



U kiest voor professionele desinfectie

Als u niets aan het toeval wilt overlaten dan heeft VEIP *Disinfectants* een compleet desinfectieprogramma voor u. Zeer effectief tegen bacteriën, gisten, schimmels en virussen. De producten zijn volledig biologisch afbreekbaar en conform de Europese Biocide Richtlijn (98/8/EC). Kijk voor meer informatie op onze website.



halamid-d

actisept

halapur

actacid

actisan-5L



Kweek van zebravissen

Edwin Romme, Esther Fijneman, Ed Lansbergen, Rob Willemsen

Erasmus Dierexperimenteel Centrum en Afd. Klinische Genetica, Erasmus mc, Rotterdam



Algemeen

De zebravis, *Danio rerio* is de officiële naam, blijkt zich uitstekend te lenen voor bepaalde vormen van medisch-wetenschappelijk onderzoek. Het gebruik van diermodellen om onderzoek te verrichten naar humane ziektebeelden wordt meestal gedaan met muizen, maar dat heeft ook nadelen. Het kweken van muizen duurt relatief lang, is kostbaar en om de embryo's te onderzoeken moet je de moeder opofferen. Daarom wordt de zebravis steeds vaker toegepast als diermodel voor het bestuderen van vooral aangeboren humane ziektebeelden.

De zebravis heeft veel voordelen: het visje is makkelijk te kweken, groeit snel en de eitjes ontwikkelen zich buiten het lichaam en zijn doorzichtig. Een dag na bevruchting is in het eitje al een compleet visje te zien, dat na drie dagen uit het eitje kruipt. Het DNA is vrijwel helemaal in kaart gebracht en heeft veel overeenkomsten met dat van de mens. Zo zijn veel ziektegenen goed vergelijkbaar tussen zebravis en mens. Die genen zijn in de evolutie weinig veranderd.

Om bij muizen de werking van eiwitten te bestuderen, worden vaak zogeheten *knock-out* muizen gekweekt. Die muizen missen juist het gen dat codeert voor het te onderzoeken eiwit, waardoor onderzoekers kunnen nagaan welke rol dat eiwit heeft wanneer het normaal aanwezig is. Maar het kweken van zulke muizen is duur, omslachtig en duurt enkele maanden tot jaren. Bovendien is vooraf niet te zeggen of een effect zichtbaar is, zodat soms alle inspanning voor niets blijkt te zijn geweest. Ook daar heeft de zebravis een 'streepje' voor: die kan eenvoudig worden geïnjecteerd met zogeheten morfolino's. Dat zijn moleculen die de aanmaak van een bepaald eiwit blokkeren. Al na twee dagen is een eventueel effect van een morfolino te zien. Als je een effect ziet, kun je alsnog een *knock-out* muis genereren, maar dan weet je wel zeker dat je dat niet voor niets doet.

De zebravis is dus zeer geschikt voor medisch-wetenschappelijk onderzoek.

Huisvesting

Voor de huisvesting van zebravissen zijn geavanceerde systemen beschikbaar. Dit zijn zogenoemde recirculatiesystemen waarin het water een aantal keer per uur door de individuele aquaria stroomt. Deze systemen waarborgen de waterkwaliteit, meten en regelen de pH, de geleidbaarheid en de temperatuur, beschikken over een uitgebreid filtersysteem en zorgen voor automatische waterversing.

Zebravissen zijn echte scholenvissen en kunnen het beste in groepjes van minimaal tien dieren gehuisvest worden. Volwassen zebravissen kunnen in dichtheden van drie tot vijf vissen per liter water worden gehouden mits het water een optimale kwaliteit heeft.



Filtering

De meeste huisvestingssystemen hebben een geavanceerd filtersysteem dat garant staat voor een optimale waterkwaliteit.

Een goed filtersysteem voor zebravissen bestaat uit een voorfilter, een biologisch filter, een mechanisch filter, een actief koolfilter en een uv-sterilisatielamp.

Een voorfilter zorgt ervoor dat dagelijks grof afval, zoals voerresten en ontlasting, verwijderd kan worden voordat het door bacteriën afgebroken wordt.

Het is dan wel van belang dat het voorfilter dagelijks gereinigd wordt, omdat het anders ook een biologische werking krijgt. Het biologisch filter is niets anders dan dragermateriaal waar bacteriën op kunnen groeien. Het is belangrijk dat voor een materiaal gekozen wordt met een groot oppervlak zodat er veel ruimte is voor de bacteriën. De bacteriën in het filter verbruiken veel zuurstof dus is het belangrijk dat het aangevoerde water naar het biofilter zeer zuurstofrijk is. Dit kan bereikt worden door het water via een cascade naar het biofilter te voeren of het biofilter te beluchten. Ook kan gekozen worden om het filtermateriaal deels of geheel boven water te plaatsen en het te filteren water over het filtermateriaal te laten sijpelen voor een optimale zuurstof verzadiging. In het biofilter wordt het door de vissen geproduceerde ammonium of ammoniak door *Nitrosomonas*-bacteriën omgezet naar nitriet waarna *Nitrobacter*-bacteriën nitriet weer omzetten naar het vele

malen minder giftige nitraat. Het mechanisch filter is er om de kleinste vuildeeltjes uit het water te vangen. Hierna kan men het water over actieve koolstof filteren om kleurstoffen en andere ongewenste, soms toxische stoffen uit het water te halen. Voordat het water terug gaat naar de aquaria of tanks dient het water bestraald te worden met een krachtige uv-c lamp om het kiemgetal van het water zo laag mogelijk te houden en infecties van tank naar tank te voorkomen.

De minimale waterdoorstroming van de aquaria of tanks is afhankelijk van de bezetting, maar gemiddeld is doorstroming met vier à vijf keer de tankinhoud per uur een goede maat. Tevens is het filter vaak de ideale plaats om het water te verwarmen of te koelen. Hierbij moet dan wel gelet worden dat de ruimtetemperatuur niet te veel afwijkt van de aquariumtemperatuur om te voorkomen dat het aquarium te koud of te warm wordt en om condens in de ruimte te voorkomen.

Waterkwaliteit

De optimale waterwaarden voor zebravissen liggen bij een neutrale tot iets basische pH (pH 7,0-7,5). De temperatuur kan het beste tussen de 25 en 28 °C worden gehouden. In veel onderzoekstellingen worden zebravissen bij een relatief hoge temperatuur gehouden. Omdat zebravissen koudbloedige dieren zijn, gaat bij een hogere temperatuur de stofwisseling sneller en daardoor verloopt ook de ontwikkeling van de eitjes en de larven sneller en worden de vissen eerder volwassen. En hoe eerder de vissen volwassen zijn hoe eerder ze zich weer kunnen voortplanten.

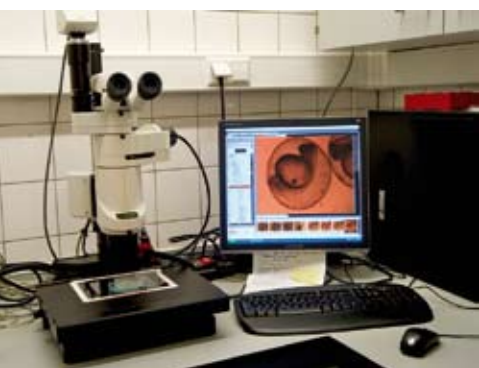


Verder is het van belang de vissen in zo schoon mogelijk water te houden. Leidingwater is qua samenstelling in de meeste gevallen zeer geschikt. Het risico is echter dat het vervuild kan zijn met bijvoorbeeld te veel koper dat is opgelost uit de waterleidingen. Ook is vaak het chloridegehalte te hoog, daarom kan beter gekozen worden voor omkeerosmosewater. Door passage via een speciaal membraan is dit water ontdaan van 98% van de giftige stoffen die in leidingwater voor kunnen komen.

Omkeerosmosewater is niet zonder nabehandeling te gebruiken voor de vissen. Het water dient eerst aangezouten te worden tot een geleidbaarheid tussen de 300 en 600 μS ontstaat. Daarnaast moeten voldoende bicarbonaten aan het water toegevoegd worden om de pH te stabiliseren. Veel gebruikte zouten zijn zeezout en natriumbicarbonaat. Ook kan een commercieel zoutmengsel gebruikt wor-

den om omkeerosmosewater aan te zouten. Indien het niet mogelijk is om omkeerosmosewater te gebruiken dient het leidingwater over een hoogactief koolfilter voorgefilterd te worden en 24 uur belucht worden om het vrije chloor te verwijderen voordat het gebruikt kan worden om de vissen te huisvesten.

Om de waterkwaliteit optimaal te houden en de eindproducten van de stikstofkringloop niet te hoog op te laten lopen dient in een goed bezet systeem dagelijks ongeveer 10% van het systeemwater ververs te worden.



Afbeelding 1. Beeldverwerkingssysteem, inclusief fluorescentie-microscoop, waarmee de ontwikkeling van embryo's op hoge resolutie bestudeerd kan worden na micro-injectie van specifieke morfolino's.



Afbeelding 2. Opstelling met zebravissen in het Erasmus Dierexperimenteel Centrum.

Voortplanting

Voor de kweek worden 's middags twee mannetjes en een vrouwtje, gescheiden van elkaar door een tussenschot, in een afzetbakje geplaatst. In sommige instituten wordt de voortplanting gestimuleerd door het water in het afzetbakje voor 30% te verversen met vers omkeerosmosewater om de geleidbaarheid van het water te laten zakken naar de helft van die van het aquariumwater. Dit is een 'trigger' voor de vrouwtjes om sneller kuit af te zetten. Ook worden soms knikkers op de bodem gelegd waardoor een speciale lichtschittering zou ontstaan met hetzelfde positieve effect voor de kuitafzetting. 's Morgens als het licht aangaat wordt het tussenschot verwijderd en na tien tot vijftien minuten kan men vaak al de eerste eieren verzamelen uit het kweekbakje. De vissen kunnen tot enkele uren nadat het licht aangegaan is eieren afzetten, per vrouwtje wel tot 200 stuks.

Het kweekbakje is verder voorzien van een plastic plantje. Dit is niet strikt noodzakelijk maar kan het vrouwtje stimuleren de eieren af te zetten. Ook is het belangrijk dat er boven de bodem een roostertje is aangebracht waar de eitjes doorheen vallen zodat de vissen de eitjes niet op kunnen eten. In plaats van een rooster kan men ook gebruik maken van knikkers op de bodem. Voor het verkrijgen van veel eitjes

tegelijktijd kan men ook een net in een aquarium hangen waar de vissen niet doorheen kunnen en de eitjes wel. Zo kan men dan een grote groep vissen tegelijktijd inzetten om eitjes af te zetten. De eitjes worden na het afzetten verzameld om in schoon water zogenaamd 'egg-water' (1) uit te laten komen.

De jonge visjes worden ook wel larven genoemd ook al kennen ze geen larvesta-



dium. Ze komen na twee dagen uit het ei en worden dan terug geplaatst in het systeem. Bij een hogere temperatuur zullen de larven zich sneller ontwikkelen, daarom kunnen ze het beste bij 28 °C gehouden worden zodat de ontwikkeling iedere keer gestandaardiseerd verloopt.

Tot en met dag 5, dus drie dagen na het uitkomen, leven de larven van hun dooierzak.

In dit stadium zijn ze erg inactief en zwemmen ze nog nauwelijks, het merendeel van de tijd hangen ze nu nog aan de wand of liggen ze op de bodem.

Op dag 5 gaan de larven vrij rond zwemmen en nemen voedsel op. Het is belangrijk om voor deze tijd dan ook niet te voeren omdat men hiermee het water extra belast met afvalstoffen.

Vanaf dag 5 kan gevoerd worden met *Paramecia* (pantoffeldiertjes, zie *Paramecia*-kweek). De larven kunnen totaal gedurende zeven tot tien dagen met pantoffeldiertjes gevoerd worden, daarnaast kan men bijvoeren met fijn droogvoer dat speciaal is ontwikkeld voor jonge vissen. Vanaf dag 7 kan voorzichtig een beetje *Artemia* (pekelkreeftjes, zie *Artemia*-kweek) gevoerd gaan worden. *Artemia*-cysten zijn er in verschillende kwaliteiten, als je de allerfijnste hebt kan al eerder begonnen worden met voeren dan wanneer de grotere gebruikt worden.

Voeding



Afbeelding 3. Vistank met een inhoud van 3,5 liter en vier weken oude vissen. In iedere tank worden vijftien vissen gehuisvest.

Zoals eerder beschreven is, heeft het de voorkeur om te starten met het voeren van de larven met *Paramecia*. Dit heeft als voordeel dat levend voer het water minder vervuult dan heel fijn droogvoer (ook wel stofvoer genoemd) en *Paramecia* is langer beschikbaar voor de vissen omdat het in leven blijft. Daarnaast is het van belang dat de jonge vissen als het ware 'in het voer staan': ze moeten de gehele dag door de beschikking hebben over vers voer. Dit betekent dat de larven drie à vier keer per dag gevoerd moeten worden. Als de vissen groot genoeg zijn kan overgeschakeld worden op *Artemia*, deze overgang ligt meestal na zeven à tien dagen *Paramecia* voeren. Als de vissen eenmaal pekelkreeftjes eten, is de meest kritieke periode voorbij. De larven zullen de komende dagen heel hard groeien en ook nu is het belangrijk dat de larven 'in het voer staan' en dus zo vaak mogelijk op een dag kleine beetjes voer krijgen. Naast de *Artemia* kan droogvoer gegeven worden en langzaam overgeschakeld worden op alleen droogvoer. Wel kan één keer per dag aan de opgroeiende vissen *Artemia* bijgegeven worden, het blijft een hoogwaardig voer dat de vissen graag eten.

Bij een goede waterkwaliteit en goede voeding zijn de vissen in drie à vier maanden volwassen. De volwassen vissen zullen ook beter kuit aanmaken en afzetten indien met ze *Artemia* gevoerd worden.

Er zijn verschillende droogvoerders op de markt geschikt om aan zebrafissen te voeren, het beste kan men granulaatvoer kiezen. Van vlokkenvoer worden kleine stukjes afgehaald en zo gaat relatief veel voer verloren – dat gaat ten koste van de waterkwaliteit. Granulaatvoer is er in verschillende korrelgrootten en kan zo aan alle leeftijden gevoerd worden. Levend voer van buiten, zoals tubifex, watervlooien en muggenlarven, kan beter gemeden worden om het risico van insleep van ziekten te voorkomen.

Paramecia-kweek

Pantoffeldiertjes worden gekweekt op kamertemperatuur in literflessen met omkeerosmosewater. Aan de fles wordt een aantal druppels liquify no. 1[©] en een beetje *Paramecia* uit een bestaande kweek toegevoegd. De *Paramecia* zal zich aan de rand van de fles aan het oppervlak van het water concentreren waar het gemakkelijk afgezogen kan worden met een 10 ml spuitje met een stukje luchtslang eraan. Wanneer liquify no. 1 aan het water toegevoegd is, wordt het water troebel; zodra het water weer helder is moet opnieuw liquify no. 1 toegevoegd worden. Als de productie na een aantal weken terugloopt moet de *Paramecia* overgeënt worden naar een nieuwe fles.

Artemia-kweek

Het kweken van pekelkreeftjes is geen echte kweek, maar het laten uitkomen van aangekochte cysten. De *Artemia*-naupliën komen uit door ze 24 uur te beluchten in zeewater. Men kan een theelepeltje cysten per liter zeewater uit laten komen. Het zeewater wordt gemaakt door 30 g instant ocean[©] zeezout per liter water toe te voegen. De optimale temperatuur om de naupliën uit te laten komen ligt tussen de 25 en 28 °C. Door het water te beluchten met een bruissteen blijven de cysten in beweging. Wanneer men na 24 uur



de beluchting uitzet, gaan de eischalen drijven en zakken de uitgekomen naupliën naar beneden. Door een opstelling te gebruiken die onderaan in een punt uitloopt blijft de *Artemia* tijdens het beluchten goed in beweging en kunnen ze na het stopzetten van de beluchting gemakkelijk geconcentreerd worden afgetapt. Met een speciale fijne zeef (artemiazeef) worden de *Artemia* opgevangen en kunnen ze aan de vissen gevoerd worden.



Afbeelding 5. Kweekflessen met *Artemia*.



Literatuur

¹ Westerfield, M. (2000). *The zebrafish book. A guide for the laboratory use of zebrafish (Danio rerio)*. 4th ed., Univ. of Oregon Press, Eugene, USA.