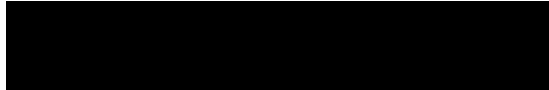




> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag



Postbus 20401  
2500 EK Den Haag  
www.centralecommissiedierproe  
ven.nl

T 0900 2800028  
ZBO-CCD@mines.nl

**Onze referentie**  
CCD 2015-45

**23 JUNI 2015**

Datum

Betreft Wob-verzoek W15-03

Geachte 

In uw email van 20 april 2015 heeft u met een beroep op de Wet openbaarheid van bestuur (hierna: Wob) informatie verzocht met betrekking tot vergunningaanvragen NTS 201550 Bescherming functionaliteit gehoorzenuw, NTS 201545 Opwekken van antigeen-specifieke immuunrespons, NTS 201547 Onderzoek visvriendelijkheid pompen en turbines, NTS 201544 Bioflocs, feed fish more with less en NTS 201541 Migratiemogelijkheden trekvis in Nederlandse rivieren.

Op uw verzoek vind alle correspondentie plaats per email. De ontvangst van uw verzoek is schriftelijk bevestigd op 21 april 2015. In deze brief is tevens de beslistermijn met vier weken verdaagd tot 16 juni 2015.

#### **Opschorting**

In de brief van 6 mei 2015 met kenmerk CCD 2015-28 is de beslistermijn met twee weken opgeschort vanwege het vragen van zienswijzen aan derden. De uiterste beslistermijn was daarmee 30 juni 2015.

#### **Wettelijk kader**

Uw verzoek valt deels onder de reikwijdte van de Wob.

#### **Inventarisatie documenten**

Op basis van uw verzoek zijn in totaal 52 documenten aangetroffen. Deze documenten zijn opgenomen in een inventarislijst, die als bijlage bij dit besluit is gevoegd. In dit besluit wordt verwezen naar de corresponderende nummers uit de inventarislijst, zodat per document duidelijk is wat is besloten.

Een document is dubbel opgenomen in de inventarisatie, dit wordt echter eenmaal verstrekt. Het betreft NTS 201547 document 11, dat identiek is aan document 5.

### **Zienswijzen**

Er zijn derde belanghebbenden bij de openbaarmaking van de documenten, deze zijn in de gelegenheid gesteld hierover een zienswijze te geven.

#### **Zienswijze NTS 201541 en NTS 201547**

Vergunninghouder geeft aan dat de projectbeschrijvingen en bijbehorende bijlagen concurrentiegevoelige informatie bevatten. Openbaarmaking daarvan zou de concurrentiepositie van vergunninghouder, die het onderzoek in concurrentie uitvoert met andere advies en ingenieursbureaus, in hoge mate schaden.

Vanwege eerbiediging van de persoonlijke levenssfeer en ter voorkoming van onevenredige bevoordeling of benadeling van de bij de aangelegenheid betrokken natuurlijke personen of rechtspersonen danwel derden wil de adviserende DEC niet dat informatie over de DEC openbaar wordt.

#### **Zienswijze NTS 201550**

Vergunninghouder en adviserende DEC willen namen en contactgegevens van medewerkers vanwege privacy en dieractivisme niet openbaar maken. Dat geldt ook voor andere gegevens die herleidbaar zijn tot medewerkers van betreffende organisaties.

#### **Zienswijze NTS 201544 en NTS 201545**

Vergunninghouder heeft uit overwegingen van bescherming van personen en bedrijfsgeheimen bedenkingen tegen openbaarmaking van persoonsgegevens, contactgegevens, locatiegegevens en bedrijfsgegevens. Ook kunnen stukken vertrouwelijke informatie bevatten die vanwege contractuele afspraken niet openbaar mogen worden gemaakt.

De zienswijzen heeft de CCD in haar belangenafweging meegenomen.

### **Besluit**

De CCD heeft besloten een deel van de door u opgevraagde informatie niet openbaar te maken. De motivering vindt u in het onderdeel Overwegingen in dit besluit.

### **Reeds openbare documenten**

Van iedere verleende vergunning wordt een niet-technische samenvatting op de website van de CCD gepubliceerd. Deze informatie is daarmee reeds openbaar.

Het betreft NTS 201541 document 9, NTS 201544 document 9, NTS 201545 document 6, NTS 201547 document 10 en NTS 201550 document 6.

### **Overwegingen**

Allereerst wil de CCD u wijzen op het volgende. Ingevolge artikel 3, vijfde lid, van de Wob, wordt een verzoek om informatie ingewilligd met inachtneming van het bepaalde in de artikelen 10 en 11.

Het recht op openbaarmaking op grond van de Wob dient uitsluitend het publieke belang van een goede en democratische bestuursvoering. Het komt iedere burger

in gelijke mate toe. Daarom kan ten aanzien van de openbaarheid geen onderscheid worden gemaakt naar gelang de persoon of de bedoeling of belangen van de verzoeker. Bij de te verrichten belangenafweging worden dan ook betrokken het algemene belang bij openbaarmaking van de gevraagde informatie en de door de weigeringsgronden te beschermen belangen, maar niet het specifieke belang van de verzoeker.

Evenmin kent de Wob een beperkte vorm van openbaarmaking. Dit betekent dat openbaarmaking van de gevraagde documenten uitsluitend aan u op grond van de Wob niet mogelijk is. Indien de betreffende documenten aan u worden verstrekt, moet de CCD deze ook aan anderen geven indien zij daarom verzoeken. In dat licht vinden de onderstaande belangenafwegingen dan ook plaats.

### **Bedrijfs- en fabricagegegevens**

Artikel 10, eerste lid, aanhef en onder c, van de Wob bepaalt dat het verstrekken van informatie achterwege blijft voor zover dit bedrijfs- en fabricagegegevens betreft, die door natuurlijke personen of rechtspersonen vertrouwelijk aan de overheid zijn medegedeeld.

In de documenten NTS 201541 met nummers 2, 3, 5, 6 en 7 en NTS 201547 met nummers 2, 3, 7, 8 en 9 en NTS 201545 met nummer 2, staan bedrijfsgegevens en fabricagegegevens. Deze gegevens zijn door vergunninghouder vertrouwelijk aan de CCD meegedeeld in het kader van artikel 10a van de Wet op de dierproeven.

Uit bovengenoemde documenten kunnen wetenswaardigheden worden afgeleid met betrekking tot de technische bedrijfsvoering en het productieproces, de onderzoeksstrategie-, methoden en commerciële toepassing van de resultaten van het onderzoek. Met openbaarmaking krijgen ook concurrerende instellingen inzicht in deze gegevens, waardoor de concurrentiepositie van vergunninghouder wordt aangetast. De toepassing van specifieke onderzoeksmethoden en -middelen is een zeer belangrijke factor in de keuze van opdrachtgevers voor betreffende vergunninghouder, die het onderzoek uitvoert in concurrentie met andere advies- en ingenieursbureaus. Deze informatie zal de CCD daarom niet openbaar maken.

Voor alle bovengenoemde documenten geldt dat de vertrouwelijke en concurrentiegevoelige bedrijfs- en fabricagegegevens onlosmakelijk zijn verbonden en vervlochten met de resterende gegevens in de betreffende documenten. De CCD zal de documenten daarom in het geheel niet openbaar maken.

Overigens wordt het publiek wel degelijk geïnformeerd over het onderzoek, zonder daarbij concurrentiegevoelige informatie prijs te geven. Dat gebeurt in de vorm van een niet technische samenvatting, die voor alle verleende projectvergunningen wordt gepubliceerd op de website van de CCD.

### **De eerbiediging van de persoonlijke levenssfeer**

Op grond van artikel 10, tweede lid, aanhef en onder e, van de Wob blijft verstrekking van informatie achterwege voor zover het belang daarvan niet opweegt tegen het belang dat de persoonlijke levenssfeer wordt geëerbiedigd.

In NTS 201541 documenten 1, 4, 8, 9 en 12, NTS 201544 documenten 1, 4 t/m 8 en 11, NTS 201545 documenten 1, 5 en 8, NTS 201547 documenten 1, 5, 6 en 13, NTS 201550 documenten 1 en 8 staan persoonsgegevens. De CCD is van oordeel dat t.a.v. deze gegevens het belang dat de persoonlijke levenssfeer wordt geëerbiedigd, zwaarder moet wegen dan het belang van openbaarheid. Personen die betrokken zijn bij het verrichten van dierproeven oefenen een maatschappelijke taak uit, en lopen het risico slachtoffer te worden van dierenrechtenactivisme<sup>1</sup>. Dat geldt ook voor de medewerkers van de CCD. Daarom zijn de persoonsgegevens verwijderd uit deze documenten.

### **Het voorkomen van onevenredige bevoordeling of benadeling**

Op grond van artikel 10, tweede lid, aanhef en onder g, van de Wob blijft verstrekking van informatie achterwege voor zover het belang daarvan niet opweegt tegen het belang van het voorkomen van onevenredige bevoordeling of benadeling van bij de aangelegenheid betrokken natuurlijke personen of rechtspersonen dan wel van derden.

### *Herleidbaarheid*

Integrale openbaarmaking van de door u opgevraagde gegevens leidt in dit geval tot onevenredige benadeling van de organisaties en de medewerkers waarop de gegevens betrekking hebben. In hierna te noemen documenten staat informatie die rechtstreeks of op zeer eenvoudige wijze te herleiden is naar de betrokken organisaties of personen. Het is niet uitgesloten dat openbaarmaking van deze gegevens vanuit dierenrechtenactivisme buitensporige reacties kan opleveren jegens deze organisaties of personen.

In verband met de zienswijze van de vergunninghouder en de adviserende DEC weegt de CCD voor de documenten NTS 201544 nummers 1 t/m 8 en 11 en NTS 201545 nummers 1 t/m 5 en 8 en NTS 201541 nummers 1, 8 en 12 en NTS 201547 nummers 1, 5 en 13 het belang van het voorkomen van onevenredige benadeling zwaarder dan het belang van openbaarmaking. Daarom is uit de betreffende documenten alle informatie verwijderd waarmee deze organisaties of personen geïdentificeerd kunnen worden:

- Namen van natuurlijke personen, zoals onderzoekers en contactpersonen
- Namen van vergunninghouder en adviserende DEC
- Deelnemernummer van de vergunninghouder
- Locatiegegevens als straatnaam, postcode, plaats maar ook de afdeling en het organisatieonderdeel wanneer deze door de naam of de specifieke unieke omschrijving direct te herleiden zijn tot de betreffende organisatie,
- Emailadressen, telefoonnummers en faxnummers die direct herleidbaar zijn tot personen of organisaties

### *Voorkomen van fraude*

Wanneer de CCD handtekeningen van bestuurders openbaar maakt zijn deze eenvoudig te kopiëren. Het is niet uitgesloten dat kwaadwillenden deze handtekening gebruiken voor frauduleuze doeleinden. Het belang van het voorkomen van onevenredige benadeling weegt de CCD hier zwaarder dan het

---

<sup>1</sup> blz 14 MvT Wet op de dierproeven,

belang van openbaarmaking. Daarom zijn uit alle vergunningen de handtekeningen van bestuurders verwijderd.

#### *Concurrentiegevoelige informatie*

De documenten NTS 201541 met nummers 2, 3, 5, 6 en 7 en NTS 201547 met nummers 2, 3, 7, 8 en 9 en NTS 201545 met nummer 2 bevatten bedrijfsvertrouwelijke en concurrentiegevoelige informatie. Openbaarmaking daarvan zou concurrenten onevenredig bevoordelen, zij krijgen op eenvoudige wijze en zonder investeringen inzicht in bedrijfsvertrouwelijke en concurrentiegevoelige informatie. Vergunninghouder zou door openbaarmaking onevenredig benadeeld worden vanwege de aantasting van haar concurrentiepositie en daarmee samenhangende financiële schade.

Voor bovengenoemde bovengenoemde documenten weegt de CCD het belang van het voorkomen van onevenredige benadeling en onevenredige bevoordeling zwaarder dan het belang van openbaarmaking.

Voor al deze documenten geldt dat de vertrouwelijke en concurrentiegevoelige gegevens onlosmakelijk zijn verbonden en vervlochten met de resterende gegevens in de betreffende documenten. De documenten worden daarom in het geheel niet openbaar gemaakt.

#### **Persoonlijke beleidsopvattingen in een stuk voor intern beraad**

Artikel 11, eerste lid, van de Wob bepaalt dat in geval van een verzoek om informatie uit documenten, opgesteld ten behoeve van intern beraad, geen informatie wordt verstrekt over daarin opgenomen persoonlijke beleidsopvattingen.

Alle ambtelijke adviezen zijn opgesteld ten behoeve van intern beraad en bevatten persoonlijke beleidsopvattingen. Het betreft de documenten NTS 201541 nummer 10, NTS 201544 nummer 10, NTS 201545 nummer 7, NTS 201547 nummer 12 en NTS 201550 nummer 7. De CCD verstrekt daarover geen informatie.

De CCD acht het niet in het belang van een goede en democratische bestuursvoering indien standpunten van ambtenaren zelfstandig worden betrokken in de publieke discussie. De CCD ziet dan ook geen aanleiding om met toepassing van artikel 11, tweede lid, van de Wob in niet tot personen herleidbare vorm informatie te verstrekken over deze persoonlijke beleidsopvattingen. De ambtelijke adviezen bevatten ook feitelijke informatie. Deze is echter zodanig verweven met de persoonlijke beleidsopvattingen dat die daar niet los van kan worden gezien. De CCD heeft daarom besloten alle ambtelijke adviezen geheel te weigeren.

#### **Uitgestelde openbaarmaking**

Aangezien naar verwachting belanghebbenden bezwaar hebben tegen de openbaarmaking van de informatie vindt de feitelijke openbaarmaking van de documenten niet eerder plaats, dan twee weken na dagtekening van deze beschikking, conform artikel 6, vijfde lid, van de Wob. Op deze wijze wordt aan deze belanghebbenden de mogelijkheid geboden om te proberen de openbaarmaking tegen te houden. Dit kan door het indienen van een

bezwaarschrift bij de CCD én door daarnaast bij de rechtbank te verzoeken om, bij wijze van voorlopige voorziening, het onderhavige besluit tot openbaarmaking te schorsen. Indien binnen twee weken na dagtekening van dit besluit een bezwaarschrift is ingediend en een verzoek om voorlopige voorziening is gedaan, wordt de uitspraak van de voorzieningenrechter afgewacht, voordat tot daadwerkelijke openbaarmaking wordt overgegaan.

De stukken die met dit besluit voor een ieder openbaar worden, zullen na afloop van de twee-weken termijn op [www.centralecommissiedierproeven.nl](http://www.centralecommissiedierproeven.nl) worden geplaatst.

Met vriendelijke groet,

De Centrale Commissie Dierproeven,  
namens deze



ir. G. de Peuter  
Algemeen Secretaris

### **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 20401, 2500 EK 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 onderwerp te vermelden. U vindt deze gegevens bovenaan 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. U kunt tijdens deze procedure een voorlopige voorziening vragen bij de Voorzieningenrechter van de rechtbank in de woonplaats van de aanvrager. U moet dan wel kunnen aantonen dat er sprake is van een spoedeisend belang.

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 aanvrager valt.

Inventaris Wob-verzoek W15-03											
nr.	document	wordt verstrekt			weigeringsgronden			11.1			
		reeds openbaar	niet geheel	deels	10.1.c	10.2.e	10.2.g				
	NTS 201541 Migratiemogelijkheden trekvis in NL rivieren										
1	Aanvraagformulier							X			
2	Projectvoorstel -oud		X					X			
3	Bijlage beschrijving dierproeven -oud		X					X			
4	Brief CCD aanhouden beoordeling dd 20 maart 2015			X							
5	Projectvoorstel - nieuw		X					X			
6	Bijlage 1 beschrijving dierproeven -nieuw		X					X			
7	Bijlage 2 beschrijving dierproeven - nieuw		X					X			
8	DEC advies							X			
9	NTS										
10	Ambtelijk advies aan CCD		X								X
11	oplegnotitie ambtelijk advies		X								X
12	vergunning			X				X			X



Inventaris Wob-verzoek W15-03										
nr.	document	wordt verstrekt			weigeringsgronden					
		reeds openbaar	niet geheel	deels	10.1.c	10.2.e	10.2.g			
	NTS 201544 Bioflocs feed fish more with less									11.1
1	Aanvraagformulier					X				
2	projectvoorstel								X	
3	Bijlage beschrijving dierproeven									X
4	Brief CCD aanhouden beoordeling dd 23 maart 2015			X				X		
5	Reactie aanvrager dd 26 maart 2015			X				X		
6	Brief CCD aanhouden beoordeling dd 30 maart 2015			X				X		
7	Reactie aanvrager dd 31 maart 2015							X		
8	DEC advies			X				X		
9	NTS 201544	X								
10	Ambtelijk advies aan CCD									
11	vergunning			X				X		X



Inventaris Wob-verzoek W15-03										
nr.	document	wordt verstrekt			weigeringsgronden			11.1		
		reeds openbaar	niet geheel	deels	10.1.c	10.2.e	10.2.g			
	NTS 201545 Opwekken antigeen specifiek immuunrespons									
1	Aanvraagformulier			X				X		
2	Projectvoorstel			X	X				X	
3	Bijlage 1 beschrijving dierproeven			X					X	
4	Bijlage 2 beschrijving dierproeven			X					X	
5	DEC advies							X	X	
6	NTS	X								
7	Ambtelijk advies		X							X
8	Vergunning			X				X	X	

Inventaris Wob-verzoek W15-03										
nr.	document	wordt verstrekt			weigeringsgronden			11.1		
		reeds openbaar	niet geheel	deels	10.1.c	10.2.e	10.2.g			
	NTS 201547 Onderzoek visvriendelijkheid in pompen en turbines									
1	Aanvraagformulier			X			X			
2	Projectvoorstel -oud		X		X			X		
3	Bijlage beschrijving dierproef - oud		X		X				X	
4	NTS -oud			X						
5	DEC advies (zelfde als doc 11)					X		X		
6	Brief CCD aanhouden beoordelen dd 20 maart 2015					X		X		
7	Projectvoorstel -nieuw		X				X		X	
8	Bijlage 1 beschrijving dierproeven -nieuw		X				X		X	
9	Bijlage 2 beschrijving dierproeven - nieuw		X				X		X	
10	NTS -nieuw	X								
11	zelfde als document 5									
12	Ambtelijk advies		X							X
13	vergunning			X			X		X	

Inventaris Wob-verzoek W15-03										
nr.	document	wordt verstrekt			weigeringsgronden			11.1		
		reeds openbaar	niet	geheel	deels	10.1.c	10.2.e		10.2.g	
	NTS 201550 Bescherming functionaliteit gehoorzenuw									
1	Aanvraagformulier				X			X		
2	projectvoorstel									
3	Bijlage 1 beschrijving dierproeven									
4	Bijlage 2 beschrijving dierproeven									
5	DEC advies				X					
6	NTS	X								
7	Ambtelijk advies		X							X
8	Vergunning				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

1.1 Heeft u een deelnemernummer van de NVWA?  
*Neem voor meer informatie over het verkrijgen van een deelnemernummer contact op met de NVWA.*

Ja > Vul uw deelnemernummer in [redacted]

Nee > U kunt geen aanvraag doen

1.2 Vul de gegevens in van de instellingsvergunninghouder die de projectvergunning aanvraagt.

Naam instelling of organisatie [redacted]

Naam van de portefeuillehouder of diens gemachtigde [redacted]

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.*

KvK-nummer [redacted]

Straat en huisnummer [redacted]

Postbus [redacted]

Postcode en plaats [redacted]

IBAN [redacted]

Tenaamstelling van het rekeningnummer [redacted]

1.4 Vul de gegevens in van de verantwoordelijke onderzoeker.

(Titel) Naam en voorletters [redacted]  Dhr.  Mw.

Functie [redacted]

Afdeling [redacted]

Telefoonnummer [redacted]

E-mailadres [redacted]

1.5 (Optioneel) Vul hier de gegevens in van de plaatsvervangende verantwoordelijke onderzoeker.

(Titel) Naam en voorletters [redacted]  Dhr.  Mw.

Functie [redacted]

Afdeling [redacted]

Telefoonnummer [redacted]

E-mailadres [redacted]

- 1.6 (Optioneel) Vul hier de gegevens in van de persoon die er verantwoordelijk voor is dat de uitvoering van het project in overeenstemming is met de projectvergunning.
- (Titel) Naam en voorletters  Dhr.  Mw.
- Functie
- Afdeling
- Telefoonnummer
- E-mailadres
- 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
- Melding op (verleende) vergunning die geen negatieve gevolgen kan hebben voor het dierenwelzijn  
Vul uw vergunde projectnummer in en ga verder met vraag 2.3
- 2.2 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
- 2.3 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 einddatum van het project?
- Startdatum 0 1 \_ 0 5 \_ 2 0 1 5
- Einddatum 3 1 \_ 1 2 \_ 2 0 1 7
- 3.2 Wat is de titel van het project?
- Bioflocs, the key to feed fish more with less
- 3.3 Wat is de titel van de niet-technische samenvatting?
- Meer met minder / Bioflocs, the key to feed fish more with less
- 3.4 Wat is de naam van de Dierexperimentencommissie (DEC) aan wie de instellingsvergunninghouder doorgaans haar projecten ter toetsing voorlegt?
- Naam DEC
- Postadres
- E-mailadres

## 4 Betaalgegevens

- 4.1 Om welk type aanvraag gaat het?
- Nieuwe aanvraag Projectvergunning € 741,00 Lege
- Wijziging € Lege
- 4.2 Op welke wijze wilt u dit bedrag aan de CCD voldoen.
- Via een eenmalige incasso
- Na ontvangst van de factuur
- 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.*

## 5 Checklist bijlagen

- 5.1 Welke bijlagen stuurt u mee?
- Verplicht
- Projectvoorstel
- Niet-technische samenvatting
- Overige bijlagen, indien van toepassing
- ~~Melding Machining~~ Appendix Description animal procedures
- DEC-advies Bioflocs
- ~~Melding Machining~~ Bioflocs

## 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:
- Centrale Commissie  
Dierproeven  
Postbus 20401  
2500 EK Den Haag
- Ondertekening door de instellingsvergunninghouder of gemachtigde (zie 1.6). De ondergetekende verklaart:
- dat het projectvoorstel is afgestemd met de Instantie voor Dierenwelzijn.
  - 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.
  - 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

Functie

Plaats

Datum

Handtekening



## 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 our website ([www.zbo-ccd.nl](http://www.zbo-ccd.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'.

1.2 Provide the name of the licenced establishment.

1.3 Provide the title of the project.

Bioflocs, the key to feed fish more with less

### 2 Categories

2.1 Please tick each of the following boxes that applies to your project.

Basic research

Translational or applied research

Regulatory use or routine production

Research into environmental protection in the interest of human or animal health or welfare

Research aimed at preserving the species subjected to procedures

Higher education or training

Forensic enquiries



### 3 General description of the project

#### 3.1 Background

Describe the project (motivation, background and context) with respect to the categories selected in 2.

- For legally required animal procedures, indicate which statutory or regulatory requirements apply (with respect to the intended use and market authorisation).
- For routine production, describe what will be produced and for which uses.
- For higher education or training, explain why this project is part of the educational program and describe the learning targets.

The project is a collaboration between [REDACTED] and focusses on bioflocs, gut microbiota and gut functioning in fish.

Bioflocs are highly porous, amorphous aggregations of microorganisms, organic wastes and other constituents held together by extracellular polymeric substances. Bioflocs have been used extensively in the treatment of domestic- and industrial wastewater. The use of bioflocs as internal water purification units in aquaculture is a relatively new approach and is referred to as Biofloc Technology (BFT). In BFT the bioflocs are co-cultured together with the cultured species while the microorganisms in the bioflocs convert organic and inorganic wastes into bacterial biomass. The latter allows a production intensity which is 5 to 10 times higher than in traditional farming systems.

During protein metabolism of fish and shrimp about 25% of the nitrogen present in protein is retained in the biomass of the cultured species. The remainder is lost as uneaten feed, faeces and urinary and branchial loss. Ammonia, which is a main metabolite in protein digestion, is toxic for both fish and crustaceans. This makes ammonia removal critical in maintaining a favourable water quality. BFT relies mainly on heterotrophs, which directly assimilate ammonia into microbial biomass. Direct assimilation of ammonia has an advantage over the autotrophic conversion of ammonia which is a common practice in intensive aquaculture, since no toxic metabolic intermediates and products are formed (e.g. nitrite and nitrate production during nitrification). The production of these toxic compounds makes water replacements of the culture system essential, while with BFT these compounds are stripped from the water column, reducing the need for water replacements to (nearly) nil. When managed correctly much biomass is produced in BFT systems. This is an advantage because the uptake of bioflocs from the water by the cultured species leads to an increase in nutrient retention efficiencies of 10 to 20 %. The nutrient composition of bioflocs is very much suitable to serve as a feed source, it has been shown in multiple studies that both tilapia and shrimp have a better health status and show better growth in an environment with a high concentration of naturally occurring microorganisms (see section 3.3). The exact mechanisms involved leading to the positive effect of bioflocs on the growth, health and homeostasis in aquaculture species are not yet fully understood.

The current project will assess the effect of bioflocs in a bottom-up manner, first the mode of administering the bioflocs will be assessed resulting in a follow-up experiment in which the response to different concentrations of bioflocs in the feed will be examined. Then the active components inside the bioflocs will be evaluated to comprehend which constituents perform which function inside the gut and finally the pro- and prebiotic function of bioflocs and its components will be investigated. The latter will be investigated to evaluate possible effects of bioflocs on soya-induced enteritis (inflammation of intestine) in carnivorous fish, which is triggered by elevated levels of soya protein in the feed. Future expectations are that with development of the biobased economy in fish feeds fishmeal and fish oil will be gradually replaced by plant ingredients, some of them causing gut inflammation. The bioflocs which will be applied in

the above mentioned experiments will be produced under standardized conditions ensuring a stable source. The nutritional value of these bioflocs, which is roughly similar to fish feed on a dry matter basis, and the overall average microbial functionality are expected to remain stable throughout the experiments.

An overarching objective of the project is to assess what role the microbes, derived from bioflocs, play inside the gastrointestinal tract of fish. A better understanding of these mechanisms will aid in the broader implementation of bioflocs as a feed component outside the current mode of application. The project will improve protein utilization and lead to better fish performance. In addition, more waste conversion into bioflocs means less nutrient discharge from aquaculture which will benefit the environment. These possible positive impacts can prove to be of great importance seen the recent re-adjustment in the expected world population (11 billion people by 2100), as estimated by the United Nations. Furthermore, the results of this project will improve understanding of the role microbiota play in the homeostasis and health status of fish. Project concepts might be translatable to other vertebrates, including humans.

---

### 3.2 Purpose

Describe the project's main objective and explain why this objective is achievable.

- If the project is focussed on one or more research objectives, which research questions should be addressed during this project?
- If the main objective is not a research objective, which specific need(s) does this project respond to?

---

The main goal of this project is to generate knowledge and create a deeper perception on the contribution of bioflocs to gut microbiota, gut functioning and homeostasis in fish.

Due to the applicability of bioflocs (defined under 3.1) in the aquaculture sector and the recent insights on the importance of gut microbiota in vertebrates the scope of this project has a nutritional and microbial-ecological direction. This scope will enable us to fill in the knowledge gaps which have been identified prior to the start of this project. The identified knowledge gaps are:

- (1) Is there a difference in the effect between live or dead bioflocs on gut homeostasis in fish;
- (2) Which concentration of bioflocs exerts the maximum effect on gut homeostasis in fish;
- (3) Can we identify 'active principles', explaining the effect of bioflocs on gut homeostasis for example polyhydroxybutyrate (PHB) concentration (substance used in microbial energy storage);
- (4) Which are the principle drivers affecting the microbial species composition in bioflocs under constant and uniform aquaculture like conditions;
- (5) It remains challenging to increase inclusion levels of vegetarian ingredients in aquaculture feed whilst reducing the fishmeal content due to physical reactions on those vegetarian product by, especially carnivorous, fish. Could bioflocs or components in bioflocs exert a countering effect on the physical adverse reactions to diets with high levels of vegetable ingredients.

During the project the following hypotheses will be tested

- Feeding live or dead bioflocs influences the microbial community composition in the gut but not functional stability.
  - Fish performance (growth, feed conversion ratio (FCR), nutrient efficiency, survival) and gut homeostasis are positively affected by bioflocs concentration in the diet.
  - PHB concentration in bioflocs has a significant effect on gut homeostasis.
  - Inclusion of bioflocs in the diet reduces soya-induced enteritis in both herbivorous and carnivorous species
-

The project is exploratory and observes bioflocs, gut microbiota and gut functioning (digestion, growth, chyme content, enzyme activity in gut cells, etc.) under different treatments relevant to commercial fish husbandry. All analytical techniques are commonly used within the project team, but were never combined previously. The team will integrate the obtained data and generate new insights, advancing existing understanding of fish performance in biofloc systems. In this sense, the research feasibility is guaranteed.

### 3.3 Relevance

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

Bioflocs and biofloc technology can meet in the demand and need for less polluting and more productive food production. In addition it can contribute to food safety and security due to several aspects:

- Marine life evolved in presence of 'marine snow' (white organic aggregates of alive and dead organic substances), and numerous organisms will readily consume bioflocs which are similar in appearance (although not necessarily in texture).
- Agricultural and aquacultural waste streams which are converted into bioflocs become a valuable, protein-rich food source for aquatic organisms.
  - o in situ processing of metabolic wastes from fish production improves nutrient efficiency 10 to 20%, even when using lower grade and cheaper food ingredients.
  - o numerous types of organic agricultural wastes available in bulk quantities can be converted in bioflocs, turning a waste into a food ingredient.
- Bioflocs make aquatic organisms healthier:
  - o numerous experiments with bioflocs or biofilms documented better growth, survival, disease resistance and feed utilization, both for fishes and crustaceans.
  - o animals receiving bioflocs show higher resistance to pathogens in disease challenge tests.
  - o inclusion of bacterial biomass in diets of salmon and trout reduced soya-induced enteritis allowing higher inclusion levels of soya in exchange for fish meal without negative health effects. In this sense, biofloc technology can contribute to the improvement of fish meal use efficiency in aquaculture.
- Bioflocs purify water, reducing pollution and improving water use efficiency. This leads to better water quality and allows raising production intensity, heading towards sustainable zero-emission aquaculture production strategies.

The project focuses on analysing shifts in microbial community structure (species composition) and function of microbiota in the gut of fishes exposed or not exposed to live or processed bioflocs. Special attention is given to the production and role of polyhydroxybutyrate in bioflocs on gut functioning. This will yield information on how bioflocs influence microbial ecology and functional stability, and as such influence homeostasis.

The project includes training of one PhD and 4-6 MSc students. Project results will be shared at international conferences and project meetings, will be published in peer reviewed journals and integrated in the teaching of AFI and MIB. International exposure will strengthen the international reputation of The Netherlands as knowledge centre for green and sustainable aquaculture.

Knowledge generated through the project will allow the consortium together with Dutch aqua-feed producers to develop the concept of 'feeding the system' reducing overall feeding costs while improving nutrient use efficiencies and minimizing pollution.

### 3.4 Research strategy

#### 3.4.1 Provide an overview of the overall design of the project (strategy).

Four experiments will be carried out. With the exception of experiment 4, the results of each experiment will affect the set-up of the next experiment. Each experiment addresses one hypothesis;

[Experiment 1:] Feeding live or dead bioflocs influences the microbial community composition in the gut but not functional stability.

The outcome of experiment 1 will result in the decision to use either live or dead bioflocs in experiment 2.

[Experiment 2:] Fish performance (growth, feed conversion ratio, nutrient efficiency, survival) and gut homeostasis are positively influenced by bioflocs concentration in the diet.

The outcome of experiment 1 and 2 will constitute the basis for diet composition and biofloc concentrations in diets used in experiment 3.

[Experiment 3:] PHB concentration in bioflocs has a significant effect on gut homeostasis.

The outcome of experiment 1-3 will result in diet preparation methods, concentrations of inclusion of bioflocs in diet of experiment 4.

[Experiment 4:] Inclusion of bioflocs in the diet reduces soya-induced enteritis in both herbivorous and carnivorous species.

The following scheme depicts a rough timeline of the different experiments carried out during the project.

Year	[ 2015 ]***	[ 2016 ]***	[ 2017 ]
Month	[1-2-3-4-5-6-7-8-9-10-11-12]	[1-2-3-4-5-6-7-8-9-10-11-12]	[1-2-3-4-5-6-7-8-9-10-11-12]
Experiment 1	P P X X L L L L L D D D	W W W W W S	
Experiment 2		P X X L L L L L L D D D W W W W S	
Experiment 3		P X X L L L L L D D D D W	W W S
Experiment 4			P X X L L L D D D D W W W S

X: execution of activity

P: preparation of detailed thesis proposal or experiment

L: laboratory

D: data analysis; ecological modelling

W: manuscript writing

S: article/thesis submission

### 3.4.2 Provide a basic outline of the different components of the project and the type(s) of animal procedures that will be performed.

#### [Experiment 1:]

##### Live versus dead bioflocs

Juvenile Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) will be grown from 1 to 10 g (approximately 30 days duration). Four diets (with known composition) will be tested:

- A: control (based on standard tilapia diet formulation)
- B: 10% live bioflocs from water + 90 % control feed (only treatment with bioflocs in the water)
- C: 10% dried biofloc in feed + 90 % control feed (included in pellet)
- D: 10% dried dead bioflocs in feed + 90 % control feed (included in pellet)

The treatments will be executed in triplicate with aquarium as experimental unit. The animals will be housed in 60 liter aquaria, connected to a recirculating aquaculture system. At the start of the experiment a total of 30 fish will be stocked per aquarium. Prior to the onset of the experiment 60 fish taken from the base population will be sampled to determine their proximate composition and gut microbiota composition. Sixty fish (1-1.5 g individual weight) is sufficient biomass to determine the proximate body composition, except for fat content. Per experimental unit 5 fish will be collected on day 15 and on day 30. These fish will be euthanized using the anaesthetic TMS of which an overdose will be administered after unconsciousness sets in. Each of the sampled fish will be subsequently disinfected, the gut will be removed aseptically, gut resident microbiota will be collected for Illumina MiSeq (to perform microbial community species identification) and gut cell scrapings will be collected for mRNA analysis (to analyse gene expression). The remainder of the fish on day 30 will be euthanized and culled for proximate analysis. Handling of the fish will be avoided as much as possible. When handling is unavoidable (e.g. weighing at start of the experiment) the fish will be anaesthetized to minimize discomfort.

The fish are initially stocked with a total of 30 fish per tank: 5 fish will be sampled on day 15, 5 fish on day 30. Of the fish remaining at the end of the experiment the proximate composition will be determined. Thirty fishes in a 60-l aquarium is an adequate group size because at this density fish display natural feeding behaviour and consume feed in group, resulting in a good feed intake. During the experiment, the biomass will increase. By sampling and removing fish at day 15, the aquarium does not become overcrowded and fish will remain well on the feed.

During the experiment, a group of fishes equaling in number twenty percent of the number of animals initially stocked will serve as 'back-up' animals. These back-up fishes will be housed separately per treatment at the same density as fishes in the experiment. The 18 back-up fish per treatment (6 per experimental unit) will receive the same diets and housed under the same conditions as the experimental animals. The intention is to maintain the back-up fish at a similar average weight as the fish in the experiment. If mortality occurs during the experiment, back-up fish will be relocated to the relevant experimental unit. Replicates with a mortality higher than 20 % will be stopped. Back-up fish which are not used during the experiment will be culled at the end of the experiment.

(\* the fish:water volume ratio is the same for 30 fish in 60 l and 18 fish in 36 l. On day 15 of the experiment 5 fish per aquarium will be removed. No fish will be removed from the back-up aquarium. In stead, the water volume will be increased by 16.7% (= 6 l) to maintain the same fish:water volume ratio as in the experimental aquaria. In case back-up fish need to be transferred to the experimental aquaria, then the water volume in the back-up aquarium will be adjusted to maintain the ratio similar as in the experimental aquaria).

Total number of fish used in this experiment sums up to:  $60 + 360 = 420 + (\text{Back-up fish: } 20 \% \text{ of } 360 = 72) = 492$  fish

Samples taken will include:

- Sampling of 60 fish taken from the base population to determine their proximate composition and gut microbiota composition.
- Samples of microbial communities in bioflocs, feed, culture water and gut (mucus & feces; 5 individuals per sampling day) will be taken on day 15 and day 30. Samples will be used to monitor microbial community composition and enzyme production by next generation sequencing of 16S rRNA gene fragments and the metatranscriptome (total mRNA).
- Daily monitoring of water quality in inlet water to fish tanks (temp., pH, total ammonia nitrogen (TAN), NO<sub>2</sub>, NO<sub>3</sub>, CO<sub>2</sub>, conductivity).
- Histology: gut samples taken at start and end experiment
- Short chain fatty acids (SCFA's): gut and biofloc (fresh & processed) samples start and end
- Remaining fishes will be culled at the end of the experiment and used for proximate analysis. Fish will grow to 8-10 g individual weight at the end of the experiment. A total biomass of 160-200 g is just sufficient to perform a complete proximate analysis.

The choice to sample 5 fish per sampling point per experimental unit was made for statistical reasons, because from previous experiments performed by Giatsis et al. (2014)\*\* we know that 5 fish per sampling provides sufficient statistical power with the proposed statistical- (e.g. PERMANOVA) and bioinformatical methods. Using 3 fish per sampling point (6 possible unique permutations) results in a minimum statistical probability of >10%. When using 4 fish per sampling point (24 unique permutations) the minimum statistical probability is 4.2 %. The minimum probabilities with both 3 and 4 fish per sampling point is too high, while using 5 fish per sampling point (120 unique permutations) results in a maximum probability < 1 % which is adequate.

The tilapia used in treatment B are held in water containing bioflocs. By nature, tilapia are capable of filter feeding and can withstand high concentrations of suspended solids in the water. The animal procedures which will be performed on the fish do not exert negative effects on fish comfort. All treatments will impose mild discomfort.

[Experiment 2:]

Dose response experiment of biofloc concentration in diet on gut homeostasis.

Whether live or dead bioflocs will be used depends on the outcome of experiment 1. Four different biofloc concentrations in the diet will be tested. The concentrations tested will also be decided based on the outcome of experiment 1. Group sizes and sampling protocols will be the same as for experiment 1. All treatments will impose mild discomfort.

[Experiment 3:]

“Active principle”

Two modes of action will be explored:

- Polyhydroxybutyrate: comparing effect of pure grade and biofloc-based PHB at different concentrations.
- Preparation-administration method of bioflocs. Depending on outcome of experiment 1 the methods are:
  - o live bioflocs: filter from water, paste (with binder).
  - o dead biofloc: dried, freeze dried and  $\gamma$ -radiated.

Group sizes and sampling procedures will be same as with experiment 1. Sampling will focus on microbial composition, enzyme production and SCFA's. All treatments will impose mild discomfort.

[Experiment 4:]

Reducing soya-induced enteritis through bioflocs

The composition of test diets will be based on experiences gained in the previous experiments. Besides tilapia, rainbow trout (carnivorous fish) will be

tested. Group sizes per replicate and sampling procedures will be the same as for experiment 1.

It is to be expected that the animals used in the control group of experiment 4 will develop enteritis due to elevated levels of soya in the diet, the level of discomfort is estimated to be moderate. The latter is unavoidable due to the need of a positive control to test the beneficial nature of bioflocs on soya-induced enteritis. The discomfort imposed on the fish of the other treatments is estimated to be mild.

The total number of animals used during the project sums up to:

Nile tilapia:

Experiment 1: 60 fish for initial state + (4 \* 3 \* 30 = 360 fish) = 420 fish  
 Experiment 2: 60 fish for initial state + (4 \* 3 \* 30 = 360 fish) = 420 fish  
 Experiment 3: 60 fish for initial state + (4 \* 3 \* 30 = 360 fish) = 420 fish  
 Experiment 4: 60 fish for initial state + (4 \* 3 \* 30 = 360 fish) = 420 fish +  
 -----  
 1680 fish

Back-up fish: 20 % of 360 = 72 fish  
 Back-up fish: 20 % of 360 = 72 fish  
 Back-up fish: 20 % of 360 = 72 fish  
 Back-up fish: 20 % of 360 = 72 fish +  
 -----  
 288 fish

Rainbow trout:

Experiment 4: 60 fish for initial state + 4 \* 3 \* 30 = 360 fish = 420 fish

Back-up fish: 20 % of 360 = 72 fish

Total use of experimental animals during project: 2100 fish

Total use of experimental animals during project: 360 fish +  
 -----  
 2460 fish

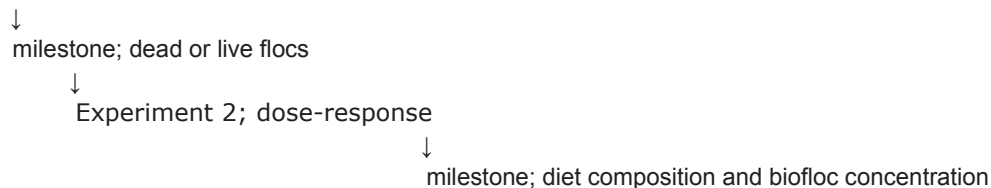
At the start of each experiment 60 fish of the base population of Nile tilapia or rainbow trout will be sampled for proximate analysis. In total 240 Nile Tilapia and 60 rainbow trout will be used.

\*\* Giatsis, C., Sipkema, D., Smidt, H., Verreth, J., Verdegem, M., 2014. The Colonization Dynamics of the Gut Microbiota in Tilapia Larvae. PloS one. 9, e103641.

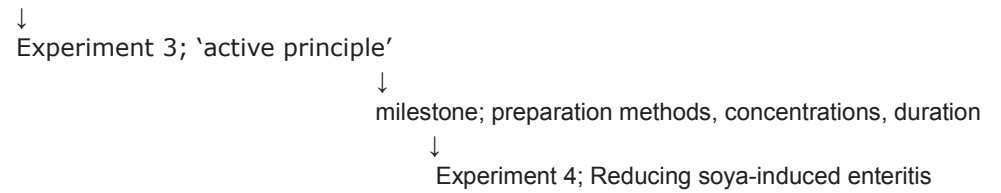
3.4.3 Describe the coherence between the different components and the different steps of the project. If applicable, describe the milestones and selection points.

As described in section 3.4.1 and 3.4.2 the experiments 2, 3 and 4 are all follow-up experiments. Every outcome of an experiment will be a milestone and decision point for the experimental design of its successor.

Experiment 1; live or dead bioflocs







3.4.4 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	Response to nutrition and feeding experiment
2	
3	
5	
6	
7	
8	
9	
10	



## 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, see our website ([www.zbo-ccd.nl](http://www.zbo-ccd.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'.

[Redacted]

1.2 Provide the name of the licenced establishment.

[Redacted]

1.3 List the serial number and type of animal procedure.

Serial number	Type of animal procedure
1	Response to nutrition and feeding experiment

*Use the serial numbers provided in Section 3.4.4 of the Project Proposal form.*

### 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.

Each experiment has a total duration of 30 days.

In each experiment, fish stocked per aquarium will be batch weighted and counted at stocking and harvesting in order to calculate the average individual

weight and growth. The individual weight of the five fish taken for gut sampling on day 15 and 30 will also be measured. A minimum stocking density of 30 fish per experimental unit was chosen to obtain sufficient biomass for proximate analyses at the end of the experiment.

#### Husbandry conditions:

The husbandry setup will be the same for each experiment. Fish are housed in 60 liter (effective volume) aquaria integrated in a recirculating aquaculture system to maintain water quality. Fish behaviour and water quality will be checked on a daily basis conform standard [REDACTED] procedures, using the clinical score sheet recording system. A detailed experimental protocol, outlining all procedures, will be attached to the clinical score sheet for each experiment. For experiment 4, trout and tilapia will be housed in different recirculating aquaculture systems, considering difference in temperature and water quality requirements.

#### Experiment 1:

Juvenile tilapia (1 g individual start weight) will be used to determine the effect of live and dead bioflocs on gut functioning. A total of 4 experimental diets will be used with a set concentration of: (1) dried dead biofloc; (2) dried bioflocs; (3) ingredients matching biofloc composition and (4) a concentration of "fresh" bioflocs from the water, treatments will be executed in triplicate. The animals will be housed in 60-liter aquaria with a total of 30 fish per aquarium at the start of the experiment. At the start of the experiment 60 fish taken from the base population will be sampled to determine their proximate composition and gut microbiota composition before the onset of the experiment. Sixty fish (1-1.5 g individual weight) are needed to provide sufficient biomass to determine the proximate composition, except for fat. Per experimental unit 5 fish will be collected on day 15 and on day 30. These fish will be euthanized using the anaesthetic TMS of which an overdose will be administered after unconsciousness sets in. Each of these fish will be subsequently disinfected, the gut will be removed aseptically, gut resident microbiota will be collected for Illumina MiSeq (to perform microbial community species identification) and gut cell scrapings will be collected for mRNA analysis (to analyse gene expression). The remainder of the fish will be euthanized on day 30 and culled for proximate analyses. Handling of the fish will be avoided as much as possible. When handling is unavoidable (e.g. weighing at start of the experiment) the fish will be anaesthetized to minimize discomfort.

#### Experiment 2:

Juvenile tilapia (1 g individual start weight) will be used to determine the effect of biofloc dose in the diet on gut homeostasis. Four different experimental diets will be tested. The concentrations of bioflocs and whether dead or live bioflocs will be used depends on the outcome of experiment 1. Group size and sampling procedures will be the same as for experiment 1.

#### Experiment 3:

Juvenile tilapia (1 g individual start weight) will be used to determine the effect of both pure grade and biofloc derived PHB in the diet on gut homeostasis and functioning. Group size and sampling procedures will be the same as for experiment 1.

#### Experiment 4:

Nile tilapia and rainbow trout (1 g individual start weight) will be used to determine the reducing effects of bioflocs on soya induced enteritis. The composition of test diets will be based on experience gained during previous experiments. Sampling procedures will be the same as for experiment 1.

---

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

The Nile tilapia will be obtained from Til-Aqua (Velden, the Netherlands), the rainbow trout will be obtained from Mohmen GmbH (Stolberg-Gressenich,

Germany). The tilapia will arrive when they are approximately 0.1 gram individual weight. The trout will be approximately 0.1-0.5 gram individual weight at arrival, depending on availability. After arrival, fish will be stocked according to the general protocol and receive a larval commercial diet until they reach the wanted individual start weight of 1 g.

Twenty percent of the number of animals used in the experiment will serve as 'back-up' animals. A total of 18 fish per treatment (6 per experimental unit) will receive the same diets and housing conditions as the experimental animals. The intention is to maintain the back-up fish at a similar average weight as the experimental fish. If mortality occurs, back-up fish will be relocated to the relevant experimental unit. Replicates with a mortality higher than 20 % will be stopped. Back-up fish which are not used during the experiment will be culled at the end of the experiment.

- At the start of each experiment the 1 g fish will be gently caught using a small net.
- Subsequent to that, the fish will be mildly sedated using TMS after which the fish will be weighted. A total of 60 fish will receive an additional dose of TMS. When euthanized they will be sampled for initial state analyses.
- The experimental animals will be randomly assigned to the experimental units. Random assignment of fish to the experimental units will be done by taking the 360 fish one by one and using randomly generated numbers without repetition between 1 and 360 per fish (Iphone application 'random #'). Fish 1-30 will be stocked in aquarium 1, 31-60 in aquarium 2, etc.

While distributing the 360 fish in 12 batches of 30 fish, the fish are anesthetized and each of the 12 batches will be stocked in a separate bucket. After the fish regain consciousness in the buckets, they will be transferred to the assigned aquarium.

- At day 15 and 30 five randomly assigned fish will be gently caught and euthanized using TMS of which an overdose will be administered after unconsciousness sets in.
- The fish are kept in a 12:12 hr light dark regime
- The fish will be fed twice daily with appropriate and full diets. An exception to the latter are the diets of experiment 4. These treatments will receive a high dose of soya in the diet, the control group of rainbow trout is expected to experience moderate discomfort due to soya-induced enteritis. Based on literature, it is to be expected that the experimental treatments besides the control will not experience this discomfort due to the positive effects of the bioflocs added to the diets.
- Besides the above describes procedures the fish will not be disturbed.

---

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

The choice to sample 5 fish per sampling point per experimental unit was made for statistical reasons, because from previous experiments performed by Giatsis et al. (2014)\* we know that 5 fish per sampling provides sufficient statistical power with the proposed statistical- (e.g. PERMANOVA) and bioinformatical methods. Using 3 fish per sampling point (6 possible unique permutations) results in a minimum statistical probability of > 10%. When using 4 fish per sampling point (26 unique permutations) the minimum statistical probability is 4.2 %. The minimum probabilities with both 3 and 4 fish per sampling point is too high, while using 5 fish per sampling point (120 unique permutations) will results in a maximum probability <1 % which is adequate.

note: Giatsis, C., D. Sipkema, H. Smidt, J. Verreth and M. Verdegem (2014). "The Colonization Dynamics of the Gut Microbiota in Tilapia Larvae." PLoS ONE 9(7): e103641.

---

## **B. The animals**

Specify the species, origin, estimated numbers, and life stages. Provide justifications for these choices.

---

Animals used:

Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*, silver/wild type, natural all male population)  
Rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, wild type)

Origin:

Nile tilapia: Til-Aqua, Velden, the Netherlands

Rainbow trout: Mohmen GmbH (Stolberg-Gressenich, Germany)

Estimated number:

Nile tilapia:

Experiment 1: 60 fish for initial state + (4 \* 3 \* 30 = 360 fish) = 420 fish

Experiment 2: 60 fish for initial state + (4 \* 3 \* 30 = 360 fish) = 420 fish

Experiment 3: 60 fish for initial state + (4 \* 3 \* 30 = 360 fish) = 420 fish

Experiment 4: 60 fish for initial state + (4 \* 3 \* 30 = 360 fish) = 420 fish +

-----  
1680 fish

Back-up fish: 20 % of 360 = 72 fish

Back-up fish: 20 % of 360 = 72 fish

Back-up fish: 20 % of 360 = 72 fish

Back-up fish: 20 % of 360 = 72 fish +

-----  
288 fish

Rainbow trout:

Experiment 4: 60 fish for initial state + 4 \* 3 \* 30 = 360 fish = 420 fish

Back-up fish: 20 % of 360 = 72 fish

Total use of experimental animals during project: 2100 fish

Total use of experimental animals during project: 360 fish +

-----  
2460 fish

At the start of each experiment 60 fish of the base population of Nile tilapia or rainbow trout will be sampled for proximate analysis. In total 240 Nile Tilapia and 60 rainbow trout will be sampled before the onset of the experiments.

Life stages:

Experiment 1-4: 1-10 gram fish individual weight

Groups of 30 fish are stocked because this is the number of fishes sampled and analyzed: 5 fish sampled on day 15, 5 fish sampled on day 30 and the proximate composition of the remaining 20 fish will be determined at the end of the experiment. Housing 30 fish in a 60-l aquarium is adequate for fish to display good feeding behaviour. Within a few days after stocking the fish will be adapted to the housing conditions and feeding schedule. Per experimental unit 5 fish will be collected on day 15 and on day 30. During the experiment, the biomass increases. By culling fish at day 15, the aquarium does not become overcrowded and fish will remain well on the feed. Previous experiments showed that a sample size of 5 animals is sufficient for statistical analysis of this type of data (Giatsis et al. 2014; see end of section A). The remaining 20 animals will be used for proximate analyses (to determine growth and nutrient efficiency in the different treatments). The 160-200 g total fish biomass of the 20 fish collected at the end of the experiment is just sufficient to perform proximate analysis.

The choice for tilapia as an experimental animal is a logical consequence of the importance of this species to worldwide aquaculture, the current use of this

kind in biofloc systems and their nature as a filter feeder. Much is known about tilapia and most literature available regarding fish farming in biofloc systems is based on experiments with shrimp or tilapia. During the last experiment rainbow trout and Nile tilapia will be used to elaborate the effects of bioflocs, or its components, on the gut functioning and health of carnivorous fish.

### **C. Re-use**

Will the animals be re-used?

No, continue with question D.

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

Are the previous or proposed animal procedures classified as 'severe'?

No

Yes> Provide specific justifications for the re-use of these animals during the procedures.

### **D. 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.

Little is known about the influences of bioflocs on the health and growth of fish. Due to the complexity of the processes in the intestine of fish, in this case there is a need for in situ research. Unfortunately there is no alternative for using fish to answer the fundamental issues addressed in the project. Groups of 30 fish are stocked because at a lower density it is difficult to get all fish to react well to the administered feed. Within a few days fish get adapted to the housing conditions and feeding schedule.

Per experimental unit 5 fish will be collected on day 15 and on day 30. During the experiment, the biomass increases. By culling fish at day 15, the aquarium does not become overcrowded and fish will remain well on the feed. Previous experiments showed that a sample size of 5 animals is sufficient for statistical analysis of this type of data (Giatsis et al. 2014; see end of section A). The remaining 20 animals will be used for proximate analyses (to determine growth and nutrient efficiency in the different treatments). The biomass of the 20 fish collected at the end of the experiment (160-200 g total weight) represents the minimum sample size required.

The number of laboratory animals used in the experiment is the minimum number required to obtain the number and size of samples needed for the analytical analyses. The experimental diets fed to the fish are complete diets providing all necessary macro and micro nutrients.

If more than 20 % of the fish stocked in an aquarium died, the remaining fish in the aquarium will be culled (In other words, one replicate of a treatment will be stopped). Fishes of 1-10 g rarely display external signs of disease and quickly die under adverse conditions. Therefore, mortality of 20% of fishes in a group was set as human end-point.

Explain what measures will be taken to minimise 1) animal suffering, pain or fear and 2) adverse effects on the environment.

Fish will be stocked with 30 fish per experimental unit, in this way natural feeding behaviour can be displayed. During the experiment, the biomass increases. By culling fish at day 15, the aquarium does not become overcrowded and fish will remain well on the feed. Water quality parameters will be kept at an adequate level. Handling the fish will be kept to a minimum, when handling cannot be avoided fish will be treated with an anaesthetic. No adverse effects on the environment are expected to occur during this project.

---

## Repetition and duplication

### E. Repetition

Explain what measures have been taken to ensure that the proposed procedures have not already been performed. If applicable, explain why repetition is None of the experiments proposed has been executed previously. This is ensured by in-depth consultation with colleagues working in the same field and extensive literature research.

## Accommodation and care

### F. Accommodation and care

Is the housing and care of the animals used in experimental procedures not in accordance with Annex III of the Directive 2010/63/EU?

No

Yes > If this may adversely affect animal welfare, describe how the animals will be housed and provide specific justifications for these choices.

### G. 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 H.

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.

## Classification of discomfort/humane endpoints

### H. Pain and pain relief

Will the animals experience pain during or after the procedures?

No > Continue with question 1.

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

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

During experiment 4 the fed diets will contain soya. Soya rich diets induce enteritis. In our experiment, the level of inflammation will be highest in the control diet. Microbiota are known to reduce development of enteritis and bioflocs are rich aggregates of microbes. Hence, in the other treatments fish discomfort is expected to be less. The soya inclusion level in the control will be such that the inflammation level will be moderate. Anti-inflammatory substances or pain relieving medication cannot be used because this would counter the expected physical reaction.



Yes

### **I. Other aspects compromising the welfare of the animals**

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

No other aspects other than 'mild' or 'moderate' as described under K. are expected during execution of the experiments. Carus has a backup power unit in case of energy failure. A disease outbreak cannot be fully prevented.

Explain why these effects may emerge.

Disease outbreak: not possible to hypothesize at this point in time. Common causes are cross infection with other experiments in Carus, intake of new fish already carrying the disease; etc.

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

Disease outbreak: experiments in separate room; follow strictly hygiene protocols; disinfection of experimental units prior to start of experiments; obtain experimental fish from trustworthy sources; follow quarantine procedures of Carus for newly obtained fish; consultation with the experimental animal expert of WU (drs. R. Steenmans) in case of observed abnormal fish behaviour or disease outbreak.

### **J. 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 K.

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

If circumstances such as a disease outbreak cause more than 20% mortality in one or more experimental units fish will be, after consulting the experimental animal expert, euthanized to prevent further distress. Continuation or termination of the experiment in such a case will be decided in consultation with drs. R. Steenmans.

Fishes of 1-10 g rarely display external signs of disease and quickly die under adverse conditions. Therefore, mortality of 20% of fishes in a group was set as human end-point. Animals will be checked daily for signs of distress: feeding and swimming behavior, signs of lethargy and external signs (skin and fin damage & coloration, external infections, eye color, etc.)

Indicate the likely incidence.

The possibility of a mortality exceeding the proposed maximum level of 20 % is very small. The severity of discomfort any treatment will impose on the fish are targeted to be moderate (through experimental design) and are highly unlikely to cause mortality.

### **K. Classification of severity of procedures**

Provide information on the expected levels of discomfort and indicate to which category the procedures are assigned ('non-recovery', 'mild', 'moderate', 'severe').

All procedures as elucidated under section A are expected to cause mild discomfort at maximum. An exception to this is that during experiment 4 the fed diets will contain elevated levels of soya-protein. This will most probably induce enteritis, the severity of this condition will be highest in the control diet. In the control the maximum inclusion level is used without the presence of bioflocs, which are known to have a beneficial effect on enteritis. The fish of this group will suffer moderate discomfort due to the inflammation. At the end of the experiments all fish will be anesthetized and killed. In summary:

\*Experiment 1: all treatments mild discomfort

\*Experiment 2: all treatments mild discomfort

\*Experiment 3: all treatments mild discomfort

\*Experiment 4: control treatment moderate discomfort; all other treatments mild discomfort

---

## End of experiment

### L. Method of killing

Will the animals be killed during or after the procedures?

No > Continue with Section 3: 'signatures'.

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

The gut microbiome, transcriptome and enzymatic activity of the 5 animals per experimental unit sampled on day 15 and 30. The animals will be killed before dissecting out the gut. The fish used in proximate analyses on day 0 and 30 will be killed prior to analyses. The number of fish stocked in each experimental unit is such that all experimental animals are used in analyses.

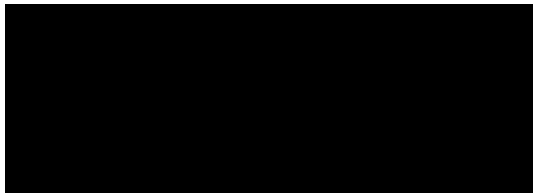
Is the proposed method of killing listed in Annex IV of Directive 2010/63/EU?

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

Yes



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

**Centrale Commissie  
Dierproeven**

Postbus 20401  
2500 EK Den Haag  
www.zbo-ccd.nl

T 0900-28 000 28 (10 ct /min)  
info@zbo-ccd.nl

**Onze referentie**

[Redacted]

**Uw referentie****Bijlagen**

Datum 23 maart 2015  
Betreft Aanvullende informatie vergunningsaanvraag

Geachte [Redacted],

Op 13 februari 2015 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "Bioflocs, the key to feed fish more with less". De aanvraag is momenteel bij ons in behandeling en wij hebben een aantal aanvullende vragen om de beoordeling af te kunnen ronden.

**Welke informatie nog nodig**

Wij hebben de volgende informatie van u nodig:

- 1: In het 'project proposal' formulier wordt bij experiment 1 van vier andere voedselregimes uitgegaan dan in het 'animal procedures' formulier. Welke is de juiste?
- 2: In de navolgende experimenten is de keuze en opzet voor 4 groepen met een ander regime niet duidelijk. Anders gezegd: licht toe op welke wijze a priori al de keuze gemaakt kan worden voor vier voedselregimes per experiment.
- 3: Het OBDA wil graag beargumenteerd zien wat go en no-go momenten zijn die de onderzoekers doen besluiten om door te gaan naar het volgende experiment en in welke vorm.
- 4: De redenatie achter het aantal backup-dieren is niet geheel duidelijk. Licht toe wat de bandbreedte is in verwachte uitval in reguliere kweek. Is er ook additionele sterfte te verwachten door de behandelingen? Het is wel evident dat de biomassa in de testbakken gelijk moet blijven omdat anders de groei van de dieren in elke replica beïnvloed wordt door een andere biomassa-water verhouding.
- 5: Om welke reden is bij bepalingen achteraf een veel hogere biomassa nodig dan aan het begin van het experiment?

6: Over enteritis bij experiment 4: De ongeriefsinschatting op de NTS en het 'description animal procedures' formulier zijn niet consistent. Geef de beschrijving die volgens u juist is en pas zo nodig de NTS aan.

**Datum**  
23 Februari 2015

**Onze referentie**

### **Opsturen informatie**

De CCD zou de gevraagde informatie graag zo snel als mogelijk, doch binnen de voorgeschreven termijn van 14 dagen van u ontvangen. Totdat de antwoorden binnen zijn, staat de behandeltijd stil. U kunt deze informatie aanleveren via NetFTP of per post. Indien u de informatie per post verstuurd, gebruik dan het bijgevoegde formulier.

### **Wanneer een beslissing**

Zodra wij de aanvullende informatie hebben ontvangen, nemen wij uw aanvraag verder in behandeling. Als u goedkeuring krijgt op uw aanvraag, kunt u daarna beginnen met het project.

### **Meer informatie**

Heeft u vragen, kijk dan op [www.zbo-ccd.nl](http://www.zbo-ccd.nl). Of neem telefonisch contact met ons op: 0900 28 000 28 (10 ct/minuut).

Met vriendelijke groet,

Centrale Commissie Dierproeven

Deze brief is automatisch aangemaakt en daarom niet ondertekend.

Bijlage:

- formulier Melding Bijlagen via de post

Centrale Commissie Dierproeven  
 Postbus 20401  
 2500 EK Den Haag  
 www.zbo-ccd.nl

Dear Beste leden van de CCD,

Antwoorden op uw vraag naar aanvullende Informatie gesteld op 23 maart 2015 zijn bijgesloten.

Naar aanleiding van vraag 6, hebben we een wijziging gemaakt in sectie 3.4. van de 'Niet-technische samenvatting'. Een aangepaste versie is bijgesloten. Naar aanleiding van dezelfde vraag stellen we ook een kleine wijziging voor in de 'Appendix: Description animal procedures'. Deze wijziging is toegelicht bij het antwoord op vraag 6. Ook dit gewijzigd document is bijgesloten.

Deze brief stuur ik ook cc. aan de eigen IvD zodat zij ook op de hoogte en in het bezit zijn van de (voorgestelde) wijzigingen aan de 'Niet-technische samenvatting' en 'Appendix: Description animal procedures'.

Voor de duidelijkheid werden de vragen herhaald bij de antwoorden:

=====Questions and Answers=====

1. In het 'project proposal' formulier wordt bij experiment 1 van vier andere voedselregimes uitgegaan dan in het 'animal procedures' formulier. Welke is de juiste?

Answer:

The feeding regimes are the same. Some confusion might arise from using different terminology and from listing the treatments in a different order. In the table below, the descriptions of the two documents are matched:

Form: Project proposal	Appendix Description animal procedures
A: control (based on standard tilapia diet formulation) <sup>1</sup>	(3) Ingredients matching biofloc composition
B: 10% live bioflocs from water + ...	(4) concentration of "fresh" bioflocs from the water
C: 10% dried biofloc in feed + ...	(2) dried bioflocs
D: 10% dried dead bioflocs in feed + ...	(1) Dried dead bioflocs

<sup>1</sup> The base diet will contain a 10% fraction matching biofloc composition (based on proximate analysis). In this way, all diets will have a similar proximate composition.

2. In de navolgende experimenten is de keuze en opzet voor 4 groepen met een ander regime niet duidelijk. Anders gezegd: licht toe op welke wijze a priori al de keuze gemaakt kan worden voor vier voedselregimes per experiment.

Answer:

All experiments are limited to 4 treatments because there are limits to the work load that can be handled by the research team for sample collection, sample preparation for analysis, laboratory analyses, data processing and interpretation.

- Experiment 2 is a dose-response study, which will analyse 4 different biofloc concentrations in the diet. A minimum of 4 biofloc concentrations is necessary to fit a dose-response regression through the data points.
  - Experiment 3 is a 'modes of action' study which will analyse the effect of PHB-type (pure grade vs. biofloc-based PHB) and PHB concentration (2 factors, each with 2 levels) in a 2x2 factorial design. Two levels is the minimum possible per factor.
  - Experiment 4 is split in 2 sub-experiments, one with tilapia and one with trout. At this stage it is not known if 1 factor or 2 two factors will be involved. In case of 1 factor it will be a dose-response study, in case of 2 factors it will be a 2x2 factorial design. In both cases, the minimum number of treatments is 4 (as explained above for either experiment 2 or 3).
3. Wij willen graag beargumenteerd zien wat go en no-go momenten zijn die de onderzoekers doen besluiten om door te gaan naar het volgende experiment en in welke vorm.

Answer:

The sequence of the experiments, and thus research question for each experiment, is fixed. The outcome(s) of the previous experiments are presently unknown.

Treatments which gave the best results, will be considered to design the basic treatments in follow up experiments. So, in this sense, it is not a go & no-go decision, as formulated in the question. In the 'Project proposal' and 'Description animal procedures' documents for this reason we referred to milestones or decision points for experimental design, not to go or no-go decisions.

4. De redenatie achter het aantal backup-dieren is niet geheel duidelijk. Licht toe wat de bandbreedte is in verwachte uitval in reguliere kweek. Is er ook additionele sterfte te verwachten door de behandelingen? Het is wel evident dat de biomassa in de testbakken gelijk moet blijven omdat anders de groei van de dieren in elke replica beïnvloed wordt door een andere biomassa-water verhouding.

Answer:

The expected mortality due to the experimental treatments is expected to be 0%. Even in the one treatment in experiment 4 with 'moderate' discomfort we expect no treatment related mortality. However, we cannot exclude with 100% certainty a disease outbreak or problem with husbandry/water quality management, causing mortality.

If more than 20% of the animals in an experimental unit die during the experiment, this unit will be removed from the experiment. This is the reason we do not keep more than 20% of the initial number of fishes stocked in the experiment as back-up animals.

5. Om welke reden is bij bepalingen achteraf een veel hogere biomassa nodig dan aan het begin van het experiment?

Answer:

Normally, all lab analyses are duplicated, so we can check for inconsistent results. To do the latter one needs extra sample material. For proximate analysis 160 g fish biomass is a safe minimum to obtain results backed up with additional analyses in case of inconsistent results. With proximate analysis, all analyses with the exception of fat content can be done, including additional analyses in case of inconsistent

[REDACTED]

results, with 40 g of fish biomass. The remaining 120 g are needed to analyse fat content. If only 60 g of fish biomass is available, an estimate of the fat content can be obtained, but with no option for additional verification in case of inconsistent results.

[REDACTED]

At the end of each experiment, per experimental unit, fat deposition will be estimated by subtracting the amount of fat present at the end of the experiment with the amount of fat present in fishes stocked at the beginning of the experiment. Because the biomass at the start of the experiment is relatively small (< 12%) compared to harvested biomass, the possible error in the estimate of fat deposition will also be relative small. In addition, the same error will apply to all treatments. In contrast, at the end of the experiment, it is important to have a precise estimate of the fat content per experimental unit in fish tissue, so treatment effects can be quantified. A lower precision in the estimated fat content at the start of each experiment, will not affect the statistical analyses (same error in all treatments). This explains why a smaller fish biomass for proximate analysis can be used at the start of the experiment than at the end of the experiment for proximate analysis. In this way, the number of animals sacrificed in the experiment was minimized.

6. Over enteritis bij experiment 4: De ongeriefsinschatting op de NTS en het 'description animal procedures' formulier zijn niet consistent. Geef de beschrijving die volgens u juist is en pas zo nodig de NTS aan.

Answer:

The text in the 'niet technische samenvatting' has been re-formulated into:  
De vissen (tilapia en forel) worden gewogen en geselecteerd (onder verdoving) en zullen daarvan hoogstens 'mild' ongerief ondervinden. Het voer voor forel bevat plantaardig eiwit (soja). Dat kan in de controlebehandeling – waar mogelijke ontstekingen in de darm veroorzaakt door soja niet worden afgeremd door toevoeging van biovlokken – leiden tot 'matig' ongerief.

In the 'Appendix: Description animal procedures' at the end of section 'J. Humane endpoints' we suggest to change the text "The severity of discomfort any treatment will impose on the fish are targeted to be moderate (through experimental design) and are highly unlikely to cause mortality." to replace with "The severity of discomfort any treatment will impose on the fish are targeted to be moderate at most (through experimental design) and are highly unlikely to cause mortality."

With kind regards,

[REDACTED]

cc. [REDACTED]

IvD [REDACTED]

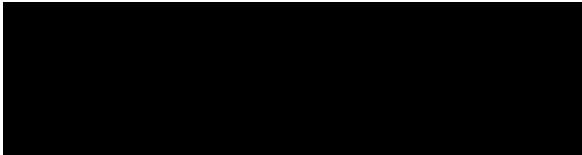
Attachments with e-mail:

- 2015-03-26 Niet Technische Samenvatting\_Bioflocs-aangepast [REDACTED]
- 2015-03-26 Appendix-Description Animal Procedures\_Bioflocs - aangepast [REDACTED]





> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag



**Centrale Commissie Dierproeven**

Postbus 20401  
2500 EK Den Haag  
www.zbo-ccd.nl

T 0900-28 000 28 (10 ct /min)  
info@zbo-ccd.nl

**Onze referentie**



**Uw referentie**

**Bijlagen**

30-03-2015  
Betreft Aanvullende informatie vergunningsaanvraag

Geachte

Op 30 maart hebben wij antwoorden ontvangen op de door ons gestelde vragen in onze brief met als kenmerk , waarvoor hartelijk dank. Het gaat over uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven met als titel 'bioflocs, the key to feed fish more with less'.

**Welke informatie nog nodig**

Bij het beantwoorden van de vragen hebben wij over vraag 4: nog niet alle informatie die wij nodig hebben om de aanvraag definitief te beoordelen.

Vraag 4: De redenatie achter het aantal backup-dieren is niet geheel duidelijk. Licht toe wat de bandbreedte is in verwachte uitval in reguliere kweek. Is er ook additionele sterfte te verwachten door de behandelingen? Het is wel evident dat de biomassa in de testbakken gelijk moet blijven omdat anders de groei van de dieren in elke replica beïnvloed wordt door een andere biomassa-water verhouding.

In uw antwoord geeft u weer dat de mortaliteit die door de behandeling veroorzaakt wordt naar verwachting 0% is. Er is nog niet ingegaan op de vraag wat de reguliere uitval naar verwachting is. Ook niet wat de redenatie is achter het getal van 20% backup-dieren en het daaraan gekoppelde humane eindpunt bij meer dan 20% sterfte.

- Kunt u alsnog toelichten hoeveel reguliere uitval u verwacht?
- kunt u alsnog de redenatie geven om het aantal proefdieren met 20% aan back-up dieren te verhogen en daarbij het humane eindpunt van 20% te hanteren, ter verduidelijking, dus niet een hoger of lager getal?

**Opsturen informatie**

De CCD zou de gevraagde informatie graag zo snel als mogelijk ontvangen doch uiterlijk binnen de voorgeschreven periode van 14 dagen. U kunt deze informatie aanleveren via NetFTP of per post. Indien u de informatie per post verstuurd, gebruik dan het bijgevoegde formulier.

**Datum**  
30-03-2015

**Onze referentie**  
[REDACTED]

**Wanneer een beslissing**

Zodra wij de aanvullende informatie hebben ontvangen, nemen wij uw aanvraag verder in behandeling. Als u goedkeuring krijgt op uw aanvraag, kunt u daarna beginnen met het project.

**Meer informatie**

Heeft u vragen, kijk dan op [www.zbo-ccd.nl](http://www.zbo-ccd.nl). Of neem telefonisch contact met ons op: 0900 28 000 28 (10 ct/minuut).

Met vriendelijke groet,

Centrale Commissie Dierproeven

Deze brief is automatisch aangemaakt en daarom niet ondertekend.

Bijlage:

- formulier Melding Bijlagen via de post



## Melding

### Bijlagen via de post

- U wilt één of meerdere bijlagen naar ons versturen? Voeg *altijd* deze Melding Bijlagen toe. Wij weten dan welke documenten van u zijn en hoeveel documenten u opstuurt.
- Meer informatie vindt u op [www.zbo-ccd.nl](http://www.zbo-ccd.nl)
- Of bel met ons: 0900 28 000 28 (10 ct/min).

### 1 Uw gegevens

- 1.1 Vul de gegevens in.
- |                |  |            |
|----------------|--|------------|
| Naam aanvrager |  |            |
| Postcode       |  | Huisnummer |
- 1.2 Bij welke aanvraag hoort de bijlage?  
*Het aanvraagnummer staat in de brief of de ontvangstbevestiging.*
- |                |  |  |
|----------------|--|--|
| Aanvraagnummer |  |  |
|----------------|--|--|

### 2 Bijlagen

- 2.1 Welke bijlagen stuurt u mee?  
*Vul de naam of omschrijving van de bijlage in.*
- |                          |  |
|--------------------------|--|
| <input type="checkbox"/> |  |
| <input type="checkbox"/> |  |
| <input type="checkbox"/> |  |

### 3 Ondertekening

- 3.1 Onderteken het formulier en stuur het met alle bijlagen op naar:
- |              |   |      |
|--------------|---|------|
| Naam         |   |      |
| Datum        | - | - 20 |
| Handtekening |   |      |
- Centrale Commissie  
Dierproeven  
Postbus 20401  
2500 EK Den Haag

Centrale Commissie Dierproeven  
Postbust 20401  
2500 EK Den Haag  
www.zbo-ccd.nl

Beste leden van de CCD,

De volgende vraag werd gesteld:

In uw antwoord [op vraag 4] geeft u weer dat de mortaliteit die door de behandeling veroorzaakt wordt naar verwachting 0% is. Er is nog niet ingegaan op de vraag wat de reguliere uitval naar verwachting is. Ook niet wat de redenatie is achter het getal van 20% backup-dieren en het daaraan gekoppelde humane eindpunt bij meer dan 20% sterfte.

-Kunt u alsnog toelichten hoeveel reguliere uitval u verwacht?

-kunt u alsnog de redenatie geven om het aantal proefdieren met 20% aan back-up dieren te verhogen en daarbij het humane eindpunt van 20% te hanteren, ter verduidelijking, dus niet een hoger of lager getal?

Antwoord:

Onze ervaring is dat reguliere uitval bij normale houderij bij deze soorten in dit groeitraject (1 - 10 g) gemiddeld 5% is (proefaccommodatie standaard, [redacted])

Echter, bij sommige proeven krijgen we te maken met hogere sterfte. Dit kan zijn door een probleem met het houderij-systeem (e.g. pomp defect, verstopte overloop, ...) of door het optreden van een infectie. Technisch problemen worden meestal snel opgelost. Bij uitval door ziekte houden we 20% aan als humaan eindpunt, omdat:

- Er duidelijk onderscheid gemaakt moet kunnen worden tussen reguliere uitval en uitval door ziekte. Door variatie tussen experimentele units ligt reguliere uitval meestal beduidend onder de 5%, maar kan ook oplopen in uitzonderlijke gevallen tot 10 - 15%. Een humaan eindpunt van 20% onderscheid zich met zekerheid van reguliere uitval (= reden voor niet een lager percentage dan 20%).
- Dagelijkse observaties van gedrag van visgroepen in experimentele units laten toe snel onregelmatigheden, en een mogelijk ziekte uitbraak te voorspellen. Dit laat toe snel maatregelen te nemen, inclusief contact opnemen met de artikel 14 proefdierdeskundige [redacted]. Als desondanks de ziekteontwikkeling doorzet, en sterfte uitstijgt boven 20%, dan geeft dit aan dat genomen maatregelen niet effectief waren en dat meer dieren zullen lijden onder de ziekte. Dan is het beter de experimentele unit in overleg met de proefdierdeskundige uit de proef te verwijderen om verder lijden te voorkomen (= reden voor niet een hoger percentage).
- Zieke dieren hebben minder eetlust en zijn minder actief dan gezonde dieren. Dit project gaat om onderzoek waarbij voedselopname en groei belangrijke



uitleesparameters zijn. Bij hoge uitval door ziekte worden onderzoeksresultaten niet meer representatief (= extra reden voor stopzetten bij bereiken van 20% uitval).

Yours sincerely,



cc.:

  
IvD 

# Format DEC-advies

---

## A. Algemene gegevens over de procedure

1. Aanvraagnummer [REDACTED]
2. Titel van het project: Bioflocs, the key to feed fish more with less
3. Titel van de NTS: Meer met minder / Bioflocs, the key to feed fish more with less
4. Type aanvraag: nieuwe aanvraag projectvergunning
5. Contactgegevens DEC:
  - Naam: [REDACTED]
  - telefoonnummer contactpersoon: [REDACTED]
  - mailadres contactpersoon: [REDACTED]
6. Adviestraject:
  - ontvangen door DEC: 04-02-2015
  - aanvraag compleet: ja
  - in vergadering besproken: 16-02-2015
  - anderszins behandeld: nee
  - termijnonderbreking(en) van 19-02-2015 tot 23-02-2015  
van 02-03-2015 tot 02-03-2015
  - aanpassing aanvraag: ja (zie 8.)
  - advies aan CCD 06-03-2015
7. Eventueel horen van aanvrager: nee

## 8. Correspondentie met de aanvrager

- Datum 19-02-2015
- De DEC heeft vragen gesteld m.b.t.:
  - Een uitvoerigere onderbouwing van het aantal benodigde dieren, zowel voor de proefgroepen als voor de reservedieren;
  - Een explicietere beschrijving van humane eindpunten (indicatoren);
  - Een uitgebreidere toelichting in de niet-technische samenvatting bij 'vervanging' op de vraag waarom er geen alternatief voorhanden is;
  - Enkele redactionele opmerkingen.
- Datum antwoord 23-02-2015
- Strekking van het (de) antwoord(en)
  - Op basis van bovenstaande vragen is de projectaanvraag door de aanvrager aangepast. In de huidige versie is voldoende tegemoet gekomen aan de vragen van de DEC.

## 9. Eventuele adviezen door experts (niet lid van de DEC): N.v.t.

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

1. Het project is vergunningplichtig (dierproeven in de zin der wet).
2. De aanvraag betreft een nieuwe aanvraag.
3. De DEC is competent om hierover te adviseren.
4. Vanwege betrokkenheid bij het betreffende project is een aantal DEC-leden, met het oog op onafhankelijkheid en onpartijdigheid, niet betrokken bij de advisering: n.v.t.

## **C. Beoordeling (inhoud):**

1. Het project is:
  - uit wetenschappelijk oogpunt verantwoord.
  - uit onderwijskundig oogpunt verantwoord: het onderzoek heeft primair niet een onderwijskundig doel, maar het betreft een PhD-project, waar ook MSc-studenten bij worden betrokken.

2. De in de aanvraag aangekruiste doelcategorie(ën) zijn in overeenstemming met de hoofddoelstelling(en).
3. De DEC onderschrijft het belang van de doelstelling. Het wordt ingeschat als een reëel belang. De DEC is van mening dat het project kan bijdragen aan wetenschappelijk inzicht in en mogelijkheden tot verbetering van voeding en (darm)gezondheid bij vis door het gebruik van biovlokken. Tevens draagt het bij aan een vermindering van het eiwitgebruik in de visteelt, hetgeen vanuit het streven naar duurzame productie een maatschappelijke relevantie heeft.
4. De gekozen strategie en experimentele aanpak kunnen leiden tot het behalen van de doelstelling binnen het kader van het project.
5. Er is geen sprake van bijzonderheden op het gebied van categorieën van dieren, omstandigheden of behandeling van de dieren.
6. Het ongerief als gevolg van de dierproeven is realistisch ingeschat en geclassificeerd. Het betreft een voerproef, waarbij verschillende diëten worden onderzocht en waarbij de vissen onder normale condities worden gehouden. Voor één behandelingsgroep is het ongerief ingeschat op matig ongerief. De overige dieren worden niet blootgesteld aan extra proefdierkundige handelingen, die meer dan gering ongerief kunnen veroorzaken.
7. Er zijn geen methoden die de voorgestelde dierproeven geheel of gedeeltelijk zouden kunnen vervangen. De onderzochte processen en interacties zijn alleen te bestuderen in levende dieren en kunnen niet nagebootst worden buiten het dier.
8. In het project wordt optimaal tegemoet gekomen aan de vereiste van de vermindering van dierproeven. Het maximale aantal te gebruiken dieren is realistisch ingeschat. De gekozen aantallen zijn minimaal nodig om de benodigde analyses te kunnen uitvoeren. De aanvrager beschikt over voldoende expertise en informatie om, bij wettelijk vereist onderzoek, te voorkomen dat onnodige duplicatie plaatsvindt.
9. Het project is in overeenstemming met de vereiste van de verfijning van dierproeven en het project is zo opgezet dat de dierproeven zo humaan mogelijk kunnen worden uitgevoerd. Het ongerief voor de dieren is minimaal. De betrokken onderzoeksgroepen beschikken over jarenlange expertise met deze soorten, die het aanbieden van een optimale leefomgeving garanderen.



10. De niet-technische samenvatting is een evenwichtige weergave van het project en begrijpelijk geformuleerd.

## **D. Ethische afweging**

Het belang van de doelstelling wordt door de DEC onderschreven, de concrete doelstellingen zijn haalbaar en kunnen niet zonder dieren worden behaald. Het onderzoek is in eerste instantie mechanistisch van aard, gericht op het onderzoeken en verklaren van processen. Op termijn kan meer inzicht hierin bijdragen aan het milieuvriendelijker maken van de aquacultuur, het verlagen van vismeelgebruik in visvoerders, het verhogen van de darmgezondheid en het verminderen van ziektegevoeligheid van kweekdieren. Dit doel weegt op tegen het ingeschatte ongerief voor de dieren. Bij de dierproeven en hun verzorging, behandeling en huisvesting wordt adequaat invulling gegeven aan de vereisten op het gebied van de vervanging, vermindering en verfijning van dierproeven. Voor het nastreven van deze doelstelling is dit gebruik van dieren naar het oordeel van de commissie ethisch aanvaardbaar.

## **E. Advies**

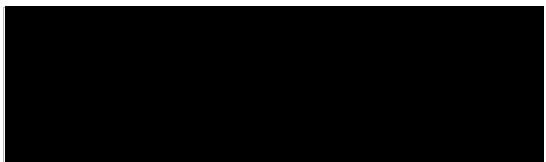
1. Advies aan de CCD

De DEC adviseert unaniem de vergunning te verlenen.

2. Het uitgebrachte advies is gebaseerd op consensus.



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

**Centrale Commissie  
Dierproeven**

Postbus 20401  
2500 EK Den Haag  
www.zbo-ccd.nl

T 0900-2800028 (10 ct /min)  
info@zbo-ccd.nl

**Onze referentie  
Aanvraagnummer**

[Redacted]

**Uw referentie****Bijlagen**  
1

Datum 23 april 2015  
Betreft Beslissing aanvraag projectvergunning dierproeven

Geachte [Redacted]

Op 13 maart 2015 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project 'Bioflocs the key to feed fish more with less' met aanvraagnummer [Redacted]. Wij hebben uw aanvraag beoordeeld.

**Beslissing**

Wij keuren uw aanvraag goed op grond van artikel 10a van de Wet op de dierproeven (hierna de wet). U kunt met het project starten. De vergunning wordt afgegeven voor de periode van 1 mei 2015 tot en met 31 december 2017.

**Procedure**

Bij uw aanvraag heeft u een advies gevoegd van de dierexperimentencommissie (DEC- [Redacted]). Bij de beoordeling van uw aanvraag is dit advies betrokken overeenkomstig artikel 10a, lid 3 van de wet. Wij kunnen ons vinden in de inhoud van het advies van de dierexperimentencommissie. Wij nemen dit advies van de commissie over, inclusief de daaraan ten grondslag liggende motivering. Dit advies en de in de bijlage opgenomen beschrijving van de artikelen van de wet- en regelgeving zijn de grondslag van dit besluit.

**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 20401, 2500 EK 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. U kunt tijdens deze procedure een voorlopige

**Datum**  
23-04-2015

**Onze referentie**  
Aanvraagnummer  
[REDACTED]

voorziening vragen bij de Voorzieningenrechter van de rechtbank in de woonplaats van de aanvrager. U moet dan wel kunnen aantonen dat er sprake is van een spoedeisend belang.

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 aanvrager valt.

**Meer informatie**

Heeft u vragen, kijk dan op [www.zbo-ccd.nl](http://www.zbo-ccd.nl). Of neem telefonisch contact met ons op: 0900 28 000 28 (10 ct/minuut).

Met vriendelijke groet,

De Centrale Commissie Dierproeven  
namens deze:

[REDACTED]  
M. W. G. Habets  
plv Algemeen Secretaris

Dit besluit is genomen met inachtneming van het Besluit mandaat, volmacht en machtiging van de Centrale Commissie Dierproeven CCD 2014 zoals de Centrale Commissie Dierproeven heeft vastgesteld op 19 december 2014, ref 2014-04 en is gepubliceerd in de Staatscourant van 2 januari 2015, Nr. 163

**Bijlagen**

- Vergunning

- Hiervan deel uitmakend:
- DEC-advies
  - Weergave wet- en regelgeving

## 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. Uit artikel 10b 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 de wijziging eerst voorgelegd worden en mag deze pas doorgevoerd worden na goedkeuren door de Centrale Commissie Dierproeven.

Artikel 10b schrijft 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 van Economische Zaken 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 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 onvermijdelijk 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 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.

## Projectvergunning

gelet op artikel 10a van de Wet op de dierproeven

Verleent de Centrale Commissie Dierproeven aan

Naam:

Adres:

Postcode en woonplaats:

Deelnemersnummer:

Deze projectvergunning voor het tijdvak 01-05-2015 tot en met 31-12-2017, voor het project Bioflocs, the key to feed fish more with less' met aanvraagnummer [REDACTED] volgens advies van Dierexperimentencommissie DEC [REDACTED] De functie van de verantwoordelijk onderzoeker is [REDACTED]

De aanvraag omvat de volgende bescheiden:

1. Een aanvraagformulier projectvergunning dierproeven, ontvangen op 13-maart-2015
2. De bij het aanvraagformulier behorende bijlagen:
  - Projectvoorstel, zoals ontvangen bij brief op 13-maart-2015;
  - Niet-technische Samenvatting van het project, zoals ontvangen bij brief op 13-maart-2015.
  - Advies van dierexperimentencommissie d.d. 06-maart-2015, ontvangen op 13-maart-2015

### Dierproeven

Naam dierproef	Diersoort	Aantal dieren	Ernst	Voorwaarden
-Experiment 1:	Tilapia	492	Licht	Geen
-Experiment 2:	Tilapia	492	Licht	Geen
-Experiment 3:	Tilapia	492	Licht	Geen
-Experiment 4	Tilapia + regenboogforel	492 + 492	Licht + maximaal matig in 108 tilapia en 108 regenboogforel	Geen

**Datum**  
23-04-2015

**Onze referentie**  
Aanvraagnummer

### **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 blijven 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 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 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 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.