

Mgr inż. Krzysztof Wojtas

- **Dziedzina:** Nauki rolnicze
- **Dyscyplina:** Zootechnika
- **Data otwarcia przewodu doktorskiego:** 01.12.2015 r.
- **Temat:** Wykorzystanie testu tendencyjności poznawczej w ocenie dobrostanu danio pręgowanego (*Danio rerio*)
- **Promotor:** Prof. dr hab. Roman Kołacz
- **Recenzenci:** 1) Prof. dr hab. Wojciech Pisula
2) Dr hab. inż. Barbara Tombarkiewicz
3) Prof. dr hab. Leszek Tymczyna

STRESZCZENIE

Najnowsze badania dowodzą, że ryby podobnie jak ssaki są świadomymi, czującymi istotami. Odczuwają nie tylko ból ale także bardziej złożone emocje, zarówno negatywne, jak i pozytywne. Ze względu na dynamiczny rozwój akwakultury i zintensyfikowanych metod produkcji pojawia się coraz więcej zagrożeń dla dobrostanu ryb hodowlanych. Ryby w akwakulturze często utrzymywane są w pustych, pozbawionych jakichkolwiek elementów strukturalnych zbiornikach. Badania dowodzą tymczasem, że zapewnienie rybom odpowiedniego wzbogacenia strukturalnego często pozytywnie wpływa na ich zdrowie, obniżenie agresji oraz przyrost masy ciała. Ważne jest więc opracowanie metod pozwalających na analizę dobrostanu tych zwierząt. Nowatorskim podejściem w badaniach nad dobrostanem jest próba mierzenia stanu emocjonalnego jako ostatecznego wskaźnika świadczącego o jakości życia zwierząt, utrzymywanych w danych warunkach.

Celem przedstawionego badania było stworzenie testu tendencyjności poznawczej, bazującego na ocenie bodźców niejednoznacznych, pozwalającego na ocenę walencji stanu emocjonalnego u ryb oraz użycie tego testu do oceny wpływu elementów wzbogacających środowisko na dobrostan *Danio pręgowanego*.

Do doświadczenia wykorzystano 100 szt. dorosłych ryb z gatunku *Danio rerio* linii ABxTL wystandaryzowanych pod kątem wielkości i masy ciała. Ryby podzielone zostały na dwie grupy, grupę BT (ang. *baren tank*): ryby w tej grupie utrzymywane były w zbiorniku pozbawionym jakichkolwiek elementów wzbogacających (całkowicie pusty zbiornik) oraz

grupę ET (ang. *enriched tank*): ryby w tej grupie utrzymywane były w zbiorniku wyposażonym w elementy wzbogacające środowisko życia w postaci kryjówek oraz syntetycznych roślin akwariowych. Wszystkie ryby poddane zostały warunkowaniu na dwa bodźce, pozytywny (A), utożsamiony z kolorem zielonym, oraz negatywny (E) utożsamiony z kolorem czerwonym. Uwarunkowane na bodźce *Danio* poddano testowi tendencyjności poznawczej w zaprojektowanym do tego celu korytarzu o radialnej strukturze. Składał się on z pięciu ramion ustawionych do siebie pod kątem 45°. Każde z ramion zakończone zostało ścianą o określonej proporcji koloru zielonego (uwarunkowanego jako bodziec pozytywny) i czerwonego (uwarunkowanego jako bodziec negatywny). Uzyskano w ten sposób strefy o różnym natężeniu tych dwóch bodźców: skrajnie po lewej stronie korytarza ramię bodźca pozytywnego „A” (100% zielonego koloru), skrajnie po prawej ramię bodźca negatywnego „E” (100% czerwonego koloru). Pomiędzy nimi natomiast umieszczono trzy ramiona reprezentujące tzw. bodźce niejednoznaczne o różnym natężeniu czerwieni i zieleni (od lewej do prawej: ramię „B”: 75% zielonego i 25% czerwonego; ramię „C”: 50% zielonego i 50% czerwonego oraz ramię „D”: 25% zielonego i 75% czerwonego). Test polegał na umieszczeniu każdorazowo w kolejnych powtórzeniach grupy pięciu osobników w środkowej części korytarza i nagraniu ich zachowania przez 5 min. po otwarciu przegród do wszystkich ramion. Następnie nagranie analizowane było przy użyciu oprogramowania komputerowego pod kątem aktywności ryb w każdej ze stref. Dodatkowo podczas doświadczenia w zbiorniku głównym badano poziomą dystrybucję ryb w toni wodnej oraz preferencję strefy w zbiorniku w celu zbadania, czy ryby z grupy ET aktywnie wykorzystywały zapewnione wzbogacenie strukturalne. Dwa dni po wykonaniu testów behawioralnych ryby zostały poddane eutanazji i analizie pod kątem zawartości kortyzolu przy użyciu testu ELISA.

Ryby z grupy ET wykazały większą aktywność w korytarzu testowym oraz większą eksplorację stref niejednoznacznych niż ryby z grupy BT. Wynik ten sugeruje, że wzbogacenie strukturalne środowiska wpłynęło pozytywnie na walencję stanu emocjonalnego ryb z grupy ET. Badanie wykazało także, że ryby, którym zapewniono wzbogacenie (ET), preferowały górne partie toni wodnej, podczas gdy ryby z grupy BT utrzymywały się bliżej strefy przydennej. Ryby te preferowały także brzegi zbiornika, podczas gdy osobniki z grupy ET aktywnie wykorzystywały elementy wzbogacające i utrzymywały się w ich pobliżu, czyli w środkowej części zbiornika. Ryby z grupy ET cechowały się większą zawartością kortyzolu w ciele niż ryby z grupy BT, co można tłumaczyć zarówno większą aktywnością i interakcjami socjalnymi

zwierząt przebywających w warunkach wzbogaconych, jak i stłumionym wydzielaniem kortyzolu u zwierząt z grupy pozbawionej bodźców.

Badanie wykazało, że test tendencyjności poznawczej może być praktycznym narzędziem do oceny stanów afektywnych u ryb. Wyniki testu sugerują, że wzbogacenie środowiska życia wpłynęło pozytywnie na stan emocjonalny, a co za tym idzie – na dobrostan ryb. Pozostałe testy behawioralne przedstawiają natomiast zależność pomiędzy warunkami utrzymania a preferencją poszczególnych stref, które po dokładniejszej analizie mogą zostać użyte jako dodatkowy wskaźnik w ocenie dobrostanu tych ryb.

ABSTRACT

The most recent studies prove that fish similar to mammals are conscious and sentient beings. They can feel not only pain, but also more complex emotions both negative and positive. Due to dynamic growth of aquaculture sector and intensification of the production methods the number of threats for farmed fish welfare is constantly growing. Fish in aquaculture are often kept in barren tanks or cages deprived of any structural elements. However the research shows that structural enrichment has a positive influence on fish health, aggression level and growth rate. Therefore it is important to develop methods that allow for accessing fish welfare. Innovative approach to this subject is an idea to measure animals' affective states as an ultimate indicator of their quality of life.

The aim of the presented research was to develop a cognitive bias test based on the assessment of ambiguous stimuli that would allow for assessing the valence of emotional state in fish and to use this test for investigating the influence of structural enrichment on welfare of Zebrafish.

In the research there were 100 adult *Danio rerio* from line ABxTL used, selected for the size and body weight. The fish were divided into two groups: group BT (Barren tank): the fish in this group were kept in a tank devoid of any elements (completely empty tank) and group ET (Enriched tank): the fish in this group were kept in a tank equipped with hides and synthetic plants. The fish were conditioned for two stimuli, positive (A) identified with green colour and negative (E) identified with red colour. Conditioned fish were tested in a radial shaped cognitive bias chamber designed for this experiment. The chamber consisted of five arms positioned at an angle of 45° relative to each other. Each arm had the back wall painted with a

certain proportion of green colour (conditioned as positive stimulus) and red colour (conditioned as negative stimulus). This allowed to create zones with different intensity of the two stimuli: the far left side representing the positive stimulus "A" (100% of green colour), the far right representing the negative stimulus "E" (100% of red colour). The three middle arms were representing ambiguous stimuli with the different intensities of red and green colours (from left to right: arm "B" 75% green and 25% red; arm "C": 50% green and 50% red and arm "D": 25% green, and 75% red). During the final test in each trial a group of five fish was placed in the middle of the testing chamber. Their behaviour was recorded for 5 minutes right after the doors for all arms were opened. Afterwards the recording was analysed for fish activity in each zone using computer software. In addition, during the experiment the horizontal distribution of the fish in the tank and the use of enrichment were investigated. Two days after the behavioural tests all fish were euthanized and analysed for cortisol content with use of ELISA test.

The fish from the ET group showed more overall activity and explored more of the ambiguous stimuli arms in the chamber than the fish from the BT group. This suggests that environmental enrichment had a positive influence on the valence of affective state in fish from the ET tank. The study also showed that fish kept in structural complex environment (ET) preferred the upper parts of the water column, while the fish from the BT group stayed more in the bottom part of the tank. Also the ET fish actively utilised the enrichment structures by swimming in the centre of the tank where they were located. The BT fish on the other side preferred the edges of the tank and avoided the central empty area. The fish kept in the ET tank had a higher cortisol concentration in the body compared to the BT fish. This can be the result of both higher activity and social interactions in the ET group as well as attenuated cortisol expression in fish devoid of the stimuli in the BT group.

The presented research showed that the cognitive bias test is a promising tool for assessing welfare and affective states in fish. Results suggest that environmental enrichment had a positive effect on the emotional state and therefore the welfare of fish. The other measured behavioural parameters showed the relationship between the living conditions and the distribution of the fish in the tank. After a more detailed analysis this could be used as an additional indicator in assessing the welfare of farmed fish.

Krzysztof Wojtas