



Norges miljø- og  
biovitenskapelige  
universitet

**Bacheloroppgave 2023**

NMBU Veterinærhøgskolen

# **En systematisk litteraturstudie om effektene av miljøberikelse hos sebrafisk (*Danio rerio*)**

A systematic literature study on the effects of  
environmental enrichment on zebrafish (*Danio rerio*)

**Ingrid Kristoffersen, Thea Nissen og Stine Solheim**

Bachelor Dyrepleie

Seksjon for eksperimentell biomedisin

## Innhold

|                                    |    |
|------------------------------------|----|
| Sammendrag.....                    | 3  |
| Definisjoner og oversettelser..... | 4  |
| Innledning.....                    | 6  |
| Sebrafisk.....                     | 8  |
| Hvordan måles resultater.....      | 14 |
| Tester.....                        | 17 |
| Formål.....                        | 19 |
| Materiale og metoder.....          | 20 |
| Resultater.....                    | 21 |
| Oppsummering av resultater.....    | 34 |
| Diskusjon.....                     | 35 |
| Miljøberikelser lyd.....           | 35 |
| Sosiale miljøberikelser.....       | 37 |
| Fysiske miljøberikelser.....       | 41 |
| Litteraturstudier.....             | 57 |
| Siste tanker.....                  | 59 |
| Konklusjon.....                    | 60 |
| Takk til bidragsyttere.....        | 61 |
| Summary.....                       | 61 |
| Referanser.....                    | 63 |
| Vedlegg.....                       | 71 |

# Sammendrag

*Tittel:* En systematisk litteraturstudie om effekten av miljøberikelse hos sebrafisk  
(*Danio rerio*)

*Forfattere:* Ingrid Kristoffersen, Thea Nissen og Stine Solheim

*Veileder:* Eirill Ager-Wick og Evgenia Dunaevskaya, seksjon for eksperimentell  
biomedisin

I dag holdes sebrafisk som brukes i forskning stort sett i kar uten miljøberikelser, på tross av at forskning viser at miljøberikelse kan ha en positiv effekt på dyrevelferden. Denne oppgaven tar for seg 39 studier som ser på hvilken effekt miljøberikelser har på sebrafisk på en rekke områder. Målet er å bidra til å finne standardløsninger for miljøberikelser hos sebrafisk som kan være med på å øke dyrevelferden til sebrafisk i laboratorier. Oppgaven tar for seg hvilken kunnskap som finnes på feltet fra før, effektene miljøberikelse kan ha, samt hva det bør forskes videre på. Videre forskning bør se på hvordan ulike berikelser påvirker sebrafisk, hvordan berikelser påvirker datainnsamling og konsistens i data, hvordan miljøberikelser påvirker replisering av forskning, samt hvilke berikelser som er mulig å standardisere med tanke på tilgjengelighet i verden og pris.

## Definisjoner og oversettelser

| <b>Forkortelser</b>          | <b>Engelske begrep og definisjon</b>   |
|------------------------------|--|
| Miljøberikelse/Beriket miljø | Environmental Enrichment - Alt som blir lagt til et miljø i et forsøk på å oppnå mer naturlig atferd og redusere stress. |
| Uberiket miljø               | Barren Environment - Ingen miljøberikelse, tomt kar, kun det som er nødvendig for overlevelse.                           |
| Auditiv miljøberikelse       | Auditory Environmental Enrichment - Miljøberikelse i form av lyd.  |
| Nytt-kar-test                | Novel tank test  |
| Sosialpreferansetest         | Social preference test   |
| Lys-mørk-test                | Light-dark test  |
| Stedspreferansetest          | Place-preference test  |
| T-labyrinttest               | T-maze test  |
| Pluss-labyrinttest           | Plus-maze test   |
| Nytt-objekt-test - NOR       | Novel object recognition test - NOR test   |
| Innlært unngåelsesprotokoll  | Inhibitory avoidance protocol  |
| Vurderings bias              | Judgement bias – optimistiske og pessimistiske valg tatt der det finnes tvetydighet.                                     |
| Dyr                          | Alle dyrearter ekskludert mennesker.   |

|                        |  |
|------------------------|--|
| Sosial samling         | Shoaling – Samlingen av fisk i et område av flere sosial grunner for eksempel førsøking, gyting og rovdryforsvar.  |
| Svømme i stim, stiming | Schooling – en gruppe som viser koordinerte bevegelser i form av synkronisert svømming.  |
| Kar                    | Tank – Beholderen sebrafiskene holdes i.   |
| Ventetid               | Latency – Tid mellom en variabel påføres og at effekten av denne kommer frem.  |
| Oppdrett               | Rearing  |
| Dpf                    | Days post fertilisation – dager etter fertilisering.   |
| SPF                    | Spesific pathogen free – fri for spesifikke patogen.   |
| Oppstalling            | Housing – der fisken bor utenom eller i eksperimenter.   |
| UCS                    | Unpredictable chronic stress – En protokoll for å studere påvirkningen av stress. Påfører modelldyr tilfeldig intervaller med stress over en lengre tidsperiode. |

## Innledning

I store deler av historien har det vært vanskelig å bruke mennesker til å studere anatomi og fysiologi, både på grunn av tilgjengelighet og på grunn av religiøse overbevisninger i samfunnet. I flere århundrer har derfor mennesker brukt andre dyrearter til dette. Dyr har både vært lettere tilgjengelig og har i liten grad åpnet spørsmål om moralitet (Franco, 2013). Med tiden har studier av dyr endret seg fra i hovedsak å bruke dyr til observasjon til å også bruke dyr som modeller i forskning, og i dag er det i mye av forskningen standard å bruke modelldyr (Ericsson et al., 2013).

I lang tid har det i hovedsak vært rotter og mus som brukes i biomedisinsk forskning. Disse gnagerne har fordelen at de er små, lette å holde, har kort livssyklus samt at de har en egnet likhet til mennesker i forhold til anatomi, fysiologi og genetikk (Elizabeth, 2013). De siste årene har man likevel begynt å se en stor økning i bruken av et annet modelldyr, nemlig sebrafisken (*Danio rerio*). Selv om mus er evolusjonært sett likere mennesker, har sebrafisken noen viktige fordeler. Den lille størrelsen og deres preferanse for å huses flere sammen gjør at de tar forholdsvis liten plass og koster mindre å holde. Sebrafisken kan reproducere seg raskt og kan produsere fra 50-300 egg opp til hver 10 dag. At embryoene er gjennomsiktig, og lagt og fertilisert utenfor kroppen, kan også gjøre en del forskning lettere utførbart (Burke, 2016).

Hold av modelldyr i forskning har lenge kun vært preget av økonomi og ergonomi. Det som har vært enklest og mest praktisk i henhold til forskningen som utføres er det som har blitt praktisert. Dette har i lang tid betydd at modelldyr har bodd i miljø som ikke nødvendigvis møter andre enn de aller mest basale behovene (Schroeder et al., 2014). De siste årene derimot har det vært et økt fokus på bedring av dyrevelferden hos modelldyr, der man blant annet har sett på om en endring av standard oppsettet for hold kan øke trivselen. Dette har

blant annet ført til et krav om miljøberikelser hos flere arter av modelldyr (Parliament, 2010, UCI). I Den europeiske union (EU) sine direktiver står det at dyrene skal ha godkjente miljøberikelser tilpasset arten og individene, og at disse ofte skal gjennomgås og oppdateres (Parliament, 2010). I det amerikanske institusjonsutvalget for pleie og bruk av dyr (IACUC) retningslinjer er det faste påkrevde miljøberikelser for flere arter, som blant annet at mus skal ha hekkematerial laget av papir eller bomull, samt forslag til en rekke andre ikke-pålagte miljøberikelser. Hos sebrafisk er det per i dag ingen krav om miljøberikelser foruten om at de skal huses flere sammen om mulig (UCI). Lenge har sebrafiskens atferd og behov, for utenom de mest basale, vært oversett. Det er først ved senere forskning på atferd at man har sett de mer nyanserte sidene av sebrafisken (Lawrence, 2016).

Bruken av sebrafisk i forskning har økt betraktelig de siste årene (Burke, 2016). Det har blitt estimert at over 3250 institusjoner spredt på 100 land jobber med sebrafisk (Kinth et al., 2013). Sammen med denne økningen ser vi også en økt interesse rundt dyrevelferden til sebrafisk i laboratoriesammenheng (Lawrence, 2016). Det har blitt gjort forsøk på å standardisere hold av sebrafisk og å tilby retningslinjer som institusjoner kan forholde seg til (Avdesh et al., 2012a). Likevel er det mye som tilsier at institusjoner og regioner i stor grad har egne standarder som de følger (Lidster et al., 2017). Standardisering i form av protokoller og praksis som gir utgangspunkt for valg for innsamling av data, analyser, avlesninger og vurderinger er viktig for å gjøre det mulig for forskere i forskjellige regioner å samarbeide. Denne praksisen bidrar til å gjøre det mulig å gjenskape forskning, tolke andres data og gjøre en helhetlig vurdering av andres arbeid (Homes et al., 2010). I forsøk med bruk av modelldyr bør oppsettet og måten dyrenes holdes på være en viktig del av standardiseringen. Om dyr i forskjellige institusjoner og regioner holdes på forskjellig vis vil det ikke bare være vanskeligere å gjenskape forskning, men det vil også være vanskeligere å sammenligne

resultater fra forskjellige studier. For å kunne fastsette en standard må en ha kunnskap om sebrafiskens naturlige atferd og levevis, samt potensielle avvik fra denne hos sebrafisk i en laboratoriesetting. Normal atferd er en viktig indikator for god dyrevelferd, samt at det bidrar til å skape mer solid data fra laboratoriestudier (Graham et al., 2018).

## Sebrafisk

### Taksonomi

Sebrafisken (*Danio rerio*) tilhører Cyprinidae som er den mest artsrike familien med virveldyr, og er en av 44 arter med danioninarter. *Danio Rerio* ble for første gang beskrevet av Francis Hamilton i *En Redegjørelse Over Fiskene Som Finnes I Elven Ganges Og Dens Forgreninger (An Account of the Fishes Found in the River Ganges and its Branches)* som ble utgitt i 1822. Etter Hamiltons utgivelse ble *D. rerio* flyttet til subgenus *Brachydanio* sammen med andre små *Danio* arter (Spencer et al., 2008).

### Utseende og morfologi

Fra tuppen av snuta til begynnelsen av den kaudale finnen er sebrafisken sjeldent mer enn 40mm. Fisken er spoleformet med en underkjeve som stikker lengere opp enn overkjeven. Øynene er sentralt plassert og ikke synlige ovenfra (Spencer et al., 2008). Sebrafisken har 5 til 7 horisontale blå bånd som går fra gjellelokket og utover i den kaudale finnen. Stripene finnes også på analfinnen mens ryggfinnen kun har en mørkere felt langs den øvre kanten med en lys ytre bord. De mørke stripene inneholder blant annet melanoforer og iridoforer, mens de lyse partiene imellom inneholder xantoforer (Parichy and Johnson, 2001). Sebrafisken har evnen til å endre på utseende i henhold til miljøet rundt. Det kan se ut til at dette brukes både som en form for kamuflasje, som når melansomene spres eller samles ut ifra lysintensitet, men også som en måte å signalisere andre fisk. Dette ser man spesielt i forbindelse med aggressiv atferd



der fargene på fisken typisk blir mørkere (Spencer et al., 2008). Hunn og hannfisker har like farger, men hannene har tendens til å ha større analfinner med noe gulere farge. På ungfisk er det vanskelig å bestemme kjønn uten disseksjon, men på voksne individer kan hunnen ses når hun er egg bærende da hun vil ha en større og mer avrundet mage (Spencer et al., 2008). Den sikreste måten å skille kjønnene på er like vel om tilstedeværelsen av genital papilla foran analfinnen hos modne hunner (Yossa et al., 2013).

### Sebrafisk i naturen

Det naturlige habitatet til sebrafisken finner man i små vassdrag og stillestående vann rundt elvene i Nepal, India, Bangladesh og mulig Myanmar (Parichy, 2015). Arten har blitt observert i en rekke forskjellige habitater fra små vassdrag, til rismarker, kulper, større elver og innsjøer (Suriyampola et al., 2015). Habitatene sebrafisken lever i har store variasjoner i temperatur, pH, turbiditet, hvor mye strøm det er i vannet samt vegetasjon (Graham et al., 2018). Sebrafiskens evner til å tilpasse seg ulike leveområder kan ha sammenheng med store fysiske variasjoner i habitatene de lever i. Monsuner i regnesongen fører til store økninger av vannmasser i de store elvesystemene, samt endringer i temperatur, vannstrømmer, turbiditet og vegetasjon (Suriyampola et al., 2015).

Sebrafisken er omnivore med en naturlig diett som i hovedsak består av dyreplankton og insekter. Selv om det er dette sebrafisken spiser i all hovedsak, har analyser av innholdet i fordøyelsessystemet vist en stor variasjon av føde. Det har blant annet blitt funnet planteplankton, trådalger, biter av karplanter, sporer, egg fra virvelløse dyr, fiskeskjell og edderkoppdyr i disse analysene. De fleste av insektene var akvatiske insekter eller akvatiske larvestadiet av terrestriske insekter (Suriyampola et al., 2015, Spencer et al., 2008).

Sebrafisken spiser dyreplankton i hovedsak fra vannsøylen, men det ble også funnet detritus,

gjørme og sand i prøvene, noe som tyder på at sebrafisken også plukker mat fra bunnsubstratene. Inklusjonen av mat fra en terrestrisk kilde kan også bety at fisken i tillegg spiser mat som er på eller nærme vannoverflaten. I denne studien var det ingen signifikant forskjell mellom dietten til hunn- og hannedyr (Spence et al., 2007).

I naturen er det flere andre arter som livnærer seg på sebrafisk. I en studie (Spence et al., 2006) over distribusjon og habitatpreferanse hos sebrafisk i Bangladesh fant forskerne at de mest vanlige rovdyrtaxa som spiste sebrafisk var slangehodefisker (*Channa* spp.) og ferskvannshorngjel (*Xenentodon cancila*) (Spence et al., 2006). Det er like vel mulig at det er langt flere arter som spiser sebrafisk, da denne studien kan ha gått glipp av andre mulige jegere, som nattaktive maller, arter som spiser egg, embryo og larver, samt fuglearter som jakter og spiser fisk (Spencer et al., 2008).

Når det kommer til sebrafiskens naturlige oppførsel er det mye vi ikke vet, da det finnes meget begrenset med forskning på sebrafisk i sitt naturlige miljø. En studie fra 2015 (Suriyampola et al., 2015) viste at miljøet rundt sebrafisken er med på å påvirke deres sosiale preferanser. Studien så på samlinger av sebrafisk i miljøer med varierende grad av strøm i vannet. I stillestående vann ble sebrafisken funnet i relativt små grupper på opptil 22 fisk, i veldig saktegående vann ble de funnet i endra mindre grupper på rundt 6-7 stykker mens i hurtiggående vann ble de funnet i veldig store grupper med opptil 300 fisk. Vi vet derfor at sebrafisken naturlig vil variere sine sosiale levemåter basert på miljø rundt der fisken lever (Graham et al., 2018).

En av få naturlige atferder som har blitt registrert hos sebrafisken er sosial samling (Graham et al., 2018). En sosial samling av fisk (*a shoal*), er en gruppe fisk som samles på grunn av en

sosial preferanse. Om disse fiskene viser koordinerte bevegelser i form av synkronisert svømming kalles det å svømme i stim (*Schooling*) (Delcourt and Poncin, 2012). Sebrafisk er en meget sosial art som ofte viser sosial samling (Graham et al., 2018). Sebrafisk viser også tendenser til å svømme i stim, men en studie om stimsvømming og sosial samling hos sebrafisken viser at stimsvømming i all hovedsak forekommer når sebrafisken er under stress. Dette kan ha sammenheng med at å svømme i stim gir bedre beskyttelse mot rovdyr, men krever også mer energi og hindrer individuell leting etter mat. Studien viste også at større grupper sebrafisk hadde mindre sannsynlighet for å svømme i stim, og oftere var kun i sosial samling. Dette kan antyde at sebrafisken opplever det som mindre stressende å befinne seg i større grupper med artsfrender enn i små grupper (Miller and Gerlai, 2012).

#### Gyting og utvikling

Data fra en studie utført i Bangladesh (Spence et al., 2007), antyder at vekst og reproduksjon hos sebrafisken er knyttet til sesongene, med en periode av hurtig vekst i monsuntiden og gyting rett i forkant. Likevel så de i studiet at hunnene produserte egg også utenfor denne tiden og at det var en sterk sammenheng mellom når sebrafisken gyttet og når mat var mer tilgjengelig. Dette kan også være med på å forklare hvorfor sebrafisk i laboratorier vil gyte hele året (Spence et al., 2007). Sebrafisk parrer og gyter på morgenkvisten når sola står opp (Brandt et al., 2002) og produserer fra 50-300 egg opp til hver 10 dag (Burke, 2016).

Gyting hos sebrafisken har nesten utelukkende blitt studert i laboratoriet på tamme stammer, men studier på viltfanget fisk utført i halvnaturlige forhold viser at paringsatferden beskrevet fra forskningen stort sett også er gjeldene i naturen. Likevel er det notert flere forskjellige atferder hos sebrafisk huset i seminaturlige kar som vi ikke har sett hos laboratoriefisk

tidligere. Dette kan indikere at sebrafisken har et mer komplekst atferdsmønster enn tidligere observert (Spencer et al., 2008).

Sebrafisk utvikler seg fort, og allerede 6 timer etter fertilisering starter gastrulasjon (D'Costa and Shepherd, 2009). Gastrulasjon er en tidlig utviklingsprosess der embryoet går fra å være et enkelt cellelag av epitelceller og om organiserer seg til en flerlags og flerdimensjonal struktur som kalles gastrula (Muhr and Ackerman, 2022). Egget klekker etter rundt to døgn, som en fritt svømmende larve (D'Costa and Shepherd, 2009). Larvestadiet varer deretter i rundt 6 uker. I løpet av denne tiden vokser larvene til mer enn tre ganger lengden sin og går gjennom en rekke morfologiske endringer som blant annet endrer finnene og pigment mønster. Etter rundt 45 dager etter fertilisering er den nå en ung-fisk. Hvor lang tid utviklingen av fisken tar er også avhengig av temperaturen den lever i. Ung-fisk morfologien ligner veldig på voksne fisk, der fisken blant annet har fått skjell, men de er ikke seksuelt modne. Sebrafisk når seksuell modenhet når de er rundt 3 måneder gamle og regnes da som voksne (Singleman and Holtzman, 2014).

Det er viktig å ha kunnskap om sebrafisken i sitt naturlige habitat for å kunne forstå og bedømme atferden og behovene til fisken i laboratoriesettinger. Likevel er det viktig å erkjenne at sebrafisk brukt i laboratorier i dag ikke nødvendigvis er helt like de sebrafiskene man kan finne vilt. I en studie (Spence et al., 2007) ble det observert at fisk i laboratoriet vokste kjappere og ble kjønnsmodne tidligere enn fisk i sitt naturlige habitat. Dette kan ha vært påvirket av tilgang på høy kvalitetsfôr og konstant varmt vann, men det kan også ha vært påvirket av selektiv avl (Spence et al., 2007). Det finnes også bevis for at forskjellige populasjoner av sebrafisk har forskjellige preferanser, også blant de tamme stammene (Spencer et al., 2008).

I forbindelse med bruken av sebrafisk i forskning kommer spørsmålet om selvbevissthet opp. Selvbevissthet, eller det å være sansende, har opp gjennom tiden blitt definert på mange forskjellige måter, og det er også i dag uenigheter om hvordan begrepet best kan defineres. I *Sentience and sensation* av Silverman J. (2008) definerer han det på denne måten: «Et sansende dyr er et som har evnen til å oppnå og tolke stimuli fra dets indre og ytre miljø og har minst en grunnleggende evne til hukommelse, dømmekraft og følelser» (Silverman, 2008). Ved bruk av dyr i forskning skal man alltid prøve å minimere antall dyr som blir brukt, samt hvor mye stress og smerter dyrene blir utsatt for. For å hjelpe til å oppnå dette er det en enighet om at man skal bruke dyr med en lavere grad av selvbevissthet, og i dag er man derfor enige om at dyr med høyere intelligens bør brukes mindre enn dyr med lavere intelligens. Det betyr at bruken av primater i forskning er betydelig mer begrenset enn bruken av for eksempel fisk. Det må like vel erkjennes at fisk er sansende dyr med kapasitet til å føle smerte, ubehag og stress (Broom, 2016).

I løpet av den tiden sebrafisk har blitt brukt som modelldyr har det blitt observert en stor endring i holdningene rundt dyrevelferden til sebrafisken i laboratoriet (Lawrence, 2016). Bruken av miljøberikelser er blitt en anerkjent måte å øke dyrevelferden hos dyr holdt i fangenskap (Newberry, 1995). I EU sine direktiver står det at fisk skal huses med miljøberikelser, med mindre atferden til fisken tilsier at det ikke er behov (Parliament, 2010). I dag blir sebrafisk stort sett huset uten miljøberikelser (Lee et al., 2019), og protokoller for hold av sebrafisk, som den av Avdesh, A. og Chen M. fra 2012, tar ofte ikke for seg miljøberikelser (Avdesh et al., 2012a). Likevel er det en endring i holdningene rundt hold av sebrafisk som har ført til flere studier som ser på effekten av et mer komplekst miljø på sebrafisken og hvordan berikelser kanskje bør innføres i protokoller hos sebrafisk (Schroeder

et al., 2014). Miljøberikelser som blir studert er kunstige planter, planter, substrat, bilder av substrat, menneskeproduserte objekter, lys, lyd, med mer. I forskningen er det fokus på hva som gir best effekt på dyrevelferd, som samtidig ikke påvirker resultatene negativt.

## **Hvordan måles resultater**

Da miljøberikelser blir brukt for å øke dyrevelferden, blir det nødvendig å ha en forståelse for hva god dyrevelferd er. I og med at det ikke finnes en satt standard på hva god dyrevelferd er, er det flere måter det kan bli definert på, og det er ofte en av disse tre kategoriene som blir brukt: naturbaserte definisjoner (at dyret får utført naturlig atferd), funksjonsbaserte definisjoner (at dyret er friskt og fungerer godt nok), eller følelsesbaserte definisjoner (at dyret generelt har en positiv mental status der det ikke opplever negative følelser), eller en kombinasjon av disse (Stevens et al., 2021). Tidligere diskuterte vi hvordan en skulle definere sansende dyr, samt hvorvidt sebrafisk er sådan. I en artikkel fra 2021 (Stevens et al., 2021) diskuterer forfatterne den samme problemstillingen. Selv om det ikke er en universal enighet om at fisk er sansende, mener forfatterne at det er overbevisende mengder bevis som støtter det. De ser det derfor som mer etisk å regne sebrafisk som sansende som et føre-var-prinsipp der det er fare for at dyrene kan bli utsatt for mulig lidelse (Stevens et al., 2021). Artikkelen tar dermed utgangspunktet i definering av dyrevelferd på denne måten: «dyr kan regnes å ha god dyrevelferd når de har god fysisk helse, mangel på mental lidelse, og mulighet for positive opplevelse», som foreslått av Dawkins (Dawkins, 2003).

For å vite hva som er god dyrevelferd må en ha kunnskap om arten man jobber med. Dette for å kunne vurdere om dyret har god helse, om den har mental lidelse, og om den opplever visse opplevelser som positive. Noen arter har atferdsmønstre og følelser som kan minne om våre egne og som vi som mennesker har lettere for å forstå. Disse dyrene tilskriver vi ofte

menneskelige egenskaper, såkalt antropomorfisme. Antropomorfisme kan ha negative følger for dyrene, da en kan tilegne dyret menneskelige egenskaper som det egentlig ikke har, og behandle det deretter (Mota-Rojas et al., 2021). En bakside av antropomorfisme er at dyr som ikke viser følelser på en måte som er lett for mennesker å tolke, kan virke som om de ikke innehar følelser. I disse situasjonene er det risiko for å undervurdere dyrenes behov og dermed også påføre dyrene en lavere grad av velferd.

Sebrafisk har blitt et etablert modelldyr der vi stadig får en økt forståelse for de komplekse atferdsmønstrene og de fysiologiske endringene som kan ses i forbindelse med forskning. For å måle effekten av miljøberikelser brukes denne kunnskapen for å prøve å gi en mest mulig objektiv forståelse av hvordan miljøberikelser og situasjoner oppleves for sebrafisken. Noen av måtene vi måler effekten av miljøberikelser er gjennom ulike stresstester, fysiologiske parameter, atferd, med mer.

#### Måling av stress

De inkluderte studiene har brukt flere metoder for å måle stress. Det har blant annet blitt tatt i bruk en rekke atferd- og stresstester, der man ser på atferdsmønsteret som en indikatorer på stress. Noen måler også kortisolnivå i plasma. Atferd kan måles på flere måter, men ofte filmes sekvenser av sebrafisken, som deretter analyseres etter allerede bestemte indikatorer på positiv eller negativ effekt. Et eksempel på en indikator brukt er tid tilbragt i bunn av karet, der mer tid brukt i bunn regnes som en indikator på mer stress, altså negativ effekt.

#### Måling av læring

Måling av læring krever mye kunnskap om sebrafisken generelt, samt en god forståelse for sebrafiskens utvikling og andre variabler som kan påvirke læringsprosessen. En type måling

man kan gjøre er å teste hvor lang tid sebrafisk oppstallet med eller uten berikelse bruker på å komme seg ut av en labyrint. Raskere fullføring vil da være en indikator på høyere læreevne.

### Måling av fysiologiske parametere

Fysiologiske parametere kan være vekt og lengde. Andre parametere krever at man først avliver fisken, slik som vekt på hjernen eller kortisolnivå.

### Fysiologiske parametere

Noen fysiologiske parametere som blir sett på i oppgaven. Kortisol er et hormon som er med på å påvirke opptak og bruk av glukose i vevet, samt at det er med på å regulere immunsystemet. På grunn av kortisol sin rolle i stressresponsen blir det ofte kalt for «stresshormonet». Stress kan være akutt om fisken blir stresset kort tid før prøvetaking, eller basalt om den har blitt utsatt for stress over en lengre periode. Ved opplevelse av stress blir blant annet binyrene stimulert til å skille ut kortisol. Kortisol bidrar til at kroppen kan håndtere stress, ved at blant annet energi mobiliseres til og i musklene (Berg and Otterholt). Andre parametere som kan måles er endring i GSK3 $\beta$ , HSP70, Akt signalering, Superoksid dismutase (SOD) aktivitet, katalase (CAT) aktivitet, TBARS nivå, reaktive oksygensubstanser (ROS) nivå, ikke-protein tiol (NPSH) nivå, og total tiol (SH) nivå. GSK3 $\beta$  er et enzym som påvirker mange cellulære prosesser i hjernen forbundet med celleoverlevelse, inflammasjon, læring, minne og utvikling. HSP70 er en familie med proteiner som beskytter celler under mye stress (Moore et al., 2021). Akt er proteiner som spiller en viktig rolle i cellemetabolisme, vekst, celledeling og celleoverlevelse (Hemmings and Restucci, 2012). SOD er enzymer som hjelper til med metabolismen av skadelige superoksidanionradikale til hydrogenperoxid og oksygen (Aarnes). Katalase (CAT) er et enzym som finnes i de fleste celler og spalter hydrogenperoksid, et giftig stoffskifteprodukt, til vann og oksygen



(Rasmussen). TBARS (thiobarbituric acid reactive substances) er biprodukter etter lipidperoksidering og brukes ofte til å måle graden av lipidperoksidering (Diaz De Leon and Borges, 2022). Reaktive oksygensubstanser (ROS) er ustabile molekyler som inneholder oksygen og lett reagerer med andre molekyler i cellene. En overflod av ROS kan føre til skader på DNA, RNA, og proteiner, og kan forårsake celledød. Ikke-proteintiol (NPSH) er tioler som ikke er proteiner. Tioler har en sentral rolle i en rekke fysiologiske funksjoner, som enzymaktivitet, signaltransduksjon, celledeling og beskyttelse av celler. Total tiol (SH) er måling av både ikke-proteintiol (NPSH) og proteintiol (PSH) (Yang and Guan, 2018).

## Tester

### Nytt-kar-test

Fisken testes ved å puttes i et nytt kar. Dette karet er delt inn horisontalt slik at man kan se hvor lang tid fisken bruker på å komme seg til toppdelen av karet og hvor mange ganger fisken beveger seg mellom sonene. Det ses også på hvor lang tid de bruker og hvor mye de beveger seg i disse sonene, samt den totale avstanden de har svømt. Denne testen brukes til å måle angstlignende atferd og stress.

### Sosialpreferansetest

Gjennomføres ved å gi fisken valget mellom forskjellige former for sosiale stimuli og se hvordan de reagerer på disse og hva de viser preferanser for.

### Lys-mørk-test

Fisken testes i et kar den ene delen er farget hvit og den andre delen er farget svart. Noen ganger er det et nøytralt område mellom de to delene, og andre ganger er det ikke det. Fisken blir plassert enten i det nøytrale området, eller i hvitt område av testkaret. Lys-mørk-test

måler angstrelatert atferd hos sebrafisk ved å se hvor mange ganger de krysser over til hvit del av karet og hvor lenge den totalt oppholder seg i den hvite delen. Flere kryssninger over til hvit del av kar er et tegn på mer utforskende atferd, og lengre opphold i hvit del er et tegn på lavere stressnivå.

### Stedspreferansetest

En stedspreferansetest kan gjennomføres på mange forskjellige måter. Det generelle oppsettet er et kar med avgrensede områder som inneholder forskjellige typer miljøberikelse, også ser forskerne hvilket område sebrafisken tilbringer mest tid i. Mer tid brukt i et spesifikt område antyder at fisken har en preferanse på denne typen miljøberikelse. T-labyrinttest og Pluss-labyrinttest er typer stedspreferansetester brukt for å teste preferanse på for eksempel farge. I den ene er karet formet som en T, hvor fisken kan velge mellom to farger. I den andre er karet formet som et plusstegn, hvor fisken kan velge mellom fire farger.

### Nytt-objekt-test

En nytt-objekt-test er en test som ser på hvor lenge fisk oppholder seg rundt et objekt som er kjent i forhold til et ukjent objekt. Testen kan brukes til å måle modighet.

### Innlært unngåelsesprotokoll

Innlært unngåelse er når dyr lærer å forbinde en spesifikk kontekst med noe negativt. Et eksempel på dette er at fisken testes i et kar der den ene delen er hvit, og den andre delen er svart. Den plasseres i den hvite delen av karet, og etter 60 sekunder med akklimatisering får de fri tilgang til den svarte delen. Når de er helt over i den svarte delen blir den hvite delen sperret av, og fisken får et elektrisk sjokk på 3V i fem sekunder. Denne prosedyren gjentas flere dager. Testen ser på hvorvidt fisken lærer seg å unngå svart del der de tidligere har fått

sjokk. Lengre ventetid før krysning over til svart del tyder på at fisken assosierer den svarte delen med elektrosjokk, og dermed økt unngåelse.

### Typer miljøberikelser

I denne oppgaven er berikelser delt inn i fysiske-, sosiale- og auditiv berikelse.

Fysiske miljøberikelser er berikelser som fisken kan se, og noen ganger interagere med.

Eksempler på fysiske miljøberikelser er objekter i karet, bilder eller farge på veggen av karet, strøm i vannet, eller lys. Sosiale berikelser er berikelser som fremmer sosial atferd. Det kan være andre fisk i karet, å se andre fisk, å se eget speilbilde eller bare noe som minner om andre fisk. Auditiv berikelse er berikelser som bruker lydbølger, som musikk og infralyd.

## **Formål**

Det overordnede målet med denne oppgaven er å bidra til å samle og oppsummere kunnskapen som finnes rundt miljøberikelser hos sebrafisk for å få et mer oversiktlig bilde av hva som må forskes videre på.

Det spesifikke målet for oppgaven er å oppsummere effekten av miljøberikelser på sebrafisk i studier som har blitt utført.

# Materiale og metoder

## Metode for litteratursøk

### Søkestreng

(Zebrafish\* OR "danio rerio") AND ("Environmental enrichment")

Denne søkestrengen ble brukt til å søke på artikler i Oria, Pubmed og Web of Science.

**Tabell 1.** Alle artikler fra kildesøk før ekskludering av artikler og duplikater

|                |     |
|----------------|-----|
| Oria           | 58  |
| Pubmed         | 38  |
| Web of Science | 80  |
| <b>Totalt</b>  | 176 |

Søket ga 176 artikler til sammen. Det var 6 artikler som ikke fulgte inklusjonskriteriene og ble tatt bort. Dette var artikler som enten var fra før 2010, som ikke var artikkel eller litteraturstudie, eller ikke var fagfelleurdert. Søkemotorenes egne sorteringsmekanismer ble brukt for å ekskludere disse kildene.

**Tabell 2.** Inklusjonskriteringer for inkludering av kilder

|                     |  |
|---------------------|--|
| Inklusjonskriterier | <ul style="list-style-type: none"><li>- Fagfelleurdert</li><li>- Fra 2010 og senere</li><li>- Artikkel eller litteraturstudie</li><li>- Inneholder «Zebrafish» eller «danio rerio» og «Environmental enrichment» i overskrift eller abstrakt</li></ul> |
|---------------------|--|

Deretter ble alle kilder lastet opp i Endnote. Gjennom Endnote ble «finn duplikater» funksjonen brukt for å fjerne duplikater. Etter at duplikater var fjernet var det igjen 78 artikler. På disse artiklene ble det gått gjennom tittel og abstrakt, og de som ikke var relevante ble fjernet.

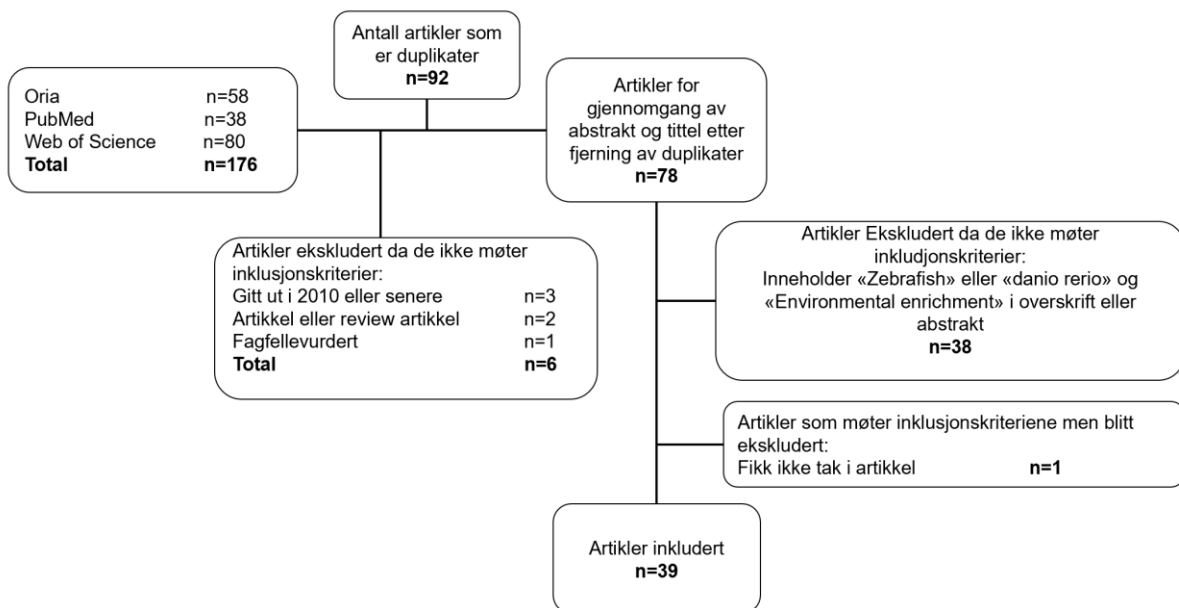
Noen artikler inneholdt «Zebrafish» eller «danio rerio» og «Environmental enrichment» i overskrift eller abstrakt, men var ikke relevant for oppgaven. Disse ble ekskludert. Noen

artikler som kom ved søk inneholder ikke både «zebrafish» eller «danio rerio» og «environmental enrichment», men var likevel relevant for oppgaven. Disse ble inkludert. Se vedlegg 1. og vedlegg 2.

Oppgaven har kun fokus på fisk som ikke allerede har blitt utsatt for behandlinger. Studier som omhandler dette, vil derfor bli ekskludert.

## Resultater

**Figur 1:** Resultat etter ekskludering og inkludering av kilder



**Tabell 3.** Resultater: Miljøberikelsene som ble studert, hvilke indikatorer som ble brukt, samt om de hadde en positiv, nøytral eller negativ effekt på sebrafisk

| Artikkel                 | Miljøberikelse   | Indikator  | Effekt av miljøberikelsen<br>↑ N ↓  |
|--------------------------|--|--|---|
| (Menezes et al., 2022)   | 2 Kunstige planter,<br>1 20mm bøyd PVC rør,<br>15 grønne klinkekuler og<br>1 gul LEGO® plastbrikke | Svømmehastighet<br>Tid brukt fryst<br>Distanse fra bunnen av karet   | ↑: Fisk utsatt for berikelse viste mindre angstlignende atferd etter innlært unngåelsesprotokoll.   |
|                          |  | Distanse fra bunnen av karet   | ↑: Fisk utsatt for berikelse viste mindre angstlignende atferd etter innlært unngåelsesprotokoll, samt at berikelse forebygget den negative lokomotoriske effekten fisk har etter å bli akutt utsatt for alkohol. |
| (Marchetto et al., 2021) | Musikk, Vivaldi<br>65-75dB, 2 ganger om dagen  | Distanse svømt<br>Tid brukt i øvre del av karet<br>Forsinkelse til å entre øvre del av karet<br>Snu vinkler<br>Krysninger over karet | ↑: Fisk utsatt for musikk viste mindre angstlignende atferd.  |
|                          |  | Kortisolnivåer   | N: Ingen endring.   |
| (Estes et al., 2021)     | Kunstige planter (Boxwood sprigs): 3 flytende, 3 nedsunket   | Distanse svømt<br>Svømmehastighet<br>Antall ganger entret øvre halvdel av karet  | N: Beriket fisk svømte inn i den øvre delen av karet flere ganger, men det ble ikke funnet en signifikant forskjell.  |

|                          |  |   |  |
|--------------------------|--|---|--|
|                          |  | Tid brukt i den øvre delen av karet         |  |
|                          |  | Antall ganger entret nedre halvdel av karet |  |
|                          | Tid brukt i den nedre delen av karet                       |   |  |
|                          |  | Antall ganger entret lys del av karet       | N/↓: Spesifikk patogenfri (SPF) fisk med berikelse brukte signifikant mer tid i den mørke delen.               |
|                          |  | Antall ganger entret mørk del av karet      |  |
|                          | En kunstig flytende plante (Boxwood sprigs)                | Tid brukt i den lyse delen av karet         | N  |
|                          |  | Tid brukt i den mørke delen av karet        |  |
|                          |  | Total nr. egg                               |  |
|                          |  | Gjennomsnittlig nr. egg                     |  |
|                          |  | Gjennomsnittlig nr. som klekker             |  |
|                          |  | Overlevelses til klekking %                 |  |
|                          |  | Klekking suksess %                          |  |
| (Collymore et al., 2015) | Plastikkplantes influens på isolerte individer og grupper. | Stedspreferanse                             | ↑: Isolerte individer utsatt for berikelse viste ingen preferanse for å være med annen fisk ovenfor en plante. |
| (de Abreu et al., 2021)  | Farge  | Tid brukt ved farge                         | N: Tendens blå > rød, grønn og gul, samt rød > gul og grønn.   |
| (Moore et al., 2021)     | Uforutsigbar lys-syklus                                    | Endringer i Akt, GSK3β og HSP70             | ↓: Redusert Akt, GSK3β og HSP70.   |
|                          | Grønt/blått lys  | Endringen i Akt                             | ↑: Økt Akt.  |

|                           |  |  |   |
|---------------------------|--|--|---|
| (Buenhombre et al., 2021) | Litteraturstudie som ser på studier med en vid variasjon i berikelser  | Resultater fra studier   | ↑: I litteraturstudiet ser de at berikelser generelt minsker angst-lignende atferd og øker immunitet. |
| (dos Santos et al., 2020) | Steinunderlag 1cm diameter, 3 grønne falske planter 25 cm høye   | Tilvenning til nytt kar test etter 7 dagers berikelseeksponering               | N: Beriket fisk hadde en lett redusert total avstand svømt.   |
|                           |  | Tilvenning til ny kar test etter 14 dagers berikelseeksponering                | N   |
|                           | Steinunderlag 1cm diameter, 1 brunt PVC rør 25mm diameter, T-formet brunt PVC rør 25mm, 4 grønne falske planter 10cm høye  | Tilvenning til nytt-kar-test etter 7 dager i ett senario og 7 dager i et annet | N   |
| (Wilkes et al., 2012)     | 1 plate med 12 sorte stenger 180mm høy, 1 plate med 12 sorte stenger 100mm høye, 1 plate med 12 sorte stenger 50mm høye<br>Stengene var 7mm i diameter og var plassert 20mm ifra hverandre | Aktivitetsnivå   | N: Ingen effekt på aktivitetsnivå.  |
|                           |  | Lengde på aggressiv atferd   | ↓: Tok lengre tid for aggressiv atferd å gi seg.  |
|                           |  | Sosial samling   | N: Ingen effekt.  |
|                           |  | Kortisolnivå   | N: Signifikant økning på dag 1, men ingen effekt ellers.  |
| (Maierdiali et al., 2020) | Karstørrelse   | Bevegelse i kar  | ↑ Fisk i større kar var dristigere.   |



|                          |  |   |  |
|--------------------------|--|---|--|
|                          |  | Stamina   | ↑ Når i større kar så har de mer stamina.  |
|                          |  | Kortisol og pepsin                                  | N: Målinger etter 3 uker som tyder på at det ikke er noen langvarige påvirkninger.           |
| (Barcellos et al., 2018) | Musikk, Vivaldi 65-75dB, 2 ganger om dagen | Tid brukt i øvre del av kar                         | ↑: Fisken hadde en preferanse for den øvre delen av karet hvor de beveget seg mer rundt.     |
|                          |  | Tid brukt i midtre del av kar                       |  |
|                          |  | Tid brukt i nedre del av kar                        |  |
|                          |  | Antall ganger fisk entret nedre del av kar          |  |
|                          |  | Hvor langt fisk svømte i hver del av karet          |  |
|                          |  | Total snu vinkel i hver del                         |  |
|                          |  | Total tid brukt i bevegelse                         |  |
|                          |  | 11 forskjellige gener                               | ↑: Perifere mengder pro-inflammatoriske cytosiner minsket. Økt aktivitet til noen CNS-gener. |
|                          |  | Kortisolnivåer                                      | N  |
| (Manuel et al., 2015)    | Sand, plastikkplanter og en steinformasjon | Tid brukt i hvit del                                | ↑: Beriket fisk tilbrakte mer tid i den hvite delen sammenlignet med uberiket fisk.          |
|                          |  | Antall krysninger mellom hvit og svart del          | ↑: Beriket fisk krysset frem og tilbake flere ganger enn uberiket fisk.                      |
|                          |  | Ventetid før krysning over til svart del dag 2 og 3 | ↓: Ingen forskjell i ventetid alle 3 dager.  |

|                       |   |  |  |
|-----------------------|---|--|--|
| (Gatto et al., 2022a) | 9 LEGO® brikker i varierende form (kloss, hjørneplate, rund, flat og blomst) og farge (rød, gul, grønn og blå) under oppstalling og en visuell berikelse under tester i form av 2D geometriske symboler på plastikkplater | Tid brukt i området med kjent mønster  | ↑: Når utsatt for en ny type visuell berikelse så oppholdt berikede larver seg nærmere disse og beveget seg mer rundt.   |
|                       |   | Tid brukt ved kjent objekt<br>Tid brukt ved ukjent objekt  | ↑: Larver som var oppvokst i et beriket miljø viste ingen preferanse for kjent eller ukjent objekt, sammenlignet med kontrollgruppen som foretrakk kjent objekt. |
| (Lee et al., 2019)    | Grus og planter i oppvekst  | Overlevelse av larver  | ↑: økt overlevelse i 5-30 dager etter fertilisering (dpf).   |
|                       |   | Lengde   | ↑: Hunnfisk utsatt for berikelse hadde en økt kroppsmasseindeks sammenlignet med uberikede hunner.   |
|                       |   |  | ↓/N: Hannfisk utsatt for berikelse var kortere og hadde mindre masse enn uberikede hanner, men de hadde lik kroppsmasseindeks.                                   |
|                       |   | Tid på å nå øvre del av karet<br>Antall ganger entret øvre del av karet<br>Tid brukt i øvre del av karet | ↑: Beriket fisk tilbrakte mer tid i øvre del av karet.   |

|                        |   |                                       |   |
|------------------------|---|---------------------------------------|---|
|                        |   | Tid brukt fryst ved bunn av kar       |   |
|                        |   | Kjønnsratio                           | N: Ingen forskjell i antall av hvert kjønn.   |
| (Wafer et al., 2016)   | Plastikkgress   | Antall egg etter 3 timer              | ↑: Stor økning i antall egg sammenlignet med uberiket fisk.   |
|                        | Plastikkblader  | Antall egg etter 3 timer              | ↑: Mild økning i antall egg i forhold til uberiket fisk.  |
| (Matheus et al., 2018) | Grus, 2 plastikkplanter 10cm høye, 1 plastikkplante 20cm høy, 1 ruinlignende plastikkbue. Deretter halvparten utsatt for en uforutsigbar kronisk stress protokoll (UCS) | Lipidperoksidering (TBARS) nivå       | ↑: Stress økte kun TBARS hos fisk i uberiket kar.   |
|                        |   | Reaktive oksygensubstanser (ROS) nivå | ↑: Økt nivå av ROS var kun observert hos stresset fisk fra uberiket kar.  |
|                        |   | Ikke-proteintiol (NPSH) nivå          | ↑: Berikelse forebygget effekten av stress på NPSH.   |
|                        |   | Total tiol (SH) nivå                  | N: Det ble funnet en sammenheng, men ingen effekt av UCS og miljøberikelser på SH   |
|                        |   | Superoksid dismutase (SOD) aktivitet  | ↑: Berikelse forebygget endringer av SOD på grunn av stress, men kun når de var oppstallet med berikelse i 28 dager, ikke 21 dager. |
|                        |   | Katalase (CAT) aktivitet              | ↑: Berikelse økte CAT aktivitet.  |

|                         |   |   |   |
|-------------------------|---|---|---|
| (Stevens et al., 2021)  | Litteraturstudie som ser på studier med en vid variasjon i berikelser                         | Resultater fra studier                  | ↑: Berikelser kan ha betydning for dyrevelferd. De ser at berikelser har en positiv effekt i mange studier.               |
| (Woodward et al., 2019) | 1 falsk plante, 1 opp-ned blomsterpotte 7cm i diameter, bilder av blått sjølandskap på vegger | Aggresjon mot speilbilde                | ↓: Kraftig økning i aggresjon.  |
|                         |   | Gjennomsnittlig antall egg              | ↑: Kraftig økning i forhold til kontrollgruppe, men ikke en signifikant økning i forhold til den mindre berikede gruppen. |
|                         |   | Gjennomsnittlig antall fertiliserte egg | N: ingen forskjell mellom behandlingene.  |
|                         |   | Masse<br>Lengde                         | N/↓: Det var ingen signifikant forskjell i masse, men det var reduser kroppslengde i forhold til kontrollgruppen.         |
|                         | Bilde av blått sjølandskap på vegger  | Aggresjon mot speilbilde                | ↓: Mild økning.   |
|                         |   | Gjennomsnittlig antall egg              | ↑: Kraftig økning i forhold til kontrollgruppe.   |
|                         |   | Gjennomsnittlig antall fertiliserte egg | N: ingen forskjell mellom behandlingene.  |
|                         |   | Masse<br>Lengde                         | N: Ingen signifikant forskjell i forhold til kontrollgruppen.   |
| (Krueger et al., 2020)  | Hvitt PVC rør, hvitt tyll, mørkt  | Stedspreferanse                         | ↑: Foretrakk sosiale berikelser i form av   |

|                                |  |  |   |
|--------------------------------|--|--|---|
|                                | papirunderlag, flerfargede klinkekuler, grønne og brune plastikkplanter, underlag med bilde av flerfargede klinkekuler, mørkt papir på vegger, bilde av flerfargede planter på veggen, bilde av andre sebrafisk på veggen, reflekterende papir på veggene, nabo fisk |  | reflekterende papir og nabofisk.  |
| (Giacomini et al., 2016)       | Sand, grus, 2 naturlige planter og korker.<br>Diazepam og fluoxetine   | Kortisolnivå                           | ↑: Både berikelse og medikamenter ga reduserte kortisolverdier. Størst effekt når de ble kombinert. |
| (Karoglu-Eravsar et al., 2021) | Grus, rør, falske planter, bilde av undervannsplanter på veggen  | Hjernevekt hos unge og eldre individer | ↑: Fisk utsatt for berikelse hadde økning i hjernevekt.   |
|                                |  | Lengde<br>Vekt                         | N: BMI ble ikke påvirket av miljøberikelser.  |
| (Gatto et al., 2022b)          | 9 LEGO® brikker i varierende farger (rød, gul, grønn og blå) og former (L-form, brikke, sylinder og blomst)  | Tid brukt ved nytt objekt              | ↑: Beriket fisk tilbrakte mer tid i nærheten av nytt objekt sammenlignet med uberiket fisk.         |

|                           |  |   |   |
|---------------------------|--|---|---|
| (Marcon et al., 2018)     | Grus, 1<br>ruinlignende<br>plastikkbue, 1<br>plastikkplante 20cm<br>høy, 2<br>plastikkplanter<br>10cm høy.<br>Deretter utsatt for<br>en kronisk stresstest | Kortisolnivå  | ↑: Fisk utsatt for<br>berikelse hadde lavere<br>kortisolmengder enn<br>uberiket fisk.   |
|                           |  | Total distanse svømt<br>Tid brukt i den nedre<br>delen av karet<br>Tid brukt i den øvre delen<br>av karet | ↓ /↑: Fisk utsatt for<br>kronisk stresstest<br>tilbrakte mer tid i nedre<br>del av karet. Fisk som<br>ikke ble utsatt for<br>kronisk stresstest og som<br>kom fra et beriket miljø<br>tilbrakte mer tid i toppen<br>av karet. |
| (DePasqual et al., 2019)  | Strømning,<br>plastikkplanter og<br>sand, strømning og<br>plastikkplante og<br>sand, uberiket miljø,<br>nøytralt midtområde<br>for føring                  | Fysisk plassering i karet   | ↑: Foretrakk strømning i<br>kombinasjon med fysisk<br>berikelse. Når ikke mulig<br>for kombinasjon<br>foretrakk de kun<br>berikelse ovenfor kun<br>strømning.   |
| (White et al., 2017)      | Sosiale<br>Enkeltvis, par og<br>grupper  | Kortisolnivå  | ↑: Flere fisk i karet førte<br>til raskere nedgang.   |
| (DePasquale et al., 2021) | Grus, 1 grønn<br>plastikkplante 14cm<br>høy, 1 rød<br>plastikkplante 14cm<br>høy, 1 sort<br>plastikkpote 9cm<br>høy  | Gjenkjennelse av kjent og<br>ukjent objekt på avstand   | ↑: Fisk med berikelse var<br>bedre på å gjenkjenne det<br>kjente objektet på<br>avstand.  |
|                           |  | Gjenkjennelse av kjent og<br>ukjent objekt på nært hold   | N: Inkonklusive.  |

|                           |  |  |  |
|---------------------------|--|--|--|
| (DePasquale et al., 2016) | Grus, 2 plastikkplanter, 1 plastikkhule, et rullerende objekt (hvit PVC rør, stein, forskjellige fargede planter og plastikkflaske) og jaging. | Hjernestørrelse                                | ↑: Fisk med berikelse og fisk utsatt for jaging hadde økt størrelse sammenlignet med kontrollgrupper.      |
|                           |  | Antall feil i labyrint                         | ↑: Fisk som var utsatt for berikelse gjorde mindre feil når jaget med nett sammenlignet med kun berikelse. |
|                           |  | Tid brukt på å komme seg ut av labyrint        | ↑: Fisk utsatt for jaging eller berikelse kom seg fortere ut av labyrinten.                                |
| (Franks et al., 2018)     | Stort akvarium med stein, planter og grus, med 10 fisk   | Bevegelse i kar                                | ↑: Gruppene var mer synkrone og hadde ingen tegn til dykkende atferd                                       |
| (Kistler et al., 2011)    | Sand, planter og keramikkpott  | Stedspreferanse                                | ↑: Sebrafisken viser en preferanse for berikede områder ovenfor uberikede.                                 |
|                           |  | Utforskende atferd, fôrsøking og sosial atferd | N: Ingen forskjell.  |
| (Sykes et al., 2018)      | ½ keramikkpote 11cm høy, 3 seksjoner med plastikkplanter   | Sosial samling                                 | ↓: Fisk fra beriket miljø svømte tettere sammen når utsatt for et nytt kar sammenlignet med uberiket fisk. |
|                           |  | Utfall mot annen fisk                          | ↓: Fisk utsatt for berikelse gjorde flere utfall mot andre fisk når de ble putt i et tom kar.              |

|                         |   |  |  |
|-------------------------|---|--|--|
| (Maximino et al., 2010) | Gjemmesteder, steiner, vegetasjon og naturlig substrat              | Tid brukt i hvit del av kar  | ↑: Signifikant økning av tid brukt i hvit del hos fisk fra beriket miljø.  |
| (Soares et al., 2020)   | Fordeling av kjønn, kjemisk kontakt, visuell kontakt og nylonplante | Total distanse svømt<br>Total snu vinkel<br>Antall kryssninger mellom områder<br>Tid brukt i den nedre delen av karet<br>Tid brukt til fisk første gang var i øvre delen av karet<br>Tid brukt i den øvre delen av karet | ↑: Mer miljøberikelse førte til mindre angstlignende atferd.   |
| (Jones et al., 2019)    | Grus, skygge fra plate over kar, falske planter, ekte planter       | Stedspreferanse  | N: Når valget mellom uberiket eller skygge fra plate eller planter valgte de uberiket. Når valg mellom skygge fra plate eller skygge fra planter var det ingen preferanse. |
| (Spence et al., 2011)   | 50 falske planter<br>50mm lange                                     | Kroppsstørrelse  | ↓: Beriket fisk var mindre enn uberiket fisk.  |
|                         |   | Tid brukt på å finne mat   | ↑: Fisk vokst opp med berikelse utviklet evnen til å finne mat raskere.  |



|                           |  |   |  |
|---------------------------|--|---|--|
| (Buenhombre et al., 2022) | Sand, grus, plast, bambuspinner og plastikkplanter   | Tid brukt frystatferd<br>Tid brukt i hvitt område   | ↑: Fisk utsatt for plutselig berikelse eller gradvis tap av berikelse viste mer angstlignende atferd enn de som hadde konstant berikelse eller gradvis økning i berikelse. |
| (Powell et al., 2021)     | Manuell vasking av kar   | Tid brukt i den nedre delen av karet<br>Rømming<br>Jaging<br>Tilbaketrekking<br>Fisk viser siden<br>Reiste finner<br>Biting | ↓: Kortvarig negativ effekt som gikk over etter en liten stund.  |
| (Volgin et al., 2018)     | Litteraturstudie som ser på studier med en vid variasjon i berikelser                          | Resultater fra studier  | ↑: Miljøberikelser ser ut til å ha en positiv effekt på sebrafisk og er med på å minske stress.  |
| (Schroeder et al., 2014)  | Sand, grus, bilde av grus, falske overhengende planter, falske planter med røtter, luftsteiner | Preferanse i par: tiden fiskene brukte i område med eller uten berikelse  | ↑: Dominant fisk foretrakk deler med underlag.   |
|                           |  | Preferanse i grupper: tiden fiskene brukte i område med eller uten berikelse  | ↑: Foretrakk grusunderlag enten alene eller i kombinasjon med planter.   |
| (Scatterty et al., 2023)  | Infralyd<br>5 Hz<br>10 Hz  | Stedspreferanse i kar   | ↓: Fisken tilbrakte minst tid i nærheten av lydkilden ved 15 Hz.   |

|  |                |                 |  |
|--|----------------|-----------------|--|
|  | 15 Hz<br>20 Hz | Bevegelse i kar | N: Det var ingen forskjell på total avstand svømt eller immobilitet. |
|--|----------------|-----------------|--|

## Oppsummering av resultater

Miljøberikelser brukt er musikk, infralyd, annen fisk, speil, og fysiske berikelser som sand, planter, steiner, grus, objekter, gjemmesteder, farger, og lys. Der det er brukt berikelser ser vi ofte lavere nivåer av kortisol og redusert angstlignende atferd, samtidig som vi ser at fisken utforsker mer. Kun i ett av studiene så forskerne at kunstige planter plassert i karet økte angstlignende atferd. Vasking av kar og plutselig introduksjon av miljøberikelse hos fisk, som frem til det tidspunktet kun hadde vært oppstallet i et uberiket miljø, økte også stress hos sebrafisk.

Miljøberikelse har også vist seg å ha andre positive effekter enn redusert stress. Det kan øke reproduksjon, aktivitet/stamina, overlevelse, hjernestørrelse, læring, og hukommelse. Vi ser også at det kan ha en positiv effekt på andre fysiologiske parametere, og at sosial berikelse kan øke sosial atferd.

Aggresjon ser vi gjentatte ganger at kan være en negativ effekt av miljøberikelse. I en av studiene så forskerne at det tok lengre tid for aggressiv atferd å gi seg, og ellers så andre studier forskjellige grader av økning i aggressiviteten hos sebrafisken. Sebrafisk som hadde vært oppstallet med miljøberikelse var også ofte mindre i størrelse, selv om kroppsmasseindeksen generelt var uendret.

## Diskusjon

I resultatene kommer det frem at ulike former for miljøberikelse kan ha positiv, nøytral eller negativ effekt på sebrafisk i ulike situasjoner. De forskjellige gruppene av miljøberikelser vi har sett på er auditive-, sosiale- og fysiske berikelser.

### Miljøberikelser lyd

Det er ikke mye forskning på effekten av auditiv miljøberikelse på sebrafisk i en forskningssetting. Barcellos et al. (2018) fant at sebrafisk utsatt for 2 timer med musikk av Vivaldi (65-75dB) to ganger om dagen i 15 dager, var mindre nervøse, hadde roligere atferd under en stresstest, og var roligere når utsatt for en lys-mørk-test. Forskerne fant også en positiv effekt på sebrafiskens fysiologi. Det var en reduisering av perifere nivåer pro-inflammatoriske cytokiner og økt aktivitet i noen av sentralnervesystemets gener (CNS genes), uten at det hadde en åpenbar effekt på kortisolnivåer.

I en annen studie (Marchetto et al., 2021) bygget de videre på dette. De spilte også Vivaldi, men ville se hva slags effekt auditiv miljøberikelse hadde på fisk som ble utsatt for en akutt sosial isolasjon. Å utsette sebrafisk for akutt 24-timers sosial isolasjon kan påvirke deres sosiale oppførsel kraftig, og de kan vise mer angstlignende atferd. Forskerne fant at auditiv miljøberikelse ikke påvirket den sosiale oppførselen eller kortisolnivåene til sebrafisken, men at de som var utsatt for musikk hadde en redusert angstlignende atferd, sammenlignet med kontrollgruppen. Funnene styrker resultatene fra Barcellos et al. (2018) om at auditiv miljøberikelse kan gjøre sebrafisk mindre engstelige og roligere. Dette betyr at berikelse i form av musikk vil kunne være viktig i laboratorier for sebrafiskens generelle velferd, og i forsøk der de blir utsatt for akutt isolasjon.

I en studie (Scatterty et al., 2023) der det ble sett på sebrafiskens respons til infralyd ved 5-, 10-, 15- og 20Hz, kom det frem at sebrafisken unngikk området nærmest lyd-kilden når den var på 15Hz. Gruppen utsatt for 20Hz tilbrakte mye tid lengst vekk fra lyd-kilden, men det var ikke noen signifikant nedgang i tid tilbrakt i sonen nærmest lyd-kilden.

Det er mye dokumentasjon på at fysiske berikelser kan være bra for velvære hos sebrafisk, men det skaper allikevel en problemstilling i forhold til hygiene, toksisitet, og aggressiv atferd, noe man ikke vil få med en auditiv berikelse (Marchetto et al., 2021). Fysiske gjenstander må rengjøres i tillegg til selve karet, og dette vil både skape mer arbeid for forskerne og mer forstyrrelser for sebrafisken. I kar der det oppstalles mer enn en sebrafisk vil dominant sebrafisk ha en beskyttende atferd ovenfor objektene, som kan gi ubehag og stress for underdanig fisk. Det har vært begrensinger i studiet til Marchetto et al. (2021) da det ikke har blitt sett på variasjoner relatert til linje, kjønn og alder. Det ble også kun brukt en type musikk her så man må se videre på om andre typer musikk vil kunne gi en annen effekt på sebrafisken.

Det var også begrensninger i studien til Barcellos et al. (2018), ettersom atferd ikke ble registrert i den mørke delen av lys-mørk-testen, så effekten av musikk kunne bare sammenlignes fra lys del. Her kom Barcellos et al. (2018) frem til at det å bli eksponert for en auditiv miljøberikelse to ganger daglig kunne gi fordeler i forhold til den konstante bakgrunnsstøyen det ofte er på et laboratorium. At musikk kan dempe angstlignende atferd ved akutt isolasjon er også viktig, da sebrafisk er mye brukt i forskning der de ofte blir isolert. Musikk kan derfor forbedre atferdsanalyser, samtidig som det kan lede til økt gyldighet og reproduserbarhet (Marchetto et al., 2021).

## Sosiale miljøberikelser

Sosial samling er en atferd vi ikke ser så mye hos laboratoriefisk. Det kan være fordi laboratoriefisk ofte blir oppstallet i et uberiket 3L kar. I en studie (Franks et al., 2018) der de hadde sebrafisk i 110L kar med et seminaturalig beriket miljø i form av grus i bakke, planter og steiner, så de en endring i sebrafiskens oppførsel som ikke var beskrevet i noen annen vitenskapelig litteratur, økt sosial samling. Et forsøk ble gjort over 10 dager, og forskerne så at sosial samling kun oppstod i to kar samtidig ved en anledning. Dette tyder på at sosial samling kan være drevet av intern sosial tilhørighet. At vi ikke har sett så mye av denne atferden hos villfisk, er fordi det er en atferd som er vanskelig å registrere i det fri, da det er vanskelig å følge villfisk tett over en lengre periode. Kar-arkitektur og oppstallingstetthet kan påvirke sebrafiskens sosiale dynamikk (Franks et al., 2018), da sebrafisk kan reagere på eget speilbilde med sosial atferd. Sebrafisk i sosiale eksperimenter der de blir testet alene burde derfor bli oppstallet i kar som ikke er refleksive, ved bruk av for eksempel vegger i matt akryl (Maximino et al., 2010).

Det har blitt gjort en del forskning på atferd som tyder på negative følelser hos sebrafisk i form av stress, frykt og smerte, men det er ikke forsket like mye på atferd som kan tyde på positive følelser (Franks et al., 2018). Resultatene fra Franks et al. (2018) om økt sosial samling kan ikke si noe om den positive effekten det kan ha, men det burde forskes mer på så man kan få en bedre idé om hva som kan føre til positive følelser hos sebrafisk.

### Antall fisk i kar

Det er tidligere vist at sebrafisk har en sterk preferanse for berikede miljøer (Kistler et al., 2011). Samtidig viser forskning at sebrafisken kan ha en enda sterkere preferanse på sosiale miljøberikelser. Sebrafisk er en sosial art som foretrekker miljøberikelser som fremmer sosial

atferd, også når de isoleres, som reflekterende overflater eller oppstalling ved siden av andre fisker (Krueger et al., 2020). I en nytt-kar-test med fire grupper (isolert og beriket, isolert og uberiket, gruppe à 5 og beriket, gruppe à 5 og uberiket), var det ingen signifikant forskjell i hvor mye tid de tilbrakte i den øvre delen av karet, hvor lang tid de brukte på å bevege seg til den øvre delen av karet, eller bevegelsesmønsteret (Collymore et al., 2015). I en lys-mørk-test gjort av de samme forskerne, var det ingen forskjell mellom de ulike gruppene på hvor lenge de oppholdt seg i den lyse delen, men det var en kraftig forskjell på hvor mange ganger de svømte inn i sonen. Her var det en kraftig økning i de isolerte fiskene sine kryssninger, sammenlignet med fiskene som var i grupper. De isolerte fiskene hadde også en pileoppførsel i overgangen som er et tegn på angstlignende atferd. Forskerne gjennomførte også en stedspreferansetest der én og én sebrafisk fikk valget mellom en plante eller en pose med tre andre sebrafisk. Det var hull i posen slik at det var mulighet for kontakt, og alle viste preferanse for å være med fiskene bortsett fra de som var blitt isolert med miljøberikelse. De viste ingen tydelig preferanse og tilbrakte omtrent like mye tid ved hver berikelse.

Sebrafisk oppstallet i grupper vil kunne komme seg raskere tilbake til normal atferd etter en stressende situasjon sammenlignet med sebrafisk oppstallet i par eller alene (White et al., 2017). I videre forskning der de utsetter sebrafisk for stressende situasjoner er det viktig å vite hvilken effekt antall fisk hver kar kan ha. Collymore et al. (2015) fant at sebrafisk viste preferanse for å være med andre fisker så lenge de ikke hadde vært oppstallet alene med en fysisk berikelse. Resultatet kan ha blitt påvirket av at planten brukt i stedspreferansetesten var den samme planten sebrafisken tidligere hadde vært oppstallet med. I tillegg valgte forskerne å kun isolere hannfisk, og vi vet derfor ikke om de samme resultatene vil kunne registreres hos isolert hunnfisk.

## Forskjeller mellom kjønn

Studien gjort av Soares et al. (2020) så på sebrafiskens sosial- og utforskningsatferd hos hunnfisk og hannfisk i forskjellige kombinasjoner og med forskjellige typer berikelser i karet. Forskerne fant høyere aktivitet i grupper som bestod av kun det ene kjønn, sammenlignet med de blandede gruppene. Det var også økt engstelighet i gruppen som bestod av kun hunner, som viste mer defensiv atferd. Maierdiyali et al. (2020) fant lignende resultater, da hannfisk var dristigere enn hunnfisk, og hunnfisk hadde et generelt høyere kortisolnivå. Andre studier har vist til forskjeller i atferd relatert til kjønn i form av aggresjon (Dahlbom et al., 2012) og angstlignende atferd (Ampatzis and Dermon, 2016), hvorav hannfisk kan se situasjoner som mer stressende i forhold til hunnfisk, og hunnfisk kan vise mindre nervøs atferd i forhold til hannfisk. Samtidig viste enkeltkjønnsgrupper med fysiske miljøberikelser, som både kunne se og lukte det motsatte kjønn, mindre tegn på angstlignende atferd og var roligere enn de som ikke hadde miljøberikelser og som bare kunne se eller lukte det motsatte kjønn (Estes et al., 2021). En forståelse av dynamikken mellom de to kjønnene vil være viktig i fremtidig forskning og burde derfor forskes videre på.

En studie av Krueger et al. (2020) så på preferanse av miljøberikelse hos sebrafisk som var oppstallet alene. Forskerne testet 10 forskjellige objekter i et kar der den ene siden hadde en berikelse og den andre side var uten. Deretter så forskerne hvor mange ganger sebrafisken entret hver seksjon, og den totale tiden brukt i hver del. Berikelsene testet inkluderte hvitt PVC-rør, hvitt tyll (stoff med fine masker) som var klippet i en strimmel og knytt i en knute, mørkt papir som var festet på bunnen av karet, mørkt papir festet til siden av karet, flerfargede klinkekuler, bilde av de samme flerfargede klinkekulene festet på bunnen av karet, grønne og brune kunstige planter, bilde av flerfargede planter festet på siden av karet, bilde av sebrafisk festet på siden av karet, og speilpapir festet på siden av karet. Forskerne så at sebrafisken

hadde sterkest preferanse for speil over uberiket miljø. Sebrafisken hadde også interaksjoner med tre andre objekter: PVC-rør, tyll, og klinkekuler. Det ble ikke registrert noen preferanse eller endring i atferd ved de resterende objektene. På grunn av preferansen for speil, som er en sosial berikelse, ble det utført enda et eksperiment for å teste sebrafiskens sosiale preferanser. Her så forskerne at fisk som oppstalles alene foretrekker å være oppstallet slik at de kan se andre fisk. Disse resultatene indikerer at sebrafisk oppstallet alene foretrekker sosial berikelse over fysisk berikelse.

I en studie (Schroeder et al., 2014) der forskerne så på forskjellen hos sebrafisk i par sammenlignet med grupper, så de at hos sebrafisk i par hadde de dominante fiskene i karene en preferanse for sand og grus over uberiket miljø, mens den underordnede fisken så ut til å bli hindret i å tilbringe tid i den berikede delen, og var dermed mest i den uberikede delen. Det var ingen preferanseforskjell mellom nedsenket plante og plante på overflaten. For sebrafisk i grupper var det en signifikant preferanse for kar med substrat, inkludert preferanse for bilde av grus over uberiket miljø. Forskerne så derimot ingen preferanse for bilde av sand over uberiket miljø. Sebrafiskene viste preferanse for grussubstrat over sand, og for flytende planter over uberiket miljø. Hunnene foretrakk også nedsenket plante over uberiket miljø, og hadde ikke noen preferanse mellom flytende plante og nedsenket plante. Hannene hadde en preferanse for flytende plante. Både hannene og hunnene foretrakk miljøer som hadde grus over de miljøene som hadde sand. Når en luftstein var installert i den uberikede delen brukte både hunner og hanner mer tid der. Vi ser at forskjeller mellom kjønn også inkluderer forskjellige preferanser for fysisk miljøberikelse. Videre forskning må inkludere denne kunnskapen når nye eksperimenter blir gjennomført.



## Fysiske miljøberikelser

Hvordan miljøberikelse påvirker larver

Så lenge sebrafisk er en viktig modell i forskningen vil det også være fordelaktig å ha en god forståelse av sebrafisklarver. I tillegg blir sebrafisk ofte brukt i forskning mens de fremdeles er larver (Basnet et al., 2019). I forsøk der sebrafisklarver blir brukt vil mer kunnskap kunne gi mulighet for å sette opp mer egnede forsøk, samt tolke resultater og målinger mer korrekt. I forsøk med bruk av voksne sebrafisk vil en forståelse av oppvekstsvilkår kunne hjelpe med å forstå variasjoner samt begrensninger i forskningen som utføres.

I studiene (Gatto et al., 2022a), (Wafer et al., 2016) og (Gatto et al., 2022b) så forskerne på hvordan miljøberikelse påvirket sebrafisklarver. Gatto et al. (2022a) så på hvordan miljøberikelser påvirker gjenkjennelesminne hos sebrafisklarver. For å teste dette hadde de sebrafisklarver i et beriket eller et uberiket miljø. Miljøberikelsene i det berikede karet var 9 LEGO® klosser av varierende farge (rød, grønn, blå, gul) og fasong. Brikkene ble flyttet på to ganger i døgnet, og etter 10 dager ble larvene testet. Forskerne så at larvene som var oppstallet i et uberiket miljø utforsket en kjent stimulus signifikant mer enn en ukjent stimulus. Larvene som hadde blitt oppstallet i et beriket miljø utforsket både kjente og ukjente stimuli like lenge. Studien demonstrerer at det er mulig å måle gjenkjennelesminne hos unge sebrafisklarver ved å bruke deres naturlige tendens til å utforske nye ting ved en nytt-objekt-test (NOR). Gjennom studien ser de larvenes kapasitet til å skille mellom visuelle objekter, samt at larvene har evnen til å anskaffe kjennetegn ved objekter og bruke dette når nye stimuli blir presentert.

Bruken av NOR hos sebrafisk, og spesielt sebrafisklarver, har likevel mange begrensninger.

Bruzzone et al. (2020) undersøkte om sebrafisklarver hadde gjenkjennelesminne, og om

NOR kunne brukes for å teste dette. Larvene ble testet ved 7-, 14- og 21- dager etter fertilisering (dpf). Kun ved 14 dpf så de signifikante resultater, der larvene hadde en preferanse for det kjente objektet over det ukjente objektet. Et kontrollleksperiment viste at sebrafisklarver viser neofobiske tendenser 21 dpf, noe som kan forklare den dårlige prestasjonen ved den alderen. Denne studien viser at sebrafisklarver har gjenkjennelsesminne, men også at det finnes flere ikke-kognitive faktorer som begrenser muligheten til å bruke NOR hos sebrafisklarver. Selv om det er begrensninger ved bruken av NOR hos sebrafisklarver som en må ta hensyn til, viser Gatto et al. (2022a) at sebrafisklarver ikke har en spontan preferanse for spesifikke mønstre. Det ble i studien også bekreftet at sebrafisklarver har komplekse visuelle ferdigheter, samt at miljøberikelser minsker neofobisk respons og øker deres utforskende natur.

Wafer et al. (2016) så i hovedsak på hvordan miljøberikelser kunne påvirke voksne sebrafisk, og overlevelsesraten hos yngel fra foreldredyr som er i beriket eller uberiket miljø.

Miljøberikelser påvirket ikke overlevelsesraten hos sebrafiskyngel. Forskerne testet kun over en generasjon og resultatene er derfor ikke representative for mer enn det. Videre forskning på om larveoverlevelse endrer seg om sebrafisk over flere generasjoner blir holdt i beriket eller uberiket miljø kunne være interessant. Det er også interessant å se på sebrafisk i beriket miljø over flere generasjoner med tanke på andre faktorer som atferd og læring.

Det siste studiet (Gatto et al., 2022b) så på hvordan miljøberikelser i den tidlige delen av utviklingen kunne påvirke angstlignende atferd hos sebrafisklarver. Fra larvene klekket ble de utsatt for enten et beriket eller et uberiket miljø. Berikelsene som ble brukt var 9 LEGO® klosser i forskjellige farger; rød, blå, grønn og gul, samt diverse former; L-formet, kloss, sylinder og blomsterformet. Larvene ble testet 7-, 14- og 21 dpf. Forskerne så at sebrafisk fra

beriket og uberiket miljø hadde den samme unnvikende atferden når utsatt for en ny visuell stimulus 7 dpf. Etter 14- og 21 dpf derimot viste larvene fra beriket miljø mindre unnvikende atferd ovenfor den nye visuelle stimulusen. Studien viser at også sebrafisklarver påvirkes av miljøet rundt. For videre forskning kan det være interessant å teste flere forskjellige typer stimuli på sebrafisk, samt teste om de har preferanser for spesifikke berikelser.

#### Fysiske miljøberikelser hos fisk med sykdom

Estes et al. (2021) så på hvordan miljøberikelser påvirket sebrafisk utsatt for infeksjon av et vanlig patogen hos sebrafisk, microspordia (*Pseudoloma neurophilia*). Effekten ble målt ved hjelp av en atferdstest, samt at de så på lengde, vekt og reproduksjon. Kontrollfiskene var spesifikk patogenfri (SPF) for *Pseudoloma neurophilia*. I studiet hadde de 4 grupper sebrafisk: beriket og infisert, beriket og SPF, uberiket og infisert, og uberiket og SPF.

Miljøberikelsene brukt i de berikede karene var tre kunstige planter som var festet i en matte på bunnen, og tre planter som fløt på toppen. I gytekarene hadde de en flytende kunstig plante. I forsøket fant de at infiserte sebrafisk var mindre i størrelsen og hadde dårligere reproduksjon enn SPF-fisk. Berikelser økte størrelsen på fiskene, men påvirket ikke fruktbarhet, og hannene ble lengre enn hunnene. De infiserte sebrafiskene entret den nederste delen av karet oftere enn SPF-fiskene, men SPF-fiskene brukte mer tid på bunnen enn de infiserte fiskene. Både de infiserte og SPF-fiskene viste angstlignende atferd, indikert ved hvor mange ganger de entret bunnsone og tiden de oppholdt seg der. I en test med én mørk og én lys side så de at SPF-fisk entret den mørke siden flest ganger og SPF med berikelse oppholdt seg lengst på den mørke siden. Dette kan antyde en mer stresset atferd hos begge gruppene. I testen med bevegelse entret sebrafiskene med berikelse flere ganger det øvre sjiktet, uavhengig av infeksjonsstatus, men i lys-mørk-testen var det fiskene som hadde hatt berikelse som entret den mørke siden flest ganger.

At resultatene er motsigende med tanke på angstlignende atferd kan bety at tilstedeværelsen av miljøberikelser påvirker utfallet av eksperimentene. Når sebrafisk fra berikelse ble flyttet over til testkar uten berikelse viste de en alarmlignende atferd. Sebrafiskene var oppstallet i grupper, som er en sosial berikelse, og det kan ha vært med på å skjule effekten av den fysiske berikelsen. SPF-fisk la betydelig flere egg enn infiserte fisk, noe man i tidligere studier ikke har sett en forskjell på. Berikelse hadde ingen effekt på gyting, uavhengig om det var i karene der fisken var oppstallet eller i gytekarene. At berikelse øker størrelsen på sebrafisk ble ikke observert av Lee et al. (2019). Der så de at hannfisk med berikelse var noe mindre enn hannfisk uten berikelse, samtidig som det ikke var noen forskjell hos hunnfiskene.

#### Fysiske miljøberikelser og atferd

Studiene (Lee et al., 2019), (Sykes et al., 2018) og (Woodward et al., 2019) ser på hvordan miljøberikelse påvirker atferd hos sebrafisk. I studiet utført av Lee et al. (2019) brukte de grus og diverse akvatiske planter som miljøberikelse. Det var ingen forskjell på hvor mange ganger sebrafisk fra det uberikede og det berikede miljøet entret den øvre delen av testkaret, men fisk fra beriket miljø oppholdt seg i den øvre delen lengre. At fisk oppholder seg i den øvre delen av karet er forbundet med lavere stressnivå. Ressursforsvar der en dominant sebrafisk ekskluderer underordnede individer ble observert i 68% av prøvetakingspunktene hos fisk i beriket miljø, men kun 5% av prøvetakingspunktene hos fisk i et uberiket miljø. I de fleste tilfellene forsvarte de dominante sebrafiskene den delen av karet som var annerledes enn det de hadde vokst opp med. Det betyr at fisk fra de berikede karene forsvarte den uberikede delen av karet, mens fisk fra uberiket kar forsvarte den berikede delen av karet. I en annen studie (Woodward et al., 2019) så forskerne at sebrafisk fra det mest berikede miljøet var mer aggressive over tid enn fisk fra et mildt beriket eller uberiket miljø. I det mest berikede karet

brukte forskerne en kunstig plante og en blomsterpotte med 7cm i diameter som sto på hodet, samt bilde av hav som bakgrunn. Gruppen som var mildt beriket, hadde kun bilde av hav i bakgrunnen, og den siste gruppen som var uberiket hadde ingen berikelser.

Andre resultater er funnet i andre studier. Basquill and Grant, (1998) og Carfagnini et al. (2009) så at et mer komplekst miljø førte til mindre aggresjon, og i Basquill and Grant (1998) så de også at det førte til mindre monopolisering av ressurser. Sykes et al. (2018) ser også at fisk fra komplekse miljøer jager hverandre mer. Forskerne registrerte hvordan sebrafisk fra uberikede miljøer var mer aktive, og samlet seg tettere når de var i sosial samling, enn fisk fra komplekse miljøer, som jaget hverandre mer.

Forskjellene i funn rundt aggresjon og ressursforsvar kan antyde at temaet er mer komplekst enn tidligere antatt. I Carfagnini et al. (2009) ser de at aggresjon øker stress og fører til at fiskene legger færre egg. For å øke dyrevelferden, samt forbedre forskning, vil det være viktig å ha mer kunnskap om denne delen av sebrafiskens atferdsmønster. En bedre forståelse av atferd som kan påvirke resultatene gjør at vi kan ikke bare kan tolke resultatene mer korrekt, men det kan også gi verktøy som hjelper med å sette opp eksperimenter på en mest hensiktsmessig måte. Dette kan være med på å begrense antall eksperimenter som må utføres, bruke færre fisk for å produsere resultater, og øke dyrevelferden hos fiskene som blir brukt.

#### Fysiske miljøberikelser og stress

Det er flere studier som tar for seg hvordan miljøberikelser påvirker stress hos sebrafisk. Menezes et al. (2022) ser på hvordan det å bo i et beriket eller uberiket miljø påvirker sebrafisk utsatt for stress. I studien hadde de berikede kar med to identiske kunstige planter, et 20mm bøyd PVC-rør, 15 grønne klinkekuler, 1 gul LEGO®-brikke og en luftstein. De uberikede

karene hadde kun luftstein. Det ble deretter gjennomført to tester der den ene ser på hvordan elektrosjokk påvirker sebrafisk som har vært oppstallet i beriket i forhold til uberiket miljø. Sebrafiskene ble delt i fire forskjellige grupper slik at det var fisk fra både beriket og uberiket miljø som opplevde, eller ikke opplevde, elektrosjokk. I studien så forskerne at sebrafisk som kom fra uberiket miljø og var utsatt for elektrosjokk viste en økt gjennomsnittlig hastighet, i forhold til både fiskene fra uberiket miljø som ikke ble utsatt for elektrosjokk, og beriket miljø som ble utsatt for elektrosjokk. Fisk fra uberiket som ble utsatt for elektrosjokk viste økt frysrespons sammenlignet med de andre gruppene, og de var nærmere bunnen enn fisk fra uberiket miljø som ikke ble utsatt for elektrosjokk. Det ble derimot ikke registrert en signifikant forskjell på avstand fra bunnen mellom den uberikede gruppen som ble utsatt for elektrosjokk og den berikede gruppen som ble utsatt for elektrosjokk, samtidig som det var en kortere distanse fra bunnen enn den berikede gruppen som ikke ble utsatt for elektrosjokk. I den andre testen som ble utført gjorde de det samme som testen før, men sebrafiskene ble utsatt for alkohol av forskjellige konsentrasjoner mellom den andre dagen med elektrosjokk og testdagen. Her så de at berikelser kan begrense de negative effektene man i tidligere studier (Araujo-Silva et al., 2020, Chacon and Luchiari, 2014, Gerlai et al., 2006) har sett at alkohol kan ha på sebrafisk. Forskerne så også en akutt depressiv effekt hos sebrafisk holdt i uberiket miljø, noe som er notert i disse studiene.

Menezes et al. (2022) viser at miljøberikelse i stor grad kan være med å påvirke sebrafiskens respons på en stressende situasjon. Generelt viste sebrafisk fra beriket miljø en dempet angstrespons når de ble utsatt for elektrosjokk. Videre så forskerne at miljøberikelse kun så ut til å ha en effekt når fiskene ble utsatt for en stressende situasjon. Når fisken ikke ble utsatt for en stressende situasjon så de ingen forskjell mellom fisk fra beriket eller uberiket miljø. I den andre delen av studiet virker det som miljøet er med å påvirke effekten alkohol har på fiskene.

Å forstå hvordan miljøberikelser påvirker sebrafisk i forbindelse med akutt stress kan være viktig for å få en helhetlig forståelse for hva som foregår med fiskene når de brukes i forskning. Mange eksperimenter og prosedyrer tar utgangspunkt i å påføre fiskene et ubehag eller en behandling som kan virke stressende på fisken. Bedre forståelse for hvordan en kan begrense stresset som oppleves av sebrafiskene, gjør at forskere kan ha mer fornuftige eksperimentelle oppsett, ved å blant annet bruke kunnskapen om hvilke variabler som kan være med å påvirke sebrafisken under forsøk.

I en studie (dos Santos et al., 2020) ser forskerne på hvordan kortere eller lengre opphold med miljøberikelser påvirker utforskende atferd hos sebrafisk. Tre forskjellige tester med forskjellig oppsett av miljøberikelser ble brukt. I den første var sebrafiskene oppstallet i et kar med berikelser i 7 dager, og berikelsene var steiner på bunnen og tre kunstige planter. I den andre var sebrafiskene oppstallet i et kar med de samme miljøberikelsene i 14 dager. I den siste var sebrafiskene i et kar med de samme berikelsene de første 7 dagene, men på dag 8 ble fiskene flyttet over i et annet kar med nye berikelser. I det nye karet var berikelsene steiner på bunn, et rett PVC-rør, et T-formet PVC-rør og 4 nye kunstige planter. For alle tre testforhold ble det også satt opp kontroller uten miljøberikelser. For den siste ble også kontrollfiskene flyttet til et nytt kar uten miljøberikelser på dag 8. For å teste om miljøberikelse kunne hjelpe sebrafisken i tilvenningen av en stresstest, ble det utført flere atferdstester. Forskerne fant ingen signifikant forskjell i hvordan sebrafiskene fra de tre forskjellige forholdene vendte seg til stresstesten. At det ikke ble observert en signifikant forskjell kan tyde på at typen miljøberikelse, og hvordan de presenteres, ikke nødvendigvis har en stor betydning for evnen sebrafisken har til å venne seg til en stresstest. Flere studier på området trengs for å kunne si hvorvidt dette stemmer.

I to studier (Matheus et al., 2018, Marcon et al., 2018) blir det utført eksperimenter der fisk som har vært i beriket eller uberiket miljø utsettes for kronisk stress. Matheus et al. (2018) følger den samme UCS-protokollen, med bare mindre forandringer, som beskrevet i Marcon et al. (2018). Sebrafiskene ble oppstallet med eller uten miljøberikelse før de ble utsatt for en rekke stressende behandlinger. Stressorene som ble brukt var eksponering for rovfisk, endringer i temperatur, mange dyr sammen på liten plass, flytting av fisk over i kar med meget lav vannstand, jaging av fisk med håv, og mange vannbytter tett på hverandre. Kontrollfiskene ble ikke forstyrret eller utsatt for stressende behandlinger.

Matheus et al. (2018) så at miljøberikelser i form av luftstein, grus, et ruinlignende plastikkobjekt, og tre nedsunkede kunstige planter, kunne være med på å redusere parametere forbundet med oksidativt stress. Marcon et al. (2018) så at miljøberikelse påvirker reaktive oksygensubstanser (ROS) og kortisol hos sebrafisk utsatt for uforutsigbart kronisk stress. Under stresstesten ble den totale distansen reist, tid brukt i øvre og nedre sone, samt antall forflytninger inn i øvre sone målt. I studien ser de at uforutsigbar kronisk stress (UCS) øker angstlignende atferd og kortisolnivået hos sebrafisk. Miljøberikelse i 21- eller 28 dager svekker effekten av UCS på ROS. Fisk fra beriket miljø som ikke ble utsatt for kronisk stress virket mer stresset i testkaret enn fisk fra uberiket miljø som ikke hadde blitt utsatt for kronisk stress. Forskernes forklaring for dette funnet er at testkaret lignet mer på miljøet sebrafiskene fra uberiket miljø er vant med, enn fisk fra beriket miljø. Disse studiene viser hvordan miljøberikelser ikke bare har en effekt på atferd, men også kan være med å påvirke biokjemiske prosesser i kroppen forbundet med stress.

Giacomini et al. (2016) ser videre på hvordan både farmakologiske og miljømessige endringer kan senke utgivelsen av kortisol som respons på akutt stress. I studien hadde de sebrafisk både



i grupper og alene, og i beriket eller uberiket kar. Berikelsene besto av sand og grus som bunnsstrat, samt naturlige planter av to forskjellige typer. Fisk ble testet med to forskjellige medikamenter, diazepam og fluoxetine, begge antidepressiva. Etter at sebrafisken hadde vært utsatt for medikamentet i 15 dager ble de utsatt for en akutt stressor, der fiskene ble jaget med nett i 120 sekunder. 15 minutter etter ble fiskene fanget og gjort klare til testing før kortisol ble målt. Både fiskene som bodde i beriket miljø og fiskene som ble utsatt for fluoxetine eller diazepam hadde lavere kortisol. Resultatene viser at bruken av miljøberikelse kan ha den samme effekten på å minske utslippet av kortisol i respons til en stressor, som farmakologiske midler. Forfatterne tror at effekten av miljøberikelse kan være forårsaket av at de gir sebrafisken en trygghetsfølelse. I miljøer der sebrafiskene ikke har miljøberikelser føler de seg mindre beskyttet og trygge, og blir derfor mer påvirket av stressende situasjoner. Studier der forskere tester farmakologiske effekter på sebrafisk sammenlignet med miljøberikelser, kan være svært nyttig for å utvide kunnskap om hvordan miljøberikelser kan være med på å påvirke resultatene.

Angst relatert til lys-mørk-preferansen til sebrafisk vokst opp i beriket eller uberiket miljø blir diskutert i Maximino et al., 2010). Her er miljøberikelsene steiner, vegetasjon og naturlig substrat. Sebrafisk vokste opp i beriket eller uberiket miljø før de ble testet for å lys-mørk-preferanse. Forskerne så at sebrafisk som har vokst opp med miljøberikelser tilbringer signifikant mer tid i den hvite delen av testkaret. Det å bruke mer tid i den hvite delen av karet er forbundet med et redusert nivå av stress. Miljøberikelser ser derfor ut til å redusere stress hos sebrafisk i denne studien.

Effekten av strukturell miljøberikelse, og hvordan den tilbys på, blir evaluert av Buenhombre et al. (2022) på vurderings bias, lys-mørk-test og aktivitetstest. Resultatene viste at fisk som

fikk plutselig tilgang på mye strukturell berikelse brukte mindre tid i et gul-grønt område, som karakteriserer en negativ vurderings bias, enn fisk oppstallet i et miljø som var konstant beriket. I lys-mørk-testen så forskerne at sebrafisk som fikk en plutselig miljøberikelse brukte mindre tid i det hvite området enn fisk som enten ble oppstallet i et konstant beriket miljø, eller et miljø som hadde en gradvis økning i berikelser. Mindre tid i det hvite området forbindes med angstlignende oppførsel. Sebrafisk som får en stadig reduisering av miljøberikelser bruker mer tid fryst, en atferd relatert til angst, enn fisk utsatt for konstant berikelse. Studien viser at plutselige introduksjoner av nye miljøberikelser kan oppleves stressende for sebrafisk. Det kan derfor være en fordel å introdusere miljøberikelser eller nye elementer i fiskens habitat varsomt, for å ikke påføre unødvendig stress på sebrafisken.

#### Hvordan miljøberikelse påvirker læring

En av måtene som er brukt til å teste hvordan miljøberikelse kan påvirke læring hos sebrafisk er å plassere de i en labyrint. Hvis sebrafisk oppdratt i et beriket miljø fullfører labyrinten raskere, vil det antyde at miljøberikelse kan forbedre læring. I en studie (DePasquale et al., 2016) testet forskerne hvor fort sebrafisk kunne finne utgangen i en labyrint. Det ble brukt to kunstige planter, et gjemmede i plast, grus, og et utbyttbart nytt objekt (hvit PVC, stein, forskjellige fargede planter, eller plastflaske) som miljøberikelse. I tillegg ble halvparten av fiskene jaget med håv. Først ble det gjort en angsttest på ung sebrafisk for å teste den angstdempende effekten miljøberikelse kan ha. Her fant de at både miljøberikelse og jaging førte til mindre angstlignende atferd. Det var heller ingen forskjell mellom effekten de to metodene hadde. De som fikk både miljøberikelse og jaging viste minst angstlignende atferd. Da de testet det samme på voksen sebrafisk så de også redusert angstlignende atferd hos de som fikk berikelse, men man så ingen effekt av jaging.

Videre testet de effekten miljøberikelse og jaging hadde på læring. Resultatene viser at fisk fra beriket miljø og fisk som ble jaget var signifikant raskere på å finne utgangen av labyrinten. Antall feil sebrafisken gjorde ble ikke påvirket hos fisk som ble jaget, men det var en nesten signifikant effekt hos sebrafisk som hadde fått miljøberikelse. Derimot var det en signifikant interaksjon mellom berikelse og jaging. Fisk med miljøberikelse hadde færre feil når de ble utsatt for jaging i forhold til de som kun hadde miljøberikelse. Fisk uten berikelse hadde derimot flere feil når de ble utsatt for jaging i forhold til de som ikke ble utsatt for jaging. Dette kan bety at effektene av jaging på læring er påvirket av eksponeringen til berikelse. Resultatene antyder også at tidligere erfaringer hos fisk som ble oppdratt i beriket miljø, og de som ble utsatt for jaging, hjalp dem å tilpasse seg til utfordringene av å bli testet og håndtert under testene. Lignende resultater ble også funnet i en annen studie (Spence et al., 2011) der forskere testet sebrafisk i en labyrint. Her ble sebrafisken testet i hvor lang tid de brukte på å lokalisere mat. Det ble brukt to forskjellige stammer av sebrafisk, og begge ble delt i to grupper hvor den ene fikk miljøberikelse i form av 50 planter tilfeldig plassert i karet og den andre fikk ingenting. Her fant de at læreevnen utviklet seg raskere hos sebrafisk oppdratt i et beriket miljø, uavhengig av stamme. De fant også at sebrafiskens størrelse påvirket hvor fort de lokaliserte maten; større fisk brukte mindre tid på å finne mat. Det viste seg også at fisk oppdratt med miljøberikelse var mindre i størrelse. Her ble det vurdert om de ved å øke kompleksiteten i miljøet til fisken, som også økte tettheten i karet, hadde økt konkurransen om mat som derfor hadde påvirket størrelse.

Selv om forskere i denne studien så at sebrafisk var mindre i størrelse når de ble oppdratt i et beriket miljø, ble det også sett i en annen studie (DePasquale et al., 2016) at telencephalon var større hos sebrafisk oppvokst med miljøberikelse. Sammenlignet med størrelse på hjernen ble det ikke sett noen signifikant forskjell mellom de to gruppene, da sebrafisk oppvokst i beriket

miljø også hadde større hjerne. Den samme effekten på hjernestørrelse ble sett i en annen studie (Karoglu-Eravsar et al., 2021), men her ble det ikke sett noen effekt på kroppsmasseindeksen. Vi kan derfor vurdere om effekten man så på kroppsstørrelse hos sebrafisk i Spence et al. (2011) hadde mer med den økte konkurransen å gjøre, og derfor økt aktivitet, enn at de var oppstallet i et beriket miljø. Det er ikke usannsynlig at større hjerne er en direkte effekt av at sebrafisken opplevde et mer komplekst miljø. Forskerne så også større hjerner hos sebrafisk utsatt for jaging (DePasquale et al., 2016), som kan bety at den økte aktiviteten, eller det faktum at sebrafisken måtte flykte, førte til større hjerne.

I en studie (DePasquale et al., 2021) hvor de testet effekten av miljøberikelse på sebrafiskens evne til å gjenkjenne objekter fant de også at miljøberikelse hadde en positiv effekt på sebrafiskens læring. Her ble det brukt grus, to kunstige planter, og en sort plastpote i den ene gruppen. Den andre gruppen fikk ingen berikelser. Testen gikk ut på å plassere et kjent- og et ukjent objekt i testkaret, og deretter måle hvor lenge fisken holdt seg ved den ene eller den andre gjenstanden. Forskerne fant at sebrafisk oppvokst i et beriket miljø var flinkere til å skille mellom kjente og ukjente objekter på avstand, sammenlignet med sebrafisk oppvokst i et uberiket miljø. Samtidig fant de at hverken sebrafisk oppvokst i beriket miljø eller de oppvokst i uberiket miljø, klarte å skille mellom kjent og ukjent objekt på nært hold. Det trengs flere studier til å bygge under disse resultatene.

Selv om flere studier viser til at miljøberikelse kan ha en positiv effekt på læreevne hos sebrafisk, kan det også ha andre effekter. I en studie (Manuel et al., 2015) så de at miljøberikelse hemmet innlært unngåelse hos sebrafisk. Sebrafisk som hadde vært oppstallet med miljøberikelse hele livet viste ingen økt ventetid på å svømme inn i den svarte delen av et kar der de tidligere hadde fått støt, sammenlignet med sebrafisk oppstallet i uberiket miljø hele livet hvor man så økt ventetid. De testet både 6mnd gammel fisk og 24mnd gammel fisk.

Dette betyr at sebrafisk fra uberiket miljø assosierte den svarte delen av karet med å få støt, og derfor unngikk det. Selv om dette kan bety at miljøberikelse faktisk kan hemme læring hos sebrafisk, er det såpass mange studier som viser at miljøberikelse fremmer læring og hukommelse, at det ble vurdert om det kunne være andre faktorer som påvirket resultatet. Hos gnagere kan man se at miljøberikelse senker behovet for smertelindring etter invasive prosedyrer, og reduserte skade-indusert hypersensitivitet i nervene til både mekaniske og kalde stimuli. Det ble derfor vurdert om sebrafisk fra et beriket miljø kunne oppfatte elektrosjokket annerledes fordi de muligens hadde forhøyet smerteterskel. Om sebrafisken fra beriket miljø ikke oppfattet elektrosjokket som vondt, har de heller ingen grunn til å unngå området det ble gitt. I tillegg viste den første testen i studiet at miljøberikelse kan øke utforskende atferd, og dette kan også være med på å forklare ventetiden. I denne studien så man også at alder kan påvirke læring hos sebrafisk. Den samme testen ble gjort på fisk fra uberiket miljø ved 6-, 12- og 24 måneders alder, og forskerne så at både de på 6- og 12 måneder lærte seg å unngå delen de fikk elektrosjokk i. Derimot så man ingen økt ventetid hos sebrafisk på 24 måneder etter at de hadde opplevd elektrosjokk. Selv om det i denne studien ble testet for både berikelse og alder, trengs det fortsatt mer forskning rundt temaet. I fremtidige studier vil det være viktig å se på alder som en faktor for feil, og om 24 måneder gammel sebrafisk viser en betydelig redusert evne til læring, burde de ikke bli brukt i slike studier.

### Strømning i vann

Sebrafisk pleier å foretrekke berikede miljøer ovenfor uberikede, men DePasqual et al. (2019) viser at strømning også er en viktig faktor i å utforme habitatpreferanser. Sebrafisk lever naturlig i en rekke forskjellige miljøer, men det er vanligst å finne dem i områder med god vegetasjon. Sebrafisk finnes i alt fra stillestående risdammer til bekker med mer strømminger.

I et forsøk der forskerne ga sebrafisken fire alternativer (uberiket, beriket, strømning, strømning og berikelse) så de en klar preferanse for den delen av karet som hadde berikelse i tillegg til strømning. Dette tyder på at kombinasjonen av strømning og berikelse hadde en effekt for sebrafiskens stedspreferanse. Når alternativet for kombinert berikelse ble tatt vekk så foretrakk fiskene berikelse alene som kan tyde på at berikelse er viktigere enn strømning. Området med kun strøm ble unngått like mye som det uberikede miljøet.

Det ble ikke samlet noen data om hvordan fiskene brukte de forskjellige sonene. Det var noen som svømte i strømningen, men dette var ikke jevnt mellom individene. Resultatet kan påvirkes av dynamikken mellom enkelte fisker, da dominante fisker kan ha en tendens til å holde underdanige fisker unna områder med underlag, hvilket kan ha ført til at fisk oppholdt seg i sonen som kun hadde strømning. Man så også i dette forsøket at sebrafisken hadde en økt preferanse for det nøytrale midtområdet hvor de ble matet, og dette tyder på at det å ha en matkilde i testkar distraherer sebrafisken fra å oppholde seg i de andre sonene, da den foretrekker området den får mat i. De har ikke fått sett på kjønnspreferanser, dominant atferd, eller personlighet i denne testen, som er noe man burde forske videre på.

### Preferanse for farge

En av miljøberikelsene som ble sett på var sebrafiskens preferanse på farge. de Abreu et al. (2021) hadde hentet inn resultater fra syv forskjellige studier om fargepreferanse hos sebrafisk, og brukte tre forskjellige tester for preferanse: Stedspreferanse test, T-labyrint test, og Pluss-labyrint test. Her kom det frem at sebrafisken hadde en tendens til å foretrekke blåfarget sone over rød (Li et al., 2014, Peeters et al., 2016, Park et al., 2016), Grønn (Pieróg et al., 2018, Peeters et al., 2016, Zhang et al., 2018, Park et al., 2016), Gul (Li et al., 2014,

Peeters et al., 2016, Zhang et al., 2018, Park et al., 2016) og hvit (Jia et al., 2017). Samtidig så de at det å oppstalle sebrafisk i blå eller svarte kar kunne senke angstlignende atferd og kortisolnivåer, sammenlignet med de oppstallet i hvite kar (de Abreu et al., 2020a). Preferansen på blå farge kan være relatert til dens generelle angstreduserende og kortisolreduserende effekt, beskrevet av de Abreu et al. (2020a). Det kan også ha sammenheng med at sebrafisk i naturen bor i mikrohabitat med klart vann med eller uten vegetasjon, som hovedsakelig tillater korte bølgelengder å komme gjennom (de Abreu et al., 2021). Det var allikevel en del motstridene resultater. I en av studiene så de en unngåelse for de blåfargede sonene (Avdesh et al., 2012b). Dette ble testet både med stedspreferanse test, og ved T-labyrint test. Noen av testene viste også at sebrafisken hadde en preferanse på rød farge over gul og grønn (Pieróg et al., 2018, Peeters et al., 2016, Zhang et al., 2018). Her vurderte forskerne om preferansen på rød farge kunne ha noe med fargen på maten sebrafisk får i laboratorier, da den ofte har en rød farge, eller om den assosierte fargen med mat de kan finne i sitt naturlige habitat. Det ble også vurdert om det kunne ha noe med at det er enklere å se rød farge på avstand i vann (de Abreu et al., 2021). Det ble også brukt forskjellig lysintensitet i studiene, noe som også kan endre sebrafiskens oppfattelse og reaksjon på de forskjellige fargene. Det kan derfor være lurt å gjøre flere forsøk for å videre utforske disse resultatene, da det kan være relevant for hvordan man oppstaller sebrafisk i fremtidige studier. Det kan også være nyttig å etablere en standard på farger til forskjellig utstyr og kar, slik at man kan ekskludere det som en faktor der man har hatt motstridene funn.

#### Effekten av uforutsigbar lys-syklus

Flere studier tyder på at en plutselig endret lys-syklus kan ha negative effekter på hjernefunksjon og den generelle helsen hos dyr og mennesker (Moore et al., 2021). Allikevel finnes det ingen universell standard for lys-syklus hos sebrafisk som er oppstallet i

laboratorier og brukes i forsøk. Antall timer på og av, og når lyset blir slått på og av, varierer derfor mellom studier. I en studie (Moore et al., 2021) der de tester effekten av en endret lys-syklus på hjernen til voksne sebrafisk, fant de en signifikant negativ effekt hos sebrafisk som ble utsatt for en endret lys-syklus i forhold til de utsatt for normal lys-syklus. Her ble lyset slått på 06:00 og slått av 20:00, altså 14 timer på og 10 timer av, hos fisk som ble utsatt for normal lys-syklus. Sebrafisk som ble utsatt for en endret lys-syklus hadde fire dager hvor lys-syklusen ble endret hver dag. De fant en redusert mengde av Akt og GSK3 $\beta$  i telencephalon, og GSK3 $\beta$  og HSP70 i optisk tectum hos sebrafiskene som ble utsatt for uforutsigbar lyseksponering. I studien testet de også effekten på miljøberikelse i form av farget lys. Sebrafisk ble utsatt for fem minutter med blått og grønt lys som skiftet hvert femte sekund. Miljøberikelsen forårsaket en betydelig økning i Akt i telencephalon, og ga derfor en tydelig positiv effekt. Denne effekten ble fullstendig blokkert hos sebrafisk som ble utsatt for uforutsigbar lyseksponering etter miljøberikelsen. Det er også viktig å nevne at kontrollfiskene som hverken hadde miljøberikelse eller uforutsigbar lyseksponering, lå på cirka samme nivå av Akt som sebrafisk som ble utsatt for begge deler. Begge hadde høyere nivå av Akt enn sebrafisk som hadde en endret lys-syklus uten miljøberikelse. Dette eksperimentet underbygger påstanden forskerne hadde om at miljøberikelse fører til en økning i Akt hos sebrafisk. Det understreker også den negative effekten en uforutsigbar lyseksponering har på sebrafisk. I fremtidige studier vil det være nødvendig å etablere en standard for lys-syklus i laboratorier, både for antall timer lyset er på, men også når lyset blir slått på.

#### Vasking av kar

I en studie (Powell et al., 2021) så forskerne effekten manuell vask av kar kan ha på sebrafiskens oppførsel, ved å skrubbe akvarieveggene, tømme en tredjedel av vannet, vaske karinnhold og fylle på rent vann. Alt dette ble gjennomført med sebrafiskene i karet. Dette er



en metode som ikke er så vanlig i en laboratoriesetting, men den gir et godt startpunkt for å undersøke påvirkningen av rutinehåndtering for fiskens velvære. Dette vil også være relevant hvis man bruker flere fysiske berikelser. Forskerne så at manuell vasking av kar skapte en midlertidig endring i fiskens atferd. Den første timen etter vask var det en økning i dykking, minsket koordinasjon og samspill i gruppen, og aggressiv atferd. En time etter at personalet forlot rommet var oppførsel tilbake til normal. Vasking av kar er en ukontrollerbar situasjon for fisken, men å innføre forutsigbarhet i form av rutiner for når og hvordan vaskingen gjennomføres kan dempe stressresponsen.

Sebrafisk slipper ut kjemiske signaler i vannet som er med på å fastsette hierarkiet i karet. Ved bytte av vann vil man minske mengden med kjemikalier, og det vil bli vanskeligere for sebrafiskene å vite hvem som er de dominante, noe som kan føre til aggressiv atferd. Det var en svak økning av aggresjon i dette forsøket, men mer forskning på gjennomføres hvis man skal bygge under dette. Fiskene var i et ganske stort kar med fysiske berikelser, og det kan ha hatt en effekt på fiskens stressreaksjon ved at den aggressive atferden ble dempet.

## **Litteraturstudier**

Tre av artiklene i oppgaven vår er litteraturstudier der den ene omhandler bevisene og utfordringene rundt miljøberikelser (Stevens et al., 2021), den andre hvordan forskjellige angst-modeller, miljøberikelse, standard forhold og variasjoner innad i arten (som kjønn, personlighet og stamme) påvirker stress og livskvalitet hos unge og voksne fisk (Buenhombre et al., 2021), og den tredje som diskuterer effekten av miljøberikelser med fokus på sebrafisk (Volgin et al., 2018). Disse studiene overlapper med denne oppgaven og tar for seg flere av de samme artiklene. Stevens et al. (2021) konkluderer med at det kan være nyttig å bruke bilde av grus på undersiden av karet, kunstige planter hos fisk som oppstalles isolert, levendefôr, og

å oppstalle fisk sammen. Oppstalling sammen med andre fisk samt bruk av levendefôr er allerede mye brukt i laboratorier, men det er lite informasjon om dens effekt på dyrevelferd hos sebrafisk. En undersøkelse (Lidster et al., 2017) fant at 85 av de 95 laboratorier de spurte brukte levendefôr. Dette kan tyde på at laboratorier så en fordel med levendefôr, enten som næring eller som en berikelse. Bruken av levendefôr som berikelse bør undersøkes nærmere, også med tanke på hvordan det kan påvirke forskningsresultatene og renhold av kar.

Bruken av bilder av grus under karene samt bruk av kunstige planter, er berikelser som kan være egnet som en del av standardiseringen rundt hold av sebrafisk. Lidster et al. (2017) så at kun 53 av 95 laboratorier vurderte enkle fysiske miljøberikelser som planter og grus som mulige å bruke, og kun 23 av 95 rapporterte at de allerede brukte det. Videre forskning rundt hvordan enkle miljøberikelser påvirker studier kan være nyttig, både for å bedre kunnskapen og eventuelt hvordan miljøberikelser kan bli en standard, men også for å lettere overbevise laboratorier om fordelene ved å bruke miljøberikelser. Å ha en standard som inkluderer miljøberikelser har lite for seg dersom standarden ikke blir tatt i bruk, så det er viktig å tenke på hvilke miljøberikelser alle laboratorier har mulighet til å bruke.

Selv om miljøberikelser i hovedsak ser ut til å ha en positiv effekt på sebrafisk, er det viktig å også undersøke de negative konsekvensene miljøberikelser kan ha. Både med tanke på variasjoner og kvalitet på data (Stevens et al., 2021), men også om miljøberikelser i enkelte situasjoner kan øke stress hos sebrafisken. Bedre forståelse for sebrafiskens naturlige atferd kan kanskje også være med på å forstå hvorfor miljøberikelser noen ganger oppleves som positivt, og andre ganger negativt, for sebrafisken.

## Siste tanker

Viktigheten av denne oppgaven

Det er viktig å fortsette å jobbe med å øke dyrevelferden for fremtidig forskning med dyr. I all hovedsak er det viktig å jobbe med økt dyrevelferd, av den grunn alene at dyrene får det bedre. Videre vil det å jobbe med dyrevelferd som en viktig og synlig prioritering være med på å gjøre forskning mer akseptabel, og skape støtte om det i befolkningen. Denne oppgaven bidrar til å legge til rette for videre forskning, som kan være med på å forbedre praksiser, som igjen kan øke velferden hos sebrafisk i laboratorier. Oppgaven gir en indikasjon på typen miljøberikelse som bør vurderes, men videre forskning trengs for å etablere en god standard praksis.

Videre forskning

Det er flere områder som bør forskes videre på for å få en bedre forståelse for hvordan forskjellige miljøberikelser påvirker sebrafisk og hvordan man kan øke dyrevelferden på mest effektivt vis. Det bør også undersøkes hvordan miljøberikelser påvirker konsistens i data, og vurdere hvilke miljøberikelser som vil gjøre minst mulig negativt utslag på forskning. Det bør videre undersøkes kostnader rundt miljøberikelser, da for dyre løsninger vil være vanskeligere å standardisere og øker sannsynligheten for at laboratorier bruker sine egne standarder. Det å etablere en god og kostnadseffektiv praksis rundt miljøberikelse, kan forbedre kvaliteten på forskning der man bruker sebrafisk.

Miljøberikelser som er spesielt interessante å forske videre på i forbindelse med å oppnå en universell standard, er berikelser som vil være lette og billige å gjennomføre på laboratorier i større deler av verden. Det kan allikevel også være interessant å undersøke mer komplekse miljøberikelser som kanskje ikke er like gjennomførbare som standard, for å få en økt

kunnskap om naturlig atferd hos sebrafisk. Det vil også være nyttig å oppnå kunnskap om ulike miljøberikelser kan være nyttig for forskning på ulike områder.

#### Oppgavens begrensninger

Denne oppgaven tar i all hovedsak for seg ulike måter miljøberikelser påvirker sebrafisk på. Den går ikke dypt inn i hvordan disse miljøberikelsene vi påvirke resultater i annen forskning, og tar ikke godt nok for seg andre relevante faktorer slik som hygiene. Oppgaven ser heller ikke på kostnader rundt disse miljøberikelsene, eller i hvilke deler av verden disse miljøberikelsene vi være tilgjengelige. En annen begrensning er at det kan være variasjoner i hvor konsistente metodene i de forskjellige studiene er. Variasjoner i metoder kan gi større variasjoner i data og gjøre det vanskeligere å sammenligne resultater.

## Konklusjon

Vi ser en del positive resultater hos fisk som blir oppstallet med miljøberikelser. Miljøberikelse fører ofte til bedre læring, hukommelse, økt hjernevekt, mindre stress, økt utforskning, økt overlevelse, økt reproduksjon og forbedring av andre fysiologiske parametere. Berikelse er viktig, men kan også ha negativ effekt. Vi ser flere resultater som tilsier at sebrafisk som får miljøberikelse ofte er mindre i størrelse og viser mer aggresjon. Dette er relevant informasjon når man setter opp forsøk. Flere former av miljøberikelse kan også kombineres, og forskjellige typer miljøberikelse vil påvirke sebrafisken forskjellig. Fremover burde det forskes mer på hvilke preferanser på miljøberikelse sebrafisken har, hvilke miljøberikelser som kan brukes uten å påvirke forskning, og hvordan man kan få en universal standard for berikelse i laboratorier.

## Takk til bidragsytere

Takk til veiledere Eirill Ager-Wick og Evgenia Dunaevskaya for gode råd rundt planlegging og oppsett av oppgaven. En spesiell takk til Evgenia for tålmodigheten og god veiledning av tre litt stressede studenter i tiden rett før innlevering.

## Summary

*Title:* A systematic literature study on the effects of environmental enrichment on zebrafish (*Danio rerio*)

*Authors:* Ingrid Kristoffersen, Thea Nissen, Stine Solheim

*Supervisor:* Eirill Ager-Wick og Evgenia Dunaevskaya, seksjon for eksperimentell biomedisin

Today zebrafish used as a model organism are usually housed in a barren environment, even though there is substantial evidence for the positive effect on animal welfare that environmental enrichments ought to have. This article looks at 39 studies regarding the effect that enrichment may have on multiple areas concerning the zebrafish. The goal is to contribute to finding a standard solution regarding the use of enrichment to increase animal welfare in the laboratory. This article will be looking at what we know about enrichment and zebrafish, the effects enrichment can have, and what would be beneficial do more studies on. For further studies, there should be considerable focus on how different enrichments affect zebrafish, data collection and data consistency, how they affect replications of the studies, and

what enrichments are possible to standardize with regards to availability throughout the world as well as cost.

## Referanser

- ABREU, C. C., FERNANDES, T. N., HENRIQUE, E. P., PEREIRA, P. D. C., MARQUES, S. B., HERDEIRO, S. L. S., OLIVEIRA, F. R. R., MAGALHAES, N. G. M., ANTHONY, D. C., MELO, M. A. D., GUERREIRO-DINIZ, C., DINIZ, D. G. & PICANCO-DINIZ, C. W. 2019. Small-scale environmental enrichment and exercise enhance learning and spatial memory of *Carassius auratus*, and increase cell proliferation in the telencephalon: an exploratory study. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 52.
- AMPATZIS, K. & DERMON, C. R. 2016. Sexual dimorphisms in swimming behavior, cerebral metabolic activity and adrenoceptors in adult zebrafish (*Danio rerio*). 312.
- ARAUJO-SILVA, H., LEITE-FERREIRA, M. E. & LUCHIARI, A. C. 2020. Behavioral Screening of Alcohol Effects and Individual Differences in Zebrafish (*Danio rerio*). *Alcohol Alcohol*, 55, 591-597.
- AVDESH, A., CHEN, M., MARTIN-IVERSON, M. T., MONDAL, A., ONG, D., RAINEY-SMITH, S., TADDEI, K., LARDELLI, M., GROTH, D. M., VERDILE, G. & MARTINS, R. N. 2012a. Regular Care and Maintenance of Zebrafish (*Danio rerio*) Laboratory: An Introduction. 69.
- AVDESH, A., MARTIN-IVERSON, M. T., MONDAL, A., CHEN, M., ASKRABA, S., MORGAN, N., LARDELLI, M., GROTH, D. M., VERDILE, G. & MARTINS, R. N. 2012b. Evaluation of color preference in zebrafish for learning and memory. *Alzheimer Dis.*, 28, 459-469.
- BARCELLOS, H. H. A., KOAKOSKI, G., CHAULET, F., KIRSTEN, K. S., KREUTZ, L. C., KALUEFF, A. V. & BARCELLOS, L. J. G. 2018. The effects of auditory enrichment on zebrafish behavior and physiology. *PeerJ*, 6, e5162.
- BASNET, R. M., ZIZIOLI, D., TAWEEDET, S., FINAZZI, D. & MEMO, M. 2019. Zebrafish Larvae as a Behavioral Model in Neuropharmacology.
- BASQUILL, S. P. & GRANT, J. W. A. 1998. An increase in habitat complexity reduces aggression and monopolization of food by zebrafish (*Danio rerio*).
- BERG, J. P. & OTTERHOLT, E. Kortisol. [Accessed 19.04.2023].
- BETHELL, E. J. 2015. "How-To" Guide for Designing Judgment Bias Studies to Assess Captive Animal Welfare. *J Appl Anim Welf Sci*, 18, S18-S42.
- BRANDT, M., GRANATO, M. & NÜSSELEIN-VOLHARD, C. 2002. Keeping and raising zebrafish. *Zebrafish*.
- BROOM, D. M. 2016. Fish brain and behaviour indicate capacity for feeling pain. [Accessed 31.03.2023].
- BRUZZONE, M., GATTO, E., XICCATO, T. L., VALLE, L. D., FONTANA, C. M., MENEGHETTI, G. & BISAZZA, A. 2020. Measuring recognition memory in zebrafish larvae: issues and limitations.
- BUENHOMBRE, J., DAZA-CARDONA, E. A., SOUSA, P., GOUVEIA, A. & CAJIAO-PACHON, M. N. 2022. Structural environmental enrichment and the way it is offered influence cognitive judgement bias and anxiety-like behaviours in zebrafish. *Animal Cognition*.
- BUENHOMBRE, J., DAZA-CARDONA, E. A., SOUSA, P. & GOUVEIA, A., JR. 2021. Different influences of anxiety models, environmental enrichment, standard conditions and intraspecies variation (sex, personality and strain) on stress and quality of life in adult and juvenile zebrafish: A systematic review. *Neurosci Biobehav Rev*, 131, 765-791.

- BURKE, E. 2016. Why Use Zebrafish to Study Human Diseases? [Accessed 21/3-23].
- CACHAT, J., STEWART, A., GROSSMAN, L., GAIKWAD, S., KADRI, F., CHUNG, K. M., WU, N., WONG, K., ROY, S., SUCIU, C., GOODSPEED, J., ELEGANTE, M., BARTELS, B., ELKHAYAT, S., TIEN, D., TAN, J., DENMARK, A., GILDER, T., KYZAR, E., DILEO, J., FRANK, K., CHANG, K., UTTERBACK, E., HART, P. & KALUEFF, A. V. 2010. Measuring behavioral and endocrine responses to novelty stress in adult zebrafish. *Nature Protocols*, 5, 1786-1799.
- CARDONA, E., BRUNET, V., BARANEK, E., MILHADE, L., SKIBA-CASSY, S., BOBE, J., CALANDREAU, L., ROY, J. & COLSON, V. 2022. Physical Enrichment Triggers Brain Plasticity and Influences Blood Plasma Circulating miRNA in Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Biology-Basel*, 11.
- CARFAGNINI, A. G., RODD, F. H., JEFFERS, K. B. & BRUCE, A. E. E. 2009. The effects of habitat complexity on aggression and fecundity in zebrafish (*Danio rerio*). 86.
- CARON, A., TRZUSKOT, L. & LINDSEY, B. W. 2022. Uncovering the spectrum of adult zebrafish neural stem cell cycle regulators. *Front Cell Dev Biol*, 10, 941893.
- CHACON, D. M. & LUCHIARI, A. C. 2014. A dose for the wiser is enough: The alcohol benefits for associative learning in zebrafish.
- COLLYMORE, C., TOLWANI, R. J. & RASMUSSEN, S. 2015. The Behavioral Effects of Single Housing and Environmental Enrichment on Adult Zebrafish (*Danio rerio*). *J Am Assoc Lab Anim Sci*, 54, 280-5.
- D'COSTA, A. & SHEPHERD, I. T. 2009. Zebrafish Development and Genetics: Introducing Undergraduates to Developmental Biology and Genetics in a Large Introductory Laboratory Class. 6.
- DAHLBOM, S. J., BACKSTRÖM, T., LUNDSTEDT-ENKEL, K. & WINBERG, S. 2012. Aggression and monoamines: Effects of sex and social rank in zebrafish (*Danio rerio*). 228.
- DAWKINS, M. S. 2003. Behaviour as a tool in the assessment of animal welfare. 106.
- DE ABREU, M. S., GIACOMINI, A., GENARIO, R., DOS SANTOS, B. E., MARCON, L., DEMIN, K. A., GALSTYAN, D. S., STREKALOVA, T., AMSTISLAVSKAYA, T. G. & KALUEFF, A. V. 2021. Color as an important biological variable in zebrafish models: Implications for translational neurobehavioral research. *Neurosci Biobehav Rev*, 124, 1-15.
- DE ABREU, M. S., GIACOMINI, A. C. V. V., GENARIO, R., DOS SANTOS, B., MARCON, L., DEMIN, K. & KALUEFF, A. 2020a. The impact of housing environment color on zebrafish anxiety-like behavioral and physiological (cortisol) responses. *Gen. Comp. Endocrinol.*, 294.
- DE ABREU, M. S., GIACOMINI, A. C. V. V., GENARIO, R., FONTANA, B. D., PARKER, M. O., MARCON, L., SCOLARI, N., BUENO, B., DEMIN, K. A., GALSTYAN, D., KOLESNIKOVA, T. O., AMSTISLAVSKAYA, T. G., ZABEGALOV, K. N., STREKALOVA, T. & KALUEFF, A. V. 2020b. Zebrafish models of impulsivity and impulse control disorders. *Eur J Neurosci*, 52, 4233-4248.
- DE ABREU, M. S., GIACOMINI, A. C. V. V., GENARIO, R., RECH, N., CARBONI, J., LAKSTYGAL, A. M., AMSTISLAVSKAYA, T. G., DEMIN, K. A., LEONARD, B. E., VLOK, M., HARVEY, B. H., PIATO, A., BARCELLOS, L. J. G. & KALUEFF, A. V. 2020c. Non-pharmacological and pharmacological approaches for psychiatric disorders: Re-appraisal and insights from zebrafish models. *Pharmacol Biochem Behav*, 193, 172928.
- DECKER, S., LAVERY, J. M. & MASON, G. J. 2023. Don't use it? Don't lose it! Why active use is not required for stimuli, resources or "enrichments" to have welfare value. *Zoo Biology*.



- DELCOURT, J. & PONCIN, P. 2012. Shoals and schools: back to the heuristic definitions and quantitative references. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, 22, 595-619.
- DEPASQUAL, C., FETTROW, S., STURGILL, J. & BRAITHWAITE, V. A. 2019. The impact of flow and physical enrichment on preferences in zebrafish. *Applied Animal Behaviour Science*, 215, 77-81.
- DEPASQUALE, C., KEMERER, N., WHITE, N., YOST, M., WOLFKILL, J., STURGILL, J. & LI, X. 2021. The Influence of an Enriched Environment in Enhancing Recognition Memory in Zebrafish (*Danio rerio*). *Frontiers in veterinary science*, 8, 749746-749746.
- DEPASQUALE, C., NEUBERGER, T., HIRRLINGER, A. M. & BRAITHWAITE, V. A. 2016. The influence of complex and threatening environments in early life on brain size and behaviour. *Proc Biol Sci*, 283, 20152564.
- DEPASQUALE, C., STURGILL, J. & BRAITHWAITE, V. A. 2020. A Standardized Protocol for Preference Testing to Assess Fish Welfare. *Jove-Journal of Visualized Experiments*.
- DIAZ DE LEON, J. A. & BORGES, C. R. 2022. Evaluation of Oxidative Stress in Biological Samples Using the Thiobarbituric Acid Reactive Substance Assay.
- DOS SANTOS, T. G., MUSSULINI, B. H. M., FRANGIPANI, L. A. & DE OLIVEIRA, D. L. 2020. Differential impact of shorter and longer periods of environmental enrichment on adult zebrafish exploratory activity (*Danio rerio*) in the novel tank paradigm. *Behav Processes*, 181, 104278-104278.
- ELIZABETH, C. B. 2013. The Mighty Mouse: The Impact of Rodents on Advances in Biomedical Research.
- ERICSSON, A. C., CRIM, M. J. & FRANKLIN, C. L. 2013. A Brief History of Animal Modeling.
- ESTES, J. M., ALTEMARA, M. L., CRIM, M. J., FLETCHER, C. A. & WHITAKER, J. W. 2021. Behavioral and Reproductive Effects of Environmental Enrichment and *Pseudoloma neurophilia* infection on Adult Zebrafish (*Danio rerio*). *J Am Assoc Lab Anim Sci*, 60, 249-258.
- FONTANA, B. D., MULLER, T. E., CLEAL, M., DE ABREU, M. S., NORTON, W. H. J., DEMIN, K. A., AMSTISLAVSKAYA, T. G., PETERSEN, E. V., KALUEFF, A. V., PARKER, M. O. & ROSEMBERG, D. B. 2022. Using zebrafish (*Danio rerio*) models to understand the critical role of social interactions in mental health and wellbeing. *Progress in Neurobiology*, 208.
- FRANCO, N. H. 2013. Animal Experiments in Biomedical Research: A Historical Perspective. [Accessed 09.03.2023].
- FRANKS, B., GRAHAM, C. & VON KEYSERLINGK, M. A. G. 2018. Is Heightened-Shoaling a Good Candidate for Positive Emotional Behavior in Zebrafish? *Animals (Basel)*, 8, 152.
- GATTO, E., BRUZZONE, M. & LUCON-XICCATO, T. 2021. Innate visual discrimination abilities of zebrafish larvae. *Behav Processes*, 193, 104534-104534.
- GATTO, E., BRUZZONE, M., MASCHIO, M. D. & DADDA, M. 2022a. Effects of environmental enrichment on recognition memory in zebrafish larvae. *Applied animal behaviour science*, 247, 105552.
- GATTO, E., DADDA, M., BRUZZONE, M., CHIARELLO, E., DE RUSSI, G., MASCHIO, M. D., BISAZZA, A. & LUCON-XICCATO, T. 2022b. Environmental enrichment decreases anxiety-like behavior in zebrafish larvae. *Dev Psychobiol*, 64, e22255-n/a.
- GERLAI, R., LEE, V. & BLASER, R. 2006. Effects of acute and chronic ethanol exposure on the behaviour of adult zebrafish (*Danio rerio*). 85.

- GIACOMINI, A. C., ABREU, M. S., ZANANDREA, R., SAIBT, N., FRIEDRICH, M. T., KOAKOSKI, G., GUSSO, D., PIATO, A. L. & BARCELLOS, L. J. 2016. Environmental and Pharmacological Manipulations Blunt the Stress Response of Zebrafish in a Similar Manner. *Sci Rep*, 6, 28986.
- GRAHAM, C., VON KEYSERLINGK, M. A. G. & FRANKS, B. 2018. Zebrafish welfare: Natural history, social motivation and behaviour. *Applied animal behaviour science*, 200, 13-22.
- GREEN, M. R. & SWANEY, W. T. 2022. Interacting effects of environmental enrichment across multiple generations on early life phenotypes in zebrafish. *J Exp Zool B Mol Dev Evol*.
- HAGETER, J., WAALKES, M., STARKEY, J., COPELAND, H., PRICE, H., BAYS, L., SHOWMAN, C., LAVERTY, S., BERGERON, S. A. & HORSTICK, E. J. 2021. Environmental and Molecular Modulation of Motor Individuality in Larval Zebrafish. *Front Behav Neurosci*, 15, 777778-777778.
- HEMMINGS, B. A. & RESTUCCI, D. F. 2012. PI3K-PKB/Akt Pathway.
- HIYOSHI, K., SAITO, K., FUKUDA, N., MATSUZAKI, T., YOSHIKAWA, H. Y. & TSUDA, S. 2021. Two-Photon Laser Ablation and In Vivo Wide-Field Imaging of Inferior Olive Neurons Revealed the Recovery of Olivocerebellar Circuits in Zebrafish. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 18.
- HOMBERG, J. R., KYZAR, E. J., STEWART, A. M., NGUYEN, M., POUDEL, M. K., ECHEVARRIA, D. J., COLLIER, A. D., GAIKWAD, S., KLIMENKO, V. M., NORTON, W., PITTMAN, J., NAKAMURA, S., KOSHIBA, M., YAMANOUCHI, H., APRYATIN, S. A., SCATTONI, M. L., DIAMOND, D. M., ULLMANN, J. F. P., PARKER, M. O., BROWN, R. E., SONG, C. & KALUEFF, A. V. 2016. Improving treatment of neurodevelopmental disorders: recommendations based on preclinical studies. *Expert Opinion on Drug Discovery*, 11, 11-25.
- HOMES, C., MCDONALD, F., JONES, M., OZDEMIR, V. & GRAHAM, J. E. 2010. Standardization and Omic Science: Technical and Social Dimensions Are Inseparable and Demand Symmetrical Study. [Accessed 23.03.23].
- JIA, L., RAGHUPATHY, R. K., ALBALAWI, A., ZHAO, Z., REILLY, J., XIAO, Q. & SHU, X. 2017. A colour preference technique to evaluate acrylamide-induced toxicity in zebrafish.
- JONES, N. A. R., SPENCE, R., JONES, F. A. M. & SPENCE-JONES, H. C. 2019. Shade as enrichment: testing preferences for shelter in two model fish species. *J Fish Biol*, 95, 1161-1165.
- JONES, N. A. R., WEBSTER, M. M. & SALVANES, A. G. V. 2021. Physical enrichment research for captive fish: Time to focus on the DETAILS. *J Fish Biol*, 99, 704-725.
- KAROGLU-ERAVSAR, E. T., TUZ-SASIK, M. U. & ADAMS, M. M. 2021. Environmental enrichment applied with sensory components prevents age-related decline in synaptic dynamics: Evidence from the zebrafish model organism. *Exp Gerontol*, 149, 111346-111346.
- KINTH, P., MAHESH, G. & PANWAR, Y. 2013. Mapping of Zebrafish Research: A Global Outlook. *PMC*, 10.
- KISTLER, C., HEGGLIN, D., WÜRBEL, H. & KÖNIG, B. 2011. Preference for structured environment in zebrafish (*Danio rerio*) and checker barbs (*Puntius oligolepis*). *Applied animal behaviour science*, 135, 318-327.
- KRUEGER, L. D., THURSTON, S. E., KIRK, J., ELSAEIDI, F., FREEMAN, Z. T., GOLDMAN, D., LOFGREN, J. L. & KELLER, J. M. 2020. Enrichment Preferences of Singly Housed Zebrafish (*Danio rerio*). *J Am Assoc Lab Anim Sci*, 59, 148-155.

- LAWRENCE, C. 2016. New frontiers for zebrafish management. *Methods in Cell Biology*. researchgate.
- LEE, C. J., PAULL, G. C. & TYLER, C. R. 2019. Effects of environmental enrichment on survivorship, growth, sex ratio and behaviour in laboratory maintained zebrafish *Danio rerio*. *J Fish Biol*, 94, 86-95.
- LEE, C. J., PAULL, G. C. & TYLER, C. R. 2022. Improving zebrafish laboratory welfare and scientific research through understanding their natural history. *Biol Rev Camb Philos Soc*, 97, 1038-1056.
- LI, X., LIU, B., LI, X.-L., LI, Y.-X., SUN, M.-Z., CHEN, D.-Y., ZHAO, X. & FENG, X.-Z. J. S. 2014. SiO<sub>2</sub> nanoparticles change colour preference and cause Parkinson's-like behaviour in zebrafish. *Sci Rep*, 4.
- LIDSTER, K., READMAN, G. D., PRESCOTT, M. J. & OWEN, S. F. 2017. International survey on the use and welfare of zebrafish *Danio rerio* in research. *J Fish Biol*, 90, 1891-1905.
- MAFFIOLI, E., ANGIULLI, E., NONNIS, S., SCALVINI, F. G., NEGRI, A., TEDESCHI, G., ARISI, I., FRABETTI, F., D'ANIELLO, S., ALLEVA, E., CIONI, C. & TONI, M. 2022. Brain Proteome and Behavioural Analysis in Wild Type, BDNF<sup>+/+</sup> and BDNF<sup>-/-</sup> Adult Zebrafish (*Danio rerio*) Exposed to Two Different Temperatures. *International Journal of Molecular Sciences*, 23.
- MAIERDIYALI, A., WANG, L., LUO, Y. C. & LI, Z. Q. 2020. Effect of Tank Size on Zebrafish Behavior and Physiology. *Animals*, 10.
- MANUEL, R., GORISSEN, M., STOKKERMANS, M., ZETHOF, J., EBBESSON, L. O. E., VAN DE VIS, H., FLIK, G. & VAN DEN BOS, R. 2015. The Effects of Environmental Enrichment and Age-Related Differences on Inhibitory Avoidance in Zebrafish (*Danio rerio* Hamilton). *Zebrafish*, 12, 152-165.
- MARCHETTO, L., BARCELLOS, L. J. G., KOAKOSKI, G., SOARES, S. M., POMPERMAIER, A., MAFFI, V. C., COSTA, R., DA SILVA, C. G., ZORZI, N. R., DEMIN, K. A., KALUEFF, A. V. & DE ALCANTARA BARCELLOS, H. H. 2021. Auditory environmental enrichment prevents anxiety-like behavior, but not cortisol responses, evoked by 24-h social isolation in zebrafish. *Behav Brain Res*, 404, 113169-113169.
- MARCON, M., MOCELIN, R., BENVENUTTI, R., COSTA, T., HERRMANN, A. P., DE OLIVEIRA, D. L., KOAKOSKI, G., BARCELLOS, L. J. G. & PIATO, A. 2018. Environmental enrichment modulates the response to chronic stress in zebrafish. *J Exp Biol*, 221, jeb176735-jeb176735.
- MATHEUS, M., RICIERI, M., ADRIELI, S., ANNA, M. S., ANA, P. H. & ANGELO, P. 2018. Enriched environment prevents oxidative stress in zebrafish submitted to unpredictable chronic stress. *PeerJ (San Francisco, CA)*, 6, e5136.
- MAXIMINO, C., DE BRITO, T. M., DIAS, C., GOUVEIA, A. & MORATO, S. 2010. Scototaxis as anxiety-like behavior in fish. *Nature Protocols*, 5, 209-216.
- MENEZES, F. P., AMORIM, R. R., SILVA, P. F. & LUCHIARI, A. C. 2022. Alcohol exposure and environmental enrichment effects on contextual fear conditioning in zebrafish. *Behav Processes*, 197, 104608-104608.
- MILLER, N. & GERLAI, R. T. 2012. From Schooling to Shoaling: Patterns of collective Motion in Zebrafish (*Danio rerio*). 7.
- MOORE, N. S., MANS, R. A., MCCAULEY, M. K., ALLGOOD, C. S. & BARKSDALE, K. A. 2021. Critical Effects on Akt Signaling in Adult Zebrafish Brain Following Alterations in Light Exposure. *Cells*, 10, 637.
- MOTA-ROJAS, D., MARITI, C., ZDEINERT, A., RIGGIO, G., MORA-MEDINA, P., DEL MAY REYES, A., GAZZANO, A., DOMÍNGUEZ-OLIVIA, A., LEZAMA-

- GARCÍA, K., JOSÉ-PÉREZ, N. & HERNÁNDEZ-ÁVALOS, I. 2021. Anthromorphism and Its Adverse Effects on the Distress and Welfare of Companion Animals. 11.
- MUHR, J. & ACKERMAN, K. M. 2022. Embryology, Gastrulation.
- NASLUND, J. & JOHNSON, J. I. 2016. Environmental enrichment for fish in captive environments: effects of physical structures and substrates. *Fish and Fisheries*, 17, 1-30.
- NATHALIE PERCIE DU, S., AMRITA, A., SABINA, A., MARC, T. A., MONYA, B., WILLIAM, J. B., ALEJANDRA, C., INNES, C. C., ULRICH, D., MICHAEL, E., PAUL, G., STEPHEN, T. H., DAVID, W. H., VIKI, H., NATASHA, A. K., STANLEY, E. L., KATIE, L., CATRIONA, J. M., MALCOLM, M., ESTHER, J. P., OLE, H. P., FRANCES, R., PENNY, R., KIERON, R., EMILY, S. S., SHAI, D. S., THOMAS, S. & HANNO, W. 2020. Reporting animal research: Explanation and elaboration for the ARRIVE guidelines 2.0. *PLoS biology*, 18, e3000411.
- NEWBERRY, R. C. 1995. Environmental enrichment: Increasing the biological relevance of captive environments.
- OLDFIELD, R. G. & BONANO, P. E. 2023. Psychological and social well-being of bony fishes in zoos and aquariums. *Zoo Biology*.
- OSBORNE, N., PAULL, G., GRIERSON, A., DUNFORD, K., BUSCH-NENTWICH, E. M., SNEDDON, L. U., WREN, N., HIGGINS, J. & HAWKINS, P. 2016. Report of a Meeting on Contemporary Topics in Zebrafish Husbandry and Care. *Zebrafish*, 13, 584-589.
- PARICHY, D. M. 2015. Advancing biology through a deeper understanding of zebrafish ecology and evolution.
- PARICHY, D. M. & JOHNSON, S. L. 2001. Zebrafish hybrids suggest genetic mechanisms for pigment pattern diversification in Danio. *Dev Genes Evol*, 211, 319-28.
- PARK, J.-S., RYU, J.-H., CHOI, T.-I., BAE, Y.-K., LEE, S., KANG, H. J. & KIM, C.-H. 2016. Innate color preference of zebrafish and its use in behavioral analyses. *Mol. Cells*, 39, 750-755.
- PARLIAMENT, E. 2010. Consolidated text: Directive 2010/63/EU of the European Parliament and of the Council of 22 September 2010 on the protection of animals used for scientific purposes (Text with EEA relevance)Text with EEA relevance.
- PEETERS, B. W., MOESKOPS, M. & VEENVLIET, A. R. J. Z. 2016. Colour preference in Danio rerio: effects of age and anxiolytic treatments. *Zebrafish*, 4.
- PIERÓG, M., GUZ, L., DOBOSZEWSKA, U., POLESZAK, E. & WLAŻ, P. 2018. Effects of alprazolam treatment on anxiety-like behaviour induced by color stimulation in adult zebrafish. *Neuropsychopharmacol*, 297-306.
- PLEEGING, C. C. F. & MOONS, C. P. H. 2017. Potential welfare issues of the Siamese fighting fish (*Betta splendens*) at the retailer and in the hobbyist aquarium. *Vlaams Diergeneeskundig Tijdschrift*, 86, 213-223.
- POUNDER, K. C., MITCHELL, J. L., THOMSON, J. S., POTTINGER, T. G., BUCKLEY, J. & SNEDDON, L. U. 2016. Does environmental enrichment promote recovery from stress in rainbow trout? *Applied animal behaviour science*, 176, 136-142.
- POWELL, C., VON KEYSERLINGK, M. A. G. & FRANKS, B. 2021. Tank cleaning temporarily increases stress and decreases affiliative behavior in zebrafish. *Applied animal behaviour science*, 242, 105414.
- RÁCZ, A., ADORJÁN, G., FODOR, E., SELLYEI, B., TOLBA, M., MIKLÓSI, Á. & VARGA, M. 2021. Housing, Husbandry and Welfare of a "Classic" Fish Model, the Paradise Fish (*Macropodus opercularis*). *Animals (Basel)*, 11, 786.
- RASMUSSEN, M. Katalase.

- SCATTERTY, K. R., PITMAN, T., ECKERSLEY, T., SCHMALTZ, R. & HAMILTON, T. J. 2023. Zebrafish aversion to infrasound in an open field test. *Front Behav Neurosci*, 16, 1019368-1019368.
- SCHROEDER, P., JONES, S., YOUNG, I. S. & SNEDDON, L. U. 2014. What do zebrafish want? Impact of social grouping, dominance and gender on preference for enrichment. *Lab Anim*, 48, 328-337.
- SILVERMAN, J. 2008. Sentience and sensation. *Lab Anim (NY)*, 37, 465-7.
- SINGLEMAN, C. & HOLTZMAN, N. G. 2014. Growth and Maturity in the Zebrafish, *Danio rerio*: A Staging Tool for Teaching and Research.
- SLOMAN, K. A., BOUYOUCOS, I. A., BROOKS, E. J. & SNEDDON, L. U. 2019. Ethical considerations in fish research. *J Fish Biol*, 94, 556-577.
- SOARES, S. M., KIRSTEN, K., POMPERMAIER, A., MAFFI, V. C., KOAKOSKI, G., WOLOSZYN, M., BARRETO, R. E. & BARCELLOS, L. J. G. 2020. Sex segregation affects exploratory and social behaviors of zebrafish according to controlled housing conditions. *Physiol Behav*, 222, 112944-112944.
- SPENCE, R., FATEMA, M. K., ELLIS, S., AHMED, Z. F. & SMITH, C. 2007. Diet, growth and recruitment of wild zebrafish in Bangladesh. *Journal of Fish Biology*, 71, 304-309.
- SPENCE, R., FATEMA, M. K., REICHARD, M., HUQ, K. A., WAHAB, M. A., AHMED, Z. F. & SMITH, C. 2006. The distribution and habitat preferences of the zebrafish in Bangladesh. *Journal of Fish Biology*, 69, 1435-1448.
- SPENCE, R., MAGURRAN, A. E. & SMITH, C. 2011. Spatial cognition in zebrafish: the role of strain and rearing environment. *Anim Cogn*, 14, 607-612.
- SPENCER, R., GERLACH, G., LAWRENCE, C. & SMITH, C. 2008. The behaviour and ecology of the zebrafish, *Danio rerio*.
- STEVENS, C. H., REED, B. T. & HAWKINS, P. 2021. Enrichment for Laboratory Zebrafish-A Review of the Evidence and the Challenges. *Animals (Basel)*, 11, 698.
- SURIYAMPOLA, P. S., SHELTON, D., SHUKLA, R. & ROY, T. 2015. Zebrafish Social Behavior in the Wild. [Accessed 28.03.2023].
- SYKES, D. J., SURIYAMPOLA, P. S. & MARTINS, E. P. 2018. Recent experience impacts social behavior in a novel context by adult zebrafish (*Danio rerio*). *Plos One*, 13.
- TAN, S. L. T., HANDASYDE, K. A., RAULT, J. L. & MENDL, M. 2020. Insensitivity to reward shifts in zebrafish (*Danio rerio*) and implications for assessing affective states. *Anim Cogn*, 23, 87-100.
- THOMSON, J. S., DEAKIN, A. G., COSSINS, A. R., SPENCER, J. W., YOUNG, I. S. & SNEDDON, L. U. 2020. Acute and chronic stress prevents responses to pain in zebrafish: evidence for stress-induced analgesia. *J Exp Biol*, 223.
- TONI, M., MANCIOCCO, A., ANGIULLI, E., ALLEVA, E., CIONI, C. & MALAVASI, S. 2019. Review: Assessing fish welfare in research and aquaculture, with a focus on European directives. *Animal*, 13, 161-170.
- TSANG, B. & GERLAI, R. T. 2022. Common Aquarium Plants as an Enrichment Strategy in Zebrafish Facilities. *Zebrafish*, 19, 218-223.
- UCI. IACUC Policy on Animal Housing and Enrichment. [Accessed 21.03.2023].
- ULLAH, I., ZUBERI, A., KHAN, K. U., AHMAD, S., THORNQVIST, P. O. & WINBERG, S. 2017. Effects of enrichment on the development of behaviour in an endangered fish mahseer (*Tor putitora*). *Applied Animal Behaviour Science*, 186, 93-100.
- VOLGIN, A. D., YAKOVLEV, O. V., DEMIN, K. A., DE ABREU, M. S., ROSEMBERG, D. B., MESHALKINA, D. A., ALEKSEEVA, P. A., FRIEND, A. J., AMSTISLAVSKAYA, T. G. & KALUEFF, A. V. 2018. Understanding the Role of

- Environmental Enrichment in Zebrafish Neurobehavioral Models. *Zebrafish*, 15, 425-432.
- WAFER, L. N., JENSEN, V. B., WHITNEY, J. C., GOMEZ, T. H., FLORES, R. & GOODWIN, B. S. 2016. Effects of Environmental Enrichment on the Fertility and Fecundity of Zebrafish (*Danio rerio*). *J Am Assoc Lab Anim Sci*, 55, 291-4.
- WANG, J. T., WANG, D. M., HU, G. J., YANG, L. E., LIU, Z. Y., YAN, D. N., SERIKULY, N., ALPYSHOV, E., DEMIN, K. A., STREKALOVA, T., BARCELLOS, L. J. G., BARCELLOS, H. H. A., AMSTISLAVSKAYA, T. G., DE ABREU, M. S. & KALUEFF, A. V. 2021. The role of auditory and vibration stimuli in zebrafish neurobehavioral models. *Behavioural Processes*, 193.
- WEBER, D. N. & GHORAI, J. K. 2013. Experimental design affects social behavior outcomes in adult zebrafish developmentally exposed to lead. *Zebrafish*, 10, 294-302.
- WHITE, L. J., THOMSON, J. S., POUNDER, K. C., COLEMAN, R. C. & SNEDDON, L. U. 2017. The impact of social context on behaviour and the recovery from welfare challenges in zebrafish, *Danio rerio*. *Animal behaviour*, 132, 189-199.
- WILKES, L., OWEN, S. F., READMAN, G. D., SLOMAN, K. A. & WILSON, R. W. 2012. Does structural enrichment for toxicology studies improve zebrafish welfare? *Applied animal behaviour science*, 139, 143-150.
- WOODWARD, M. A., WINDER, L. A. & WATT, P. J. 2019. Enrichment Increases Aggression in Zebrafish. *Fishes*, 4.
- XU, C. S., HOU, M. M., SU, L. X., QIU, N., YU, F. D., ZOU, X. H., WANG, C. L., WANG, J. W. & HE, Y. F. 2022a. The Effect of Environmental Enrichment on Laboratory Rare Minnows (*Gobiocypris rarus*): Growth, Physiology, and Behavior. *Animals*, 12.
- XU, C. S., SU, L. X., QIU, N., HOU, M. M., YU, F. D., ZOU, X. H. & WANG, J. W. 2022b. The Effect of Unpredictable Chronic Stress on Rare Minnow (*Gobiocypris rarus*): Growth, Behaviour and Physiology. *Biology-Basel*, 11.
- YANG, Y. & GUAN, X. 2018. Non-Protein Thiol Imaging and Quantification in Live Cells with a Novel Benzofurazan Sulfide Triphenylphosphonium Fluorogenic Compound. *Anal Bioanal Chem*, 409, 3414-3427.
- YOSSA, R., SARKER, P. K., PROULX, E., SAXENA, V., EKKER, M. & VANDENBERG, G. W. 2013. A Practical Approach for Sexing Zebrafish, *Danio rerio*. *Journal of Applied Aquaculture*, 25, 148-153.
- ZABEGALOV, K. N., KOLESNIKOVA, T. O., KHATSKO, S. L., VOLGIN, A. D., YAKOVLEV, O. A., AMSTISLAVSKAYA, T. G., FRIEND, A. J., BAO, W., ALEKSEEVA, P. A., LAKSTYGAL, A. M., MESHALKINA, D. A., DEMIN, K. A., DE ABREU, M. S., ROSEMBERG, D. B. & KALUEFF, A. V. 2019. Understanding zebrafish aggressive behavior. *Behav Processes*, 158, 200-210.
- ZHANG, S., LIU, X., SUN, M.-Z., ZHANG, Q., LI, T., LI, X., XU, J., ZHAO, X., CHEN, D. & FENG, X. 2018. Reversal of reserpine-induced depression and cognitive disorder in zebrafish by sertraline and Traditional Chinese Medicine (TCM). *Behav Brain Funct*, 14.
- ZHU, S. I., MCCULLOUGH, M. H., PUJIC, Z., SIBBERAS, J., SUN, B., DARVENIZA, T., BUCKNALL, B., AVITAN, L. & GOODHILL, G. J. 2023. *fmr1* Mutation Alters the Early Development of Sensory Coding and Hunting and Social Behaviors in Larval Zebrafish. *J Neurosci*, 43, 1211-1224.

# Vedlegg

**Vedlegg 1.** Oversikt over alle inkluderte artikler og begrunnelse for hvorfor artiklene er inkludert på bakgrunn om de møter inklusjonskriteriet «Overskrift eller abstrakt inneholder «Zebrafish» eller «danio rerio» og «Environmental enrichment» eller ikke

| <b>Artikkel navn</b>      | <b>Inklusjonskriterie:<br/>Overskrift eller<br/>abstrakt inneholder<br/>«Zebrafish» eller<br/>«danio rerio» og<br/>«Environmental<br/>enrichment»</b> | <b>Begrunnelse for hvorfor artikler som ikke<br/>møter inklusjonskriteriet er inkludert</b>      |
|---------------------------|---|--|
| (Menezes et al., 2022)    | Ja  |  |
| (Marchetto et al., 2021)  | Ja  |  |
| (Estes et al., 2021)      | Ja  |  |
| (Collymore et al., 2015)  | Ja  |  |
| (de Abreu et al., 2021)   | Ja  |  |
| (Tsang and Gerlai, 2022)  | Ja  |  |
| (Moore et al., 2021)      | Ja  |  |
| (Buenhombre et al., 2021) | Ja  |  |
| (dos Santos et al., 2020) | Ja  |  |
| (Wilkes et al., 2012)     | Ja  |  |
| (Maierdiali et al., 2020) | Nei   | «Environmental enrichment» er ikke nevnt i overskrift eller abstrakt. Artikkelen er likevel tatt |

|                                |     |   |
|--------------------------------|-----|---|
|                                |     | med da den omhandler om kar størrelse påvirker sebrafiskens oppførsel og fysiologi. Dette er relevant for oppgaven da vi ser på dette som en slags miljøberikelse.  |
| (Barcellos et al., 2018)       | Ja  |   |
| (Manuel et al., 2015)          | Ja  |   |
| (Gatto et al., 2022a)          | Ja  |   |
| (Lee et al., 2019)             | Ja  |   |
| (Wafer et al., 2016)           | Ja  |   |
| (Matheus et al., 2018)         | Ja  |   |
| (Stevens et al., 2021)         | Ja  |   |
| (Woodward et al., 2019)        | Ja  |   |
| (Krueger et al., 2020)         | Ja  |   |
| (Giacomini et al., 2016)       | Ja  |   |
| (Karoglu-Eravsar et al., 2021) | Ja  |   |
| (Gatto et al., 2022b)          | Ja  |   |
| (Marcon et al., 2018)          | Ja  |   |
| (DePasqual et al., 2019)       | Ja  |   |
| (White et al., 2017)           | Nei | «Environmental enrichment» er ikke nevnt i overskrift eller abstrakt. Nevner «Social enrichment» og omhandler hvordan sosial kontekst kan hjelpe sebrafisk bedring etter vanlige laboratorier prosedyrer. Dette er relevant for |



|                           |     |  |
|---------------------------|-----|--|
|                           |     | oppgaven da sosial berikelse også er en type miljøberikelse.   |
| (DePasquale et al., 2021) | Ja  |  |
| (DePasquale et al., 2016) | Nei | «Environmental enrichment» er ikke nevnt i overskrift eller abstrakt. Artikkelen omhandler hvordan hjernen til sebrafisker vokst opp i miljøer av varierende kompleksitet og med eller uten stressfaktorer har utviklet seg. Artikkelen er relevant da den omhandler fysiske miljøberikelser samt stressfaktorer som å bli jaget av fiskenett som er relevant da oppgaven skal se på fysiske miljøberikelse samt stress relatert til det å leve og bli håndtert i en forskningssammenheng. |
| (Franks et al., 2018)     | Nei | «Environmental enrichment» er ikke nevnt i overskrift eller abstrakt. Artikkelen tar for seg et fenomen, «heightened-shoaling» og i hvilke settinger dette oppstår. I artikkelen har de testet fiskene i 110L kar som skal simulere naturlig habitat. Dette er med på å gi en forståelse for hva som er positiv og naturlig atferd hos sebrafisk. For å vite hvilke miljøberikelser som fører til bedre dyrevelferd er det nødvendig å forstå sebrafiskens naturlige atferd.               |
| (Kistler et al., 2011)    | Nei | «Environmental enrichment» er ikke nevnt i overskrift eller abstrakt. Artikkelen tar for seg   |

|                         |     |  |
|-------------------------|-----|--|
|                         |     | preferansen for fysisk miljøberikelse over et uberiket miljø. Dette er noe denne oppgaven også skal se på, noe som gjorde artikkelen relevant.   |
| (Sykes et al., 2018)    | Nei | «Environmental enrichment» er ikke nevnt i overskrift eller abstrakt. Artikkelen tar for seg endringer i gruppeoppførsel hos to grupper sebrafisk i forskjellige miljøer, en med mer komplekst miljø og en med et mindre komplekst miljø. Dette er relevant for oppgaven da den tar for seg trivsel hos sebrafisk ved bruk av miljøberikelser. |
| (Maximino et al., 2010) | Nei | «Environmental enrichment» er ikke nevnt i overskrift eller abstrakt. Artikkelen tester om fysisk miljøberikelse kan redusere angstlignende oppførsel hos sebrafisk. Dette er relevant for oppgaven.   |
| (Soares et al., 2020)   | Ja  |  |
| (Jones et al., 2019)    | Nei | «Environmental enrichment» er ikke nevnt i overskrift eller abstrakt, men nevner «shade as enrichment» i overskrift og tar for seg sebrafiskens preferanser for å gjemme seg under gjenstander som lager skygge. Dette er relevant for oppgaven da det brukes fysiske miljøberikelser i testen.  |

|                           |     |  |
|---------------------------|-----|--|
| (Spence et al., 2011)     | Nei | «Environmental enrichment» er ikke nevnt i overskrift eller abstrakt. Artikkelen tar for seg evnen sebrafisk oppvokst i et komplekst miljø versus et uberiket miljø har til å lære. Dette er relevant for oppgaven da det ser noe om effekten miljøberikelse kan ha hos sebrafisk.   |
| (Buenhombre et al., 2022) | Ja  |  |
| (Powell et al., 2021)     | Nei | «Environmental enrichment» er ikke nevnt i overskrift eller abstrakt. Selv om vasking av kar ikke er en miljøberikelse som legges til for å øke dyrevelferd er det en del av håndtering av fiskene. For å forstå hele miljøet rundt fisken kan det også være lurt å forstå hvordan fisken påvirkes av denne type håndtering. |
| (Volgin et al., 2018)     | Ja  |  |
| (Schroeder et al., 2014)  | Ja  |  |
| (Scatterty et al., 2023)  | Ja  |  |

**Vedlegg 2.** Oversikt over alle ekskluderte artikler og begrunnelse for hvorfor artiklene er ekskludert på bakgrunn om de møter inklusjonskriteriet «Overskrift eller abstrakt inneholder «Zebrafish» eller «danio rerio» og «Environmental enrichment» eller ikke

| Artikkel navn | Overskrift eller abstrakt inneholder «Zebrafish» eller | Begrunnelse for hvorfor artikler som møter inklusjonskriterier er ekskludert |
|---------------|--|--|
|               |  |  |

|                                 | <b>«danio rerio» og<br/>«Environmental<br/>enrichment»</b> |  |
|---------------------------------|--|--|
| (Pounder et al., 2016)          | Nei  |  |
| (Decker et al., 2023)           | Nei  |  |
| (Xu et al., 2022a)              | Nei  |  |
| (Xu et al., 2022b)              | Nei  |  |
| (Ullah et al., 2017)            | Nei  |  |
| (Naslund and Johnsson,<br>2016) | Nei  |  |
| (Sloman et al., 2019)           | Nei  |  |
| (Rácz et al., 2021)             | Nei  |  |
| (Bethell, 2015)                 | Nei  |  |
| (Lee et al., 2022)              | Nei  |  |
| (Gatto et al., 2021)            | Nei  |  |
| (Tan et al., 2020)              | Nei  |  |
| (Green and Swaney,<br>2022)     | Ja   | Overskrift inneholder både «Zebrafish» og «Environmental enrichment». For å begrense oppgavens størrelse tar vi ikke med betydningen av miljøberikelser i tidligere generasjoner, denne artikkelen er dermed ikke relevant for denne oppgaven. |
| (Lidster et al., 2017)          | Nei  |  |
| (Cachat et al., 2010)           | Nei  |  |

|                                   |     |  |
|-----------------------------------|-----|--|
| (de Abreu et al., 2020c)          | Ja  | Abstraktet inneholder både «Zebrafish» og «Environmental enrichment». Artikkelen tar i hovedsak for seg menneskelig psykiatrisk sykdom med hvordan sebrafisk kan hjelpe med å forstå dette. Dette er ikke relevant for selve oppgaven der det ses på miljøberikelser med tanke på zebrafisk. |
| (Jones et al., 2021)              | Nei |  |
| (Osborne et al., 2016)            | Ja  | Selv om abstraktet inneholder både «Zebrafish» og «Environmental enrichment» møter ikke teksten inklusjonskriteriene ved å ikke være en artikkel eller en oversiktsartikkel.   |
| (Nathalie Percie du et al., 2020) | Nei |  |
| (Toni et al., 2019)               | Nei |  |
| (Wang et al., 2021)               | Nei |  |
| (Abreu et al., 2019)              | Nei |  |
| (DePasquale et al., 2020)         | Nei |  |
| (Caron et al., 2022)              | Nei |  |
| (Zabegalov et al., 2019)          | Nei |  |
| (Fontana et al., 2022)            | Nei |  |
| (de Abreu et al., 2020b)          | Nei |  |
| (Graham et al., 2018)             | Nei |  |
| (Thomson et al., 2020)            | Nei |  |
| (Maffioli et al., 2022)           | Nei |  |

|                             |     |  |
|-----------------------------|-----|--|
| (Hageter et al., 2021)      | Ja  | Abstraktet inneholder både «Zebrafish» og «Environmental enrichment». Selv om artikkelen møter inklusjonskriteriene er den lite relevant for oppgaven da den tar for seg snu bias hos zebrafisk for å forstå blant annet hvorfor mennesker er høyre- eller venstrehendt.   |
| (Weber and Ghorai, 2013)    | Ja  | Abstraktet inneholder både «Zebrafish» og «Environmental enrichment». Selv om artikkelen møter inklusjonskriteriene er den lite relevant for oppgaven da den kun tar for seg fisk som har vært utsatt for bly som embryo. For å begrense oppgavens størrelse tar vi kun for oss fisk som i utgangspunktet ikke er utsatt for behandlinger. |
| (Zhu et al., 2023)          | Nei |  |
| (Homberg et al., 2016)      | Nei |  |
| (Cardona et al., 2022)      | Nei |  |
| (Pleeging and Moons, 2017)  | Nei |  |
| (Oldfield and Bonano, 2023) | Nei |  |
| (Hiyoshi et al., 2021)      | Nei |  |



Norges miljø- og biovitenskapelig universitet  
Noregs miljø- og biovitenskapelige universitet  
Norwegian University of Life Sciences

Postboks 5003  
NO-1432 Ås  
Norway