

Til landets fiskeforskningsinstitusjoner

Invitasjon til å skrive søknad om forskningsmidler til:

Miljøberikelse i fiskeforsøk på laboratoriet

Sammendrag

Norecopa er landets konsensus-plattform for erstatning, reduksjon og forbedring av dyreforsøk. Norecopa er en uavhengig medlemsorganisasjon med et styre som representerer alle fire interesseparter (forvaltningen, akademia, industrien og dyrevernerorganisasjonene) og en basisbevilgning fra departementene (LMD og FKD).

I forbindelse med Næringskomitéens behandling av regjeringens forslag til statsbudsjett for 2013 fikk Norecopa en tilleggsbevilgning. Norecopa ønsker å bruke noe av dette til å fremme forskningen på effekten av miljøberikelse på resultatene fra laboratorieforsøk utført på fisk i forbindelse med oppdrettsnæringen.

Siden midlene er begrenset, ønsker Norecopa at de brukes til å kjøpe fri fagpersoner på området som kan benytte sin tid til å skrive en utfyllende søknad til Norges Forskningsråd, eventuelt også andre aktuelle instanser, i samarbeid med Norecopa.

Bakgrunn

Norecopa har fokusert på bruken av fisk i forskning siden organisasjonen ble stiftet i 2007 (<http://www.norecopa.no/sider/tekst.asp?side=124>).

Med støtte fra Norges Forskningsråd ble det dannet en arbeidsgruppe som skrev en rapport med tittel 'Fisk i forskning - miljøkrav og velferdsindikatorer hos fisk' (<http://www.forskningsradet.no/no/Nyheter/Kunnskapsbehov+om+velferd+for+forsoksfisk/1253953229481>). Rapporten peker ut miljøberikelse som et område som bør ses nærmere på, se vedlegg.

Med støtte fra Fiskeri- og kystdepartementet og Dyrevernfondet gjennomførte Norecopa en landsomfattende undersøkelse av fiskeforskningsstasjonene, prosjektet 3R-KART (<http://www.norecopa.no/sider/tekst.asp?side=173>). Prosjektet bekreftet konklusjonen fra NFR-rapporten om at miljøberikelse var et viktig forskningstema.

Invitasjon

Norecopa inviterer med dette landets fiskeforskningsinstitusjoner til å delta i utforming av en søknad om midler til forskning på effektene av miljøberikelse på laboratorieforsøk hos fiskearter av relevans til oppdrettsnæringen. Norecopa tilbyr ca. kr. 100 000 til dette formålet, som forventes brukt til å skrive en søknad som tilfredsstillende kravene til en som kan sendes til NFRs Havbruksprogram.

Faglig bakgrunn

Innledning

Miljøberikelse (*Environmental Enrichment*) er et viktig begrep innenfor faget forsøksdyrlære og er gjenstand for mye oppmerksomhet (<http://www.nc3rs.org.uk/news.asp?id=395>), ikke minst på grunn av kravene i det nye EU-direktivet (se nedenfor). Målet er å skape et miljø for dyrene som tilfredsstillende flest mulig av deres naturlige behov, og som dermed øker dyrenes velferd. Dette fører til mindre aggresjon ovenfor andre dyr og mennesker. Målinger som gjøres på forsøksdyr som lever i harmoni med sitt miljø kan dernest forventes å gi et bedre bilde av behandlingen som dyrene er blitt utsatt for, uten forstyrrende effekter fra stress-induserte endringer. Dyreforsøk blir dermed ikke bare mer etisk akseptable men de vil gi mer korrekte resultater med mindre "bakgrunnsstøy", noe som også gjør det mulig å redusere antallet forsøksdyr.

Det har vært tildels store debatter rundt dette temaet:

- Miljøberikelse kan ha store økonomiske konsekvenser, f.eks. i form av større og mer kompliserte bur/tanker eller innkjøp utstyr som settes inn i dem.
- Rengjøring av bur og kar blir vanskeligere, med større fare for oppblomstring av mikro-organismer og sykdomsutbrudd.
- Velferdsgevinsten har vært tema for diskusjon. I mangel av gode velferdsindikatorer for mange dyrearter, har det vært usikkert om dyrene setter pris på miljøberikende tiltak, eller om de oppfatter dem som et stressmoment eller en direkte trussel. At en mus gnager i stykke en pinne som legges i buret, behøver ikke å bety at den har glede av aktiviteten. Valg av miljøberikelse har ofte vært basert på antropomorfske tilnærminger.
- Så lenge dyr holdes innesperret, vil mange hevde at miljøberikelse er ikke mer enn et forsøk på miljøforbedring (*Environmental Improvement*) fremfor en berikelse av dyrets naturlige miljø. I dette nøtattet brukes det innarbeidede begrepet "miljøberikelse" konsekvent, selv om de berikende tiltak ikke resulterer i det samme som dyrene ville blitt eksponert til i sitt naturlige miljø.

Debatten om behovet for miljøberikelse preges også av hvorvidt man tror på en "kar-effekt" eller "bur-effekt". I gnagermiljøet er det blitt mye større fokus på dette de senere årene. Miljøforhold kan variere fra bur til bur, derfor bør både kontrolldyrene og dyrene som behandles oppstalles i det samme miljøet. Det kan oppstå tildels store forskjeller mellom ulike bur, som tilskrives miljøfaktorer utenfor selve buret som f.eks. støy, lys, lukt, passasje av mennesker m.m. Eksponering til stressorer som bråk og trafikk forbi karene kan utløse økte plasmanivå av kortisol hos fisk (Barton & Iwama, 1991; Mommsen et al., 1999). I tillegg vil det være lokale miljøvariasjoner innenfor hvert bur. Det er derfor aksept på at det er buret/karet (og ikke dyret eller dyregruppen) som utgjør "den eksperimentelle enheten" i statistikk-terminologien.

Pr. definisjon kan kar-effekten ofte ikke gjenskapes eller kvantifiseres, fordi man ikke vet hva den er forårsaket av.

Den store gevinsten med vellykket miljøberikelse ligger i potensialet til å få frem sunne, tillitsfulle forsøksdyr med en høy grad av trivsel og med et lavt nivå av negativt stress som lever i harmoni med sine omgivelser (miljøet, andre dyr og mennesker). De vil avgi resultater som gjenspeiler forsøksbetingelsene og som ikke er forstyrret av indre eller ytre miljøeffekter. Nyere forskning (se nedenfor) tyder også på at fisk som oppstalles i et beriket miljø har bedre

læringsevne og økt celledeling i hjernen.

Et konkret mål med en utredning om miljøberikelse hos laboratoriefisk blir å etablere metoder for å måle hvordan dyrene virkelig oppfatter en forbedring i miljøet deres. Gareth Readman (2009) siterer Newberry (1995):

“Enrichment attempts will fail if the environmental modifications have little functional significance to the animals, are not sufficiently focused to meet a specific goal or are based on an incorrect hypothesis regarding the causation and mechanisms underlying a problem.”

Miljøberikende tiltak av betydning for laboratoriefisk kan tenkes å omfatte blant annet:

- gruppeoppstalling av fisk (for stimfisk, og arter som tåler nærvær av andre individer)
- innføring av kunstig soloppgang og solnedgang i lysregimet
- bruk av flere typer fôr som genererer ulike typer adferd
- strømsetting som passer dyrearten, med muligheten for fisken å velge strømhastigheten og hvile utenfor strømmen
- plasseringen av vanninntaket
- utforming av karet
- inventar i karet
- bruk av skjulesteder (f.eks. sand for bunnfisk)
- optimal rensing av karet*

Noen av disse parametrene er regulert med artsspesifikke krav fra myndighetene.

* dette behøver ikke å bety full utskifting av karinnholdet. I gnagermiljøet har det f.eks. vist seg at det kan være gunstig å la noe av burets innhold være igjen ved burskift (særlig redet), for ikke å stresse dyret ved å utsette det for et helt nytt miljø opptil flere ganger i uken.

Kunnskap om miljøberikelse hos fisk

Det virker som om det fortsatt er et stort behov for mer forskning på området. Det vil helt sikkert være behov for artstilpassede retningslinjer, gitt de store variasjonene i atferden og krav til levemiljøet til artene som brukes i laboratorieforsøk.

Trolig vil ett enkelt tiltak ikke være nok for å skape et vellykket miljø for en art. En blanding av atferdsrelaterte, fysiske og biokjemiske studier må trolig benyttes for å skaffe full oversikt.

Havforskningsinstituttet i samarbeid med flere andre miljøer har publisert en modell for velferdsevaluering hos laks, SWIM (Stien et al., 2013). Modellen bruker imidlertid ikke velferdsindikatorer som kan sies å være særlig knyttet opp mot miljøberikelse eller effektene av dette (som f.eks. økt hjerneplastisitet og utforskningsatferd).

Effektene av hierarki, smoltifisering og håndteringsstress

Ved å måtte forholde seg til artsfrender og mennesker vil forsøksfisk utsettes for stressfulle situasjoner, som kommer i tillegg til indre påkjenninger som smoltifiseringsprosessen hos anadrome arter. Elementer som sosiale hierarki, håndtering og smoltifisering er vist å påvirke plasmakortisol (Øverli et al., 1999; Aas-Hansen et al., 2003). Stress i akvakultur påvirker kortisolnivåer (Barton & Iwama, 1991; Mommsen et al., 1999). Likedan er kortisolprofilene forskjellige mellom dominante og underordende artsfrender (Øverli et al., 1999).

Effektene på celledeling i hjernen

Laksefisk i små grupper danner hierarkier med dominante og underordnede fisk. De underordnede viser tegn på stress og mindre celledeling i hjernen. Lignende endringer i hjernen har vært sett hos regnbueørret som føres med kortisol (Sørensen, 2013). Miljøberikelse hadde stor innflytelse på fiskens hjernefunksjon (se vedlegg).

Salvanes *et al.* (2013) har påvist at smolt fra villaks som vokser i klekkeri-tanker med miljøberikelse (steiner og kunstige planter) har større hjerneplasticitet og bedre kognitive evner enn kontrollgruppen etter bare 8 uker. Gruppen har også vist at juvenile torsk er flinkere til å lære fra eldre artsfrender å konsumere levende fôr dersom de oppstalles i et beriket miljø (Strand *et al.*, 2010).

Effektene på veksthastighet

Landin *et al.* (2009) har sett på effekten av å gi skjul til juvenile regnbueørret. Veksthastigheten var imidlertid mindre hos fisk i tankene med skjul. Landin har nylig skrevet flere manuskripter om dette arbeidet, som for tiden er til vurdering hos tidsskriftene.

Krav til miljøberikelse

Mattilsynet arbeider med forberedelser på å gjennomføre EUs nye forsøksdyrdirektiv 2010/63/EU. I utkast til ny forskrift, som er oversendt FKD og LMD, står det følgende om miljøberikelse:

'Alle dyr skal ha tilgang til arealer med tilstrekkelig kompleksitet for å kunne utøve et bredt spekter av normal atferd. For å redusere stressindusert atferd, skal dyrene gis mulighet til å kontrollere og velge sitt miljø. Oppdrettere, formidlere og brukere skal ta i bruk egnede berikingsmetoder som øker antallet aktiviteter dyrene har tilgang til, og som gir dem større mulighet til å mestre sin situasjon. Beriking kan oppnås gjennom fysisk trening, fødesøk og finmotoriske og kognitive aktiviteter som er egnet for arten. I dyreinnhegninger skal miljøberikelsen tilpasses dyrearten og individuelle behov. Berikingsprogram skal revideres og oppdateres regelmessig.'

Utforming av søknaden, valg av forsøksmetodikk

Det blir i stor grad opp til den som får oppdraget å velge forsøksmetodikk som passer til oppgaven, og dette kan innebære at den endelige søknaden vil beskrive samarbeid mellom flere forskningsinstitusjoner. Norecopa ser for seg løpende kontakt med den som får oppdraget. Det skrives en avtale mellom Norecopa og oppdragstakeren innen arbeidet begynner.

Referanser

Barton B.A. & Iwama G.K. (1991): Physiological changes in fish from stress in aquaculture with emphasis on the response and effects of corticosteroids. Annual Review of Fish Diseases 1, 3-26

- Landin et al., (2009): Welfare and enrichment criteria for fish used in research. SEB Poster presentation
- Mommsen T.P., Vijayan M.M. & Moon T.W. (1999): Cortisol in teleosts: dynamics, mechanisms of action, and metabolic regulation. *Reviews in Fish Biology and Fisheries* 9: 211-268
- Newberry R. C. (1995): Environmental enrichment: Increasing the biological relevance of captive environments. *Appl. Anim. Behav. Sci.* 44:229–243.
- Readman G. (2009) Husbandry and environmental enrichment. What do fish need and has there been much progress? Presentasjon ved et internasjonalt konsensusmøte, Harmonisation of the Care and Use of Fish in Research, Gardermoen 22.-24. september 2009. <http://www.norecopa.no/norecopa/vedlegg/Readman.pdf>
- Salvanes A.G.V., Moberg O., Ebbesson L.O.E., Nilsen T.O., Jensen K.H. & Braithwaite V.A. (2013): Environmental enrichment promotes neural plasticity and cognitive ability in fish. *Proc Roy Soc B* 280, 22 september 2013, no. 1767 20131331 (omtalt i <http://forskning.no/artikler/2013/august/363561>)
- Sørensen C., Johansen I.B. & Øverli Ø. (2013): Neural plasticity and stress coping in teleost fishes. *General and Comparative Endocrinology*, 181, 25–34.
- Stien L.H., Bracke M.B.M., Folkedal O., Nilsson J., Oppedal F., Torgersen T., Kittilsen S., Midtlyng P.J., Vindas M.A., Øverli Ø. & Kristiansen T.S. (2013): Salmon Welfare Index Model (SWIM 1.0): a semantic model for overall welfare assessment of caged Atlantic salmon: review of the selected welfare indicators and model presentation.
- Strand D.A., Utne-Palm A.C., Jakobsen, Braithwaite V.A., Jensen K.H. & Salvanes A.G.V. (2010): Enrichment promotes learning in fish. *Mar Ecol Prog Ser*, 412: 273-282.
- Øverli, Ø., Olsen, R.E., Løvik, F. & Ringø, E. (1999): Dominance hierarchies in Arctic charr, *Salvelinus alpinus* L.: differential cortisol profiles of dominant and subordinate individuals after handling stress. *Aquaculture Research* 30. 259-264.
- Aas-Hansen Ø., Johnsen H.K., Vijayan M.M. & Jørgensen E.H. (2003): Development of seawater tolerance and concurrent hormonal changes in fed and fasted Arctic charr at two temperature regimes. *Aquaculture*, 222: 135-148.

Vedlegg

Utdrag fra rapporten Fisk i forskning - miljøkrav og velferdsindikatorer hos fisk

Publisert av NFR i 2009.

<http://www.forskningsradet.no/servlet/Satellite?blobcol=urldata&blobheader=application%2Fpdf&blobheadername1=Content-Disposition%3A&blobheadervalue1=+attachment%3B+filename=Fiskiforskningweb.pdf&blobkey=id&blobtable=MungoBlobs&blobwhere=1274460435955&ss>

Det er ingen tradisjon for å tenke på tiltak for miljøberikelse i forsøksfiskenheter. Den teknologien som brukes i fiskeforsøk er i all hovedsak utstyr produsert for kommersiell produksjon. De fleste arter har en historie i kultur som begynner med forsøk i liten skala og under ekstensive forhold, der en bruker kunnskap om fiskens naturlige miljø for å lære seg å mestre reproduksjon og yngelproduksjon. Med økende kunnskapsnivå og grad av mestring går utviklingen gjerne raskt i retning av standard enheter uten hensyn til fiskens naturlige preferanser. Sirkelformede kar er dominerende, både i produksjon og i forskning, og av hensyn til renhold brukes glatte flater og minst mulig av innretninger som kan bryte strømningsbildet.

Det best dokumenterte eksemplet på bruk av miljøberikende innretninger i akvakultursammenheng er bruk av biomatter i klekkeenheter til laks, som gir en klar forbedring av resultater. Laksefisk i kar som er helt eller delvis dekket av lokk vil vise preferanse for skygge. Flatfisk setter tydelig pris på bunndekke av sand i karet, og det observeres at for eksempel kveite graver seg ned i sanden. Torsk er kjent for å være aktiv og rastløs i mær, noe som bl.a. kan gi utslag i at den biter i stykker notveggen. Det diskuteres om torsk i mær kan ha nytte av innretninger som lar den finne utløp for aggresjon og aktivitetstrang.

Samtidig er det flere betenkeligheter knyttet til miljøberikende tiltak i form av tekniske innretninger. Enhver installasjon i karet medfører fare for mekanisk skade som følge av kollisjoner, sammenstøt eller oppskraping. Hud og slimlag hos fisk er langt mer sårbar enn for eksempel pelsen hos et pattedyr. I mange sammenhenger er det også en vedvarende strøm i vannet, og fisken tvinges til konstant bevegelse. De fleste fiskeslag reagerer også på nærmest enhver ytre påvirkning med fluktreaksjon, det vil si svømming med stor hastighet uten retning, og i slike situasjoner økes faren for sammenstøt. Enhver innretning som bryter vannstrømmen påvirker også strømningsbildet i karet, og kan hindre for eksempel selvrensing. Innretninger i karet medfører fare for groing og hindre renhold. Bunndekke i form av for eksempel sand kan påvirke det mikrobielle miljøet, og gi problemer med avløp.

Det er derfor mange hensyn som må tas, og mange av disse momentene er spesifikke for fisk. I forsøkssammenheng som retter seg inn mot akvakultur er det også viktig at miljøet for fisken i forsøk er relevant for det miljøet resultatene skal brukes i. På den ene siden tilsier dette en viss tilbakeholdenhet i forhold til å introdusere nye elementer i forsøksenheter, men på den andre siden ligger det et potensial for å utvikle forbedringer i forsøksenheter som kan komme kommersiell produksjon til nytte.

Det er grunn til å vurdere spesifikt potensialet for bruk av miljøberikende tiltak i forsøksenheter for fisk. Studier av atferd hos arten i naturlige omgivelser bør sammenholdes med atferd i karener, med tanke på å identifisere viktige forskjeller som kan videreutvikles til miljøberikende tiltak. Samtidig bør det være mulig å dra vekslers på kunnskap som er opparbeidet i akvariehold, i forhold til metoder og tiltak som er i bruk her. Enkle preferansestudier som bygger på slike observasjoner vil kunne øke forståelsen av

hvilke tiltak som er formålstjenlige, og praktisk mulige å gjennomføre. Samtidig er det behov for forskning på hvordan man kan redusere negative konsekvenser av miljøberikelse.

Harmonisering av karmiljø er det viktigste tiltaket for å redusere variasjon mellom kar, ofte kalt kareffekt. Redusert variasjon mellom kar øker presisjonen i observasjonene, og derigjennom verdien av forsøket (økt refinement). Oppsett som gir høy reproducerbarhet mellom kar (liten kareffekt) kan gi sikre observasjoner ved bruk av færre replika (reduksjon) enn oppsett som skjemmes av store kareffekter.

Mange av de miljøfaktorene det er viktig å harmonisere er kjente faktorer. Forskjellene mellom kar kan være godt innenfor artens toleranseområde, og ville ha vært ubetydelige i produksjonssammenheng, men de kan likevel bidra til unødvendig støy i forsøksoppsett og uforklarlig variasjon i resultater. Vannkvalitet og vanntilførsel til forsøksenheter byr på spesielle utfordringer i denne sammenhengen. Det må sikres samme vannkvalitet i alle enheter, med tanke på for eksempel gassmetning og temperatur. Ved tilsetning av oksygen til kar med høye biomasse og god vekst kan selv små forskjeller i tilvekst gi ulik oksygenmetning. På samme måte kan forskjeller i vannutskiftning gi forskjeller i CO₂-nivå i karvannet, og små vannmengder gjennom rør av liten diameter kan gi temperaturfall før vannet når karet. En lite påaktet faktor er vannhastighet. Ved samme vannutskiftning kan strømningsbildet i karet være svært ulikt, avhengig av utforming og justering av innløp og utløp. Høy vannhastighet gir påtvunget høy svømmehastighet, og lite er kjent om hvor grensene går, mens lav vannhastighet påvirker på den andre siden fiskens sosiale interaksjoner. Det må også gjøres valg med hensyn til lys. Bakgrunnsbelysning fra tak kan gi ulike lysnivå og forskjeller i skyggevirking i kar. Bruk av separate lyskilder for hvert kar er et alternativ, men gamle og nye pærer kan gi ulikt lys, selv om de i utgangspunktet er av samme type.

Effekten av andre ytre påvirkninger som for eksempel menneskelig aktivitet er vanskeligere å definere, og må sannsynligvis studeres som stresseffekter. I en forsøksavdeling må det forventes et høyt aktivitetsnivå både i forbindelse med røkt og stell, og i forbindelse med ulike forsøksaktiviteter som forsøksstart og prøveuttak. De fleste fiskeslag som er aktuelle for forsøk blir lett forstyrret av menneskelig aktivitet, selv om det også er forskjeller i tamhet mellom ulike populasjoner innen en art. I en fiskeavdeling vil en likevel få fluktreaksjoner hos fisken hver gang et menneske passerer, og den totale belastningen for hvert kar vil påvirkes av karetts plassering i forhold til gangveier, arbeidsbenker osv. Fra kommersielt oppdrett er det bl.a. rapportert om erfaringer med at oransje kjeledresser forstyrrer fisken mer enn klær av mørk farge! Andre ytre påvirkninger som støy og vibrasjoner kan være vanskelig å unngå, og utfordringen blir å sikre mest mulig lik belastning for alle enheter. Det finnes erfaringer for at banale ting som at vedvarende kondensdrøpp i kar har påvirket forsøksresultater.

Behovet for nøyaktighetsgrad når det gjelder harmonisering vil variere med forsøksformålet for mange av disse parametrene. På de fleste av disse områdene eksisterer det også betydelig uformell kompetanse omkring på forsøksavdelingene, men det finnes ingen felles standarder. Slike spørsmål er også lite diskutert i de fiskeforskningsrelaterte fagmiljøene, til forskjell fra situasjonen i andre forsøksdyravdelinger.

Det bør gjennomføres en sammenliknende studie av atferd under naturlige forhold og i kar hos noen aktuelle arter, med tanke på å identifisere trekk ved naturlig atferd som ikke dekkes i kar. Relevant kunnskap fra akvariehold bør oppsummeres og spilles inn i dette arbeidet.