in RAS, because of the following: Waste in the water largely originates from solids, which can settle or float and can easily be removed. Solids can disintegrate leading to the formation of suspended solids. Solid and especially suspended solids (due to larger surface to volume ratio) are an important source of dissolved waste in the water (ammonia, nitrite, nitrate and phosphate). Suspended solids and dissolved waste are important water quality parameters for fish. Currently, various cultured marine fish species (e.g., yellowtail and salmon), which are fed pelleted feeds, egest their faeces in an unstable form. At the moment of egestion, already complete disintegration of the faecal pellet occurs inside the fish tank. This means that already at the moment of egestion, the water quality is negatively affected inside the fish tank. Therefore, optimizing faecal waste stability will remain important also if technological breakthroughs would happen.*

**d. De DEC ziet graag een sterkere statistische onderbouwing voor de keuzes die zijn gemaakt in aantal dieren, aantal tanks (experimentele eenheden) en aantal replicates (herhalingen).**

*The measurements intended in the proposed experiments can be clustered in two categories: 1) those having tank as the experimental unit: performance parameters, faecal digestibility, faecal recovery, chyme characteristics and kinetics of digestion (progression of digestion), body composition, energy and nitrogen balances; 2) those having individual fish as experimental unit: blood parameters, microbiome, tissue related parameters.*

*For the focus parameters with tank as experimental unit (chyme characteristics, kinetics of digestion and faecal recovery) a power analysis was done. This power analysis was done with*



the conditions of having a difference of 10% between means of two treatments (calculated as  $\frac{|x_1 - x_2|}{\frac{x_1 + x_2}{2}} * 100$ ) tested significant with  $P=0.05$  and a power of 80% with an expected sigma of 4% of the expected means (calculated as  $\frac{\sigma}{\frac{x_1 + x_2}{2}} * 100$ ). This power analysis indicated that 3 replicates are required per treatment. Since in each of the experiments 4 treatments have been planned this leads to 12 experimental units (tank) per experiment. The total number of experimental animals used per experiment is further determined by the number of fish stocked per tank. In the current project, the minimal number of fish that is required to be stocked in the current experiments was/is determined by the measurements being done on chyme/luminal content. Per gut segment 5g of dry chyme(digesta) is needed. Based on the applied calculation in the application, this results in a minimum number of  $n=24$  fish per tank. Thus at the end of each experiment  $12 \times 24 = 288$  fish are required. For measuring energy and nitrogen balances, initial body composition needs to be determined with requires 20 fish thus in total 308 fish per experiment. In order to reduce the number of animals used, the measurements of final body composition (10 fish per tank) is done on part of the animals that are also used for chyme/digesta collection. Similarly, the fish that are sampled for blood and tissues (3 fish per tank, thus 9 per treatment) are also part of the animals that are used for chyme collection. The number of fish samples for blood etc. are also based on power analysis.

**Changes:** the following is added to 3. Statistical methods: "For the focus parameters with tank as experimental unit (chyme characteristics, kinetics of digestion and faecal recovery) a power analysis was done. This power analysis was done with the conditions of having a difference of 10% between means of two treatments (calculated as  $\frac{|x_1 - x_2|}{\frac{x_1 + x_2}{2}} * 100$ ) tested significant with  $P=0.05$  and a power of 80% with an expected sigma of 4% of the expected means (calculated as  $\frac{\sigma}{\frac{x_1 + x_2}{2}} * 100$ ). This power analysis indicated that 3 replicates are required per treatment. Since in each of the experiments 4 treatments have been planned this leads to 12 experimental units (tank) per experiment."

**e. Wat zou productie deze vissoort toevoegen aan de reeds bestaande (kweekvis)soorten? Of op grotere schaal zelfs: wat voegt dit toe ten opzichte van reeds bestaande productie van dierlijke eiwitten?**

As mentioned above, the primary focus of the project is a basic/fundamental research question investigating the effect of diet (carbohydrates) on digestion kinetics and physiology, whereby faecal quality is determined. The implications and impact of this research is not restricted to only yellowtail but is also relevant for salmon, where currently in Norway where cage culture are stimulated (forced) to collect as much as possible the solid waste originating from faeces underneath cages. In the current application, yellowtail is chosen as fish species in a project partially financed by the 5.1 lid1c and the Dutch government/EU, who wishes to stimulate the culture of yellowtail in RAS. So next to fundamental/basic aspects, the research has direct and applied aspects. Within the EU, the 5.1 lid1c is considered a benchmark company for the development of aquaculture in Europe. One of the long-term goals of the EU is to become less dependent on the import of fish, and also to achieve production of fish with minimal impact on the environment, which is considered the be one of the strengths of RAS culture. RAS specifically allows for local production and thus low transport footprint.

Yellowtail kingfish, also called yellowtail amberjack or great amberjack, is a species of the *Seriola* genus commonly cultured worldwide. Currently there are four species of this genus farmed in aquaculture. The aquaculture production of amberjack in cages has a long history. The global yearly production has been between 130.000 and 170.000 tonnes for the past years (equivalent to ~86.7 to 113.3 mil fish/year). At global level, yellowtail is not a newly cultured species, though it is newly cultured in RAS and in the Netherlands. Currently (in 2022) the production of yellowtail in the Netherlands is 1700 tonnes and is projected to be 12000 tonnes next year. When assuming a final weight of 1.5 kg (which is on the high side) this is equivalent to ~1.1 and ~8.0 mil fish/year. Yellowtail kingfish is a tuna like fish. The demand for (and culture of) yellowtail is driven by the fact that is a good alternative for tuna. Some of the benefits of the production of yellowtail kingfish in RAS is that the reproduction cycle is closed (year-round supply of juveniles), the fish is an easy to handle/robust species and suitable to keep in groups (no aggression/cannibalism). Compared to terrestrial protein sources (pig, poultry, cattle), the consumption of proteins from fish such as yellowtail can have health benefits for humans. Fish not only provides high quality protein, but is also rich in essential omega-3 long-chain poly-unsaturated fatty acids, vitamins such as B12 and micronutrients including bioavailable calcium, iron and zinc. The intake of these essential nutrients via fish consumption have positive effects among others on cerebral development, immune defence and other important physiological processes. From a circular food system approach, high quality waste streams/coproducts and novel ingredients with high protein

content (e.g., algal meals, insectmeals etc.) should preferably be used to feed fish rather than traditional terrestrial animals for providing proteins for humans, because of the high protein efficiency in fish. Knowledge and management of (faecal) waste in aquaculture is required for the transition to circular seafood production.

**f. In hoeverre kan de kennis die verworven wordt daadwerkelijk ingezet worden in de praktijk? Kan er echt een verschil gemaakt worden op locatie bij de kweker?**

*Next to the fundamental/basic aspects of the research, it is foreseen that the gained knowledge will be translated to application in practice. The practical importance of the research is demonstrated by the involvement of the Dutch yellowtail kingfish producer, and Dutch Government/EU (as mentioned above). An employee of the company is based at our University to perform this research as part of his PhD. The results of the running project are discussed (minimally) 4 times per year in project meetings with the involved researchers and the company. With the gained knowledge the company will steer and make specific requests towards their feed manufacturers regarding diet formulation and composition. Thus the project will result in improved diet formulation for yellowtail that are tailored for maintaining optimal water quality and RAS (water purification) functioning. As for other PhD projects financed by the Dutch Government/EU, the results will be made publicly available for use by others, including those growing other marine fish species (especially salmon).*

10. Eventuele adviezen door experts (niet lid van de DEC): n.v.t.

**B. Beoordeling (adviesvraag en behandeling)**

1. De DEC heeft vastgesteld dat het project vergunningplichtig is (dierproeven in de zin der wet).
2. De aanvraag betreft een nieuwe aanvraag.
3. De DEC is competent om over de aanvraag te adviseren vanuit het oogpunt van onafhankelijkheid, onpartijdigheid en beschikbare expertises.
4. DEC-leden, met het oog op onafhankelijkheid en onpartijdigheid, uitgesloten van de behandeling van de aanvraag en het opstellen van het advies: N.v.t.

**C. Beoordeling (inhoud)**

1. De DEC beoordeelt deze aanvraag als toetsbaar. De aanvraag heeft voldoende samenhang tussen de uit te voeren proeven.
2. De DEC heeft geen tegenstrijdige wetgeving, gericht op de gezondheid en welzijn van het dier of het voortbestaan van de soort, gesignaleerd die het uitvoeren van de proef in de weg kan staan.
3. De DEC acht dat de in de projectaanvraag aangekruiste doelcategorie(ën) wel aansluit(en) bij de hoofddoelstelling.

**Belangen en waarden**

4. Het directe doel omschreven in de aanvraag is: *to investigate 'Effect of carbohydrates on digestive functioning, nutrient digestibility (i.e. amount of faecal waste produced) and faecal characteristics of yellowtail kingfish (Seriola lalandi).'*  
Het uiteindelijke doel omschreven in de aanvraag is: *to improve the sustainability of yellowtail kingfish farming through the diet, by reducing the impact of the waste load on the Recirculating Aquaculture System (and the environment) and at the same time guaranteeing fish health.*  
De DEC heeft vastgesteld dat er een directe en reële relatie is tussen beide doelstellingen en dat het directe doel gerechtvaardigd is binnen de context van het onderzoeksveld. De DEC heeft tijdens de discussie wel besproken in hoeverre de intensivering van de aquacultuur überhaupt een wenselijke situatie is. Dit onderwerp komt in verschillende onderdelen van dit advies terug.
5. De belanghebbenden in het project en hun morele waarden zijn:
  - *Researcher: enable to better understand the underlying mechanisms of carbohydrates on nutrient digestion and faecal quality (recovery and production) in yellowtail kingfish*
  - *Fish farmers: Improved faecal quality and reduced quantity, leading to reduced TSS in the culture and discharge water will improve animal health and system functioning, whilst reducing water use (including less waste discharge), thereby realizing a more sustainable form of fish farming*

- *Fish consumer (human population): Improved faecal quality and quantity, consequently improving animal health, system performance and reducing environmental impact (eutrophication), is required to enable the growth of aquaculture production in a more sustainable and socially acceptable way.*
  - *Fish: reduced TSS in the culture water can lead to improved system functioning and better water quality for the fish, safeguarding fish health (welfare). In addition, the nutrition (or the impact of the diet on the fish) can be improved by studying the effect on the digestion kinetics.*
  - *Experimental animals: The experimental animals used during this project will have no benefit in this project. Mild discomfort*
  - *Environment: improved waste management can reduce the impact on the environment (i.e. eutrophication) and water use. Improving the nutrient efficiency in the diets (digestibility) will also reduce the pressure (amount) on resources.*
6. Voor zover de DEC dat kan inschatten is er geen aanleiding om de in de aanvraag beschreven effecten op het milieu in twijfel te trekken.

#### Proefopzet en haalbaarheid

7. De DEC heeft vastgesteld dat de kennis en kunde van de onderzoeksgroep en andere betrokkenen bij de dierproeven, afgaande op het geschreven voorstel en het oordeel van de IvD, wel voldoende gewaarborgd zijn.
8. De DEC beoordeelt dat dit project goed opgezet is. Vragen die de DEC had over het project zijn naar tevredenheid beantwoord (zie ook C9).

#### Welzijn dieren

9. Er is sprake is van de volgende bijzondere categorie(ën) van dieren, omstandigheden of behandeling van de dieren:
- Bedreigde diersoort(en) (10e, lid 4)
  - Niet-menselijke primaten (10e)
  - Dieren in/uit het wild (10f)
  - Niet gefokt voor dierproeven (11, bijlage I richtlijn)
  - Zwerfdieren (10h)
  - Hergebruik (1e, lid 2)
  - Locatie: buiten instelling vergunninghouder (10g)
  - Geen toepassing verdoving/pijnbestrijding (13)
  - Dodingsmethode niet volgens bijlage IV richtlijn (13c, lid 3)
- De keuze hiervoor is realistisch ingeschat en geclassificeerd.
10. De dieren worden gehuisvest en verzorgd op een wijze die niet voldoet aan de eisen die zijn opgenomen in bijlage III van richtlijn 2010/63/EU.
11. De DEC schat in dat de cumulatieve inschatting van ongerief realistisch is ingeschat en geclassificeerd.
12. Naast het proefgerelateerd ongerief is er sprake van aantasting van integriteit van het dier anders dan als gevolg van de proefbehandelingen. Het gaat hierbij om de aanpassing van het dieet van een vleeseter tot een gedeeltelijk plantaardig dieet. Het was de DEC in eerste instantie onduidelijk of het dieet geheel of gedeeltelijk plantaardig zou zijn, na het stellen van vragen heeft de aanvrager die nader toegelicht.
13. De DEC heeft vastgesteld dat de criteria voor humane eindpunten goed zijn gedefinieerd en dat goed is ingeschat welk percentage van de dieren een humaan eindpunt zal bereiken.

#### 3V's

14. De DEC beoordeelt dat de aanvrager voldoende aannemelijk heeft gemaakt dat er geen geschikte vervangingsalternatieven zijn.
15. De DEC schat in, na nadere uitleg van de aanvrager, dat het aantal te gebruiken dieren realistisch is ingeschat.
16. De projectaanvraag is voldoende in overeenstemming met de vereiste verfijning van dierproeven en het project is zodanig opgezet dat de dierproeven zo humaan mogelijk kunnen worden uitgevoerd.
17. Er is geen sprake van wettelijk verplicht onderzoek; de vraag over duplicatie is niet van toepassing.

Dieren in voorraad gedood en bestemming dieren na afloop proef

18. De dieren worden van beide geslachten in gelijke mate ingezet in de proeven.
19. Er worden dieren gedood in het kader van het project.
20. Er is geen sprake van herplaatsing of hergebruik.

NTS

21. De NTS is naar het oordeel van de DEC een evenwichtige weergave van het project, begrijpelijk geformuleerd en voldoet dit aan de vereisten in de herziene Wod Art. 10.a.1.7.

#### **D. Ethische afweging**

1. De centrale morele vraag van het project is: Is het gebruik van 1232 vissen met licht ongerief en dood gerechtvaardigd teneinde informatie te verzamelen om de vissen in praktijk te voeren met een (hoofdzakelijk) plantaardig dieet met toevoegingen, dat minder vervuiling geeft van het gebruikte water en zo duurzamer zou zijn?
2. De DEC constateert dat het hier gaat om een aanvraag met voldoende samenhang. De DEC heeft haar afweging gemaakt na de volgende schade baten analyse:  
Er is licht ongerief voor 1232 dieren, maar de dieren worden gedood in het kader van de proef (basaal belang). De integriteit wordt geschaad door een voer te geven dat afwijkt van het natuurlijke voer voor deze dieren (serieus belang). De baten zijn hier vooral economisch. De yellowtail kingfish is commercieel interessant omdat het een high-end niche markt bedient, aldus medegedeeld door een visexpert binnen de DEC (perifeer belang). Verder wordt er mogelijk kennis verzameld die van belang zou kunnen zijn voor de sector (onzeker: perifeer belang).
3. Het antwoord op de centrale morele vraag is:  
Het antwoord op de morele vraag is deze keer niet eenduidig voor de gehele DEC. Dit is uitgebreid besproken in de DEC-vergadering, wat geresulteerd heeft in het volgende: de meerderheid van de DEC-leden kan de centrale morele vraag met 'ja' beantwoorden. Een minderheid van drie leden kon zich hier niet in vinden en namens hen is onder E2 een minderheidsstandpunt geformuleerd.

#### **E. Advies**

1. Advies aan de CCD:  
De meerderheid van de DEC adviseert de CCD het project te vergunnen.
2. Het uitgebrachte advies is niet gebaseerd op consensus. De meerderheid van de DEC: uit de antwoorden blijkt, dat goed over het project is nagedacht en biedt zeker sterke mogelijkheden tot uitbreiding van onze kennis betreffende diersoort overschrijdende kennis van (verterings)fysiologie. Natuurlijk is het risico dat een dergelijk project bijdraagt aan een ongewenste nieuwe intensieve dierlijke productie nooit uit te sluiten, maar kan zeker ook bijdragen aan een structurele verbetering van bestaande intensieve visteelten.

Namens een drietal DEC-leden volgt hier het minderheidsstandpunt:

Het antwoord op de morele vraag is dat dit onderzoek niet moreel te rechtvaardigen is. De onderbouwing hiervoor is als volgt:

Ten eerste: Een algemene zorg: de huidige ontwikkeling in de aquacultuur lijkt er een te zijn van toenemende intensivering en instrumentalisering van de houderij en het dier.

Worden hier niet dezelfde fouten gemaakt als in het verleden bij de intensieve veehouderij?

Ten tweede: Het belang van het kweken van de Yellow tail kingfish is esthetisch (smaakvol product) en commercieel en gericht op een high-end niche markt. Het draagt als zodanig weinig bij aan de voedselvoorziening met dierlijke (vis) eiwitten. Er zijn al voldoende alternatieven hiervoor bij andere vissoorten. (Het discussiepunt hoe noodzakelijk dat überhaupt is voor de voedselvoorziening is hieronder nog als buiten de context opmerking opgenomen.)

Ten derde: Aan de carnivore vis wordt een met kunstmatige toevoegingen bewerkt voer gevoerd. De vis wordt, door het eten van een dieet dat voor dat voor de vis geen natuurlijke samenstelling heeft, gedwongen zich aan te passen aan het systeem dat de feces van een meer plantaardig voer zonder toevoegingen niet goed kan verwerken. Dit is een aantasting van de intrinsieke waarde en integriteit van het dier.

Kortom: Het draait hier om een aantasting van de integriteit van het dier, waarvoor de belangrijkste rechtvaardiging een esthetisch en commercieel belang is. Dit is daarom een voorbeeld van (niet noodzakelijke) instrumentalisering en vertechnisering in de dierhouderij, die in deze tijd steeds meer als moreel ongewenst wordt gezien, en volgens de mening van een minderheid (drie leden) van de DEC ook moreel onjuist is.

3. Tijdens het beoordelen van de aanvraag en het opstellen van het advies, zijn de volgende dilemma's of knelpunten naar voren gekomen:
  - Buiten de context: is het kweken van dieren voor consumptie überhaupt nog te verantwoorden?



Centrale Commissie Dierproeven

## Form Project proposal

- This form should be used to write the project proposal for animal procedures.
- The appendix 'description animal procedures' is an appendix to this form. For each type of animal procedure, a separate appendix 'description animal procedures' should be enclosed.
- For more information on the project proposal, see the Guidelines to the project licence application form for animal procedures on our website ([www.centralecommissiedierproeven.nl](http://www.centralecommissiedierproeven.nl)).
- Or contact us by phone (0900-2800028).

### 1 General information

- |     |  |   |
|-----|--|---|
| 1.1 | Provide the approval number of the 'Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority'. | 5.1 lid2h   |
| 1.2 | Provide the name of the licenced establishment.  | 5.1 lid2h   |
| 1.3 | Provide the title of the project.  | Effect of carbohydrates on digestive functioning and faecal characteristics of yellowtail kingfish ( <i>Seriola lalandi</i> ) |

### 2 Categories

- |     |   |  |
|-----|---|--|
| 2.1 | Please tick each of the following boxes that applies to your project. | <input checked="" type="checkbox"/> Basic Research   |
|     |   | <input checked="" type="checkbox"/> Translational or applied research  |
|     |   | <input type="checkbox"/> Regulatory use of routine production  |
|     |   | <input type="checkbox"/> Research into environmental protection in the interest of human or animal health or welfare |
|     |   | <input type="checkbox"/> Research aimed at preserving the species subjected to procedures                            |
|     |   | <input type="checkbox"/> Higher education or training  |
|     |   | <input type="checkbox"/> Forensic enquiries  |
|     |   | <input type="checkbox"/> Maintenance of colonies of genetically altered animals not used in other animal procedures  |

## 3 General description of the project

### 3.1 Background

Describe the project (motivation, background and context) with respect to the categories selected in 2.1.

---

#### Background

Currently, land-based aquaculture is mainly dominated by freshwater species, but marine species are gaining importance (FAO, 2018). One of these marine fish species is yellowtail kingfish (*Seriola lalandi*). Yellowtail kingfish is mainly produced in sea cages in countries like Australia, New Zealand, Spain, Mexico, Japan and Chile (Moran et al., 2009; Soriano et al., 2018). However, more and more efforts are being made to shift the production of yellowtail kingfish in recirculation aquaculture systems (RAS) (e.g. Denmark, Germany, The Netherlands and United States of America) (EUMOFA, 2020). The advantage of a RAS is that waste water can be treated to (partly) remove solid waste and dissolved nutrients from the system and effluent water, allowing the reuse of the water. In literature it is mentioned that the waste discharge from a RAS can be substantially reduced by the factor 100 compared to a classic flow-through system (Amirkolaie, 2011). One of the challenges of farming yellowtail kingfish in RAS is the watery quality of their faeces, due to instable consistency and fine faecal particles. The absence of stable/solid faecal pellets makes it difficult to remove the solid faecal matter from the water, and can result in high concentrations of total suspended solids (TSS) in the RAS and effluent water (Moran et al., 2009). TSS are known to affect animal performance and health, system functioning and environmental eutrophication (Brinker et al., 2005; Brinker and Rösch, 2005; Chen et al., 1999; Moccia et al., 2007; Reid et al., 2009; Schumann et al., 2016; Timmons et al., 2018). Regarding animal performance and health, increasing TSS in the system water may lead to an impaired physiological functioning of the gills, resulting in a reduced oxygen uptake through the gills (observed in juvenile green grouper; Au et al., 2004). On system level, TSS might lead to a suboptimal system functioning (Chen et al., 1993; Schumann et al., 2016; Timmons et al., 2018). High organic loads, as a result of faecal waste, cause an increase in heterotrophic bacterial growth in the biofilter, outcompeting nitrifying bacteria (Schumann et al., 2016; Timmons et al., 2018). Therefore, the biofilter efficiency will be reduced, resulting in increasing ammonia concentrations in the water (Chen et al., 1993; Timmons et al., 2018; Unger and Brinker, 2013). In relation to the environment, discharging water with a high concentration of TSS (nutrient rich) will cause eutrophication and destroys ecosystems of receiving water bodies. Moreover, removing TSS from the system water will as well allow more reuse of water (Amirkolaie, 2011; Moran et al., 2009). Thus, the removal of solids is a key factor in the success of a RAS operation, because of its potential impact on animal performance and health, system functioning, and environmental eutrophication (Amirkolaie, 2011; Brinker et al., 2005; Brinker and Rösch, 2005b; Chen et al., 1993; Fernandes and Tanner, 2008; Schumann et al., 2016; Unger and Brinker, 2013). In RAS operations, solid removal techniques are mostly based on sedimentation and/or filtration. While sedimentation efficiency is mainly determined by faecal particle size and density, filtration efficiency is mainly determined by the particle size and stability (Moccia et al., 2007; Timmons et al., 2018). When particles are too small to settle or to be captured by filtration, they will remain suspended in the water column (Unger and Brinker, 2013). Accordingly, the particles might break down or even further dissolve due to water absorption, shear forces or biological degradation, hindering their removal (Brinker et al., 2005; Unger and Brinker, 2013). Waste management issues could be controlled by reducing the faecal quantity (through improved digestion) or improving the faecal quality (higher and faster removal rate) (Amirkolaie, 2011).

#### Problem statement

The demand for aquaculture and fishery products for human consumption increased by 21.2 million tonnes (16.3%) from 2011 to 2016, due to an increased human population and increased consumption per capita (FAO, 2020). During the past years, the increase in aquaculture production was mainly responsible to meet the increasing demand, since the total fisheries production stagnated (FAO, 2020). This increased aquaculture production goes along with an increasing demand of aquafeeds. Historically, pelleted diets for aquaculture contain fish meal. However, due to the limited availability of fish meal, a shift in the production of aquafeeds to more plant-based diets took place over the past decades (Staessen et al., 2020a). Moreover, pelleted aquafeeds are

nowadays produced by extrusion. This has many advantages such as an improved pellet quality. However, for the production of aquafeeds by extrusion starch needs to be included (8-12%) to maintain the structural integrity of the pellet (Romano and Kumar, 2019). Therefore, both the shift to more plant-based diets and the use of pelleted aquafeeds go along with an increasing carbohydrate (starch, sugar and NSP) inclusion within the diets for yellowtail kingfish. This inclusion of carbohydrate inclusion can affect the faecal waste management by 1) altering the nutrient digestibility (faecal quantity) and/or 2) faecal characteristics (faecal quality) (Meriac et al., 2014; Schneider et al., 2004; Staessen et al., 2020a).

According to literature, the amount of faecal waste produced can be influenced by the carbohydrate content of the diet (Meriac et al., 2014; Staessen et al., 2020a). Therefore, it is expected that an improved carbohydrate digestibility will result in a reduced faecal quantity (especially in carnivorous fish like yellowtail kingfish). This will result in a reduced amount of TSS (Kokou and Fountoulaki, 2018), ultimately positively affecting the animal health, system performance and environmental eutrophication (Brinker et al., 2005; Brinker and Rösch, 2005a; Chen et al., 1999; Moccia et al., 2007a; Reid et al., 2009; Schumann et al., 2016; Timmons et al., 2018). Factors which might lead to an increased digestibility (reduction of faecal waste) are 1) bile acid supplementation and 2) enzyme supplementation. Fish meal contains bile acids, while those are absent in plant ingredients (Staessen et al., 2020a). Bile acids and its precursors taurine and cholesterol are important factors in nutrient digestion processes (Sinha et al., 2011; Staessen et al., 2020b, 2020a) and thus faecal waste production. It is hypothesized that dietary supplementation with bile acids will improve nutrient digestibility. Compared to other monogastric animals, studies on fish using amylase and NSP-degrading enzymes are limited (Zheng et al. 2020). It has been shown that the endogenous amylase activity of yellowtail kingfish is relatively low compared to other fish species (Chen et al., 2006), thus being less able to digest starch. Therefore, it is hypothesized that dietary enzyme supplementation (amylase) may improve nutrient digestibility.

Besides an effect of carbohydrates on faecal quantity, it was shown by studies with Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*), rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and white sturgeon (*Acipenser transmontanus*) that the carbohydrate content within the diet can as well influence the faecal characteristics (Brinker and Friedrich, 2012; Hung et al., 1990; Meriac et al., 2014). For yellowtail kingfish, an instable faecal waste production has been observed by yellowtail kingfish farmers. However, detailed information on factors affecting faecal waste characteristics are absent from published literature for yellowtail kingfish. According to literature, instable faecal waste can be due to the presence of carbohydrates in the gastro intestinal tract (GIT), as they can affect the osmolality, water reabsorption and fermentation processes (Hung et al., 1990; Sinha et al., 2011; Tran-Tu et al., 2018) and thus the faecal waste characteristics/stability. Moreover, carnivorous fish like yellowtail kingfish have a more limited capacity for starch digestion and lower tolerance for free sugars compared to omnivorous fish like carp. The breakdown of starch and degradation of NSP and uptake of free sugars in the intestine (e.g. location and speed) is affected by multiple dietary factors (Hemre et al., 2002). Also factors like feeding frequency can affect how well fish deal with carbohydrates, for example when a lot of feed and thus starch is given at once, this may result in exceeding the capacity of the GIT to handle sugars compared to feeding the same amount spread over a longer time period. It could be that the instable quality of faeces observed in YTK is affected by the amount of free sugars, as the capacity of the GIT to handle may be limited. It is expected that enzymes (targeting starch and NSP) or bile acid supplementation reduce the amount of faeces, but might at the same time improve the quality of faeces. Ultimately, this would result in a reduced amount of TSS load in the system water, positively affecting the animal health, system performance and environmental eutrophication. Therefore, the effect of carbohydrates on digestion kinetics and faecal characteristics are of high relevance. The current project aims to gain insight in the effect of 1) starch and, 2) NSP on digestion kinetics and faecal characteristics and moreover, studies factors that potentially influence the effect of starch and NSP. Two experiments will focus on the effect of starch (experiment A1 and A2) and two experiments will focus on the effect of NSP (experiment B1 and B2).

### **Experiment A1 and A2**

A previous experiment with yellowtail kingfish showed that yellowtail kingfish are less well able to digest starch compared to other species like rainbow trout, European sea bass or Nile tilapia (Burel et al., 2000; Krogdahl et al., 2004; Maas et al., 2019; Peres and Oliva-Teles, 2002). Furthermore, it was shown that high levels of dietary starch reduced the overall digestibility of the diets, increasing the waste production. In regard to the faecal quality, fish fed the diets containing low levels of starch excreted faecal pellets and short strings, which was not observed at the diets containing high levels of starch. It is therefore hypothesized that there is an optimum starch level regarding faecal



recovery. Experiment A1 investigates the effect of starch level and amylase supplementation on the digestion kinetics and faecal characteristics. Experiment A2 investigates the effect of starch type and feeding frequency on the digestion kinetics and faecal characteristics.

### **Experiment B1 and B2**

Literature shows that increasing levels of NSP can increase faecal bile acid losses and its deconjugation. Bile acids and its precursors taurine and cholesterol are important factors in the nutrient digestion processes (in particular fat digestion) (Sinha et al., 2011; Staessen et al., 2020a, 2020b) and thus faecal waste production (amount) and faecal waste composition, which may affect the faeces recovery (quality). According to literature, increasing levels of NSP can affect the digesta viscosity, affecting the mixing of digestive enzymes. In addition, NSP may affect the gut morphology (increased chyme viscosity and binding of water, which can interfere with enzyme functionality and water secretion/absorption and also carbohydrates can bind bile acids, therefore altering the enterohepatic bile acid cycling) and physiology (due to the lower NSP digestibility than protein and fat, the bulk of the chyme will increase, which may alter the size and length of digestive organs and the turnover of intestinal mucosal cells), both effects of NSP may alter the digestion kinetics. Experiment B1 investigates the effect of NSP level and bile acid supplementation on the digestion kinetics and faecal characteristics. Experiment B2 investigates the effect of feeding level and exogenous NSP-degrading enzymes on the digestion kinetics and faecal characteristics.

### **Key publications**

- Amirkolaie, A.K., 2011. Reduction in the environmental impact of waste discharged by fish farms through feed and feeding. *Rev. Aquac.* 3, 19–26. <https://doi.org/10.1111/j.1753-5131.2010.01040.x>
- Au, D.W.T., Pollino, C.A., Wu, R.S.S., Shin, P.K.S., Lau, S.T.F., Tang, J.Y.M., 2004. Chronic effects of suspended solids on gill structure, osmoregulation, growth, and triiodothyronine in juvenile green grouper *Epinephelus coioides*. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 266, 255–264. <https://doi.org/10.3354/meps266255>
- Brinker, A., Friedrich, C., 2012. Fish meal replacement by plant protein substitution and guar gum addition in trout feed. Part II: Effects on faeces stability and rheology. *Biorheology* 49, 27–48. <https://doi.org/10.3233/BIR-2012-0605>
- Brinker, A., Koppe, W., Rösch, R., 2005. Optimised effluent treatment by stabilised trout faeces. *Aquaculture* 249, 125–144. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2004.12.029>
- Brinker, A., Rösch, R., 2005. Factors determining the size of suspended solids in a flow-through fish farm. *Aquac. Eng.* 33, 1–19. <https://doi.org/10.1016/j.aquaeng.2004.10.003>
- Burel, C., Boujard, T., Tulli, F., Kaushik, S.J., 2000. Digestibility of extruded peas, extruded lupin, and rapeseed meal in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and turbot (*Psetta maxima*). *Aquaculture* 188, 285–298. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(00\)00337-9](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(00)00337-9)
- Chen, B.N., Qin, J.G., Kumar, M.S., Hutchinson, W.G., Clarke, S.M., 2006. Ontogenetic development of digestive enzymes in yellowtail kingfish *Seriola lalandi* larvae. *Aquaculture* 260, 264–271. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2006.06.021>
- Chen, S., Timmons, M.B., Aneshansley, D.J., Bisogni, J.J., 1993. Suspended solids characteristics from recirculating aquacultural systems and design implications. *Aquaculture* 112, 143–155. [https://doi.org/10.1016/0044-8486\(93\)90440-A](https://doi.org/10.1016/0044-8486(93)90440-A)
- Chen, Y.S., Beveridge, M.C.M., Telfer, T.C., 1999. Settling rate characteristics and nutrient content of the faeces of Atlantic salmon, *Salmo salar* L., and the implications for modelling of solid waste dispersion. *Aquac. Res.* 30, 395–398. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2109.1999.00334.x>
- EUMOFA, 2020. Recirculating Aquaculture Systems. <https://doi.org/10.2771/66025>
- FAO, 2020. The State of World Fisheries and Aquaculture 2020., Sustainability in action. Rome. <https://doi.org/10.4060/ca9229en>
- FAO, 2018. The State of World Fisheries and Aquaculture 2018 - Meeting the sustainable development goals.
- Hemre, G.I., Mommsen, T.P., Krogdahl, Å., 2002. Carbohydrates in fish nutrition: Effects on growth, glucose metabolism and hepatic enzymes. *Aquac. Nutr.* 8, 175–194. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2095.2002.00200.x>
- Hung, S.S.O., Groff, J.M., Lutes, P.B., Fynn-Aikins, F.K., 1990. Hepatic and Intestinal Histology of Juvenile White Sturgeon Fed Different Carbohydrates. *Aquaculture Volume* 87, 349–360. [https://doi.org/10.1016/0044-8486\(90\)90072-U](https://doi.org/10.1016/0044-8486(90)90072-U)
- Kokou, F., Fountoulaki, E., 2018. Aquaculture waste production associated with antinutrient presence in common fish feed plant ingredients. *Aquaculture* 495, 295–310. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2018.06.003>
- Krogdahl, Å., Sundby, A., Olli, J.J., 2004. Atlantic salmon (*Salmo salar*) and rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) digest and metabolize nutrients differently. Effects of water salinity and dietary starch level. *Aquaculture* 229, 335–360. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(03\)00396-X](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(03)00396-X)
- Maas, R.M., Verdegem, M.C.J., Schrama, J.W., 2019. Effect of non-starch polysaccharide composition and enzyme supplementation on growth performance and nutrient digestibility in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Aquac. Nutr.* 25, 622–632. <https://doi.org/10.1111/anu.12884>
- Meriac, A., Eding, E.H., Schrama, J., Kamstra, A., Verreth, J.A.J., 2014. Dietary carbohydrate composition can change waste production and biofilter load in recirculating aquaculture systems. *Aquaculture* 420–421, 254–261. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2013.11.018>

- Moccia, R., Bevan, D., Reid, G., 2007. Composition of feed and fecal waste from commercial trout farms in Ontario: physical characterization and relationship to dispersion and depositional modelling. *Aquaculture*.
- Moran, D., Pether, S.J., Lee, P.S., 2009. Growth, feed conversion and faecal discharge of yellowtail kingfish (*Seriola lalandi*) fed three commercial diets. *New Zeal. J. Mar. Freshw. Res.* 43, 917–927. <https://doi.org/10.1080/00288330909510050>
- Peres, H., Oliva-Teles, A., 2002. Utilization of raw and gelatinized starch by European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) juveniles. *Aquaculture* 205, 287–299. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(01\)00682-2](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(01)00682-2)
- Reid, G.K., Liutkus, M., Robinson, S.M.C., Chopin, T.R., Blair, T., Lander, T., Mullen, J., Page, F., Moccia, R.D., 2009. A review of the biophysical properties of salmonid faeces: Implications for aquaculture waste dispersal models and integrated multi-trophic aquaculture. *Aquac. Res.* 40, 257–273. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2008.02065.x>
- Romano, N., Kumar, V., 2019. Starch gelatinization on the physical characteristics of aquafeeds and subsequent implications to the productivity in farmed aquatic animals. *Rev. Aquac.* 11, 1271–1284. <https://doi.org/10.1111/raq.12291>
- Schneider, O., Amirkolaie, A.K., Vera-Cartas, J., Eding, E.H., Schrama, J.W., Verreth, J.A.J., 2004. Digestibility, faeces recovery, and related carbon, nitrogen and phosphorus balances of five feed ingredients evaluated as fishmeal alternatives in Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* L. *Aquac. Res.* 35, 1370–1379. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2004.01179.x>
- Schumann, M., Unger, J., Brinker, A., 2016. Floating faeces: Effects on solid removal and particle size distribution in RAS. *Aquac. Eng.* 78, 75–84. <https://doi.org/10.1016/j.aquaeng.2016.10.007>
- Sinha, A.K., Kumar, V., Makkar, H.P.S., De Boeck, G., Becker, K., 2011. Non-starch polysaccharides and their role in fish nutrition - A review. *Food Chem.* 127, 1409–1426. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.02.042>
- Soriano, E.L., Ramírez, D.T., Araujo, D.R., Gómez-Gil, B., Castro, L.I., Sánchez, C.G., 2018. Effect of temperature and dietary lipid proportion on gut microbiota in yellowtail kingfish *Seriola lalandi* juveniles. *Aquaculture* 497, 269–277. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2018.07.065>
- Staessen, T.W.O., Verdegem, M.C.J., Koletsi, P., Schrama, J.W., 2020a. The effect of dietary protein source (fishmeal vs. plant protein) and non-starch polysaccharide level on fat digestibility and faecal bile acid loss in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquac. Res.* 51, 1170–1181. <https://doi.org/10.1111/are.14467>
- Staessen, T.W.O., Verdegem, M.C.J., Weththasinghe, P., Schrama, J.W., 2020b. The effect of dietary non-starch polysaccharide level and bile acid supplementation on fat digestibility and the bile acid balance in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture* 523, 735174. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2020.735174>
- Timmons, M.B., Guerdat, T., Brian, V.J., 2018. *Recirculating aquaculture*, 4th Edition.
- Tran-Tu, L.C., Hien, T.T.T., Bosma, R.H., Heinsbroek, L.T.N., Verreth, J.A.J., Schrama, J.W., 2018. Effect of ingredient particle sizes and dietary viscosity on digestion and faecal waste of striped catfish (*Pangasianodon hypophthalmus*). *Aquac. Nutr.* 24, 961–969. <https://doi.org/10.1111/anu.12632>
- Unger, J., Brinker, A., 2013. Floating feces: A new approach for efficient removal of solids in aquacultural management. *Aquaculture* 404–405, 85–94. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2013.04.015>

## 3.2 Purpose

3.2.1 Describe the project's immediate and ultimate goals. Describe to which extent achieving the project's immediate goal will contribute to achieving the ultimate goal.

- If applicable, describe all subobjectives

The overall research objective of the present project is to investigate 'Effect of carbohydrates on digestive functioning, nutrient digestibility (i.e. amount of faecal waste produced) and faecal characteristics of yellowtail kingfish (*Seriola lalandi*).' The ultimate goal is to improve the sustainability of yellowtail kingfish farming through the diet, by reducing the impact of the waste load on the Recirculating Aquaculture System (and the environment) and at the same time guaranteeing fish health.

The research is both fundamental and translational and applied. It is expected that the outcome of this project contributes to the following immediate goals.

(1) reduce the total waste load by improving the faecal quality (recovery), by:

- studying the effect of both starch and non-starch-polysaccharides on faecal quality
- studying ways to mitigate the effect of both starch and non-starch polysaccharides on faecal quality

(2) reduce the total waste production (improving digestibility) by:

- studying the effect of starch and non-starch polysaccharides on nutrient digestibility and digestion kinetics
- studying ways to mitigate the effect of both starch and non-starch polysaccharides on nutrient digestibility and digestion kinetics.

This all contributes to the overall aim of allowing the transition for more plant-based-diets when farming yellowtail kingfish.

3.2.2 Provide a justification for the project's feasibility.

---

The experiments will be carried out in the designated research facilities, where the staff has long experience in aquacultural nutrition and fish husbandry. Experimental work and laboratory analysis will be conducted in designated laboratories. Previous experiments with yellowtail kingfish in this research facility and unit were performed successfully and all experimental procedures are common (standardized) for the research facilities and the involved researchers, minimizing the possibility of failure. During this project, people with different academic expertise (microbiota, nutrition and RAS) are involved, ensuring relevant expertise prior to this project application.

3.2.3 Are, for conducting this project, other laws and regulations applicable that may affect the welfare of the animals and/or the feasibility of the project?  No  Yes > Describe which laws and regulations apply and describe the effect on the welfare of the animals and the feasibility of the project.

---

### 3.3 Relevance

3.3.1 What is the scientific and/or social relevance of the objectives described above?

---

Scientific relevance: Investigating the digestion mechanisms of starch and NSP will enable to better understand the underlying mechanisms of carbohydrates on nutrient digestion and faecal quality (recovery and production). Additionally, obtained knowledge on the effects of carbohydrate on nutrient digestibility and faecal quality might create opportunities in different finfish species with poor quality faeces (e.g. salmon).

Social relevance: the results of the study will ultimately lead to a reduced amount of TSS in the system and effluent water of RAS improving, allowing an increased inclusion of plant-based ingredients in feed formulation for yellowtail kingfish farming. Both improved waste management and safeguarding fish health through feed formulation for yellowtail kingfish farming will improve the sustainability of the yellowtail kingfish farming. This can have a positive view of society for aquaculture.

3.3.2 Who are the project's stakeholders? Describe their specific interests.

---

- Researcher: enable to better understand the underlying mechanisms of carbohydrates on nutrient digestion and faecal quality (recovery and production) in yellowtail kingfish
- Fish farmers: Improved faecal quality and reduced quantity, leading to reduced TSS in the culture and discharge water will improve animal health and system functioning, whilst reducing water use (including less waste discharge), thereby realizing a more sustainable form of fish farming
- Fish consumer (human population): Improved faecal quality and quantity, consequently improving animal health, system performance and reducing environmental impact (eutrophication), is required to enable the growth of aquaculture production in a more sustainable and socially acceptable way.
- Fish: reduced TSS in the culture water can lead to improved system functioning and better water quality for the fish, safeguarding fish health (welfare). In addition, the nutrition (or the impact of the diet on the fish) can be improved by studying the effect on the digestion kinetics.
- Experimental animals: The experimental animals used during this project will have no benefit in this project.
- Environment: improved waste management can reduce the impact on the environment (i.e. eutrophication) and water use. Improving the nutrient efficiency in the diets (digestibility) will also reduce the pressure (amount) on resources.

### 3.4 Strategy

3.4.1 Provide an overview of the overall design of the project (strategy). If applicable, describe the different phases in the project, the coherence, the milestones, selection points and decision criteria.

---

The experiments are designed to cover the overall aim as described in section 3.2 to evaluate the effect of carbohydrates on digestive functioning and waste characteristics, with the focus on reducing the waste produced (amount) and faecal stability (increasing recovery). The experiments A1 and A2 will focus on the effect of starch and the experiments B1 and B2 will focus on the effect of NSP on digestive functioning. All experiments consist of a feeding trial which are performed according to a comparable setup, whereby the samples taken and animal procedures will be comparable. The experiments will differ in their dietary treatment.

#### Experiment A1:

The first experiment aims at evaluating the effect of starch level, amylase supplementation and their combination on digestive functioning (e.g. viscosity, dry matter content, osmolality, bile acid loss) and faecal waste characteristics. Four experimental diets will be formulated according to a 2 × 2 factorial design. The first factor investigated will be starch level, where diets will be formulated to have contrasting starch levels. The second factor will be the supplementation with or without amylase in the experimental diet. The experiment allows to test the effect of starch level on the measured parameters (described below) and the effect of amylase to improve the breakdown and digestibility of starch, to mitigate the negative effects of starch on faecal waste production and faecal quality.

#### Experiment A2:

Based on the information gathered from experiment A1, a diet which will be optimal (sensitive) for assessing the effect of feeding frequency and starch type on digestive functioning will be formulated. The experiment aims to evaluate the effect of dietary starch type, feeding frequency and their combination on digestive functioning (e.g. viscosity, dry matter content, osmolality, bile acid loss) and faecal waste characteristics. Four experimental diets will be formulated according to a 2 × 2 factorial design. The first factor is dietary starch type, where two diets will be formulated to have comparable levels of starch but different in type (either through processing or ingredient choice). The second factor will be feeding frequency, whereby the diets will be either fed by hand twice a day or more frequently/constantly (e.g. with a belt feeder). Both treatments are expected to have an effect on the digestion kinetics of starch and thus alter chyme characteristics and ultimately faecal characteristics (amount of faeces through digestibility).

#### Experiment B1:

The second experiment aims at evaluating the effect of NSP level, bile acid supplementation and their combination to test their effect on digestive functioning (e.g. nutrient digestibility, viscosity, dry matter content, osmolality and bile acid loss) and faecal waste characteristics. Four experimental diets will be formulated according to a 2 × 2 factorial design. The first factor investigated will be NSP level, formulating two diets contrasting in NSP level. The second factor investigated will be the supplementation with or without bile acids. With the NSP level, the focus is in particular the effect on bile metabolism (and the associated fat digestibility). While with the bile acid supplementation it is investigated whether the effect of NSP on bile loss can be mitigated (improving fat digestibility). Both the NSP level and the bile supplementation are expected to alter the faeces characteristics (through both NSP level and fat digestibility).

#### Experiment B2:

Based on the information gathered from experiment B1, a diet which will be optimal (sensitive) for assessing the effect of NSP inclusion and enzyme supplementation on digestive functioning will be formulated. This experiment aims at evaluating the feeding level, the supplementation of NSP-degrading enzymes, and their combination to test their effect on digestive functioning (e.g. nutrient digestibility, viscosity, dry matter content, osmolality and bile acid loss) and faecal waste characteristics. Four experimental diets will be formulated according to a 2 × 2 factorial design. The first factor investigated will be feeding level, applying two different feeding levels. The second factor investigated will be the supplementation with or without NSP-degrading enzymes. Hereby testing whether NSP-degrading enzymes can successfully be used to reduce the effect of NSP and whether the effect of enzymes is dependent on the level feeding level (and thus the amount of NSP provided).

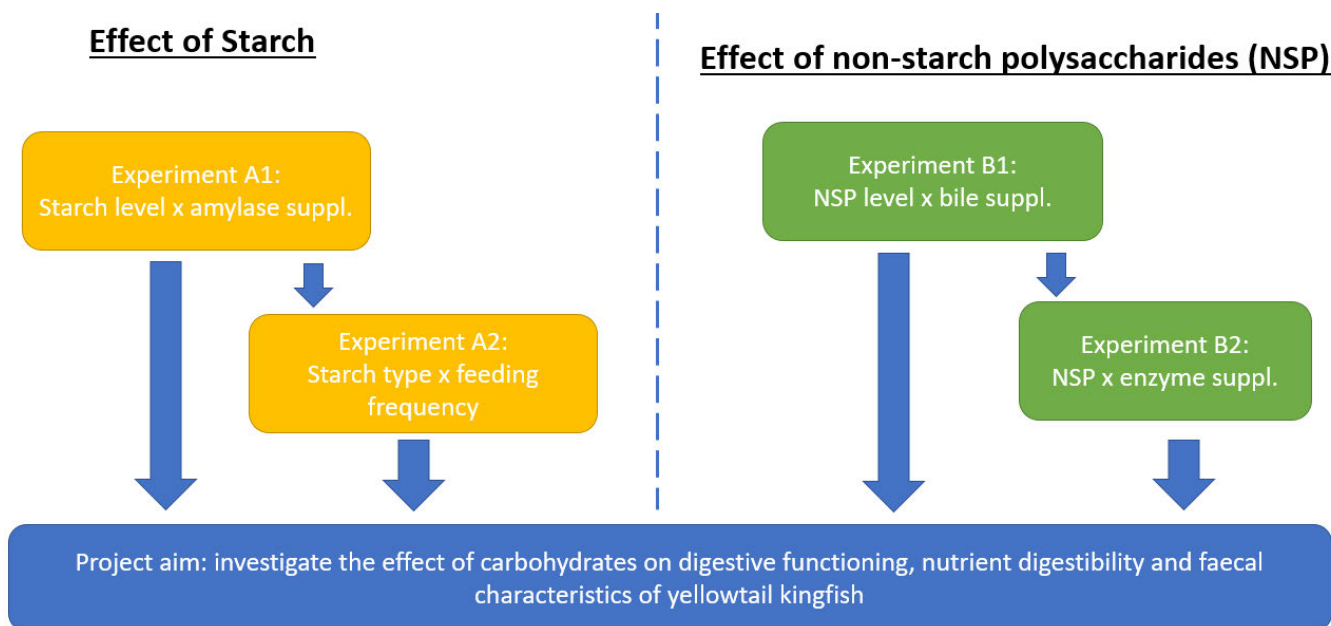
Measurements:

- Faecal material will be collected for apparent digestibility measurements (ADCs). Whole body composition will be measured for each dietary treatment from fish sampled at the start and at the end of the experiment and growth performance indicators (including feed conversion ratio) will be used to compare the effectiveness of, and the differences, between treatments. Nitrogen balances will be calculated based on nutrient digestible intake and body composition (Harter et al., 2013). At the end of the experiment, all animals will be killed and parameters regarding nutrient digestibility (digestion kinetics/progression of digestion throughout the GIT) and faecal characteristics (e.g. osmolality, viscosity, microbiota, or bile acid content) of the chyme will be measured along the gastro intestinal tract (e.g. stomach, proximal, middle, distal intestine). In addition, blood samples will be taken to measure parameters related to digestion of carbohydrates (glucose levels in the blood) and gut samples will be analysed for histology and morphology.

#### 3.4.2 Provide a justification for the strategy described above.

---

The project consists of four experiments. After experiment A1 (decision moment), the acquired information will be used to design the experimental diets (sensitive design) for experiment A2. The diets used in experiment A2 will differ in starch type, differences in starch type will be achieved by difference of processing of the same diet or by the use of ingredient(s) with different starch types. After experiment B1 (decision moment), the acquired information will be used to design the experimental diet (sensitive design for experiment B2). All experiments contribute to the overall aim of evaluating the effect of carbohydrates on digestive functioning (progression of digestion along the GIT), and nutrient digestibility (faecal waste production) and faecal quality. The project can be described as basic research, but also as translational research, as results might give opportunities for fish species with poor faecal quality such as Atlantic salmon or striped catfish.



**Figure 1.** overview project setup.

3.4.3 List the different types of animal procedures. Use a different appendix 'description animal procedures' for each type of animal procedure.

Serial number	Type of animal procedure
1	Faeces quality and quantity measurements



Centrale Commissie Dierproeven

## Appendix

### Description animal procedures

- This appendix should be enclosed with the project proposal for animal procedures.
- A different appendix 'description animal procedures' should be enclosed for each type of animal procedure.
- For more information on the project proposal, see the Guidelines to the project licence application form for animal procedures on our website ([www.centralecommissiedierproeven.nl](http://www.centralecommissiedierproeven.nl)).
- Or contact us by phone (0900-2800028)

#### 1 General information

1.1	Provide the approval number of the 'Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority'.	5.1 lid2h	
1.2	Provide the name of the licenced establishment.	5.1 lid2h	
1.3	List the serial number and type of animal procedure <i>Use the numbers provided at 3.4.3 of the project proposal.</i>	Serial number 1	Type of animal procedure Faeces quality and quantity measurements

#### 2 Description of animal procedures

##### A. Experimental approach and primary outcome parameters

Describe the general design of the animal procedures in relation to the primary outcome parameters. Justify the choice of these parameters.

The project consists of four experiments. All experiments are aimed to investigate the effect of carbohydrates and different dietary co-factors on digestive functioning, such as nutrient digestibility (in particular focusing on the effect of carbohydrates), dry matter, pH, osmolality, viscosity, microbiota composition, and bile acid metabolism and faecal characteristics. Experiments A (A1 & A2) and experiments B (B1 & B2) can be performed independently from each other. After experiment A1, the diets will be formulated for experiment A2 based on the information of experiment A1 (sensitive diets). Experiment A1 aims at evaluating the effect of starch level and amylase supplementation on the above mentioned factors in yellowtail kingfish. Experiment A2 aims to investigate the effect if feeding frequency and starch type (1 diet selected from experiment A1) on digestive functioning of yellowtail kingfish. Experiment B1 aims to investigate the effect of non-starch polysaccharides (NSP) level and bile acid/emulsifier supplementation on digestive functioning of yellowtail kingfish. After experiment B1, the diet will be



formulated for experiment B2 based on the information of experiment B1 (sensitive diets). Experiment B2 aims to investigate the effect of feeding level and NSP-degrading enzyme supplementation on digestive functioning (progression of digestion).

### **Each experiment:**

#### Primary outcome parameters:

- Performance indicators - batch weighing of the fish at the beginning and at the end of the experiment (non-invasive).
- Apparent digestibility coefficients (ADC) - sampling of faeces using a swirl separator (non-invasive)
- Faeces recovery - sampling of faeces using a swirl separator (non-invasive)
- Blood samples - measuring glucose levels.
- Chyme/luminal content for analyses related to digestion kinetics and faecal characteristics, e.g.:
  - o Apparent digestibility coefficients: progression of digestion throughout the gastrointestinal tract (GIT) and mineral availability (not possible to do non-invasive for yellowtail kingfish).
  - o pH
  - o Osmolality
  - o Viscosity
  - o Microbiota composition
  - o Dry matter content.
  - o Bile acid content
    - Blood samples are taken to measure parameters related to the digestion of carbohydrates (e.g. pH, glucose levels). For drawing blood, fish will be first put under anaesthesia, after drawing blood fish will be killed using an overdose of benzocaine before sampling of body tissue (e.g. gills and intestine). 3 fish/tank are used.
    - Whole body composition will be measured for each dietary treatment from fish sampled at the start and at the end of the experiment and growth performance indicators (including feed conversion ratio) will be used to compare the effectiveness of, and the differences, between treatments. Nitrogen balances will be calculated based on nutrient digestible intake and body composition (Harter et al., 2013). At the end of the experiment, all animals will be killed and the pH, osmolality, viscosity, microbiota, DM and bile acid content of the chyme will be measured along the gastrointestinal tract (stomach, proximal, middle, distal intestine). This to elucidate on the reasons for watery/poor quality faeces.
    - The project consists of four experiments. The design/procedures are identical among the different experiments. Each experiment will last for 5 weeks and prior to that 2 weeks of acclimatization. The experimental animal species used will be yellowtail kingfish (*Seriola lalandi*). The duration of the experiment includes 2 weeks of acclimatization which are necessary for the fish to adapt to the feeding method (using commercial feed), temperature, light conditions, the facility environment and to recover from transportation **5.1 lid1c** The experiment will last for 5 weeks, which are needed to collect enough faeces, get a response from the fish to the diet and to collect sufficient amount of chyme at the end of the experiment.
    - At the end of each experiment, chyme, blood and tissue samples will be collected. Both experiments are followed by decision moment to decide on the diets to be used in experiment A2 and B2. For experiment A2: A diet which will be optimal for assessing the effect of feeding frequency and starch type on digestive functioning will be formulated. For experiment B2: A diet which will be optimal for assessing the effect of NSP inclusion and enzyme supplementation on digestive functioning will be formulated.
    - Experiment A (A1->A2) and B (B1->B2) can be performed independent from each other. All experiments will follow the same procedures.

During each experiment, two dietary factors are tested in a 2 × 2 factorial design resulting in four test diets. Each experiment will be set up using 12 tanks, therefore each treatment will be



tested with 3 replicates. Before the start of the experiment, fish will be subjected to 24 hours of fasting to completely empty their gut. At the start of the experiment 20 fish will be killed using an overdose of benzocaine for initial body composition. Subsequently, 24 yellowtail kingfish will be randomly counted, batch weighed and stocked per tank (fish will be sedated). Fish will be fed at least at about 80% of the expected satiation (20g/kg<sup>0.8</sup>). Fish will be fed by hand twice daily (this will deviate for experiment B1, as the factor feeding frequency will involve a different feeding protocol). Faecal matter will be collected continuously overnight, a task that will be accomplished by using swirl separators (non-invasive). During the last week of the experiment, faecal material will be collected continuously for 48 hours to determine faecal recovery. At the end, fish will be sedated using benzocaine and batch weighed per tank. Subsequently, all fish from each tank will be killed by administering an overdose of benzocaine for collecting samples. For drawing blood, fish will be first put under anaesthesia, after drawing blood fish will be killed using an overdose of benzocaine before sampling of body tissues (e.g. gills and intestine), 3 fish per tank are used. All 24 fish per tank, including fish taken for body composition (10 fish/tank) and blood and tissue samples (3 fish/tank) will be used to collect chyme/luminal content in order to minimize the amount experimental animals. Handling of the fish will be avoided as much as possible. When handling is unavoidable (e.g. weighing at the start of the experiment and drawing blood) the fish will be sedated/anaesthetized.

- The present research aims at exploring the effect of carbohydrates and different dietary co-factors on the digestive functioning, nutrient digestibility (in particular in relation to the effect of carbohydrates) and chyme: pH, osmolality, viscosity, microbiota composition, and bile acid and dry matter content. To identify the main effect of carbohydrates (starch and NSP) on digestive functioning of the gastrointestinal tract (progression of digestion throughout the GIT), following factors will be investigated:
  - o Experiment A1: Starch level and amylase supplementation.
  - o Experiment A2: Feeding frequency and starch type.
  - o Experiment B1: NSP level and bile/emulsifier supplementation.
  - o Experiment B2: Feeding level and enzyme supplementation.

Overall, it is aimed to investigate the effect of carbohydrates on digestive functioning, as previous experiments with starch and NSP level resulted in an altered nutrient digestibility and faecal recovery.

#### Experiment A1:

- The experiment is designed to evaluate the effect of starch level and amylase supplementation on digestive functioning such as nutrient digestibility (in particular carbohydrate digestibility), chyme: pH, osmolality, viscosity, microbiota composition, DM and bile acid content and faecal characteristics.
- Four experimental diets will be formulated, according to a 2 × 2 factorial design. The factors under investigation are:
  - o Starch level
  - o Amylase supplementation
    - All diets will be formulated to meet the known nutrient requirements for yellowtail kingfish.
    - Measurements: as described under the primary outcome parameters.

#### Experiment A2:

- The outcome of experiment A1 (information gathered) in regard to the effect of starch level and amylase supplementation on digestive functioning, will be used to optimize the formulation of the diets used in experiment A2 (refinement). The information will be used to formulate dietary conditions that are sensitive for detecting the effect of the factors starch type and feeding frequency (i.e., on the starch level used in the diets and whether to apply amylase or not to all diets). The criteria for optimizing the diet formulation are: organic matter digestibility, faeces recovery and distal chyme characteristics which reflect in intermediate faecal pellet quality.
- The experiment is designed to evaluate the effect of feeding frequency and starch type on digestive functioning such as nutrient digestibility (in particular carbohydrate

digestibility), chyme: pH, osmolality, viscosity, microbiota composition, DM, and bile acid content and faecal characteristics.

- Four experimental diets will be formulated, according to a 2 × 2 factorial design. The factors under investigation are:
  - o Feeding frequency
  - o Starch type (either through processing or ingredients choice).
    - All diets will be formulated to meet the known nutrient requirements for yellowtail kingfish.
    - Measurements: as described under the primary outcome parameters.

#### Experiment B1:

- The experiment is designed to evaluate the effect of NSP level and bile acid/emulsifier supplementation on digestive functioning such as nutrient digestibility (in particular fat and carbohydrate digestibility), chyme: pH, osmolality, viscosity, microbiota composition, DM, and bile acid content and faecal characteristics.
- Four experimental diets will be formulated, according to a 2 × 2 factorial design. The factors under investigation are:
  - o NSP level
  - o Bile acid/Emulsifier supplementation
    - All diets will be formulated to meet the known nutrient requirements for yellowtail kingfish.
    - Measurements: as described under the primary outcome parameter.

#### Experiment B2:

- The outcome of experiment B1 (information gathered) in regard to the effect of NSP level and bile acid/emulsifier supplementation on digestive functioning, will be used to optimize the formulation of the diets used in experiment B2 (refinement). The information will be used to formulate dietary conditions that are sensitive for detecting the effect NSP-degrading enzymes feeding level (i.e., on the NSP level used in the diets). The criteria for optimizing the diet formulation are: organic matter digestibility, faeces recovery and distal chyme characteristics which reflect in intermediate faecal pellet quality.
- The experiment is designed to evaluate the effect of feeding level and NSP-degrading enzyme(s) supplementation on digestive functioning such as nutrient digestibility (in particular fat and carbohydrate digestibility), chyme: pH, osmolality, viscosity, microbiota composition, DM, and bile acid content and faecal characteristics.
- Four experimental diets will be formulated, according to a 2 × 2 factorial design. The factors under investigation are:
  - o Feeding level
  - o Enzyme supplementation
    - All diets will be formulated to meet the known nutrient requirements for yellowtail kingfish.
    - Measurements: as described under the primary outcome parameter.

Describe the proposed animal procedures, including the nature, frequency and duration of the treatment. Provide justifications for the selected approach.

In each experiment, the following animal procedures are applied:

#### *Fasting:*

- The day before the start of the experiment (the day before fish handling: harvesting, counting, sampling, weighing) fish will be subjected to 24 hours of fasting to allow emptying of the gastrointestinal tract. A short-term fasting or feed withdrawal period is applied to get a representative value for biomass weight at the start of the experiment. Fish are exothermic animals and often do not feed for certain periods of time. Therefore, short-term fasting (24 hours) is considered to cause no discomfort to the fish.

#### *Anaesthesia:*

- Fish biomass per tank will be measured by weighing under anaesthesia (sedated) at the start and at the end of the experiment, using benzocaine.
- For drawing blood fish will be put under anaesthesia, after drawing blood (fish will not recover), fish will be killed using an overdose of benzocaine.

*Weighing & counting:*

- For determination of the feeding level and growth performance parameters at the end of the experiment.
- Fish will be weighed in three batches per tank (24 fish/tank).
- 2 x all fish per tank: at the start and at the end of the experiment.

*Body composition:*

- 20 fish at the start of the experiment and 10 fish per tank (12 tanks x 10 fish = 120 fish) at the end of the experiment for a total of 140 fish.
- For proximate body composition analysis to determine fat content and nitrogen balances.

*Blood & tissue sampling:*

- 3 fish at the end of the experiment per tank (12 tanks x 3 fish = 36 fish), blood will be drawn on anaesthetized fish, tissue samples will be taken after the fish are killed using an overdose of benzocaine.
- Blood – glucose
- Tissue – Intestine (+ potential additional samples like gills).

*Chyme/luminal content:*

- All fish at the end of the experiment (24 fish/tank) (including fish taken for body composition (10 fish/tank) and blood and tissue samples (3 fish/tank)) chyme is collected along the GIT (stomach, proximal, middle and distal intestine).
- Measurements include analyses for:
  - o Digestion kinetics: dry matter, ash, N and minerals.
  - o pH, osmolality, viscosity, microbiota composition and bile acid content.

*Fish killed:*

- All fish will be killed to take all the samples required (body composition, tissue and chyme/luminal content), 308 fish per experiment (20 start + 288 end). In total, 1232 (4 experiments x 308 fish) will be killed.

*Non-invasive:*

- Collecting faeces for nutrient digestibility and faecal recovery (during experimental period).

Describe which statistical methods have been used and which other considerations have been taken into account to minimise the number of animals.

**Overview:**

In total (4 experiments) the amount of fish used will be 1232 (308 fish x 4 experiments). The number of fish per experiment is determined by 1) the number of tanks (replicate) per treatment and 2) the minimal amount of fish per tank is determined by the minimum amount of chyme that needs to be collected per tank (replicate) to perform the indicated analyses/measurements. The sampling for body composition, blood and tissue do not influence the number of experimental animals per experiment, as these fish are used and needed to collect sufficient chyme.

**Overview per experiment:**

	Amount	Initial body composition	Final body composition	Blood & Tissue	Chyme
Body composition start	20	X			
Body composition final	120		X		X
Blood and tissue	36			X	X
Chyme (intestinal content)	288				X
Total	<b>308</b>				

#### *Number of tanks per treatment*

· The experiments will be set up using 12 tanks. During each experiment, two dietary factors are tested in a 2 × 2 factorial design resulting in 4 test diets. For the focus parameters with tank as experimental unit (chyme characteristics, kinetics of digestion and faecal recovery) a power analysis was done. This power analysis was done with the conditions of having a difference of 10% between means of two treatments (calculated as  $[(x_1 - x_2) / ((x_1 + x_2) / 2)] * 100$ ) tested significant with  $P=0.05$  and a power of 80% with an expected sigma of 4% of the expected means (calculated as  $\sigma_x / ((x_1 + x_2) / 2) * 100$ ). This power analysis indicated that 3 replicates are required per treatment. Since in each of the experiments 4 treatments have been planned this leads to 12 experimental units (tank) per experiment. 3 replicates per treatment is the minimal number required to perform outlier testing. A two-way ANOVA will be used for statistical analysis related to osmoregulation (chyme, blood and tissue samples), performance data, digestibility, body composition and nutrient balances. For parameters measured at tank level (growth, nutrient digestibility, nitrogen and energy balances and parameter measured on collected chyme), each tank is the experimental unit.

#### *Number of fish for sampling body composition*

· For measurement of nitrogen retention, initial and final body composition needs to be determined by proximate analysis. Previous studies showed that it is required to collect at least 20 fish at the beginning and 10 fish/tank at the end of the experiment (Saravanan *et al.*, 2013; Maas *et al.*, 2018) to perform this proximate analysis adequately. Collecting 20 and 10 fish respectively at the beginning and end of the experiment prevents that variation between fish within the same tank (experimental unit) affect the average body composition (protein, fat, minerals) per treatment/experimental unit.

#### *Blood and tissue sampling*

· 3 fish/tank will be sampled for blood and tissue analysis for a total of 9 fish per treatment. In total, 36 fish per experiment will be sampled for blood and tissue (e.g. intestine) providing sufficient statistical power and degrees of freedom, as shown in a previous study (Magnoni *et al.*, 2018).

#### *Chyme/luminal content*

· The chyme/luminal content will be analysed for:

o Digestion kinetics: Ash, DM, N and minerals.

o pH, osmolality, viscosity, microbiota composition, and bile acid content.

· per tank are needed. In order to minimize the amount of fish, all 24 fish per tank including fish taken for body composition (10 fish/tank) and blood and tissue samples (3 fish/tank) are used for chyme (digesta content) collection. The sampling of chyme and the parameters we want to measure are quite unique, which makes it difficult to rely on literature for the amount (weight) of fish needed. The chyme content will be collected in the stomach and 3 intestinal segments (proximal, middle and distal). Since information regarding the chyme collection for yellowtail kingfish, the amount of faecal chyme content will be adapted in regard to a recent experiment (2018.W-0010.004) with rainbow trout of approximately 250 g mean final weight. This research showed that from the proximal, middle and distal approximately 22.4 %, 7.5 % and 12.8% of the last meal fed was collected as chyme (on DM basis). So, the mid intestine is the most limiting segment for collecting sufficient chyme. To perform all the indicated analyses, a minimum of 5 g dried digesta is needed per section (DM, ash and minerals, Nitrogen-Dumas, pH, osmolality, viscosity, microbiota composition and bile acid content). In order to collect sufficient amount of faeces from the mid intestine, we need to feed the fish 72 g (5 g / 7 % non-digested feed). The expected final mean weight of the fish is around 200 g. Fish will be fed at 23.75 g/kg<sup>0.8</sup>, meaning that each fish eats 6.0 g/d (200 g / 1000 g \* 23.75 g/kg<sup>0.8</sup>) and thus 3.25 g at their last feeding moment. With each fish consuming 3.25 g of feed, you need a total of 22.15 fish (72 / 3.25 g), having a safety margin of 5 % we need 23.3 (22.15 fish / 95%) and thus 24 fish/tank.

## References

- Harter, T. (2013). Isoenergetic replacement of fat by starch in diets for African catfish (*Clarias gariepinus*): effect on chyme characteristics, water fluxes in the gastro intestinal tract and nutrient digestibility.
- López-Luna, J., Vásquez, L., Torrent, F., & Villarroel, M. (2013). Short-term fasting and welfare prior to slaughter in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Aquaculture*, 400, 142-147.
- Maas, R. M., Verdegem, M. C., Dersjant-Li, Y., & Schrama, J. W. (2018). The effect of phytase, xylanase and their combination on growth performance and nutrient utilization in Nile tilapia. *Aquaculture*, 487, 7-14.
- Magnoni, L. J., Eding, E., Leguen, I., Prunet, P., Geurden, I., Ozório, R. O., & Schrama, J. W. (2018). Hypoxia, but not an electrolyte-imbalanced diet, reduces feed intake, growth and oxygen consumption in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Scientific reports*, 8(1), 4965.
- Saravanan, S., Geurden, I., Orozco, Z. G. A., Kaushik, S. J., Verreth, J. A. J., & Schrama, J. W. (2013). Dietary electrolyte balance affects the nutrient digestibility and maintenance energy expenditure of Nile tilapia. *British Journal of Nutrition*, 110(11), 1948-1957.
- Waagbø, R., Jørgensen, S. M., Timmerhaus, G., Breck, O., & Olsvik, P. A. (2017). Short term starvation at low temperature prior to harvest does not impact the health and acute stress response of adult Atlantic salmon. *PeerJ*, 5, e3273.

## B. The animals

Specify the species, origin, life stages, estimated numbers, gender, genetic alterations and, if important for achieving the immediate goal, the strain.

Serial number	Species	Origin	Life stages	Number	Gender	Genetically altered	Strain
	89 - Other Fish*	04	juvenile	1232	mix sex	n.a.	Yellowtail kingfish, obtained from a commercial company

## Provide justifications for these choices

### Species

Yellowtail kingfish (*Seriola lalandi*), is a recently cultured fish species in recirculating aquaculture systems (RAS). The demand of Yellowtail kingfish is high and expected to growth, making it an important marine fish in RAS. A challenge of farming yellowtail kingfish in RAS is their poor faecal quality. The instable faecal consistency and fine faecal particles makes it difficult to remove the faecal material from the water, resulting in high concentrations of total suspended solids (TSS) in the RAS and effluent water. This makes yellowtail kingfish the target animal.

### Origin

Yellowtail kingfish: From 5.1 lid1c

### Life stages

Above 60 grams weight of fish individual upon arrival (depending on the availability). The fish are in the juvenile stage when used, this is a stage that is very relevant for development, and is easy to handle for researchers. The size of the fish is of relevance, if the fish have a high initial body weight, the effect of the dietary treatment on body composition (nutrient utilisation) is difficult to detect (dilution). If the fish are too small, high amounts of fish are needed to collect sufficient amount chyme (for digestion kinetics) and faeces for digestibility studies and recovery.

### Number

The number of animals used in each experiment is determined by the number of tanks used (12) and the number of fish per tank (24). A total of 308 fish will be used per experiment which

makes a total of 1232 (4 experiments in total). The amount of fish used is the minimum required to collect sufficient samples (chyme) for the needed analyses (see 3 Statistical methods).

Gender

A mixed sex population will be used, common practice

Genetic alterations

Not applicable.

Strain

Not applicable

### C. Accommodation and care

Is the housing and care of the animals used in experimental procedures in accordance with Annex III of the Directive 2010/63/EU?

Yes

No > If this may adversely affect animal welfare, describe how the animals will be housed and provide specific justifications for these choices.

The entire trial will be carried out in the digestibility unit (n = 12 circular tanks) of the research facility. All tanks are connected to a recirculating water treatment system. The volume of each tank is 300L. At the start of the trial, 24 fish will be stocked per tank. Prior to stocking, each individual group of 24 fish will be weighed under anaesthesia in three batches.

Water quality and environmental conditions are maintained for optimal known conditions: Physio-chemical parameters are: photoperiod 20h light, 4h dark; water refreshment of the system according to NO<sub>3</sub>-N limits; water flow in the tank 7 L/min; temperature 23-25 degree; pH 7.3 - 7.6; NH<sub>4</sub>-N <2 mg/L; NH<sub>3</sub>-N <0.06 mg/L; NO<sub>2</sub>-N <1 mg/L; NO<sub>3</sub>-N <100 mg/L; salinity 33 - 35 ppt; dissolved oxygen >5.5 mg/L.

### D. Pain and compromised animal welfare

Will the animals experience pain during or after the procedures?

No

Yes > Will anaesthesia, analgesia or other pain relieving methods be used?

No > Justify why pain relieving methods will not be used.

Yes > Indicate what relieving methods will be used and specify what measures will be taken to ensure that optimal procedures are used.

- 1) During handling (e.g. weighing at the start of the experiment), fish will be sedated with benzocaine.
- 2) For determining body composition and collection chyme, fish will be killed using an overdose of benzocaine.
- 3) For drawing blood and sampling body tissues, fish will be anaesthetized using benzocaine and blood will be drawn. After blood sampling, fish will be killed and used for sampling of body tissues (e.g. gills and intestine).

Describe which other adverse effects on the animals welfare may be expected?

### Per experiment:

- 20 fish will be killed (initial body composition) at the start of the experiment which will cause mild discomfort.
- 288 fish will be weighed at the start and at the end of the experiment and will experience mild discomfort.
- All 288 fish will be killed (final body composition, chyme, blood and tissue samples) at the end of the experiment, the killing using anaesthesia will cause mild discomfort.

- 36 fish (of these 288) will be anaesthetized for drawing blood. After drawing blood, fish will be killed using anaesthesia. This will cause mild discomfort.  
· No other aspects other than 'mild' discomfort as described above are expected during the execution of the experiments. Diet: all diets will be formulated to meet the known nutrient requirements of yellowtail kingfish.

Explain why these effects may emerge.

Diet: To the best of our knowledge the applied contrast in diet composition have no negative effects. Weighing fish under sedation and killing fish using an overdose of benzocaine is essential in order to determine the indicated outcome parameters (growth, body composition, etc.).

Indicate which measures will be adopted to prevent occurrence or minimise severity.

Diets will be formulated to cover all the known nutrient requirements. Water quality of the system will be checked daily. Weighing of fish: sedation will be used to minimize discomfort. Related to the experimental procedures no HEP's are expected. Fish will be anesthetized when drawing blood, after drawing blood fish will be killed using an overdose of anaesthesia. Before taking samples, fish will be killed using an overdose of anaesthesia.

#### **E. Humane endpoints**

May circumstances arise during the animal procedures which would require the implementation of humane endpoints to prevent further distress?

No > Continue with question F.

Yes > Describe the criteria that will be used to identify the humane endpoints.

Indicate the likely incidence.

#### **F. Classification of severity of procedures**

Provide information on the experimental factors contributing to the discomfort of the animals and indicate to which category these factors are assigned ('non-recovery', 'mild', 'moderate', 'severe'). In addition, provide for each species and treatment group information on the expected levels of cumulative discomfort (in percentages).

No other aspects other than 'mild' discomfort as described under the point '*describe which other adverse effects on the animals' welfare may be expected*' are expected during execution of the experiments.

## G. Replacement, reduction, refinement

Describe how the principles of replacement, reduction and refinement were included in the research strategy, e.g. the selection of the animals, the design of the procedures and the number of animals.

### Replacement

Little is known about the interaction between carbohydrates and their effect on digestive functioning, pH, osmolality, viscosity, DM, microbiota composition and bile acid content for yellowtail kingfish. Studying this requires a whole animal model. No replacement is possible for this complex mechanisms.

### Reduction

Multiple non-invasive experiments were done prior to the project, the reduce the amount of experimental treatments. 24 fish per experimental unit (200 g body weight at the end of each experiment) is the minimal needed for sufficient chyme collection. All other samples (besides chyme) will be taken from fish used for chyme collection.

### Refinement

The experimental diets fed to the fish are complete diets providing all necessary macro and micronutrients nutrient required for yellowtail kingfish. To reduce discomfort of fish during weighing and blood sampling, sedation/anaesthesia will be applied. For tissue and chyme sampling fish will be first killed using an overdose of benzocaine. The system allows to collect faeces using non-invasive methods.

Are adverse environmental effects expected? Explain what measures will be taken to minimise these effects.

No

Yes > Describe the environmental effects and explain what measures will be taken to minimise these effects.

## H. Re-use

Will animals be used that have already been used in other animal procedures ?

No > Continue with question I.

Yes > Explain why re-use is considered acceptable for this animal procedure.

## I. Repetition

Explain for legally required animal procedures what measures have been taken to ensure that the proposed procedures have not already been performed. If applicable, describe why duplication is required.

The experiments proposed have not been executed previously. Feasibility of this project, contribution to knowledge and the scientific merit of this research has been ensured by colleagues working in the same field and extensive literature research.

## J. Location where the animals procedures are performed

Will the animal procedures be carried out in an establishment that is not licenced by the NVWA?

No > Continue with question K.

Yes > Describe this establishment.

Provide justifications for the choice of this establishment. Explain how adequate housing, care and treatment of the animals will be ensured.



## End of experiment

### K. Destination of the animals

Will the animals be killed during or after the procedures?

No > Provide information on the destination of the animals.

Yes > Explain why it is necessary to kill the animals during or after the procedures.

The researched processes and interactions cannot be simulated outside the animal. For taking the specific tissue samples (chyme, tissue, etc.), blood and determining the body composition all 308 fish per experiment need to be killed.

Is the proposed method of killing listed in Annex IV of Directive 2010/63/EU?

No > Describe the method of killing that will be used and provide justifications for this choice.

Yes > Will a method of killing be used for which specific requirements apply?

No > Describe the method of killing.

### Overdose of anaesthesia

Yes > Describe the method of killing that will be used and provide justifications for this choice.

If animals are killed for non-scientific reasons, justify why it is not feasible to rehome the animals.

n.a.

Naam van het project	Effect van koolhydraten op de mestproductie van Geelvintonijn
NTS-identificatiecode	NTS-NL-374472 v.1
Nationale identificatiecode van de NTS <i>Veld wordt niet gepubliceerd.</i>	
Land	Nederland
Taal	nl
Indiening bij EU <i>Veld wordt niet gepubliceerd.</i>	ja
Duur van het project, uitgedrukt in maanden.	60
Trefwoorden	Geelvintonijn Mest kwaliteit Koolhydraten Water kwaliteit Verteeringskinetiek
Doel(en) van het project	Fundamenteel onderzoek: Ethologie/diergedrag/dierbiologie Omzettinggericht en toegepast onderzoek: Diervoeding

## DOELSTELLINGEN EN VERWACHTE VOORDELEN VAN HET PROJECT

Beschrijf de doelstellingen van het project (bijvoorbeeld het aanpakken van bepaalde wetenschappelijke onduidelijkheden, of wetenschappelijke of klinische behoeften).	Het uiteindelijke doel is om de mestkwaliteit (hoeveelheid en consistentie) van vissen in de aquacultuur te verbeteren doormiddel van het voer, in dit project ligt de focus op de koolhydraat fractie (zetmeel en vezels) in het voer. Met de transitie naar meer plantaardige ingrediënten in visvoerders is het belangrijk inzicht te krijgen op de invloed van koolhydraten op verteringskinetiek en mestkwaliteit. Er wordt gekeken in hoeverre geelvintonijn om kan gaan met deze koolhydraten en hoe voer gerelateerde factoren kunnen bijdragen om de mestkwaliteit en verteringskinetiek te verbeteren. Een verbeterde vertering en mestkwaliteit zal een gunstig effect hebben op afvalwaterkwaliteit. Daarnaast kunnen deze inzichten bijdragen aan een verminderd gebruik van vismeel.
Welke potentiële voordelen kan dit project opleveren? Leg uit hoe de wetenschap vooruit kan worden geholpen of mensen, dieren of het milieu uiteindelijk voordeel kunnen hebben bij het project. Maak, waar van toepassing, een onderscheid tussen voordelen op korte termijn (binnen de looptijd van het project) en voordelen op lange termijn (die mogelijk pas worden bereikt nadat het project is afgerond).	Wetenschappelijke relevantie: het onderzoek richt zich op het verkrijgen van wetenschappelijke inzichten in het effect van voeding (verschillende factoren, met focus op factoren gerelateerd aan de transitie naar meer plantaardige ingrediënten in visvoerders) op de mestkwaliteit en de verteringskinetiek. Het effect van de onderzochte factoren op de mestkwaliteit en verteringskinetiek in geelvintonijn is nog niet bekend. Maatschappelijke relevantie: de resultaten van het onderzoek kunnen leiden tot adviezen voor de voeding voor de kweek van Geelvintonijn, wat de voedingsbenutting kan bevorderen en kan bijdragen aan het ontwikkelen van duurzamere visvoerders, waaronder een minder noodzakelijk gebruik van vismeel. Daarnaast draagt het onderzoek bij aan het verbeteren van de waterkwaliteit in de viskwekerij door 1) minder mestproductie en 2) verbeterde mestkwaliteit, wat kan zorgen voor verminderd water gebruik en daardoor verminderde lozing van nutriënten in het milieu.

**VOORSPELDE SCHADE**

<p>In welke procedures worden de dieren gewoonlijk gebruikt (bijvoorbeeld injecties, chirurgische procedures)? Vermeld het aantal en de duur van deze procedures.</p>	<p>Voor het nemen van monsters van onder andere chymus en lichaamssamenstelling zullen de dieren gedood worden. Het afnemen van bloed gebeurt onder verdoving, waarna de dieren direct gedood worden (dieren komen niet meer bij). Daarnaast zullen de dieren gewogen worden onder lichte verdoving, kort vasten en verschillende diëten krijgen. Dit zal hoogstens licht ongerief met zich meebrengen.</p>				
<p>Wat zijn de verwachte gevolgen/nadelige effecten voor de dieren, bijvoorbeeld pijn, gewichtsverlies, inactiviteit/verminderde mobiliteit, stress, abnormaal gedrag, en wat is de duur van die effecten?</p>	<p>Tijdens het wegen zullen de dieren licht verdoofd zijn en tijdens het afnemen van bloed zullen ze verdoofd zijn, daarnaast worden geen nadelige effecten verwacht.</p>				
<p>Welke soorten en aantallen dieren zullen naar verwachting worden gebruikt? Wat zijn de verwachte ernstgraden en de aantallen dieren in elke ernstcategorie (per soort)?</p>	<p>Soort:</p>	<p>Totaal aantal</p>	<p>Geraamde aantallen naar ernstgraad</p>		
<p>Andere vissen (other Pisces)</p>	<p>1232</p>	<p>0</p>	<p>Licht</p> <p>1232</p>	<p>Matig</p> <p>0</p>	<p>Ernstig</p> <p>0</p>
<p>Wat gebeurt er met de dieren die aan het einde van de procedure in leven worden gehouden?</p>	<p>Soort:</p>	<p>Geraamd aantal te hergebruiken, in het habitat-/houderijsysteem terug te plaatsen of voor adoptie vrij te geven dieren</p>			
<p>Geef de redenen voor het geplande lot van de dieren na de procedure.</p>	<p>Hergebruikt</p>	<p>Teruggeplaatst</p>	<p>Geadopteerd</p>		
<p>Voor het nemen van monsters van onder andere chymus, lichaamssamenstelling en weefsels zullen de dieren gedood worden. Deze monsters kunnen alleen verkregen worden door het doden van de dieren.</p>	<p>Voor het nemen van monsters van onder andere chymus, lichaamssamenstelling en weefsels zullen de dieren gedood worden. Deze monsters kunnen alleen verkregen worden door het doden van de dieren.</p>				

## TOEPASSING VAN DE DRIE V'S

<p><b>1. Vervanging</b> Beschrijf welke diervrije alternatieven op dit gebied voorhanden zijn en waarom zij niet voor het project kunnen worden gebruikt.</p>	<p>De onderzochte processen (verteringskinetiek, etc.) zijn alleen te bestuderen in levende dieren en kunnen niet nagebootst worden buiten het dier.</p>
<p><b>2. Vermindering</b> Leg uit hoe de aantallen dieren voor dit project zijn bepaald. Beschrijf de stappen die zijn genomen om het aantal te gebruiken dieren te verminderen en de beginselen die zijn gebruikt bij het opzetten van de studies. Beschrijf, waar van toepassing, de praktijken die gedurende het hele project zullen worden toegepast om het aantal dieren die in overeenstemming met de wetenschappelijke doelstellingen werden gebruikt, tot een minimum te beperken. Deze praktijken kunnen bijvoorbeeld bestaan uit proefprojecten, computermodellen, het delen van weefsel en hergebruik.</p>	<p>De experimenten zijn zo ontworpen dat het minimale aantal proefdieren wordt gebruikt om alle essentiële analyses te kunnen uitvoeren en om tot statistisch onderbouwde resultaten te komen.</p>
<p><b>3. Verfijning</b> Geef voorbeelden van de specifieke maatregelen (bv. verscherpte monitoring, postoperatieve behandeling, pijnbestrijding, training van dieren) die in verband met de procedures moeten worden genomen om de welzijnskosten (schade) voor de dieren tot een minimum te beperken. Beschrijf de mechanismen om gedurende de looptijd van het project nieuwe verfijningstechnieken in gebruik te nemen.</p>	<p>De diëten zijn volwaardige diëten die alle nutriënten voldoende bevatten. Tijdens handelingen zijn de vissen licht verdoofd. Voorafgaand aan het nemen van samples voor lichaamssamenstelling en chymus worden de vissen eerst gedood met een overdosis anesthesie. Mest voor het bepalen van de verteerbaarheid kan gesampled worden op een niet-invasieve manier.</p>
<p>Licht de keuze van de soorten en de bijbehorende levensstadia toe</p>	<p>Geelvintonijn is een zoutwater kweekvis die zijn opkomst maakt in kweeksystemen op het land. De huidige vraag naar geelvintonijn is hoog en wordt verwacht verder toe te nemen in de toekomst. Door de waterige/slechte mestkwaliteit van geelvintonijn is de mest moeilijk te verwijderen uit water, wat de fijne deeltjes (mest) in het water en effluent verhoogd, wat kan leiden tot slechte waterkwaliteit (en omstandigheden van de vis) en hoog waterverbruik (relevantie). Daarnaast kan geelvintonijn als modeldier voor andere soorten met een slechte mestkwaliteit dienen. De vissen bevinden zich bij gebruik in het juveniele stadium (nog niet geslachtsrijp), dit is een stadium dat zeer relevant is voor de fysiologische ontwikkeling en voor onderzoekers gemakkelijk te hanteren is.</p>

**VOOR EEN BEOORDELING ACHTERAF GESELECTEERD PROJECT**

Project geselecteerd voor BA?	nee
Termijn voor BA	
<b>Reden voor de beoordeling achteraf</b>	
Bevat ernstige procedures	
Maakt gebruik van niet-menselijke primaten	
Andere reden	
Toelichting van de andere reden voor de beoordeling achteraf	

**AANVULLENDE VELDEN**

Nationaal veld 1 <i>Veld wordt niet gepubliceerd.</i>	
Nationaal veld 2 <i>Veld wordt niet gepubliceerd.</i>	
Nationaal veld 3 <i>Veld wordt niet gepubliceerd.</i>	
Nationaal veld 4 <i>Veld wordt niet gepubliceerd.</i>	
Nationaal veld 5 <i>Veld wordt niet gepubliceerd.</i>	
Startdatum project <i>Veld wordt niet gepubliceerd.</i>	
Einddatum project <i>Veld wordt niet gepubliceerd.</i>	
Goedkeuringsdatum project <i>Veld wordt niet gepubliceerd.</i>	
ICD-code 1 <i>Veld wordt niet gepubliceerd.</i>	
ICD-code 2 <i>Veld wordt niet gepubliceerd.</i>	
ICD-code 3 <i>Veld wordt niet gepubliceerd.</i>	
Link naar de eerdere versie van de NTS buiten het EC-systeem	



# Advies aan CCD

**B**

Datum 14 juli 2022

Betreft Advies Secretariaat over Aanvraag projectvergunning Dierproeven AVD202216106

Instelling: 5.1 lid2h  
Onderzoeker: 5.1 lid2e  
Project: Effect of carbohydrates on digestive functioning and faecal characteristics of yellowtail kingfish (*Seriola lalandi*)  
Aanvraagnummer: AVD202216106  
Betreft: Nieuwe aanvraag  
Categorieën: Fundamenteel onderzoek  
Translationeel of toegepast onderzoek

## 1 Inzicht in aanvraag en de eventuele knelpunten en risico's

<b>Proces</b>	De volgende vragen zijn gesteld aan de aanvrager.  Vragen over de NTS: In uw NTS noemt u de term 'chymus'. Deze term is niet begrijpelijk voor het algemene publiek. Kunt u deze term aanpassen?  Kunt u onder het kopje 'Objectives of the project' van uw NTS de relevantie van het voorgestelde project verder toelichten?			
<b>Naam proef</b>	<b>Diersoort</b>	<b>Stam</b>	<b>Aantal dieren</b>	<b>Herkomst</b>
<b>3.4.3.1 Faeces quality and quantity measurements</b>				
	Andere vissen (andere Pisces)	Yellowtail kingfish	1.232	<b>Dieren die niet voor onderzoek gefokt zijn</b>

## Huisvesting en verzorging anders dan Bijlage III Richtlijn

### 3.4.3.1 Faeces quality and quantity measurements

Citaat:

The entire trial will be carried out in the digestibility unit (n = 12 circular tanks) of the research facility. All tanks are connected to a recirculating water treatment system. The volume of each tank is 300L. At the start of the trial, 24 fish will be stocked per tank. Prior to stocking, each individual group of 24 fish will be weighed under anaesthesia in three batches.

Water quality and environmental conditions are maintained for optimal known conditions: Physio-chemical parameters are: photoperiod 20h light, 4h dark; water refreshment of the system according to NO<sub>3</sub>-N limits; water flow in the tank 7 L/min; temperature 23-25 degree; pH 7.3 - 7.6; NH<sub>3</sub>-N <2 mg/L; NH<sub>3</sub>-N <0.06 mg/L; NO<sub>2</sub>-N <1 mg/L; NO<sub>3</sub>-N <100 mg/L; salinity 33 - 35 ppt; dissolved oxygen >5.5 mg/L.

## Gebruik van mannelijke en vrouwelijke dieren

### 3.4.3.1 Faeces quality and quantity measurements

Andere vissen (andere Pisces) Er worden zowel mannelijke als vrouwelijke dieren gebruikt.

<b>Locatie uitvoering experimenten</b>	- Alle proeven vinden plaats in een instelling van een vergunninghouder. - Er zijn geen problemen bekend met de vergunninghouder.
--	--

## 2 DEC advies

<b>DEC-advies</b>	<p>Citaat C4: [...] De DEC heeft vastgesteld dat er een directe en reële relatie is tussen beide doelstellingen en dat het directe doel gerechtvaardigd is binnen de context van het onderzoeksveld. De DEC heeft tijdens de discussie wel besproken in hoeverre de intensivering van de aquacultuur überhaupt een wenselijke situatie is. Dit onderwerp komt in verschillende onderdelen van dit advies terug.</p> <p>Citaat C9: Er is sprake is van de volgende bijzondere categorie(ën) van dieren, omstandigheden of behandeling van de dieren: <input type="checkbox"/> Niet gefokt voor dierproeven (11, bijlage I richtlijn) De keuze hiervoor is realistisch ingeschat en geëvalueerd.</p> <p>Citaat C10: De dieren worden gehuisvest en verzorgd op een wijze die niet voldoet aan de eisen die zijn opgenomen in bijlage III van richtlijn 2010/63/EU.</p> <p>Ethische afweging van de DEC: Citaat D:</p>
-------------------	---

1.

De centrale morele vraag van het project is: Is het gebruik van 1232 vissen met licht ongerief en dood gerechtvaardigd teneinde informatie te verzamelen om de vissen in praktijk te voeren met een (hoofdzakelijk) plantaardig dieet met toevoegingen, dat minder vervuiling geeft van het gebruikte water en zo duurzamer zou zijn?

2.

De DEC constateert dat het hier gaat om een aanvraag met voldoende samenhang. De DEC heeft haar afweging gemaakt na de volgende schade baten analyse: Er is licht ongerief voor 1232 dieren, maar de dieren worden gedood in het kader van de proef (basaal belang). De integriteit wordt geschaad door een voer te geven dat afwijkt van het natuurlijke voer voor deze dieren (serieus belang). De baten zijn hier vooral economisch. De yellowtail kingfish is commercieel interessant omdat het een high-end niche markt bedient, aldus medegedeeld door een visexpert binnen de DEC (perifeer belang). Verder wordt er mogelijk kennis verzameld die van belang zou kunnen zijn voor de sector (onzeker: perifeer belang).

3.

Het antwoord op de morele vraag is deze keer niet eenduidig voor de gehele DEC. Dit is uitgebreid besproken in de DEC-vergadering, wat geresulteerd heeft in het volgende: de meerderheid van de DEC-leden kan de centrale morele vraag met 'ja' beantwoorden. Een minderheid van drie leden kon zich hier niet in vinden en namens hen is onder E2 een minderheidsstandpunt geformuleerd.

De DEC heeft extern advies ingewonnen bij

- de aanvrager is om aanvullingen gevraagd

De DEC heeft vragen gesteld aan de aanvrager die betrekking hadden op de toegepaste dieetsamenstelling, de korte en lange termijn impact op de welzijn en gezondheid van het dier, het optimaliseren van huidige systemen, de statistische onderbouwing van de aantallen dieren, de toegevoegde waarde van de voorgestelde vissoort aan de voedselvoorziening en in hoeverre de kennis in de praktijk toegepast zal worden.

Het DEC advies is Positief



Het uitgebrachte advies is niet gebaseerd op consensus.

Citaat E2:

Het uitgebrachte advies is niet gebaseerd op consensus. De meerderheid van de DEC: uit de antwoorden blijkt, dat goed over het project is nagedacht en biedt zeker sterke mogelijkheden tot uitbreiding van onze kennis betreffende diersoort overschrijdende kennis van (verterings)fysiologie. Natuurlijk is het risico dat een dergelijk project bijdraagt aan een ongewenste nieuwe intensieve dierlijke productie nooit uit te sluiten, maar kan zeker ook bijdragen aan een structurele verbetering van bestaande intensieve visteelten.

Namens een drietal DEC-leden volgt hier het minderheidsstandpunt:

Het antwoord op de morele vraag is dat dit onderzoek niet moreel te rechtvaardigen is. De onderbouwing hiervoor is als volgt:

Ten eerste: Een algemene zorg: de huidige ontwikkeling in de aquacultuur lijkt er een te zijn van toenemende intensivering en instrumentalisering van de houderij en het dier. Worden hier niet dezelfde fouten gemaakt als in het verleden bij de intensieve veehouderij?

Ten tweede: Het belang van het kweken van de Yellow tail kingfish is esthetisch (smaakvol product) en commercieel en gericht op een high-end niche markt. Het draagt als zodanig weinig bij aan de voedselvoorziening met dierlijke (vis) eiwitten. Er zijn al voldoende alternatieven hiervoor bij andere vissoorten. (Het discussiepunt hoe noodzakelijk dat überhaupt is voor de voedselvoorziening is hieronder nog als buiten de context opmerking opgenomen.)

Ten derde: Aan de carnivore vis wordt een met kunstmatige toevoegingen bewerkte voer gevoerd. De vis wordt, door het eten van een dieet dat voor dat voor de vis geen natuurlijke samenstelling heeft, gedwongen zich aan te passen aan het systeem dat de feces van een meer plantaardig voer zonder toevoegingen niet goed kan verwerken. Dit is een aantasting van de intrinsieke waarde en integriteit van het dier.

Kortom: Het draait hier om een aantasting van de integriteit van het dier, waarvoor de belangrijkste rechtvaardiging een esthetisch en commercieel belang is. Dit is daarom een voorbeeld van (niet noodzakelijke) instrumentalisering en vertechnering in de dierhouderij, die in deze tijd steeds meer als moreel ongewenst wordt gezien, en volgens de mening van een minderheid (drie leden) van de DEC ook moreel onjuist is.

De volgende dilemma's zijn gesignaleerd door de DEC:

Citaat E3:

Buiten de context: is het kweken van dieren voor consumptie überhaupt nog te verantwoorden?

### 3 Kwaliteit DEC advies

<b>Kwaliteit DEC-advies</b>	
<p>Het DEC advies is navolgbaar. In het DEC advies is op heldere wijze inzicht gegeven in de vragen die aan de aanvrager zijn gesteld. Echter, bij de beantwoording van de beoordelingsvragen ontbreekt veelal een heldere uitwerking van de visie van de DEC. Graag zag de CCD een weerspiegeling van de discussies met betrekking tot de beoordelingsvragen binnen de DEC. Desondanks volgt de ethische afweging op logische wijze uit de beantwoording van de C vragen.</p> <p>Uw oordeel over de onderbouwing ontbreekt bij C10. Graag hadden wij uw conclusie hierover in het advies onder C10 teruggezien.</p> <p>Onder E3 van uw advies noemt u een dilemma dat buiten de context ligt van onderhavig projectvoorstel. Het door u gestelde dilemma, te weten of het kweken van dieren voor consumptie nog steeds te verantwoorden is, overstijgt de competentie van de CCD, waardoor zij de DEC geen passende terugkoppeling kan geven.</p>	

### 4 Inhoudelijke beoordeling

<b>Doelstelling</b> Doelstelling	<p>Citaat:</p> <p>The overall research objective of the present project is to investigate 'Effect of carbohydrates on digestive functioning, nutrient digestibility (i.e. amount of faecal waste produced) and faecal characteristics of yellowtail kingfish (<i>Seriola lalandi</i>).' The ultimate goal is to improve the sustainability of yellowtail kingfish farming through the diet, by reducing the impact of the waste load on the Recirculating Aquaculture System (and the environment) and at the same time guaranteeing fish health. The research is both fundamental and translational and applied. It is expected that the outcome of this project contributes to the following immediate goals.</p> <p>(1) reduce the total waste load by improving the faecal quality (recovery), by:</p> <ul style="list-style-type: none"><li>- studying the effect of both starch and non-starch-polysaccharides on faecal quality</li><li>- studying ways to mitigate the effect of both starch and non-starch polysaccharides on faecal quality</li></ul> <p>(2) reduce the total waste production (improving digestibility) by:</p> <ul style="list-style-type: none"><li>- studying the effect of starch and non-starch polysaccharides on nutrient digestibility and digestion kinetics</li><li>- studying ways to mitigate the effect of both starch and non-starch polysaccharides on nutrient digestibility and digestion kinetics.</li></ul> <p>This all contributes to the overall aim of allowing the transition for more plant-based-diets when farming yellowtail kingfish.</p>
-------------------------------------	--

Wetenschappelijk en maatschappelijk belang	<p>Citaat:  Scientific relevance: Investigating the digestion mechanisms of starch and NSP will enable to better understand the underlying mechanisms of carbohydrates on nutrient digestion and faecal quality (recovery and production). Additionally, obtained knowledge on the effects of carbohydrate on nutrient digestibility and faecal quality might create opportunities in different finfish species with poor quality faeces (e.g. salmon).</p> <p>Social relevance: the results of the study will ultimately lead to a reduced amount of TSS in the system and effluent water of RAS improving, allowing an increased inclusion of plant-based ingredients in feed formulation for yellowtail kingfish farming. Both improved waste management and safeguarding fish health through feed formulation for yellowtail kingfish farming will improve the sustainability of the yellowtail kingfish farming. This can have a positive view of society for aquaculture.</p>
Onderbouwing wetenschappelijk en maatschappelijk belang	Het belang is voldoende uitgewerkt en onderbouwd.
<b>Wetenschappelijke kwaliteit</b> Kwaliteit aanvrager/onderzoeksgroep en onderzoek	<p>Citaat DEC advies C7:  De DEC heeft vastgesteld dat de kennis en kunde van de onderzoeksgroep en andere betrokkenen bij de dierproeven, afgaande op het geschreven voorstel en het oordeel van de IvD, wel voldoende gewaarborgd zijn.</p> <p>Het Secretariaat heeft geen reden te twijfelen aan de kwaliteit van de aanvragers en het onderzoek.</p>

### 3V's

Vervanging	
	<p><b>3.4.3.1 Faeces quality and quantity measurements:</b> Citaat:  Little is known about the interaction between carbohydrates and their effect on digestive functioning, pH, osmolality, viscosity, DM, microbiota composition and bile acid content for yellowtail kingfish. Studying this requires a whole animal model. No replacement is possible for this complex mechanisms.</p>
Verminderen	
	<p><b>3.4.3.1 Faeces quality and quantity measurements:</b> Citaat:  Multiple non-invasive experiments were done prior to the project, the reduce the amount of experimental treatments. 24 fish per experimental unit (200 g body weight at the end of each experiment) is the minimal needed for sufficient chyme collection. All other samples (besides chyme) will be taken from fish used for chyme collection.</p>

Verfijnen	
	<b>3.4.3.1 Faeces quality and quantity measurements:</b> Citaat: The experimental diets fed to the fish are complete diets providing all necessary macro and micronutrients nutrient required for yellowtail kingfish. To reduce discomfort of fish during weighing and blood sampling, sedation/anaesthesia will be applied. For tissue and chyme sampling fish will be first killed using an overdose of benzocaine. The system allows to collect faeces using non-invasive methods.

<b>Hergebruik</b>	Er is geen sprake van hergebruik van dieren.
-------------------	--

<b>Naam proef</b>	<b>Worden de dieren gedood?</b>	<b>Doden volgens richtlijn?</b>
3.4.3.1 Faeces quality and quantity measurements	Ja	volgens de richtlijn.

<b>Naam proef</b>		
<b>3.4.3.1 Faeces quality and quantity measurements</b>	HEP: Worden niet verwacht	
Andere vissen (andere Pisces)	Ongerief: 100,0% Licht	

## 5 Samenvatting

Het projectvoorstel bevat voldoende informatie over het belang van het onderzoek, de strategie, de 3V's, het ongerief en de humane eindpunten om tot een oordeel te kunnen komen. Het DEC-advies kan als grondslag dienen voor het besluit.

De aanvrager geeft aan dieren in te zetten die niet zijn gefokt voor dierproeven. Het betreft onderzoek in Yellowtail kingfish, welke ook als doeldier fungeert. **5.2 lid1**

De aanvrager beschrijft dat de huisvesting van de dieren afwijkt van de richtlijnen zoals genoemd in bijlage III van richtlijn 2010/63/EU. **5.2 lid1**

Het DEC advies is gebaseerd op een meerderheidsstandpunt. Een aantal DEC leden is van mening dat het voorgestelde onderzoek bij zal dragen aan de intensivering van de viskwekerij en dat de verbetering van de kweek van de

Yellowtail kingfish voornamelijk een economisch belang behartigt en, samen met de aanwezige alternatieve bronnen van viseiwitten, minimaal bijdraagt aan de voedselvoorziening. Daarnaast zijn deze DEC leden overtuigd dat de (proef)dieren onnodig worden aangetast door het aanbieden van kunstmatige voeding. In het uitvoeringsbeleid vergunningsaanvragen ten behoeve van de veehouderij wordt vermeld dat een schade-baten analyse voor aanvragen waar een economisch belang van toepassing is en gericht zijn op symptoombestrijding, positief uit kunnen vallen als er aanvullende baten zijn te behalen bij het project. In het geval van het onderhavige project is het verduurzamen van de mate waarop vissen (in het bijzonder de Yellowtail kingfish) worden gehouden een dergelijke bijdrage. 5.2 lid1

## **6 Voorstel besluit incl. voorstel geldigheidsduur van de vergunning**

5.2 lid1

De ingangsdatum van de vergunning kan niet voor de verzenddatum van de beschikking zijn en zal indien van toepassing aangepast worden. Dit is ook het geval bij een voorgenomen besluit.

## **7 Concept beschikking voor akkoord CCD**

---

**Van:** info@zbo-ccd.nl  
**Verzonden:** vrijdag 15 juli 2022 11:33  
**Aan:** 5.1 lid2h  
**CC:** 5.1 lid2e 5.1 lid2h  
**Onderwerp:** Aanhouden AVD 5.1 lid2h 202216106

Geachte 5.1 lid2e

Op 09-06-2022 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "Effect of carbohydrates on digestive functioning and faecal characteristics of yellowtail kingfish (*Seriola lalandi*)" met aanvraagnummer AVD 5.1 lid2h 202216106. In uw aanvraag zitten voor ons nog enkele onduidelijkheden. In dit bericht leest u wat wij nog nodig hebben en wanneer u een beslissing kunt verwachten.

#### Welke informatie nog nodig

Wij hebben de volgende informatie van u nodig om uw aanvraag verder te kunnen beoordelen:

#### Niet technische samenvatting

In uw NTS noemt u de term 'chymus'. Deze term is niet begrijpelijk voor het algemene publiek. Kunt u deze term aanpassen?

Kunt u onder het kopje 'Objectives of the project' van uw NTS de relevantie van het voorgestelde project verder toelichten?

Zonder deze aanvullende informatie kan de beslissing nadelig voor u uitvallen omdat de gegevens onvolledig of onduidelijk zijn.

#### Opsturen binnen veertien dagen

Stuur de ontbrekende informatie binnen veertien dagen na de datum van dit bericht op. U kunt dit aanleveren via NetFTP.

#### Wanneer een beslissing

De behandeling van uw aanvraag wordt opgeschort tot het moment dat wij de aanvullende informatie hebben ontvangen. Als u goedkeuring krijgt op uw aanvraag, kunt u daarna beginnen met het project.

Mocht u vragen hebben, dan kunt u uiteraard contact met ons opnemen.

Met vriendelijke groet,  
Namens de Centrale Commissie Dierproeven

5.1 lid2e

[www.centralecommissiedierproeven.nl](http://www.centralecommissiedierproeven.nl)

.....  
Postbus 93118 | 2509 AC | Den Haag  
.....

T: 0800 789 0789

E: info@zbo-ccd.nl

Geachte CCD,

Naar aanleiding van de opmerkingen bij ons project "Effect of carbohydrates on digestive functioning and faecal characteristics of yellowtail kingfish (*Seriola lalandi*)" met aanvraagnummer AVD5.1 lid2H 202216106 hebben wij de onderstaande antwoorden geformuleerd. Bijgevoegd de hernieuwede NTS, deze is ook opnieuw geupload in APandE.

**Opmerking CCD:** In uw NTS noemt u de term 'chymus'. Deze term is niet begrijpelijk voor het algemene publiek. Kunt u deze term aanpassen?

**Antwoord:** De term chymus is veranderd naar darminhoud.

**Opmerking CCD:** Kunt u onder het kopje 'Objectives of the project' van uw NTS de relevantie van het voorgestelde project verder toelichten.

**Antwoord:** De nadruk is nu duidelijker gelegd op het hoofddoel van het doen van fundamenteel onderzoek en de toepasbaarheid (vertaalslag naar andere soorten) is verder toegelicht. Deze sectie leest nu als volgt:

*Het hoofddoel is fundamenteel onderzoek naar de impact van verschillende typen koolhydraten op de vertering, verteringskinetiek en mestkwaliteit. Naast het fundamentele doel heeft het onderzoek ook een direct toepasbaar doel, namelijk het verbeteren van de hoeveelheid en consistentie (stevigheid) van de mest van vissen door middel van het voer. Een verbeterde vertering en mestkwaliteit zal een gunstig effect hebben op afvalwaterkwaliteit en de waterkwaliteit in kweeksystemen. Als mest uit elkaar valt in het water kan het zorgen voor hoge concentraties van zwevende/fijne deeltjes in het kweekstelsel die moeilijk te verwijderen. Deze deeltjes kunnen meerdere negatieve effecten hebben op bijvoorbeeld de vis (kieuwen: verminderd zuurstofopname) en de waterkwaliteit (verminderd functioneren van het bio filter). Tijdens het onderzoek wordt gewerkt met geelstaart koningsvis, echter is relevantie breder en zijn de uitkomsten ook toepasbaar voor andere soorten die last hebben van slechte (instabiele) mestkwaliteit zoals zalm. In Noorwegen dienen kwekers van zalmen die gebruik maken van kooiculturen zo veel mogelijk de mest onder de kooien te verwijderen. Dit is eenvoudiger als de mest stabiel is.*

*Met de transitie naar meer plantaardige ingrediënten in visvoerders is het belangrijk inzicht te krijgen op de invloed van koolhydraten op verteringskinetiek en mestkwaliteit. Daardoor kunnen deze inzichten bijdragen aan een verminderd gebruik van vismeel.*

Was eerst:

*Het uiteindelijke doel is om de mestkwaliteit (hoeveelheid en consistentie) van vissen in de aquacultuur te verbeteren doormiddel van het voer, in dit project ligt de focus op de koolhydraat fractie (zetmeel en vezels) in het voer. Met de transitie naar meer plantaardige ingrediënten in visvoerders is het belangrijk inzicht te krijgen op de invloed van koolhydraten op verteringskinetiek en mestkwaliteit. Er wordt gekeken in hoeverre geelvintonijn om kan gaan met deze koolhydraten en hoe voer gerelateerde factoren kunnen bijdragen om de mestkwaliteit en verteringskinetiek te verbeteren. Een verbeterde vertering en mestkwaliteit zal een gunstig effect hebben op afvalwaterkwaliteit. Daarnaast kunnen deze inzichten bijdragen aan een verminderd gebruik van vismeel.*

## NON-TECHNICAL PROJECT SUMMARY

<b>Country</b>	NL	*
<b>Language</b>	nl	*
<b>EU submission</b>	yes [1]	*
<b>Title of the project</b>	Effect van koolhydraten op de mestproductie van geelstaart	
<b>NTS identifier</b>		
<b>NTS national identifier</b>	NTS202216106	
<b>Duration of the project</b>	60	(in months) *
<b>Keywords</b>	*	
Keyword 1	Geelstaart koningsvis	
Keyword 2	Mest kwaliteit	
Keyword 3	Koolhydraten	
Keyword 4	Water kwaliteit	
Keyword 5	Verteeringskinetiek	

### [Purpose\(s\) of the project](#)

#### Objectives and predicted benefits of the project

##### Objectives of the project

Het hoofddoel is fundamenteel onderzoek naar de impact van verschillende typen koolhydraten op de vertering, verteringskinetiek en mestkwaliteit. Naast het fundamentele doel heeft het onderzoek ook een direct toepasbaar doel, namelijk het verbeteren van de hoeveelheid en consistentie (stevigheid) van de mest van vissen door middel van het voer. Een verbeterde vertering en mestkwaliteit zal een gunstig effect hebben op afvalwaterkwaliteit en de waterkwaliteit in kweeksystemen. Als mest uit elkaar valt in het water kan het zorgen voor hoge concentraties van zwevende/fijne deeltjes in het kweekstelsel die moeilijk te verwijderen. Deze deeltjes kunnen meerdere negatieve effecten hebben op bijvoorbeeld de vis (kieuwen: verminderd zuurstofopname) en de waterkwaliteit (verminderd functioneren van het bio filter). Tijdens het onderzoek wordt gewerkt met geelstaart koningsvis,

##### Potential benefits likely to derive from this project

Wetenschappelijke relevantie: het onderzoek richt zich op het verkrijgen van wetenschappelijke inzichten in het effect van voeding (verschillende factoren, met focus op factoren gerelateerd aan de transitie naar meer plantaardige ingrediënten in visvoerders) op de mestkwaliteit en de verteringskinetiek. Het effect van de onderzochte factoren op de mestkwaliteit en verteringskinetiek in geelstaart koningsvis is nog niet bekend.

Maatschappelijke relevantie: de resultaten van het onderzoek kunnen leiden tot adviezen voor de voeding voor de kweek van geelstaart koningsvis, wat de voedingsbenutting kan bevorderen en kan bijdragen aan het ontwikkelen van duurzame visvoerders, waaronder een minder noodzakelijk gebruik van vismeel. Daarnaast draagt het onderzoek bij aan het verbeteren van de waterkwaliteit in

##### Predicted harms

In what procedures will the animals typically be used



Voor het nemen van monsters van onder andere darminhoud en lichaamssamenstelling zullen de dieren gedood worden. Het afnemen van bloed gebeurt onder verdoving, waarna de dieren direct gedood worden (dieren komen niet meer bij). Daarnaast zullen de dieren gewogen worden onder lichte verdoving, kort vasten en verschillende diëten krijgen. Dit zal hoogstens licht ongerief met zich meebrengen.

#### Expected impacts/adverse effects on the animals \*

Tijdens het wegen zullen de dieren licht verdoofd zijn en tijdens het afnemen van bloed zullen ze verdoofd zijn, daarnaast worden geen nadelige effecten verwacht.

#### Expected harms \*

#### Fate of animals kept alive

#### Reasons for the planned fate of the animals after the procedure \*

Voor het nemen van monsters van onder andere chymus, lichaamssamenstelling en weefsels zullen de dieren gedood worden. Deze monsters kunnen alleen verkregen worden door het doden van de dieren.

#### **Application of the Three Rs**

##### **1. Replacement** \*

De onderzochte processen (verteringskinetiek, etc.) zijn alleen te bestuderen in levende dieren en kunnen niet nagebootst worden buiten het dier.

##### **2. Reduction** \*

De experimenten zijn zo ontworpen dat het minimale aantal proefdieren wordt gebruikt om alle essentiële analyses te kunnen uitvoeren en om tot statistisch onderbouwde resultaten te komen.

### 3. Refinement

De diëten zijn volwaardige diëten die alle nutriënten voldoende bevatten. Tijdens handelingen zijn de vissen licht verdoofd. Voorafgaand aan het nemen van samples voor lichaamssamenstelling en darminhoud worden de vissen eerst gedood met een overdosis anesthesie. Mest voor het bepalen van de verteerbaarheid kan gesampled worden op een niet-invasieve manier.

Explain the choice of species and the related life stages

Geelstaart koningsvis is een zoutwater kweekvis die zijn opkomst maakt in kweeksystemen op het land. De huidige vraag naar geelstaart koningsvis is hoog en wordt verwacht verder toe te nemen in de toekomst. Door de waterige/slechte mestkwaliteit van geelstaart koningsvis is de mest moeilijk te verwijderen uit water, wat de fijne deeltjes (mest) in het water en effluent verhoogd, wat kan leiden tot slechte waterkwaliteit (en omstandigheden van de vis) en hoog waterverbruik (relevantie). Daarnaast kan geelstaart koningsvis als modeldier voor andere soorten met een slechte mestkwaliteit dienen. De vissen bevinden zich bij gebruik in het juveniele stadium (nog niet geslachtsrijp), dit is een stadium dat zeer relevant is voor de fysiologische ontwikkeling en voor onderzoekers gemakkelijk te hanteren is.

#### Project selected for Retrospective Assessment

Project selected for RA?

no [0]

Deadline for RA

Reasons for retrospective assessment

Contains severe procedures

Uses non-human primates

Other reason

Explanation of the other reason for retrospective assessment

#### Additional fields

National field 1





# Advies aan CCD

**B**

Datum 25 juli 2022  
Betreft Advies Secretariaat over Aanvraag projectvergunning Dierproeven AVD202216106

Instelling: 5.1 lid2h  
Onderzoeker: 5.1 lid2e  
Project: Effect of carbohydrates on digestive functioning and faecal characteristics of yellowtail kingfish (*Seriola lalandi*)  
Aanvraagnummer: AVD202216106  
Betreft: Nieuwe aanvraag  
Categorieën: Fundamenteel onderzoek  
Translationeel of toegepast onderzoek

## 1 Inzicht in aanvraag en de eventuele knelpunten en risico's

<b>Proces</b>	De volgende vragen zijn gesteld aan de aanvrager.  Vragen over de NTS: In uw NTS noemt u de term 'chymus'. Deze term is niet begrijpelijk voor het algemene publiek. Kunt u deze term aanpassen?  Kunt u onder het kopje 'Objectives of the project' van uw NTS de relevantie van het voorgestelde project verder toelichten?			
<b>Naam proef</b>	<b>Diersoort</b>	<b>Stam</b>	<b>Aantal dieren</b>	<b>Herkomst</b>
<b>3.4.3.1 Faeces quality and quantity measurements</b>				
	Andere vissen (andere Pisces)	Yellowtail kingfish	1.232	<b>Dieren die niet voor onderzoek gefokt zijn</b>

## Huisvesting en verzorging anders dan Bijlage III Richtlijn

### 3.4.3.1 Faeces quality and quantity measurements

Citaat:

The entire trial will be carried out in the digestibility unit (n = 12 circular tanks) of the research facility. All tanks are connected to a recirculating water treatment system. The volume of each tank is 300L. At the start of the trial, 24 fish will be stocked per tank. Prior to stocking, each individual group of 24 fish will be weighed under anaesthesia in three batches.

Water quality and environmental conditions are maintained for optimal known conditions: Physio-chemical parameters are: photoperiod 20h light, 4h dark; water refreshment of the system according to NO<sub>3</sub>-N limits; water flow in the tank 7 L/min; temperature 23-25 degree; pH 7.3 - 7.6; NH<sub>3</sub>-N <2 mg/L; NH<sub>3</sub>-N <0.06 mg/L; NO<sub>2</sub>-N <1 mg/L; NO<sub>3</sub>-N <100 mg/L; salinity 33 - 35 ppt; dissolved oxygen >5.5 mg/L.

## Gebruik van mannelijke en vrouwelijke dieren

### 3.4.3.1 Faeces quality and quantity measurements

Andere vissen (andere Pisces) Er worden zowel mannelijke als vrouwelijke dieren gebruikt.

<b>Locatie uitvoering experimenten</b>	- Alle proeven vinden plaats in een instelling van een vergunninghouder. - Er zijn geen problemen bekend met de vergunninghouder.
--	--

## 2 DEC advies

<b>DEC-advies</b>	<p>Citaat C4: [...] De DEC heeft vastgesteld dat er een directe en reële relatie is tussen beide doelstellingen en dat het directe doel gerechtvaardigd is binnen de context van het onderzoeksveld. De DEC heeft tijdens de discussie wel besproken in hoeverre de intensivering van de aquacultuur überhaupt een wenselijke situatie is. Dit onderwerp komt in verschillende onderdelen van dit advies terug.</p> <p>Citaat C9: Er is sprake is van de volgende bijzondere categorie(ën) van dieren, omstandigheden of behandeling van de dieren: <input type="checkbox"/> Niet gefokt voor dierproeven (11, bijlage I richtlijn) De keuze hiervoor is realistisch ingeschat en geclassificeerd.</p> <p>Citaat C10: De dieren worden gehuisvest en verzorgd op een wijze die niet voldoet aan de eisen die zijn opgenomen in bijlage III van richtlijn 2010/63/EU.</p> <p>Ethische afweging van de DEC: Citaat D:</p>
-------------------	---

1.

De centrale morele vraag van het project is: Is het gebruik van 1232 vissen met licht ongerief en dood gerechtvaardigd teneinde informatie te verzamelen om de vissen in praktijk te voeren met een (hoofdzakelijk) plantaardig dieet met toevoegingen, dat minder vervuiling geeft van het gebruikte water en zo duurzamer zou zijn?

2.

De DEC constateert dat het hier gaat om een aanvraag met voldoende samenhang. De DEC heeft haar afweging gemaakt na de volgende schade baten analyse: Er is licht ongerief voor 1232 dieren, maar de dieren worden gedood in het kader van de proef (basaal belang). De integriteit wordt geschaad door een voer te geven dat afwijkt van het natuurlijke voer voor deze dieren (serieus belang). De baten zijn hier vooral economisch. De yellowtail kingfish is commercieel interessant omdat het een high-end niche markt bedient, aldus medegedeeld door een visexpert binnen de DEC (perifeer belang). Verder wordt er mogelijk kennis verzameld die van belang zou kunnen zijn voor de sector (onzeker: perifeer belang).

3.

Het antwoord op de morele vraag is deze keer niet eenduidig voor de gehele DEC. Dit is uitgebreid besproken in de DEC-vergadering, wat geresulteerd heeft in het volgende: de meerderheid van de DEC-leden kan de centrale morele vraag met 'ja' beantwoorden. Een minderheid van drie leden kon zich hier niet in vinden en namens hen is onder E2 een minderheidsstandpunt geformuleerd.

De DEC heeft extern advies ingewonnen bij

- de aanvrager is om aanvullingen gevraagd

De DEC heeft vragen gesteld aan de aanvrager die betrekking hadden op de toegepaste dieetsamenstelling, de korte en lange termijn impact op de welzijn en gezondheid van het dier, het optimaliseren van huidige systemen, de statistische onderbouwing van de aantallen dieren, de toegevoegde waarde van de voorgestelde vissoort aan de voedselvoorziening en in hoeverre de kennis in de praktijk toegepast zal worden.

Het DEC advies is Positief

Het uitgebrachte advies is niet gebaseerd op consensus.

Citaat E2:

Het uitgebrachte advies is niet gebaseerd op consensus. De meerderheid van de DEC: uit de antwoorden blijkt, dat goed over het project is nagedacht en biedt zeker sterke mogelijkheden tot uitbreiding van onze kennis betreffende diersoort overschrijdende kennis van (verterings)fysiologie. Natuurlijk is het risico dat een dergelijk project bijdraagt aan een ongewenste nieuwe intensieve dierlijke productie nooit uit te sluiten, maar kan zeker ook bijdragen aan een structurele verbetering van bestaande intensieve visteelten.

Namens een drietal DEC-leden volgt hier het minderheidsstandpunt:

Het antwoord op de morele vraag is dat dit onderzoek niet moreel te rechtvaardigen is. De onderbouwing hiervoor is als volgt:

Ten eerste: Een algemene zorg: de huidige ontwikkeling in de aquacultuur lijkt er een te zijn van toenemende intensivering en instrumentalisering van de houderij en het dier. Worden hier niet dezelfde fouten gemaakt als in het verleden bij de intensieve veehouderij?

Ten tweede: Het belang van het kweken van de Yellow tail kingfish is esthetisch (smaakvol product) en commercieel en gericht op een high-end niche markt. Het draagt als zodanig weinig bij aan de voedselvoorziening met dierlijke (vis) eiwitten. Er zijn al voldoende alternatieven hiervoor bij andere vissoorten. (Het discussiepunt hoe noodzakelijk dat überhaupt is voor de voedselvoorziening is hieronder nog als buiten de context opmerking opgenomen.)

Ten derde: Aan de carnivore vis wordt een met kunstmatige toevoegingen bewerkte voer gevoerd. De vis wordt, door het eten van een dieet dat voor dat voor de vis geen natuurlijke samenstelling heeft, gedwongen zich aan te passen aan het systeem dat de feces van een meer plantaardig voer zonder toevoegingen niet goed kan verwerken. Dit is een aantasting van de intrinsieke waarde en integriteit van het dier.

Kortom: Het draait hier om een aantasting van de integriteit van het dier, waarvoor de belangrijkste rechtvaardiging een esthetisch en commercieel belang is. Dit is daarom een voorbeeld van (niet noodzakelijke) instrumentalisering en vertechnering in de dierhouderij, die in deze tijd steeds meer als moreel ongewenst wordt gezien, en volgens de mening van een minderheid (drie leden) van de DEC ook moreel onjuist is.

De volgende dilemma's zijn gesignaleerd door de DEC:

Citaat E3:

Buiten de context: is het kweken van dieren voor consumptie überhaupt nog te verantwoorden?

### 3 Kwaliteit DEC advies

Kwaliteit DEC-advies
<p>Het DEC advies is navolgbaar. In het DEC advies is op heldere wijze inzicht gegeven in de vragen die aan de aanvrager zijn gesteld. Echter, bij de beantwoording van de beoordelingsvragen ontbreekt veelal een heldere uitwerking van de visie van de DEC. Graag zag de CCD een weerspiegeling van de discussies met betrekking tot de beoordelingsvragen binnen de DEC. Desondanks volgt de ethische afweging op logische wijze uit de beantwoording van de C vragen.</p> <p>Uw oordeel over de onderbouwing ontbreekt bij C10. Graag hadden wij uw conclusie hierover in het advies onder C10 teruggezien.</p> <p>Onder E3 van uw advies noemt u een dilemma dat buiten de context ligt van onderhavig projectvoorstel. Het door u gestelde dilemma, te weten of het kweken van dieren voor consumptie nog steeds te verantwoorden is, overstijgt de competentie van de CCD, waardoor zij de DEC geen passende terugkoppeling kan geven.</p> <p>Wij waarderen de door u benoemde dilemma's in het minderheidsstandpunt met betrekking tot het kweken van dieren voor consumptie en de toenemende intensivering van de aquacultuur. In onze ogen is dit dilemma vergelijkbaar met de ethiek rondom dierproeven ten behoeve van de veehouderij. Ons beoordelingskader ten aanzien van dergelijke aanvragen is toegelicht in de handreiking 'Uitvoeringsbeleid vergunningsaanvragen veehouderij', die te downloaden is op onze website. Als het gaat om dierproeven ten behoeve van de veehouderij, acht de CCD het van belang dat de dierproeven een directe bijdrage leveren aan het verbeteren van welzijn en gezondheid van de doeldieren of dat het project bijdraagt aan andere aspecten van verduurzaming van de veehouderij. Aan een economisch belang kent de CCD een beperkt belang toe. De CCD vindt het daarnaast van belang dat aanvragen niet enkel gericht zijn op symptoombestrijding, omdat deze problematiek vaak ook verminderd kan worden door aanpassing van het huidige veehouderij systeem. De huidige aanvraag richt zich naast het onderzoeken van een aangepast dieet bij de vissen uiteindelijk ook op het verduurzamen van het houden van de vissen in aquacultuur. Gezien het lichte ongerief van de proeven en de mogelijke welzijns- en duurzaamheidsopbrengsten van het project hebt u in onze ogen een juiste ethische inschatting gemaakt.</p>



#### 4 Inhoudelijke beoordeling

<p><b>Doelstelling</b> Doelstelling</p>	<p>Citaat: The overall research objective of the present project is to investigate 'Effect of carbohydrates on digestive functioning, nutrient digestibility (i.e. amount of faecal waste produced) and faecal characteristics of yellowtail kingfish (<i>Seriola lalandi</i>).' The ultimate goal is to improve the sustainability of yellowtail kingfish farming through the diet, by reducing the impact of the waste load on the Recirculating Aquaculture System (and the environment) and at the same time guaranteeing fish health. The research is both fundamental and translational and applied. It is expected that the outcome of this project contributes to the following immediate goals. (1) reduce the total waste load by improving the faecal quality (recovery), by: - studying the effect of both starch and non-starch-polysaccharides on faecal quality - studying ways to mitigate the effect of both starch and non-starch polysaccharides on faecal quality (2) reduce the total waste production (improving digestibility) by: - studying the effect of starch and non-starch polysaccharides on nutrient digestibility and digestion kinetics - studying ways to mitigate the effect of both starch and non-starch polysaccharides on nutrient digestibility and digestion kinetics. This all contributes to the overall aim of allowing the transition for more plant-based-diets when farming yellowtail kingfish.</p>
<p>Wetenschappelijk en maatschappelijk belang</p>	<p>Citaat: Scientific relevance: Investigating the digestion mechanisms of starch and NSP will enable to better understand the underlying mechanisms of carbohydrates on nutrient digestion and faecal quality (recovery and production). Additionally, obtained knowledge on the effects of carbohydrate on nutrient digestibility and faecal quality might create opportunities in different finfish species with poor quality faeces (e.g. salmon). Social relevance: the results of the study will ultimately lead to a reduced amount of TSS in the system and effluent water of RAS improving, allowing an increased inclusion of plant-based ingredients in feed formulation for yellowtail kingfish farming. Both improved waste management and safeguarding fish health through feed formulation for yellowtail kingfish farming will improve the sustainability of the yellowtail kingfish farming. This can have a positive view of society for aquaculture.</p>
<p>Onderbouwing wetenschappelijk en maatschappelijk belang</p>	<p>Het belang is voldoende uitgewerkt en onderbouwd.</p>

<b>Wetenschappelijke kwaliteit</b> Kwaliteit aanvrager/ onderzoeksgroep en onderzoek	<p>Citaat DEC advies C7: De DEC heeft vastgesteld dat de kennis en kunde van de onderzoeksgroep en andere betrokkenen bij de dierproeven, afgaande op het geschreven voorstel en het oordeel van de IvD, wel voldoende gewaarborgd zijn.</p> <p>Het Secretariaat heeft geen reden te twijfelen aan de kwaliteit van de aanvragers en het onderzoek.</p>
---	---

### 3V's

Vervanging	
	<b>3.4.3.1 Faeces quality and quantity measurements:</b> Citaat: Little is known about the interaction between carbohydrates and their effect on digestive functioning, pH, osmolality, viscosity, DM, microbiota composition and bile acid content for yellowtail kingfish. Studying this requires a whole animal model. No replacement is possible for this complex mechanisms.
Verminderen	
	<b>3.4.3.1 Faeces quality and quantity measurements:</b> Citaat: Multiple non-invasive experiments were done prior to the project, the reduce the amount of experimental treatments. 24 fish per experimental unit (200 g body weight at the end of each experiment) is the minimal needed for sufficient chyme collection. All other samples (besides chyme) will be taken from fish used for chyme collection.
Verfijnen	
	<b>3.4.3.1 Faeces quality and quantity measurements:</b> Citaat: The experimental diets fed to the fish are complete diets providing all necessary macro and micronutrients nutrient required for yellowtail kingfish. To reduce discomfort of fish during weighing and blood sampling, sedation/anaesthesia will be applied. For tissue and chyme sampling fish will be first killed using an overdose of benzocaine. The system allows to collect faeces using non-invasive methods.

<b>Hergebruik</b>	Er is geen sprake van hergebruik van dieren.
-------------------	--

<b>Naam proef</b>	<b>Worden de dieren gedood?</b>	<b>Doden volgens richtlijn?</b>
3.4.3.1 Faeces quality and quantity measurements	Ja	volgens de richtlijn.

<b>Naam proef</b>		
<b>3.4.3.1 Faeces quality and quantity measurements</b>	HEP: Worden niet verwacht	
Andere vissen (andere Pisces)	Ongerief: 100,0% Licht	

## 5 Samenvatting

### 5.2 lid1

De aanvrager geeft aan dieren in te zetten die niet zijn gefokt voor dierproeven. Het betreft onderzoek in Yellowtail kingfish, welke ook als doeldier fungeert. Zowel de DEC als 5.2 lid1

De aanvrager beschrijft dat de huisvesting van de dieren afwijkt van de richtlijnen zoals genoemd in bijlage III van richtlijn 2010/63/EU. 5.2 lid1

Het DEC advies is gebaseerd op een meerderheidsstandpunt. Een aantal DEC leden is van mening dat het voorgestelde onderzoek bij zal dragen aan de intensivering van de viskwekerij en dat de verbetering van de kweek van de Yellowtail kingfish voornamelijk een economisch belang behartigt en, samen met de reeds aanwezige alternatieve bronnen van viseiwitten, minimaal bijdraagt aan de voedselvoorziening. Daarnaast zijn deze DEC leden overtuigd dat de (proef)dieren onnodig worden aangetast door het aanbieden van kunstmatige voeding. In het uitvoeringsbeleid vergunningsaanvragen ten behoeve van de veehouderij wordt vermeld dat een schade-baten analyse voor aanvragen waar een economisch belang van toepassing is en gericht zijn op symptoombestrijding, positief uit kunnen vallen als er aanvullende baten zijn te behalen bij het project. In het geval van het onderhavige project is het verduurzamen van de mate waarop vissen (in het bijzonder de Yellowtail kingfish) worden gehouden een dergelijke bijdrage. 5.2 lid1

## 6 Voorstel besluit incl. voorstel geldigheidsduur van de vergunning

### 5.2 lid1

De ingangsdatum van de vergunning kan niet voor de verzenddatum van de beschikking zijn en zal indien van toepassing aangepast worden. Dit is ook het geval bij een voorgenomen besluit.

## **7 Concept beschikking voor akkoord CCD**

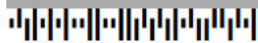


> Retouradres Postbus 93118 2509 AC Den Haag

5.1 lid2h

5.1 lid2e

5.1 lid2h



**Centrale Commissie  
Dierproeven**

Postbus 93118  
2509 AC Den Haag  
centralecommissiedierproeven.nl  
0800 789 0789  
info@zbo-ccd.nl

**Onze referentie**

Aanvraagnummer  
AVD 5.1 lid2h 202216106

**Bijlagen**

3

Datum 25 juli 2022

Betreft Beslissing aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte 5.1 lid2e,

Op 9 juni 2022 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "Effect of carbohydrates on digestive functioning and faecal characteristics of yellowtail kingfish (*Seriola lalandi*)" met aanvraagnummer AVD 5.1 lid2h 202216106. Wij hebben uw aanvraag beoordeeld.

### **Beslissing**

Wij keuren uw aanvraag goed. Uit artikel 10a, eerste lid van de Wet op de dierproeven (hierna: de wet) volgt daarom dat het is toegestaan om uw project uit te voeren binnen de gestelde vergunningsperiode. Deze vergunning wordt afgegeven voor de periode van 25 juli 2022 tot en met 30 juni 2027.

De onderbouwing van deze beslissing vindt u onder 'Overwegingen'.

### **Procedure**

#### *Advies dierexperimentencommissie*

Wij hebben advies gevraagd bij de dierexperimentencommissie 5.1 lid2h (hierna: DEC). Dit advies is ontvangen op 14 juli 2022. Bij de beoordeling van uw aanvraag is dit advies betrokken overeenkomstig artikel 10a, derde lid van de wet.

### *Nadere vragen aanvrager*

Op 15 juli 2022 hebben wij u om aanvullingen gevraagd. U heeft tijdig antwoord gegeven. Het verzoek om aanvullingen had betrekking op technisch taalgebruik en het benoemen van de relevantie van het voorgestelde project in de NTS. Uw reactie is betrokken bij de behandeling van uw aanvraag.

**Datum:**

25 juli 2022

**Aanvraagnummer:**

AVD 5.1 lid2n 202216106

### **Overwegingen**

Wij kunnen ons vinden in de inhoud van het advies van de DEC, inclusief de daaraan ten grondslag liggende motivering.

### **Bezwaar**

Als u het niet eens bent met deze beslissing, kunt u binnen zes weken na verzending van deze brief schriftelijk een bezwaarschrift indienen.

Een bezwaarschrift kunt u sturen naar Centrale Commissie Dierproeven, afdeling Juridische Zaken, postbus 93118, 2509 AC Den Haag.

Bij het indienen van een bezwaarschrift vragen we u in ieder geval de datum van de beslissing waartegen u bezwaar maakt en het aanvraagnummer te vermelden. U vindt deze nummers in de rechter kantlijn in deze brief.

Bezwaar schorst niet de werking van het besluit waar u het niet mee eens bent. Dat betekent dat dat besluit wel in werking treedt en geldig is. Nadat u een bezwaarschrift heeft ingediend kunt u een voorlopige voorziening vragen bij de voorzieningenrechter van de rechtbank in de vestigingsplaats van de vergunninghouder. U moet dan wel kunnen aantonen dat er sprake is van een spoedeisende situatie.

Voor de behandeling van een voorlopige voorziening is griffierecht verschuldigd. Op

<http://www.rechtspraak.nl/Organisatie/Rechtbanken/Pages/default.aspx> kunt u zien onder welke rechtbank de vestigingsplaats van de vergunninghouder valt.

**Meer informatie**

Heeft u vragen, kijk dan op [www.centralecommissiedierproeven.nl](http://www.centralecommissiedierproeven.nl), stuur een e-mail naar [info@zbo-ccd.nl](mailto:info@zbo-ccd.nl) of neem telefonisch contact met ons op: 0800 789 0789.

**Datum:**

25 juli 2022

**Aanvraagnummer:**AVD **5.1 lid2e** 202216106

Centrale Commissie Dierproeven  
namens deze:

**5.1 lid2e**

drs. F. Braunstahl  
Algemeen Secretaris

**Bijlagen:**

- Projectvergunning
- DEC-advies
- Weergave wet- en regelgeving



# Projectvergunning

## gelet op artikel 10a van de Wet op de Dierproeven

Verleent de Centrale Commissie Dierproeven aan

Naam:

Adres:

Postcode en plaats:

Deelnemersnummer:

5.1 lid2h

deze projectvergunning voor het tijdvak 25 juli 2022 tot en met 30 juni 2027, voor het project "Effect of carbohydrates on digestive functioning and faecal characteristics of yellowtail kingfish (*Seriola lalandi*)" met aanvraagnummer AVD 5.1 lid2h 202216106, na advies van dierexperimentencommissie 5.1 lid2h. De functie van de verantwoordelijk onderzoeker is 5.1 lid2h. Het besluit is gebaseerd op de volgende (aangepaste) stukken:

- 1 een aanvraagformulier projectvergunning dierproeven, zoals ontvangen op 9 juni 2022
- 2 de bij het aanvraagformulier behorende bijlagen:
  - a Projectvoorstel, zoals ontvangen op 14 juli 2022;
  - b Bijlagen dierproeven
    - 3.4.3.1 Faeces quality and quantity measurements, zoals ontvangen op 14 juli 2022;
  - c Niet-technische Samenvatting van het project, zoals ontvangen op 21 juli 2022;
  - d Advies van dierexperimentencommissie, zoals ontvangen op 14 juli 2022
  - e De aanvullingen op uw aanvraag, zoals ontvangen op 21 juli 2022.

Naam proef	Diersoort/ Stam	Aantal dieren	Ongerief
<b>3.4.3.1 Faeces quality and quantity measurements</b>			
	Andere vissen (andere Pisces) / Yellowtail kingfish	1.232	100,0% Licht

### Geldende voorschriften

Wij wijzen u op onderstaande geldende voorschriften, die volgen uit artikel 1d, vierde lid, artikel 10, eerste lid en/of artikel 10a3 van de wet.

- Go/ no go momenten worden voor aanvang van elk experiment afgestemd met de IvD.
- Het is verboden een dierproef te verrichten voor een doel dat, naar de algemeen kenbare, onder deskundigen heersende opvatting, ook kan worden bereikt anders dan door middel van een dierproef, of door middel van een dierproef waarbij minder dieren kunnen worden gebruikt of minder ongerief wordt berokkend dan bij de in het geding zijnde proef het geval is.
- Het is verboden dierproeven te verrichten voor een doel waarvan het belang niet opweegt tegen het ongerief dat aan het proefdier wordt berokkend.
- Overige wettelijke bepalingen blijven van kracht.





**Aanvraagnummer:**

AVD<sup>5.1 lid2n</sup> 202216106

## Weergave wet- en regelgeving

### **Dit project en wijzigingen**

Volgens artikel 10c van de Wet op de Dierproeven (hierna de wet) is het verboden om andere dierproeven uit te voeren dan waar de vergunning voor is verleend. De dierproeven mogen slechts worden verricht in het kader van een project, volgens artikel 10g, derde lid van de wet. Uit artikel 10b, eerste lid van de wet volgt dat de dierproeven zijn ingedeeld in de categorieën terminaal, licht, matig of ernstig. Als er wijzigingen in een dierproef plaatsvinden, moeten deze gemeld worden aan de Centrale Commissie Dierproeven. Hebben de wijzigingen negatieve gevolgen voor het dierenwelzijn, dan moet volgens artikel 10a5, eerste lid van de wet de wijziging eerst voorgelegd worden en mag deze pas doorgevoerd worden na goedkeuren door de Centrale Commissie Dierproeven. Artikel 10b, tweede en derde lid van de wet schrijven voor dat het verboden is een dierproef te verrichten die leidt tot ernstige mate van pijn, lijden, angst of blijvende schade die waarschijnlijk langdurig zal zijn en niet kan worden verzacht, tenzij hiervoor door de Minister een ontheffing is verleend.

### **Verzorging**

De fokker, leverancier en gebruiker moeten volgens artikel 13f van de wet over voldoende personeel beschikken en ervoor zorgen dat de dieren behoorlijk worden verzorgd, behandeld en gehuisvest. Er moeten ook personen zijn die toezicht houden op het welzijn en de verzorging van de dieren in de inrichting, personeel dat met de dieren omgaat moet toegang hebben tot informatie over de in de inrichting gehuisveste soorten en personeel moet voldoende geschoold en bekwaam zijn. Ook moeten er personen zijn die een eind kunnen maken aan onnodige pijn, lijden, angst of blijvende schade die tijdens een dierproef bij een dier wordt veroorzaakt. Daarnaast zijn er personen die zorgen dat een project volgens deze vergunning wordt uitgevoerd en als dat niet mogelijk is zorgen dat er passende maatregelen worden getroffen.

In artikel 9 van de wet staat dat de persoon die het project en de dierproef opzet deskundig en bekwaam moet zijn. In artikel 8 van het Dierproevenbesluit 2014 staat dat personen die dierproeven verrichten, de dieren verzorgen of de dieren doden, hiervoor een opleiding moeten hebben afgerond.

Voordat een dierproef die onderdeel uitmaakt van dit project start, moet volgens artikel 10a3 van de wet de uitvoering afgestemd worden met de instantie voor dierenwelzijn.

### **Pijnbestrijding en verdoving**

In artikel 13 van de wet staat dat een dierproef onder algehele of plaatselijke verdoving wordt uitgevoerd tenzij dat niet mogelijk is, dan wel bij het verrichten van een dierproef worden pijnstillers toegediend of andere goede methoden gebruikt die de pijn, het lijden, de angst of de blijvende schade bij het dier tot een minimum beperken. Een dierproef die bij het dier gepaard gaat met zwaar letsel dat hevige pijn kan veroorzaken, wordt niet zonder verdoving uitgevoerd. Hierbij wordt afgewogen of het toedienen van verdoving voor het dier traumatischer is dan de dierproef zelf en het toedienen van verdoving onverenigbaar is met het doel van de dierproef. Bij een dier wordt geen stof toegediend waardoor het dier niet meer of slechts in verminderde mate in staat is pijn te tonen, wanneer het dier niet tegelijkertijd

**Aanvraagnummer:**AVD 5.1 lid2f 202216106

voldoende verdoving of pijnstilling krijgt toegediend, tenzij wetenschappelijk gemotiveerd. Dieren die pijn kunnen lijden als de verdoving eenmaal is uitgewerkt, moeten preventief en postoperatief behandeld worden met pijnstillers of andere geschikte pijnbestrijdingsmethoden, mits die verenigbaar zijn met het doel van de dierproef. Zodra het doel van de dierproef is bereikt, moeten passende maatregelen worden genomen om het lijden van het dier tot een minimum te beperken.

**Einde van een dierproef**

Artikel 13a van de wet bepaalt dat een dierproef is afgelopen wanneer voor die dierproef geen verdere waarnemingen hoeven te worden verricht of, voor wat betreft nieuwe genetisch gemodificeerde dierenlijnen, wanneer bij de nakomelingen niet evenveel of meer, pijn, lijden, angst, of blijvende schade wordt waargenomen of verwacht dan bij het inbrengen van een naald. Er wordt dan door een dierenarts of een andere ter zake deskundige beslist of het dier in leven zal worden gehouden. Een dier wordt gedood als aannemelijk is dat het een matige of ernstige vorm van pijn, lijden, angst of blijvende schade zal blijven ondervinden. Als een dier in leven wordt gehouden, krijgt het de verzorging en huisvesting die past bij zijn gezondheidstoestand.

Volgens artikel 13b van de wet moet de dood als eindpunt van een dierproef zoveel mogelijk worden vermeden en vervangen door in een vroege fase vaststelbare, humane eindpunten. Als de dood als eindpunt onvermijdelijk is, moeten er zo weinig mogelijk dieren sterven en het lijden zo veel mogelijk beperkt blijven.

Uit artikel 13c van de wet volgt dat het doden van dieren door een deskundig persoon moet worden gedaan, wat zo min mogelijk pijn, lijden en angst met zich meebrengt. De methode om te doden is vastgesteld in de Europese richtlijn artikel 6.

In artikel 13d van de wet is vastgesteld dat proefdieren geadopteerd kunnen worden, teruggeplaatst in hun habitat of in een geschikt dierhouderijsysteem, als de gezondheidstoestand van het dier het toelaat, er geen gevaar is voor volksgezondheid, diergezondheid of milieu en er passende maatregelen zijn genomen om het welzijn van het dier te waarborgen.

---

**Van:** info@zbo-ccd.nl  
**Verzonden:** donderdag 28 juli 2022 09:35  
**Aan:** 5.1 lid2h  
**Onderwerp:** Terugkoppeling over projectvergunningsaanvraag AVD 5.1 lid2h 202216106

**Categorieën:** Dossier: Maurice

Geachte 5.1 lid2h ,

Op 09-06-2022 hebben wij een aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen waarover uw DEC advies heeft uitgebracht. Het gaat om het project 'Effect of carbohydrates on digestive functioning and faecal characteristics of yellowtail kingfish (Seriola lalandi)' met aanvraagnummer AVD 5.1 lid2h 202216106.

De CCD heeft de aanvrager aanvullende vragen gesteld. De aanvullingen hadden betrekking op technisch taalgebruik en het benoemen van de relevantie van het voorgestelde project in de NTS.

De CCD heeft besloten de vergunning toe te wijzen. De aanvrager en verantwoordelijk onderzoeker zijn hierover ingelicht. De beschikking is verstuurd op 25-7-2022.

Het DEC advies is navolgbaar. In het DEC advies is op heldere wijze inzicht gegeven in de vragen die aan de aanvrager zijn gesteld. Echter, bij de beantwoording van de beoordelingsvragen ontbreekt veelal een heldere uitwerking van de visie van de DEC. Graag zag de CCD een weerspiegeling van de discussies met betrekking tot de beoordelingsvragen binnen de DEC. Desondanks volgt de ethische afweging op logische wijze uit de beantwoording van de C vragen.

Uw oordeel over de onderbouwing ontbreekt bij C10. Graag hadden wij uw conclusie hierover in het advies onder C10 tergezien.

Onder E3 van uw advies noemt u een dilemma dat buiten de context ligt van onderhavig projectvoorstel. Het door u gestelde dilemma, te weten of het kweken van dieren voor consumptie nog steeds te verantwoorden is, overstijgt de competentie van de CCD, waardoor zij de DEC geen passende terugkoppeling kan geven.

Wij waarderen de door u benoemde dilemma's in het minderheidsstandpunt met betrekking tot het kweken van dieren voor consumptie en de toenemende intensivering van de aquacultuur. In onze ogen is dit dilemma vergelijkbaar met de ethiek rondom dierproeven ten behoeve van de veehouderij. Ons beoordelingskader ten aanzien van dergelijke aanvragen is toegelicht in de handreiking 'Uitvoeringsbeleid vergunningsaanvragen veehouderij', die te downloaden is op onze website. Als het gaat om dierproeven ten behoeve van de veehouderij, acht de CCD het van belang dat de dierproeven een directe bijdrage leveren aan het verbeteren van welzijn en gezondheid van de doeldieren of dat het project bijdraagt aan andere aspecten van verduurzaming van de veehouderij. Aan een economisch belang kent de CCD een beperkt belang toe. De CCD vindt het daarnaast van belang dat aanvragen niet enkel gericht zijn op symptoombestrijding, omdat deze problematiek vaak ook verminderd kan worden door aanpassing van het huidige veehouderij systeem. De huidige aanvraag richt zich naast het onderzoeken van een aangepast dieet bij de vissen uiteindelijk ook op het verduurzamen van het houden van de vissen in aquacultuur. Gezien het lichte ongerief van de proeven en de mogelijke welzijns- en duurzaamheidsopbrengsten van het project hebt u in onze ogen een juiste ethische inschatting gemaakt.

Mocht u vragen hebben over onze beslissing, dan kunt u uiteraard contact met ons opnemen.

Met vriendelijke groet,

Namens de Centrale Commissie Dierproeven

5.1 lid2e

[www.centralecommissiedierproeven.nl](http://www.centralecommissiedierproeven.nl)

.....  
Postbus 93118 | 2509 AC | Den Haag

.....  
T: 0800 789 0789

E: [info@zbo-ccd.nl](mailto:info@zbo-ccd.nl)