

**Reaktionen von Afrikanischen Elefanten (*Loxodonta africana*) auf
verschiedene Aspekte des Zoomanagements im Hinblick auf Stress und
Wohlbefinden unter Berücksichtigung der individuellen
Variation**

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades

der Naturwissenschaften

vorgelegt beim Fachbereich Biowissenschaften

der Johann Wolfgang Goethe-Universität

in Frankfurt am Main

von

Susan Hambrecht

aus Heidelberg

Frankfurt 2020

(D 30)

Vom Fachbereich Biowissenschaften der
Johann Wolfgang Goethe-Universität als Dissertation angenommen.

Dekan: Prof. Dr. Sven Klimpel

Gutachter: Prof. Dr. Paul W. Dierkes

Zweitgutachter: Prof. Dr. Manfred Kössl

Datum der Disputation:

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	I
Abkürzungsverzeichnis	II
Zusammenfassung	1
1 Hintergrund.....	3
1.1 Stress	5
1.1.1 Die Wahrnehmung des Stressors.....	6
1.1.2 Die Stressantwort	6
1.1.3 Auswirkungen der Stressantwort auf den Organismus	8
1.2 Die Aktivität der HPA-Achse: Zeitliche Rhythmen und stressbedingte Schwankungen der Cortisolsekretion.....	9
1.2.1 Zeitliche Rhythmen der Cortisolsekretion	10
1.2.2 Stressbedingte Cortisolsekretion	11
1.2.3 Ursachen der Variation in der akuten Cortisolantwort.....	11
1.3 Das Management von Stress und Wohlbefinden bei Tieren in Menschenobhut	15
1.3.1 Persönlichkeit	18
1.3.2 Umweltanreicherung (<i>environmental enrichment</i>)	20
1.3.3 Training	23
2 Umfang der Arbeit	29
2.1 Publikation A: Diurnal variation of salivary cortisol in captive African elephants (<i>Loxodonta africana</i>) under routine management conditions and in relation to a translocation event	29
2.2 Manuskript B: Stress in the management of African elephants under human care? Salivary cortisol responses to positive reinforcement training and novel enrichment objects in captive African elephants (<i>Loxodonta africana</i>).....	30
2.3 Manuskript C: Individual variation and repeatability of the behavioral response to novel objects in captive African elephants (<i>Loxodonta africana</i>).....	30
3 Methodik.....	31
3.1 Tiere, Haltung und Management	31
3.2 Managementsituationen	33
3.2.1 Transport (Publikation A)	33
3.2.2 Neuartiges Enrichmentobjekt (<i>Novel Object Test</i> , NOV) (Manuskript B und C).34	
3.2.3 Positives Verstärkungstraining (<i>positive reinforcement training</i> , PRT) (Manuskript B)	34
3.3 Cortisoluntersuchung	35
3.3.1 Auswahl des Probenmaterials	35
3.3.2 Entnahme der Speichelproben.....	36
3.3.2.1 Transport (Publikation A).....	36

3.3.2.2	Diurnale Variation der Cortisolsekretion (Publikation A) und Cortisolantwort auf die Managementsituationen PRT und NOV (Manuskript B).....	37
3.3.3	Cortisolanalyse.....	37
3.4	Untersuchung des Verhaltens im <i>Novel Object Test</i> (Manuskript C)	38
3.5	Datenverarbeitung und -analyse	40
4	Ergebnisse	42
4.1	Publikation A: Diurnal variation of salivary cortisol in captive African elephants (<i>Loxodonta africana</i>) under routine management conditions and in relation to a translocation event.....	42
4.2	Manuskript B: Stress in the management of African elephants under human care? Salivary cortisol responses to positive reinforcement training and novel enrichment objects in captive African elephants (<i>Loxodonta africana</i>)	43
4.3	Manuskript C: Individual variation and repeatability of the behavioral response to novel objects in captive African elephants (<i>Loxodonta africana</i>).....	43
5	Diskussion.....	45
5.1	Stress und Wohlbefinden.....	46
5.2	Reaktives und proaktives Management von Stress und Wohlbefinden	49
5.3	Herausforderungen und Möglichkeiten der Cortisolmessung aus Speichel und des <i>Novel Object Tests</i>	51
5.3.1	Die Unterstützung der Forschung durch Zoopersonal	51
5.3.2	Die Kontrolle von Störvariablen.....	52
5.3.3	Cortisolmessung aus Speichel	53
5.3.4	<i>Novel Object Test</i>	55
6	Schlussfolgerung.....	59
7	Literaturverzeichnis	60
	Danksagung	83
	Lebenslauf.....	85
	Anhang	87
	Publikation A.....	87
	Manuskript B.....	100
	Manuskript C.....	145

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Modell der biologischen Antwort von Tieren auf Stress nach Moberg (2000)....	5
Abbildung 2: Die Stressantwort des sympathischen Nervensystems und des neuroendokrinen Systems bei Säugetieren.	7
Abbildung 3: Zeitverlauf der Cortisolantwort auf einen akuten, milden Stressor (durchgezogene Linie) und einen schweren und/oder chronischen Stressor (gestrichelte Linie).	12
Abbildung 4: Beispiele für <i>environmental enrichment</i> der Elefanten.	22
Abbildung 5: Beispiele für Interaktionen zwischen Pfleger und Elefant auf der Basis von Training durch Verstärkung.....	27
Abbildung 6: Experimenteller Aufbau, in die Studien einbezogene Zoos und Tiere sowie Untersuchungszeiträume.	32
Abbildung 7: Gleichgewichtszustand der Immunreaktion zwischen Antikörper, Antigen und markiertem Antigen eines Enzymimmunoassays (EIA).	37
Abbildung 8: Kamerapositionen an den Testarenen des <i>Novel Object Tests</i>	39
Abbildung 9: Beispiele für das Verhalten <i>High-Interest-Activity</i> (HIA) im <i>Novel Object Test</i> bei verschiedenen Elefanten.	39

Abkürzungsverzeichnis

Ab	Antibody, Antikörper
ACTH	adrenocorticotropes Hormon
Ag	unmarkiertes Antigen
Ag*	markiertes Antigen
BIAZA	British and Irish Association of Zoos and Aquariums
BMEL	Bundesministerium für Ernährung und Landwirtschaft
CORT0, CORT10, etc.	Cortisolkonzentration zu einem bestimmten Zeitpunkt, z.B. bei 0 min (CORT0), 10 min (CORT10), etc.
CRH	Corticotropin-Releasing-Hormon
EAZA	European Association of Zoos and Aquaria
EIA	Enzymimmunoassay
FC	free contact, freier Kontakt
GLMM	general linear mixed model, allgemeines lineares gemischtes Modell
HIA	High-Interest-Activity
HPA-Achse	Hypothalamus-Hypophysen-Nebennierenrinden-Achse
LMM	linear mixed model, lineares gemischtes Modell
NOV	Novel Object Test, neuartiges Enrichmentobjekt
OUT	out of view
PC	protected contact, geschützter Kontakt
PRT	positive reinforcement training, positives Verstärkungstraining
SNS	sympathisches Nervensystem

Zusammenfassung

In welchen Situationen steht ein Tier unter Stress und wie beeinflusst Stress dessen Wohlbefinden? Dies sind die Kernfragen, mit denen Zoos konfrontiert sind, wenn es darum geht, den Bedürfnissen ihrer Tiere gerecht zu werden. Die Beantwortung dieser Fragen ist jedoch angesichts der großen individuellen Variabilität des Inputs, der Stress hervorrufen kann, und des Outputs, der das Wohlbefinden bestimmt, eine Herausforderung. Um diese Herausforderung zu meistern, brauchen Zoos Kenntnisse darüber, welche Haltungsbedingungen und Managementsituationen Verhaltens-, physiologische oder emotionale Veränderungen hervorrufen, sowohl positive als auch negative. Dies trifft insbesondere auf Arten zu, die aufgrund ihrer Biologie und des großen öffentlichen Interesses große Anforderungen an das Management in Menschenobhut stellen, wie den Afrikanischen Elefanten. Die vorliegende Arbeit hatte daher das Ziel, unter Berücksichtigung der individuellen Variation die Auswirkungen bestimmter Managementsituationen auf physiologischen Stress und das Wohlbefinden der Tiere zu evaluieren.

Für diese Arbeit wurden zehn Afrikanische Elefanten aus drei Zoos im Rahmen eines Experiments in 2016 und 2017 mehrmals untersucht. Dieses Experiment umfasste zum einen die Messung von physiologischem Stress auf der Basis der Konzentration des „Stresshormons“ Cortisol im Speichel der Elefanten. Zu diesem Zweck wurden an bestimmten Tagen und zu folgenden Zeitpunkten Speichelproben entnommen: morgens, nachmittags vor und mehrmals nach einer von zwei Managementsituationen (positives Verstärkungstraining [PRT] und neuartiges Enrichmentobjekt [NOV]). Zum anderen diente die Exposition gegenüber dem neuartigen Enrichmentobjekt als sogenannter *Novel Object Test*. Dieser Standardtest der Persönlichkeitsforschung bei Tieren deckte bei anderen Arten konsistente Verhaltensunterschiede zwischen Individuen auf. Um zu untersuchen, ob dies auch auf Afrikanische Elefanten zutrifft, wurden die individuellen Verhaltensreaktionen auf das neuartige Objekt aufgezeichnet. Darüber hinaus wurden unabhängig von dem Experiment vor und nach einem Transport jeweils morgens und nachmittags Speichelproben von dem transferierten Tier und von zwei Tieren im Bestimmungszoo gesammelt, um den Effekt dieses potenziellen Stressors auf die individuellen Cortisolspiegel zu untersuchen.

Publikation A zeigt, dass die Elefanten unter den Bedingungen des Routinemanagements (das heißt dem routinemäßigen Tagesablauf der Tierpflege) am Morgen signifikant höhere Cortisolwerte im Speichel aufwiesen als am Nachmittag. Diese diurnale Variation der Cortisolsekretion ist typisch für tagaktive Arten und wurde daher auch für die untersuchten Elefanten erwartet. Unter Stressbedingungen wurde weder ein signifikanter Unterschied zwischen den Cortisolspiegeln vor und nach dem Transport noch zwischen den Cortisolwerten am Morgen

und am Nachmittag festgestellt. Der prozentuale Unterschied zwischen dem morgendlichen und nachmittäglichen Cortisolspiegel war jedoch beim transferierten Tier nach dem Transport wesentlich geringer als vor dem Transport, was möglicherweise auf eine Stressreaktion auf den Transport und die Eingewöhnung im neuen Zoo hindeutet. Darüber hinaus zeigten sich deutliche Cortisolanstiege unmittelbar nach der ersten Zusammenführung des transferierten Tiers mit dem Bullen im neuen Zoo. Dieses Ergebnis demonstriert zum einen, dass Cortisol physiologischen Stress widerspiegelt. Zum anderen zeigt es die Notwendigkeit, zeitnah nach einem Stressor Speichelproben zu entnehmen, was nach dem Transport nicht möglich war.

Die Studie in Manuskript B zeigt unterschiedliche durchschnittliche Zeitverläufe der Cortisolantworten im Speichel auf die Managementsituationen PRT und NOV. PRT könnte aufgrund des beobachteten cortisolsenkenden und damit potenziell stresspuffernden Effekts förderlich für das Wohlbefinden sein. NOV induzierte im Mittel eine moderate, kurzfristige Cortisolantwort. Dies deutet darauf hin, dass die Tiere geringem physiologischem Stress ausgesetzt waren, mit dem sie jedoch erfolgreich umgehen konnten. Außerdem bestand eine bemerkenswerte individuelle Variation in den Cortisolverläufen in derselben Situation. Die Unterschiede im Cortisolspiegel zwischen den Tieren hingen mit dem Alter (bei NOV) und dem Zoo (bei PRT) zusammen. Der Effekt des Geschlechts und des Haltungssystems auf den Cortisolspiegel war hingegen variabel. Die Ergebnisse der Studie zeigen, dass die individuelle Variation der Cortisolsekretion unbedingt berücksichtigt werden muss, um physiologischen Stress zuverlässig zu erkennen.

Die Studie in Manuskript C ergab, dass sich die untersuchten Tiere im *Novel Object Test* konsistent in ihrem Verhalten gegenüber einem neuartigen Objekt unterschieden. Dieses Ergebnis zeigt, dass der *Novel Object Test* auch bei Elefanten genutzt werden kann, um die Persönlichkeit der Tiere zu untersuchen. Da die Persönlichkeit nachweislich Stress und Wohlbefinden unter bestimmten Haltungsbedingungen bestimmt, können die aus dem *Novel Object Test* gewonnenen Erkenntnisse diversen Managemententscheidungen bezüglich des individuellen Wohlbefindens, zum Beispiel der Umweltanreicherung, zugrunde liegen.

Zusammenfassend können die Erkenntnisse dieser Arbeit zum einen die Interpretation von Schwankungen im Speichelcortisol im Hinblick auf physiologischen Stress und Wohlbefinden beim Afrikanischen Elefanten unterstützen. Zum anderen zeigen sie die Nützlichkeit des *Novel Object Tests* zur Einschätzung der Persönlichkeit von Elefanten. Kenntnisse über die Persönlichkeit ermöglichen es, Verhaltensunterschiede zwischen Tieren richtig zu interpretieren und proaktiv im Management zu berücksichtigen, um das individuelle Wohlbefinden zu gewährleisten.

1 Hintergrund

Bedenken über das Wohlbefinden von Tieren (Tierwohl, *animal welfare*) prägen zunehmend die Ansichten der Haltung von Tieren zur Nahrungsproduktion, Forschung und in Zoos (Hosey et al., 2011; Meehan et al., 2016). Die Mitgliedzoos des Europäischen Zooverbands (*European Association of Zoos and Aquaria*, EAZA) verpflichten sich das Wohlbefinden ihrer Tiere zu gewährleisten (EAZA, 2020a). Zoos sind außerdem auf das Wohlbefinden ihrer Tiere angewiesen, um ihre Mission zu erfüllen: Nur Tiere, die körperlich und mental gesund sind bzw. aussehen, fördern positive Emotionen bei den Besuchern und die Sensibilisierung der Besucher für den Artenschutz (Hosey et al., 2011; Meehan et al., 2016). Zoos stehen daher vor der Herausforderung, wie die Haltungspraktiken weiter verbessert werden können, um das Wohlbefinden der Tiere zu gewährleisten bzw. zu fördern. Entsprechende Entscheidungen können jedoch nur nachhaltig das Wohlbefinden verbessern, wenn diese auf einer wissenschaftlichen Grundlage erfolgen (Melfi, 2009).

Animal welfare ist definiert als „der Zustand eines Tieres im Hinblick auf seine Versuche, mit seiner Umwelt zurechtzukommen“ (Broom, 1986). Das heißt, das Wohlbefinden eines Tieres hängt davon ab, wie umfangreich diese Versuche sein müssen und wie erfolgreich sie letztendlich sind (Hemsworth und Barnett, 2000). Ein wichtiger Aspekt dieser Definition ist, dass es sich dabei um einen subjektiven Zustand handelt, der sowohl durch die physiologische und psychologische Verfassung als auch durch die Persönlichkeit des Tieres (siehe 1.3.1) bestimmt wird. Folglich kann sich das Wohlbefinden zwischen Individuen derselben Art unterscheiden, sogar wenn sie denselben Bedingungen ausgesetzt sind (Hosey et al., 2011). Die Wissenschaft des Wohlbefindens von Tieren (*animal welfare science*) im Zoo hat das Ziel, die Zooumwelt so zu gestalten, dass das Wohlbefinden der Tiere optimal gefördert wird (Meehan et al., 2016). Dies erfordert verlässliche Indikatoren, um einzuschätzen, welche Haltungsbedingungen und -situationen bei welchen Individuen Verhaltens-, physiologische oder emotionale Veränderungen hervorrufen (Meehan et al., 2016; Melfi, 2009). Da das Stressniveau häufig mit dem Wohlbefinden eines Tieres korreliert (Romero, 2004), werden in vielen Fällen physiologische Reaktionen gemessen, die auf Stress (siehe 1.1) hindeuten, wie Veränderungen des Glucocorticoidspiegels (Moberg, 2000; Ralph und Tilbrook, 2016; siehe 1.2).

Bisher liegt der Schwerpunkt auf der Feststellung geringen Wohlbefindens, das heißt jene Situationen zu erkennen und wenn möglich zu vermeiden, die das Tier nicht erfolgreich bewältigen kann (Melfi, 2009). Typische Indikatoren dafür sind das Auftreten von abnormalem Verhalten (zum Beispiel Birkett und Newton-Fisher, 2011) und erhöhte Glucocorticoidspiegel (zum Beispiel Pearson et al., 2015). Die Abwesenheit schlechten körperlichen Befindens und

negativer (emotionaler) Erfahrungen ist jedoch nicht gleichzusetzen mit gutem Wohlbefinden; dieses kann erst durch positive emotionale Zustände erreicht werden (Boissy et al., 2007; Yeates und Main, 2008). Daher wird nun zunehmend untersucht, wie positive emotionale Zustände bei Tieren entstehen, wie diese sich in Verhalten und Physiologie äußern und wie diese gefördert werden können (Boissy et al., 2007; Melfi, 2009).

Die Haltung von Elefanten ist in zweierlei Hinsicht eine Herausforderung für Zoos: Zum einen sind Elefanten bei Besuchern beliebte Zootiere (Skibins et al., 2017). Deren Wohlbefinden steht daher ganz besonders im Fokus der Öffentlichkeit (zum Beispiel Rüth, 2018). Zum anderen stellen Elefanten aufgrund der Kombination aus Größe, anspruchsvoller Sozialstruktur (Archie et al., 2006; Evans und Harris, 2008), hoch entwickelten kognitiven Fähigkeiten (Bates et al., 2008; Polansky et al., 2015) und der Herkunft aus subtropischen bis tropischen Regionen enorme Ansprüche an die Haltung in Menschenobhut (Veasey, 2006). Das Wohlbefinden von Zooelefanten und die ethische Rechtfertigung, diese Arten in Zoos zu halten, wird daher immer wieder diskutiert (Kreger und Hutchins, 2010). Um diese Debatte auf einer wissenschaftlichen Grundlage zu führen, braucht es Studien, die erforschen, wie Zoos den Bedürfnissen von Elefanten gerecht werden können. Zum Beispiel untersuchte eine kürzlich veröffentlichte Studienreihe (zusammengefasst in Meehan et al., 2016) anhand eines epidemiologischen Ansatzes den Status quo von Haltungsbedingungen und Management von Elefanten in nordamerikanischen Zoos und brachte diesen mit Indikatoren des Wohlbefindens in Verbindung. Die Autoren schlossen aus ihren Ergebnissen, dass entsprechend der Biologie von Elefanten unter anderem die Haltung in stabilen sozialen Gruppen sowie eine abwechslungsreiche Beschäftigung und Fütterung das Wohlbefinden der Tiere begünstigt. Aus ethischer Sicht stellt sich die Frage, ob der Wert der Zooelefanten für Erholung, Bildung, Artenschutz und Forschung (die vier Hauptaufgaben von Zoos) eine Beeinträchtigung des individuellen Wohlbefindens rechtfertigt. Kreger und Hutchins (2010) erläutern den großen Wert von Zooelefanten für die Erfüllung dieser Aufgaben, lassen die Beantwortung dieser Frage jedoch angesichts der Emotionalität und Komplexität der Thematik verständlicherweise offen.

Im Gegensatz zu den oben genannten epidemiologischen Studien verfolgt die vorliegende Arbeit einen experimentellen Ansatz. Die drei Teilstudien untersuchten gezielt die Auswirkungen bestimmter Managementsituationen auf den Spiegel des Cortisols, des wichtigsten Glucocorticoids bei Afrikanischen Elefanten (Publikation A und Manuskript B) bzw. auf das Verhalten (Manuskript C), um die Bedeutung dieser Situationen für das Wohlbefinden zu bewerten.

1.1 Stress

Stress ist ein häufig verwendetes, aber meistens nur unzureichend definiertes Konzept in der Biologie (Reeder und Kramer, 2005). Daher gibt dieses Kapitel zunächst eine Einführung in das Stressmodell der vorliegenden Arbeit. Es handelt sich dabei um das Modell von Moberg (2000), das in Abbildung 1 dargestellt ist. Darin bezeichnet Stress einen Zustand, in dem die Homöostase eines Organismus gestört ist (Moberg, 2000). Dieser Zustand lässt sich in drei Phasen unterteilen: die Wahrnehmung der Ursache des Stressors (Stressor genannt), die Bekämpfung des Stressors und die Konsequenzen dieser Stressantworten. Stress hat somit eine sehr wichtige biologische Funktion: Stress ist adaptiv, das heißt er vermittelt die Anpassung des Organismus an kurzfristige Umweltveränderungen.

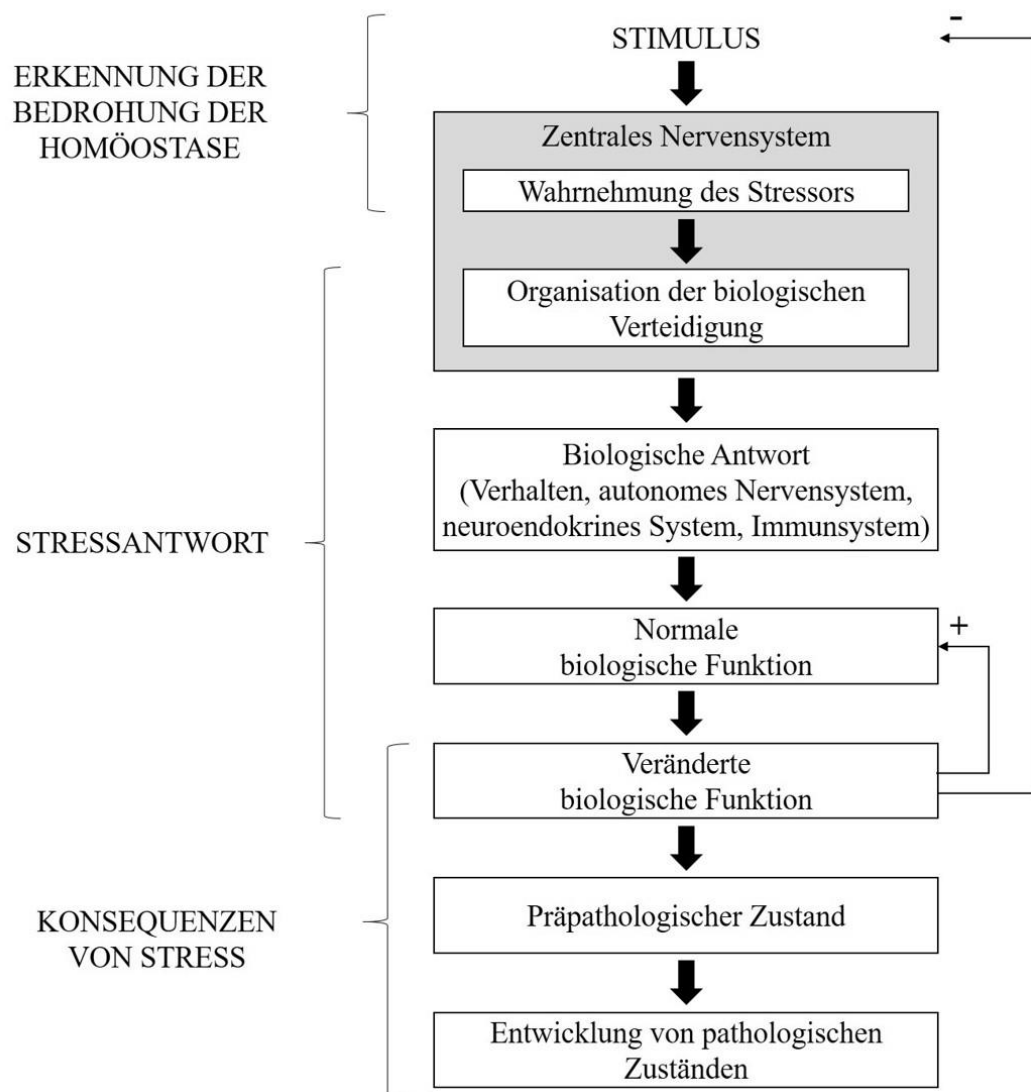


Abbildung 1: Modell der biologischen Antwort von Tieren auf Stress nach Moberg (2000).

1.1.1 Die Wahrnehmung des Stressors

Stress besteht sobald das zentrale Nervensystem des Individuums den Stressor wahrnimmt. Diese Reize, Situationen oder allgemein Herausforderungen, die die Homöostase stören, können sowohl physiologischen (zum Beispiel Hypoglykämie: Beerda et al., 1996) als auch psychologischen (psychosozialer Stressor: Kirschbaum et al., 1993; Räuberdruck: Sheriff et al., 2009; positive und negative affektive Zustände: Ralph und Tilbrook, 2016) Ursprungs sein. Dabei spielt die Bedrohlichkeit der jeweiligen Situation für den Organismus keine Rolle (Moberg, 2000); es kommt nur darauf an, dass die Situation unter den gegebenen Umständen als Stressor empfunden wird.

1.1.2 Die Stressantwort

Der Organismus reagiert auf einen Stressor mit einer Reihe von Verhaltens- und physiologischen Stressantworten, die durch verschiedene neuroanatomische Strukturen und periphere Organe vermittelt werden (Reeder und Kramer, 2005). Nach Moberg (2000) können diese Stressantworten in vier Hauptkategorien unterteilt werden: Verhaltensantwort, Antwort des autonomen Nervensystems, neuroendokrine und immunologische Antwort.

Die Verhaltensantwort auf akute (kurzfristige) Stressoren, die Angst hervorrufen, leitet sich häufig von dem Verhalten zur Räubermeidung ab, wie erhöhte Aufmerksamkeit und Vermeidung des Stressors (Rushen, 2000). Länger andauernde Stressoren können sich in einer Änderung des Verhaltensbudgets in zeitlicher und räumlicher Hinsicht äußern (Boonstra et al., 1998; Hik, 1994; Jachowski et al., 2012).

Die Stressantworten des Sympathikus des autonomen Nervensystems (SNS) und der Hypothalamus-Hypophysen-Nebennierenrinden-Achse (HPA-Achse) des neuroendokrinen Systems sind in Abbildung 2 dargestellt und werden im Folgenden basierend auf Reeder und Kramer (2005) zusammengefasst. Die Stressantwort des SNS erfolgt fast unmittelbar. Der Hypothalamus projiziert zum Rückenmark und induziert dadurch die Freisetzung der Catecholamine Noradrenalin (aus den Spinalnerven) und Adrenalin (aus dem Nebennierenmark). Diese Neurohormone vermitteln die sogenannte Kampf-oder-Flucht-Reaktion, indem sie zum einen durch die Erhöhung der Herzfrequenz und des Blutdrucks den Organismus in erhöhte Erregung versetzen. Zum anderen stellen sie durch die Förderung des Abbaus von Glycogen zu Glucose (Glycogenolyse) und der Aufspaltung von Fetten (Lipolyse) Energie bereit. Der Parasympathikus bewirkt schließlich die Herunterregulierung dieser Stressantwort. Die am besten untersuchte neuroendokrine Stressantwort ist die erhöhte Aktivität der HPA-Achse (Matteri et al., 2000). Wie von Reeder und Kramer (2005) zusammengefasst, aktiviert der Hypothalamus diese

Hormonkaskade durch die Ausschüttung des Corticotropin-Releasing-Hormons (CRH) und anderer Releasing-Hormone. CRH wiederum bewirkt die Freisetzung des adrenocorticotropen Hormons (ACTH) aus der Hypophyse. Neben ACTH schüttet die Hypophyse auch Prolactin sowie β -Endorphin aus. Ersteres spielt eine Rolle bei der Unterdrückung der Fortpflanzung, letzteres wirkt schmerzstillend. ACTH induziert schließlich die Abgabe von Glucocorticoiden (Cortisol bei den meisten Säugetieren, Corticosteron bei Nagetieren und Vögeln) aus der Nebennierenrinde ins Blut.

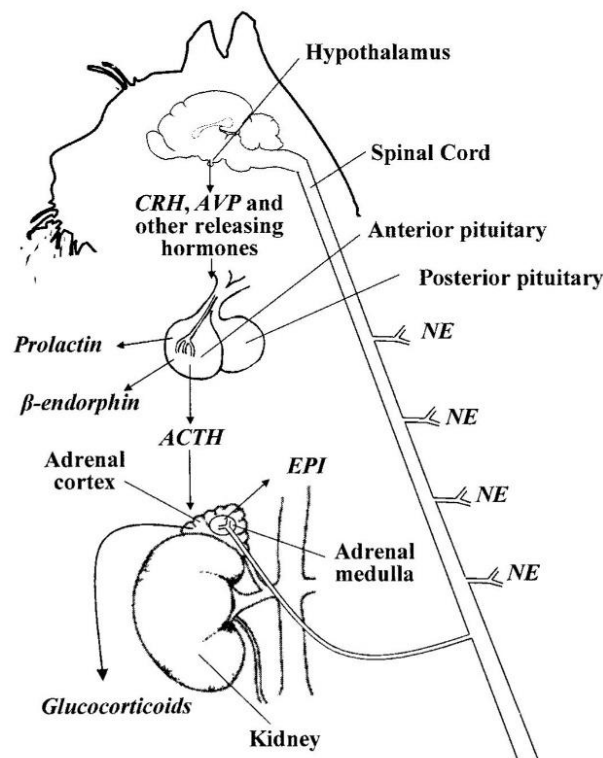


Abbildung 2: Die Stressantwort des sympathischen Nervensystems und des neuroendokrinen Systems bei Säugetieren.

Beschreibung siehe Text. CRH=Corticotropin-Releasing-Hormon, AVP=Arginin-Vasopressin, ACTH=adrenocorticotropes Hormon, NE=Noradrenalin, EPI=Adrenalin. Übernommen von Reeder und Kramer (2005).

Obwohl die HPA-Achse zeitgleich mit dem SNS aktiviert wird, werden ACTH und Glucocorticoide einige Minuten später freigesetzt als Noradrenalin und Adrenalin. Während letztere die sofortige Bereitstellung von Energie ermöglichen, haben Glucocorticoide längerfristige und breiter gefächerte Wirkungen auf den Körper (Sapolsky et al., 2000). Glucocorticoide sind

Steroidhormone, die eine Vielzahl von Körperfunktionen regulieren, einschließlich des Energiestoffwechsels, der Fortpflanzung und des Immunsystems (Moberg, 2000). Die Antwort des Immunsystems auf Stress äußert sich in einer erhöhten Anfälligkeit für Krankheiten. Es wird vermutet, dass Catecholamine und Glucocorticoide bei dieser Unterdrückung des Immunsystems während Stress eine Rolle spielen (Blecha, 2000; Padgett und Glaser, 2003).

Die Stressantwort ist keine unspezifische Reaktion des Organismus, die stets alle der vier beschriebenen Kategorien umfasst, sondern variiert je nach Typ des Stressors und verschiedenen individuellen Faktoren (zum Beispiel Alter, psychologischer Zustand und genetische Ausstattung) (Moberg, 2000, siehe 1.2.3). Zum Beispiel unterscheiden sich die Zeitverläufe von Adrenalin, Noradrenalin und Glucocorticoiden in Abhängigkeit von dem psychologischen Zustand des Individuums (de Boer et al., 1990). Wie bereits im Kontext der Wahrnehmung des Stressors erwähnt, ist es nicht der, aus menschlicher Sicht bewertete, Grad der Bedrohlichkeit, der das Stressniveau bestimmt. Sowohl schädliche als auch positive Situationen können vergleichbare Stressantworten auslösen (Boissy et al., 2007; Colborn et al., 1991).

1.1.3 Auswirkungen der Stressantwort auf den Organismus

Erst die Folgen der Stressantwort für die biologischen Funktionen des Organismus bestimmen, ob Stress das Wohlbefinden beeinträchtigt (Moberg, 2000). Der Unterschied zwischen adaptivem und schädlichem Stress (Distress) liegt in dem Ausmaß der biologischen Kosten, die mit der Bewältigung des Stressors einhergehen. Diese Kosten werden von der Dauer der Erholung von den Folgen der Stressantwort mitbestimmt. Stress besteht so lange bis die biologischen Kosten wieder ausgeglichen sind. Erst dann ist die Homöostase wiederhergestellt.

Adaptiver Stress geht nur mit geringen biologischen Kosten einher, da diese durch sich schnell regenerierende Reserven an biologischen Ressourcen abgedeckt werden können, ohne die biologischen Funktionen zu beeinträchtigen. Distress besteht, wenn die Bewältigung von Stress die Reserven übersteigt und Energie von wichtigen biologischen Funktionen abgezogen werden muss. Dies verlängert die Erholungsphase und erhöht die biologischen Kosten, was zu der Entwicklung von pathologischen Zuständen führen kann (Moberg, 2000). Dazu gehören Erkrankungen des Herz-Kreislaufsystems (Gregory, 2004), erhöhte Anfälligkeit für Krankheiten (Aich et al., 2009), Beeinträchtigung des Wachstums (Santos et al., 2000), Unterdrückung der Fortpflanzung (Young et al., 2006) und Entwicklung abnormaler Verhaltensweisen, wie Selbstverstümmelung (Davenport et al., 2008). Distress kann sowohl infolge von kurzfristigem (akutem) als auch langfristigem (chronischem) Stress entstehen (Moberg, 2000; Ralph und Tilbrook, 2016). Akuter Stress kann schädlich sein, wenn er wichtige biologische Funktionen

unterbricht (zum Beispiel im Fortpflanzungszyklus: Dobson et al., 1999) oder kurzfristig Energieressourcen abzieht, die für wichtige biologische Funktionen benötigt werden (zum Beispiel während des Wachstums: Hemsworth et al., 1981). Distress aufgrund von chronischem Stress entsteht entweder durch einen langfristigen Stressor oder durch die Aneinanderreihung mehrerer gleich- oder verschiedenartiger akuter Stressoren (Boonstra et al., 1998; Ladewig, 2000). In all diesen Fällen hat der Organismus keine Möglichkeit zur zeitnahen Erholung von dem stressbedingt erhöhten Bedarf an Ressourcen und die biologischen Kosten akkumulieren sich. Schließlich kann milder dauerhafter Stress, der an sich keine negativen Folgen hat, jedoch die Reserven aufbraucht, den Organismus angreifbar für weitere Stressoren machen (Moberg, 2000). Die Kosten der Antworten auf diesen sekundären Stressor können dann nur durch die Umleitung der Ressourcen anderer biologischer Funktionen gedeckt werden, was letztendlich zu Beeinträchtigungen dieser Funktionen führen kann.

1.2 Die Aktivität der HPA-Achse: Zeitliche Rhythmen und stressbedingte Schwankungen der Cortisolsekretion

Die HPA-Achse ruht nicht auf einem konstanten Aktivitätsniveau „in Erwartung“ eines Stressors, sondern zeigt eine nach zeitlichen Rhythmen schwankende Basisaktivität. Entsprechend fluktuiert auch der Cortisolspiegel in zeitlich vorhersagbarer Art und Weise in einem oftmals circadianen Rhythmus (Kalsbeek et al., 2012). Die Stressantwort der HPA-Achse überdeckt diese Grundaktivität durch akute Cortisolanstiege. Sowohl die Basisaktivität als auch die akute Cortisolantwort werden durch das negative Feedback des Cortisols auf die ersten Stufen der HPA-Achse im Gehirn reguliert (Herman et al., 2003). Dieses „Sicherheitssystem“ ist überlebenswichtig für den Organismus, um diesen vor den negativen Auswirkungen eines langfristig erhöhten Cortisolspiegels zu schützen. Die kurzfristige Aktivierung der HPA-Achse über die Basisaktivität hinaus führt unter anderem zur Mobilisierung von Energie auf Kosten der Energiespeicherung sowie zur Unterdrückung des Wachstums, der Fortpflanzung, der Verdauung und der Immunantwort einschließlich von Entzündungsreaktionen (Boonstra et al., 1998; Fraser, 2008; Munck et al., 1984). Wie bereits in 1.1.3 allgemein für Stress beschrieben, ist diese Umverteilung biologischer Ressourcen zum Zweck der Bewältigung des Stressors nur kurzfristig und im Rahmen der jeweiligen Reserven adaptiv. Die chronische Aktivierung der HPA-Achse hingegen und damit ein dauerhaft erhöhter Cortisolspiegel sowie eine langfristige Störung des circadianen Rhythmus kann eben diese biologischen Funktionen beeinträchtigen (Leliavski et al., 2015; Miller und O'Callaghan, 2002; Sheriff et al., 2009).

1.2.1 Zeitliche Rhythmen der Cortisolsekretion

Jeder Organismus ist mit regelmäßig auftretenden Umweltveränderungen konfrontiert. Um die Homöostase in energieeffizienter Art und Weise an diese vorhersagbaren Schwankungen anzupassen, verfügt der Organismus über eine „biologische Uhr“ (die suprachiasmatischen Nuclei im Hypothalamus), die Verhalten und Physiologie primär nach dem Hell-Dunkel-Zyklus, aber auch nach bestimmten periodisch auftretenden Ereignissen ausrichtet (zum Beispiel soziale Reize und Nahrungsverfügbarkeit, Hastings et al., 1998; Kalsbeek et al., 2012; Mistlberger, 2011). Dies bringt adaptive Vorteile, da Energie in Abhängigkeit von den Umweltbedingungen bereitgestellt bzw. eingespart werden kann (Gilliam et al., 2000). Dabei spielt die Aktivität der HPA-Achse eine maßgebliche Rolle. Endogene Schwankungen der Cortisolsekretion nach circadianen und circannualen (circa 12-Monats-) Rhythmen ermöglichen es dem Organismus, durch passendes Timing erhöhter Cortisolausschüttung Energie zu mobilisieren und das Erregungsniveau zu erhöhen, um mit vorhersehbaren und regelmäßig auftretenden Stressoren umzugehen (Kalsbeek et al., 2012). Entsprechend treten Cortisolanstiege häufig zu den Jahres- bzw. Tageszeiten auf, zu denen ein erhöhter Energiebedarf besteht. Zum Beispiel ist das Cortisolniveau bei vielen Arten während der jährlichen Paarungs- (Reeder und Kramer, 2005) oder Wachstumszeit (Geweihwachstum bei Hirschen: Ingram et al., 1999) vergleichsweise höher als zu anderen Jahreszeiten. Jedoch ist eine Generalisierung aufgrund von Art- und Geschlechtsunterschieden im Energiebedarf zu den verschiedenen Jahreszeiten schwierig (Reeder und Kramer, 2005). Auch bei Elefanten im Zoo wurden saisonale Schwankungen des Cortisolspiegels festgestellt (Casares et al., 2016; Menargues Marcilla et al., 2012), die Ursachen sind jedoch angesichts der konstanten und relativ hohen Nahrungsverfügbarkeit im Zoo unklar. Der tägliche Cortisolanstieg innerhalb des circadianen Rhythmus der Aktivität der HPA-Achse ist sowohl bei tagaktiven als auch bei nachtaktiven Arten an den primär durch den Tag-Nacht-Zyklus bestimmten Beginn der jeweiligen Aktivitätsphase geknüpft (Kalsbeek et al., 2012). Während das tägliche Cortisolmaximum bei nachtaktiven Tieren (zum Beispiel Nagern) abends auftritt, zeigen tagaktive Arten, einschließlich des Afrikanischen Elefanten (Casares et al., 2016; Publikation A), einen diurnalen Rhythmus mit einem Cortisolmaximum am Morgen (zum Beispiel Pferd: Bohák et al., 2013; Schimpanse, *Pan troglodytes*: Kutsukake et al., 2009; Asiatischer Elefant, *Elephas maximus*: Menargues et al., 2012). Dieser Peak ist gefolgt von einem graduellen Abfall der Aktivität der HPA-Achse über den Tag hinweg bis circa um Mitternacht das minimale tägliche Cortisolniveau erreicht ist. Dieser tägliche Zeitverlauf der basalen Cortisolsekretion kann durch Stress gestört werden, sodass sich das Cortisolniveau des täglichen Minimums jenem des Maximums annähert. Bei akutem Stress ist diese

Abflachung nur vorübergehend (siehe Publikation A). Chronischer Stress hingegen kann den circadianen Rhythmus dauerhaft stören (Nicolaidis et al., 2017).

1.2.2 Stressbedingte Cortisolsekretion

Während die zeitlichen Rhythmen der Aktivität der HPA-Achse die adaptiven Reaktionen auf vorhersagbare Stressoren ermöglichen, erlauben akute Cortisolantworten die Bewältigung von unvorhersehbaren Herausforderungen. Ein prototypischer akuter Stressor ist der plötzliche Angriff eines Räubers auf ein Beutetier. Dieses Ereignis schließt für beide verschiedene Stressoren mit ein: erhöhte körperliche Aktivität, Verletzung sowie psychologischen Stress der Jagd (Angst, Wachsamkeit). Dieser Stress ist akut, da er entweder durch die erfolgreiche Tötung oder die erfolgreiche Flucht des Beutetiers beendet wird.

Die prototypische zeitliche Auflösung der Cortisolantwort auf solch einen akuten Stressor sieht folgendermaßen aus: Der Cortisolanstieg beginnt sofort nach der Wahrnehmung des Stressors und erreicht Maximalwerte 15-30 min danach. Die erhöhten Cortisolwerte beginnen sofort nach dem Peak wieder auf das Basislevel (das heißt das Cortisolniveau vor Auftreten des Stressors) abzufallen, das nach 60-90 min erreicht ist (de Kloet et al., 2005). Dieser Zeitverlauf ist über verschiedene Vertebraten hinweg hochgradig konserviert, unterliegt jedoch einer gewissen Variation (Sheriff et al., 2011a), worauf im nächsten Abschnitt näher eingegangen wird.

1.2.3 Ursachen der Variation in der akuten Cortisolantwort

Das Auftreten einer akuten Cortisolantwort auf eine Situation hängt letztendlich nur davon ab, ob das Individuum diese in Abhängigkeit von seinem Alter, Geschlecht, etc. und den Umweltbedingungen als Stressor wahrnimmt und, wenn ja, ob es diesen als eher mild oder schwer empfindet. Daher ist es nicht überraschend, dass die Cortisolantwort auf denselben Stressor bei demselben Individuum über die Zeit oder zwischen Individuen variieren kann (Cockrem, 2013; siehe Manuskript B). Generell kann die Exposition gegenüber einem Stressor vier alternative Resultate ergeben: i) Cortisolanstieg, ii) Cortisolabfall, iii) keine Cortisoländerung und iv) veränderte Ansprechbarkeit der HPA-Achse für zukünftige Stressoren (Bishop et al., 2013). Dabei ist i) in der Regel von größtem Interesse, da Stress gemeinhin mit Cortisolanstiegen gleichgesetzt wird (Moberg, 2000; Matteri et al., 2000; Hosey et al., 2011).

Der zeitliche Verlauf einer Cortisolantwort liefert Hinweise darauf, ob ein Stressor als relativ mild oder schwer empfunden wurde und lässt daher auch Rückschlüsse auf die Konsequenzen der Stressantwort für das Wohlbefinden zu. Wie in Abbildung 3 gezeigt, besteht ein grundsätzlicher Unterschied im Zeitverlauf der Cortisolantwort zwischen akuten, relativ milden

und schweren Stressoren. So ist die Höhe und Dauer der Cortisolantwort häufig größer, je schwerer der Stressor ist (García et al., 2000; Matteri et al., 2000; Sheriff et al., 2011a). Bei relativ mildem Stress funktioniert der Feedback-Mechanismus, das heißt der Cortisolspiegel beginnt unmittelbar nach dem Maximalwert wieder auf das Ausgangsniveau zurückzukehren. Schwere oder länger bestehende (chronische) Stressoren, zum Beispiel das in 1.2.2 genannte Beispiel des Räuberangriffs oder ein dauerhaft hohes Prädationsrisiko, sind dagegen mit länger andauernden Erhöhungen des Cortisolspiegels aufgrund schwacher Rückkopplungssignale assoziiert (Sheriff et al., 2011a).

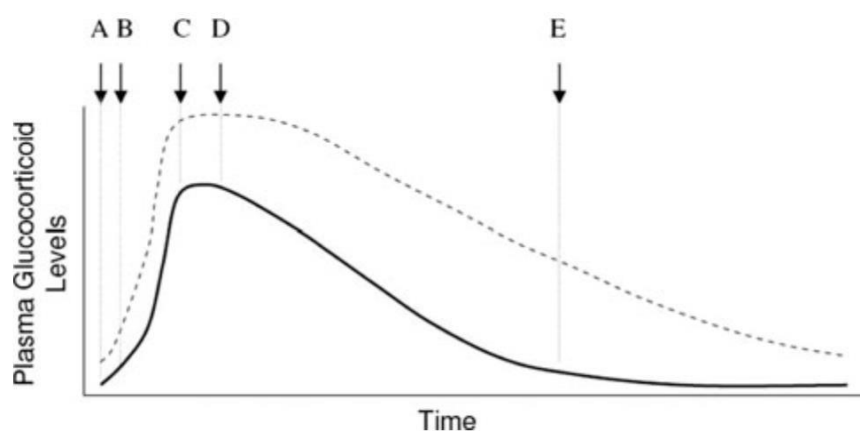


Abbildung 3: Zeitverlauf der Cortisolantwort auf einen akuten, milden Stressor (durchgezogene Linie) und einen schweren und/oder chronischen Stressor (gestrichelte Linie).

A: Der Stressor wird wahrgenommen. B: Der Anstieg beginnt bereits nach wenigen Minuten. C: Maximalwerte sind nach 15-30 min erreicht. Bei schwerem und/oder chronischem Stress ist die Änderung des Cortisolspiegels im Vergleich zum Ausgangsniveau vor dem Stressor höher. D: Bei akutem, mildem Stress beginnt die Erholungsphase bald nachdem der Maximalwert erreicht wurde. E: Bei akutem, mildem Stress ist das Ausgangsniveau vor dem Stressor nach circa 60-90 min wieder erreicht. Bei schwerem und/oder chronischem Stress erfolgt der Rückgang des erhöhten Cortisolspiegels zum Ausgangsniveau langsamer und die Erholungsphase ist länger als bei akuten, milden Stressoren (D und E). Übernommen von Sheriff et al. (2011a).

Im Allgemeinen basiert die Variabilität der Aktivität der HPA-Achse auf der übergeordneten Rolle des Hypothalamus bei der Regulierung der Homöostase. Der Hypothalamus integriert Signale des autonomen Nervensystems mit Informationen über endokrine, emotionale, Motivations- und Verhaltenszustände. Dies hat das Ziel, die Homöostase durch die

Koordination des autonomen und endokrinen Outputs mit dem Verhaltenszustand aufrechtzuerhalten (Iverson et al., 2000). Entsprechend bestimmen sowohl innere psychologische und physiologische Zustände als auch äußere Bedingungen den Cortisolspiegel zu einem bestimmten Zeitpunkt.

Erwartungsgemäß wurde die Variation innerhalb eines Individuums und zwischen Individuen derselben Spezies im basalen und stressbedingten Cortisolspiegel mit diversen intrinsischen und extrinsischen Faktoren in Verbindung gebracht. Bei verschiedenen Säugetierarten inklusive des Menschen wurden Unterschiede zwischen Individuen in Abhängigkeit von Alter (Anestis et al., 2006; Koch et al., 2014; Seeman et al., 2001), Geschlecht (Guimont und Wynne-Edwards, 2006; Turner et al., 2010), reproduktivem Status (Fanson et al., 2014; Ganswindt et al., 2010; Ingram et al., 1999), frühen Erfahrungen (Kanitz et al., 2004; Meaney et al., 1991) und Körperkondition (Dosmann et al., 2015; Parrott und Misson, 1989) gefunden. Extrinsische Einflussfaktoren waren: Tageszeit (Ichikawa et al., 1972; Irvine und Alexander, 1994), Jahreszeit (Ingram et al., 1999), Prädationsrisiko (Sheriff et al., 2011b) und sozialer Kontext (Hennessy et al., 2009). Der Zusammenhang zwischen einem Faktor und dem Cortisolspiegel ist jedoch häufig nicht eindeutig. Dies deutet auf Interaktionen zwischen verschiedenen Faktoren und dem Stressor hin, was angesichts der Cortisolausschüttung vorgeschalteten Integration unzähliger Informationen zu erwarten ist. Zum Beispiel wiesen Turner et al. (2010) nach, dass die Geschlechtsunterschiede in der Höhe der Cortisolantwort bei Schafen stressorspezifisch sind. Seeman et al. (2001) bestätigten Erkenntnisse aus früheren Studien, dass der basale Cortisolspiegel von alten Männern und Frauen höher ist als bei jüngeren Individuen des jeweiligen Geschlechts. Jedoch zeigten diese Autoren auch, dass die altersbedingten Unterschiede in der Höhe der Cortisolantwort vom Geschlecht abhängen. Sheriff et al. (2011b) konnten weiterhin nachweisen, dass Schneeschuhhasen, die einem kontinuierlich hohen Prädationsrisiko und geringer Nahrungsverfügbarkeit ausgesetzt sind, eine stärkere Cortisolantwort auf einen neuen akuten Stressor zeigen als jene Tiere, die diese chronischen Stressoren nicht erfahren (dabei handelt es sich um Sensitivierung der HPA-Achse, worauf nachfolgend näher eingegangen wird).

Intra- und interindividuelle Variation in der Cortisolantwort kann weiterhin durch unterschiedliche vorangegangene Stresserfahrungen hervorgerufen werden, die zu einer Änderung der Ansprechbarkeit der HPA-Achse gegenüber zukünftigen Stressoren führen. Erfahrung oder der psychologische Zustand wird häufig als Faktor genannt, der maßgeblich die empfundene Schwere des Stressors und damit die Cortisolantwort (oder ausbleibende Cortisolantwort) auf eine Situation erklärt (Romero, 2004; Koolhaas et al., 2011). Mit „Erfahrung“ sind in der

Regel die vorangegangene Exposition gegenüber Stressoren, die daraus resultierenden Lernprozesse (zum Beispiel Habituation) und deren Effekte auf die Stressantwort gemeint. Erfahrung wirkt jedoch nicht nur auf der kognitiven Ebene, sondern kann auch zu physiologischen Veränderungen führen, zum Beispiel zur Herunterregulierung der Ansprechbarkeit der Nebennierenrinde für ACTH (Ladewig und Smidt, 1989). In diesem Fall wäre die Funktion der HPA-Achse gestört und das System überhaupt nicht mehr in der Lage, eine Cortisolantwort zu initiieren (Ladewig, 2000; Romero, 2004).

Die wiederholte Exposition gegenüber demselben meist relativ milden, akuten Stressor kann dazu führen, dass das Individuum diese Situation nicht mehr als Stressor wahrnimmt. Dies äußert sich in der Habituation der Aktivität der HPA-Achse, das heißt die Cortisolantwort schwächt sich mit jeder Wiederholung im Vergleich zur ersten oder einmaligen Exposition ab (Grissom und Bhatnagar, 2009; Romero, 2004). Es ist bisher noch unklar, wie lange die Habituation der HPA-Achse an einen Stressor anhält. Studien zeigen jedoch, dass die Habituation an bekannte (und daher milde) Stressoren länger bestehen bleibt (Grissom und Bhatnagar, 2009). Außerdem kann die Habituation ausbleiben, wenn der Stressor zwar derselbe ist, dessen Kontext sich aber unterscheidet, zum Beispiel aufgrund eines anderen Geruchs (Grissom et al., 2007).

Man vermutet, dass neben der Herunterregulierung der HPA-Achse durch das negative Feedback auch höhere kognitive Prozesse (assoziatives Lernen und Gedächtnis) eine Rolle bei der Habituation der HPA-Achse spielen. Diese resultieren in einer verstärkten Wahrnehmung von Vorhersagbarkeit und Kontrollierbarkeit eines Stressors. Dadurch verringert sich der empfundene Stress in einer Situation, was sich in einer verkürzten Erholungsphase nach dem Peak der Cortisolantwort äußert (wie in 1.1.3 und oben in diesem Abschnitt beschrieben, ist die Dauer der Erholungsphase ein Indikator für die Schwere des Stressors) (Koolhaas et al., 2011).

Evolutionär liegt der Vorteil der Habituation der HPA-Achse darin begründet, dass durch die Herunterregulierung der Stressantworten auf nicht-lebensbedrohliche Situationen weniger biologische Kosten entstehen (siehe 1.1.3). Die Habituation an schwere und chronische Stressoren hingegen kann eine Fehlanpassung sein, was das Auftreten von Sensitivierung in evolutionärer Hinsicht erklärt (Nesse et al., 2016). Die Sensitivierung der HPA-Achse durch vorangegangenen chronischen Stress resultiert in einer verstärkten Cortisolantwort auf einen neuen akuten Stressor im Vergleich zu dem isolierten Auftreten dieses Stressors (Bhatnagar und Dallman, 1998; Ladewig, 2000; Sheriff et al., 2011b). Folglich erlaubt die Sensitivierung die Aufrechterhaltung der Ansprechbarkeit der HPA-Achse für akute Stressoren trotz chronischem Stress (Bhatnagar und Vining, 2003; Dallman et al., 1992).

Ob diese Lernprozesse stattfinden oder nicht, hängt nicht nur von der Erfahrung des Individuums ab, sondern auch von den Eigenschaften des habituierenden bzw. sensitivierenden Stressors. Diese umfassen die relative Schwere des Stressors im Sinne der Lebensbedrohlichkeit (zum Beispiel gilt Bewegungseinschränkung als relativ mild im Vergleich zu Schmerz), die Regelmäßigkeit und die Häufigkeit, mit der der Stressor auftritt, sowie dem Auftreten andersartiger Stressoren. Zum Beispiel erfolgt die Habituation an regelmäßig auftretende (und damit vorhersagbare) milde Stressoren schneller als an unregelmäßig auftretende Stressoren (Ladewig, 2000).

Die Effekte aller möglichen Einflussfaktoren auf die individuelle Stressantwort können unter der „Persönlichkeit“ eines Individuums zusammengefasst werden. Die Konzepte „Persönlichkeit“, „*coping style*“, „Verhaltenssyndrom“ und „Temperament“ beschreiben alle dasselbe Phänomen: Individuen unterscheiden sich aufgrund ihrer verschiedenen genetischen Ausstattung und Erfahrungen konsistent in ihren Reaktionen auf bestimmte Umweltvariablen (Hosey et al., 2011). Diese konsistenten individuellen Unterschiede bestehen sowohl im Verhalten als auch in der physiologischen Stressantwort, wie der Aktivität der HPA-Achse (Cockrem, 2007; Koolhaas et al., 2010). Im Zusammenhang mit der Stressphysiologie wird hauptsächlich der Begriff *coping style* verwendet, der sich auf die Kapazität und Strategie der Tiere im Umgang mit Stressoren bezieht (Groothuis und Carere, 2005) und damit eine engere Definition von Persönlichkeit darstellt. Die Individuen diverser Tiergruppen (Nagetiere, Schweine, Vögel und einige Primaten, Carere et al., 2010) variieren konsistent entlang des proaktiv/reaktiv- bzw. kühn/scheu-Kontinuums (Koolhaas et al., 1999; Wilson et al., 1994). Proaktive Tiere zeigen aktive, kühne und wenig flexible Verhaltensreaktionen sowie relativ geringe akute Cortisolantworten. Reaktive Tiere hingegen verhalten sich scheu, passiv und flexibel gegenüber Umweltveränderungen, was mit relativ hohen Cortisolantworten einhergeht (Cockrem, 2007).

1.3 Das Management von Stress und Wohlbefinden bei Tieren in Menschenobhut

Gutes Wohlbefinden der Tiere bildet die Grundlage für die erfolgreiche Bildungs- und Artenschutzarbeit von Zoos (EAZA, 2020a). Entsprechend unterstützt der Europäische Zooverband die Mitgliedzoos in der Förderung und Erhaltung des Tierwohls, unter anderem durch die regelmäßige Veröffentlichung sogenannter *Best Practice Guidelines*. Diese Richtlinien informieren darüber, wie die Zoonhaltung artspezifischen Bedürfnissen gerecht werden kann (EAZA, 2020a; EAZA, 2020b).

Das vorrangige Ziel muss dabei sein, Distress unter allen Umständen zu vermeiden, da diese Art von Stress das Wohlbefinden beeinträchtigt (Wielebnowski, 2003; siehe 1.1.3). Es ist jedoch unmöglich und aufgrund der adaptiven Funktion von Stress auch vollkommen unnötig, das Leben von Zootieren völlig stressfrei zu gestalten. So ist akuter milder Stress akzeptabel, vorausgesetzt die Möglichkeit zur Erholung ist gegeben (Ladewig, 2000). Auch akuter schwerer Stress ist manchmal nicht zu vermeiden, kann jedoch durch entsprechendes Management gelindert werden (zum Beispiel durch Training, siehe 1.3.3).

Doch wie lassen sich diese theoretischen Überlegungen in die Praxis umsetzen? In dieser Hinsicht steht das Zoomanagement vor zwei grundsätzlichen Herausforderungen: i) Die Untersuchung der Auswirkungen von bestimmten Haltungsbedingungen oder –situationen auf Indikatoren von Stress und Wohlbefinden und ii) die Förderung bzw. Vermeidung von Situationen, die Stress und Wohlbefinden beeinflussen. Dabei muss zudem die individuelle Variation berücksichtigt werden: Da sich Individuen in ihren Reaktionen auf eine bestimmte Situation unterscheiden (zum Beispiel in der Cortisolantwort, siehe 1.2.3), variieren sie auch in dem Grad des Wohlbefindens, den sie in dieser Situation erfahren (Tetley und O'Hara, 2012). Folglich müssen Stress und Wohlbefinden individuell untersucht und „gemanagt“ werden.

Die Auswirkung der Haltung von Tieren in Menschenobhut kann grundsätzlich auf zwei Art und Weisen untersucht werden: durch epidemiologische Studien (zum Beispiel Meehan et al., 2016) oder experimentelle Untersuchungen (zum Beispiel Gronqvist et al., 2013). Erstere können allgemeine Zusammenhänge zwischen der täglichen Routine (zum Beispiel Menge und Diversität der Umweltanreicherung, siehe 1.3.2) und verschiedenen Indikatoren herstellen (zum Beispiel Hormonspiegel, Aktivität, abnormales Verhalten). Experimentelle Untersuchungen hingegen stellen eine direkte Verbindung zwischen spezifischen Situationen und Änderungen im Verhalten oder im physiologischen Stress her. Der Zoo ist dafür bestens geeignet, denn die Zoomwelt ist relativ kontrolliert (konstante Tagesroutinen, vorhersagbare Anwesenheit bestimmter Individuen) und es stehen Daten zur Lebensgeschichte der Individuen zur Verfügung. Beide Vorteile ermöglichen die Kontrolle bzw. Interpretation von Variation zwischen Versuchswiederholungen und Individuen.

Sowohl epidemiologische als auch experimentelle Studien zeigten art- und studienübergreifend zwei „Eigenschaften“ des Zoomanagements auf, die Stress hervorrufen und das Wohlbefinden beeinträchtigen können. Diese umfassen die Störung oder Verhinderung der Ausübung von Verhaltensbedürfnissen und den Mangel an Auswahl und Kontrolle (Morgan und Tromborg, 2007). Verhaltensbedürfnisse sind Verhaltensweisen, die überwiegend intern motiviert sind, da sie auch ohne externe Reize gezeigt werden. Wenn Verhaltensbedürfnisse nicht

ausgelebt werden können, kann dies zu Frustration, zu Distress und damit zur Beeinträchtigung des Wohlbefindens des Individuums führen (Hughes und Duncan, 1988; Shepherdson et al., 1993; Swaisgood et al., 2001). Eine epidemiologische Studie bei Elefanten zeigte, dass soziale Faktoren des Managements einen großen Einfluss auf verschiedene Indikatoren des Wohlbefindens haben (zusammengefasst in Meehan et al., 2016). Dies ist nachvollziehbar, da Elefanten ein hochentwickeltes Sozialsystem aufweisen (Archie et al., 2006) und ein adäquates Sozialverhalten daher ein Verhaltensbedürfnis darstellt (Poole, 1998).

Ein Individuum nimmt seine Umwelt als kontrollierbar wahr, wenn sein Verhalten die Wahrscheinlichkeit des Auftretens eines Ereignisses bestimmt oder wenn das Individuum die Möglichkeit hat, zwischen alternativen Ereignissen zu wählen (Buchanan-Smith, 1997; Buchanan-Smith und Badihi, 2012). Dabei besteht ein Zusammenhang zwischen Kontrolle und Vorhersagbarkeit: Kontrolle macht die Umwelt vorhersagbar und Vorhersagbarkeit ermöglicht den Erwerb von Kontrolle (Bassett und Buchanan-Smith, 2007). Im Vergleich zum natürlichen Habitat bietet ein Zoogehege aufgrund der vergleichsweise geringen Komplexität der Umwelt weniger Auswahlmöglichkeiten und Kontrolle, ist aber durch einen relativ hohen Grad an Vorhersagbarkeit gekennzeichnet (Bassett und Buchanan-Smith, 2007): die Bewegungsfreiheit ist eingeschränkt, Reize, Artgenossen und Menschen können nur in einem bestimmten Rahmen vermieden werden und die zeitliche und räumliche Verfügbarkeit von Futter und Paarungspartnern ist vorgegeben (Morgan und Tromborg, 2007). Ob sich Vorhersagbarkeit und Kontrolle über eine Situation positiv oder negativ auf das Wohlbefinden auswirken, hängt von deren Natur und Kontext ab (van Rooijen, 1991). Zum Beispiel scheint die vollkommene Vorhersagbarkeit über den Zeitpunkt der Futterverfügbarkeit zu erhöhtem Stress zu führen, da Signale, die diese ankündigen, in der Regel nicht verlässlich sind. Folglich führt der Verlust von Vorhersagbarkeit zu Stress und unvorhersehbare Zeitpunkte der Fütterung scheinen in diesem Zusammenhang besser für das Wohlbefinden der Tiere zu sein (Waite und Buchanan-Smith, 2001).

Die Ziele des Managements von Stress und Wohlbefinden sind somit klar: Die Tiere müssen grundlegende Verhaltensbedürfnisse ausleben können und einen gewissen Grad an Kontrolle (v.a. über aversive Situationen, Bassett und Buchanan-Smith, 2007) empfinden. Das Verhalten bietet dabei einen sehr guten Ansatzpunkt, um Stress zu steuern (Moberg, 2000). Folglich zielen viele „Managementwerkzeuge“ auf die quantitative und/oder qualitative Veränderung des Verhaltens ab (zum Beispiel Umweltsanierung [siehe 1.3.2] und Training [siehe 1.3.3]). Das Verhalten freilebender Artgenossen sollte dabei natürlich als Richtwert dienen (Hutchins, 2006), denn die Verhaltensbedürfnisse von Zootieren leiten sich von jenen ihrer

freilebenden Artgenossen ab. Die grundlegenden Bedürfnisse nach Sicherheit, Umweltkomplexität, Kontrolle über die Umwelt und Neuheit werden somit von artspezifischen Faktoren beeinflusst (Poole, 1998). Elefanten haben hohe kognitive Fähigkeiten und sind in der Lage ihr Wissensrepertoire in Abhängigkeit von neuen Erfahrungen zu überarbeiten (Byrne und Bates, 2011). Außerdem haben adulte Elefanten keine natürlichen Feinde (Wittemyer et al., 2005), wodurch die Erkundung neuer Reize weniger durch die Informationsbeschaffung über potenzielle Räuber, sondern eher durch Neugier gekennzeichnet ist. Folglich brauchen Elefanten eine abwechslungsreiche Umwelt, die Exploration mit nützlichen Informationen belohnt und Möglichkeiten für verschiedene Verhaltensoptionen bietet (Olson, 2004).

Zoos haben verschiedene Managementwerkzeuge, die nicht nur Stress verringern bzw. vermeiden, sondern auch positive emotionale Zustände fördern. Dazu gehören Umweltsanreicherung (*environmental enrichment*) und positives Verstärkungstraining (*positive reinforcement training*). Einerseits schaffen diese beiden Werkzeuge Situationen, in denen das Tier positive Erfahrungen erwartet (Boissy et al., 2007). Andererseits geben sie dem Tier mehr Verhaltensoptionen und damit mehr Möglichkeiten, die passende Verhaltensantwort auf Stress zu geben (Carlstead und Shepherdson, 2000). Da diese Managementwerkzeuge obligatorische Bestandteile des Elefantenmanagements darstellen (Sach et al., 2019), wird deren Effekt auf Stress und Wohlbefinden in 1.3.2 und 1.3.3 näher beleuchtet. Zunächst wird jedoch auf die „Persönlichkeit“ als Managementwerkzeug eingegangen, da dieses Konzept insbesondere der Anwendung von Umweltsanreicherung zugrunde liegen kann.

1.3.1 Persönlichkeit

Zoostudien zeigen, dass sich Individuen konsistent in ihren Umweltreaktionen unterscheiden und dass diese Unterschiede mit Haltung, Reproduktionserfolg und Wohlbefinden zusammenhängen (Carlstead et al., 1999a; Carlstead et al., 1999b; Wielebnowski, 1999). Das Wissen um konsistente individuelle Unterschiede in Verhalten und Stressphysiologie kann somit für Wohlbefinden und Management relevante Entscheidungen unterstützen (Tetley und O'Hara, 2012). Wie in 1.2.3 bereits im Kontext von Stress erklärt, definiert Konsistenz das Konzept der Persönlichkeit.

Grundsätzlich bedeutet Konsistenz, dass die Unterschiede, die beim ersten Mal zwischen Individuen einer Gruppe beobachtet wurden, auch in den folgenden Malen auftreten werden. Folglich kann die Reaktion eines Tieres im Vergleich zu seinen Gruppenmitgliedern in verschiedenen Situationen vorhergesagt werden. Dies ermöglicht es wiederum, sein Wohlbefinden unter verschiedenen Bedingungen einzuschätzen (Hosey et al., 2011). Dieses Wissen

kann dabei helfen, Managementsituationen auf die individuellen Bedürfnisse zuzuschneiden und so das psychologische und körperliche Wohlbefinden jedes einzelnen Tieres sicherzustellen (Hall et al., 2018; Highfill, 2008; Watters und Powell, 2012). Zum Beispiel wurde das Merkmal proaktiv/reaktiv bei vielen Arten gefunden (Carere et al., 2010). Manche Studien sprechen auch von Neophilie/Neophobie (zum Beispiel Monestier et al., 2017) oder Kühnheit/Scheu (zum Beispiel Sinn et al., 2014). Diese Merkmale beschreiben konsistente Unterschiede zwischen Individuen in den Verhaltensantworten und physiologischen Stressreaktionen auf meist neue Situationen, die aufgrund ihrer Neuheit ein gewisses Risiko (zum Beispiel einen versteckten Räuber) bergen (Bergvall et al., 2011; Wilson et al., 1994). Erkenntnisse über individuelle Unterschiede in dem Ausmaß der Kühnheit können genutzt werden, um individuell zugeschnittene Beschäftigungsprogramme (Enrichment) zu entwickeln (Horback et al., 2013).

Grundsätzlich werden zwei Methoden zur Untersuchung der Persönlichkeit angewandt: Verhaltensbewertungen durch Personen, die die Tiere gut kennen, und Verhaltenskodierung basierend auf unmittelbaren ethologischen Verhaltensbeobachtungen oder Tests, wie dem *Novel Object Test* (Gosling, 2001; siehe 1.3.2 und Manuskript C). In Zoos werden überwiegend Verhaltensbewertungen durch Pfleger genutzt (Tetley und O'Hara, 2012). Mehrere Pfleger schätzen dabei unabhängig voneinander, wie stark bestimmte Merkmale, wie aggressiv, neugierig und gesellig, auf das jeweilige Tier zutreffen. Da diese Bewertung auf subjektivem Wissen über das Tier basiert, beeinflusst die Dauer der Arbeit mit dem Tier die Verlässlichkeit (Reliabilität, siehe unten) der Bewertung (Highfill et al., 2010; King et al., 2005; Powell und Svoke, 2008) und sollte daher als Einflussfaktor berücksichtigt werden (Tetley und O'Hara, 2012). Verhaltenskodierung wird häufig als die objektivere Methode angesehen. Jedoch müssen auch Beobachter auf subjektives Wissen und Erfahrungen zurückgreifen, um einzuschätzen, ob das beobachtete Verhalten dem im Ethogramm definierten entspricht (Meagher, 2009). Um aussagekräftige Persönlichkeitsbeurteilungen zu erhalten, müssen daher unbedingt die Reliabilität und Validität jeder Methode gezeigt werden (Gosling, 2001; Martin und Bateson, 2007). Validität wird durch die Korrelation der Ergebnisse aus Bewertung und Kodierung untersucht (Baker und Pullen, 2013; Horback et al., 2013). Die Überprüfung der Reliabilität oder Wiederholbarkeit (*repeatability*, siehe Manuskript C) erfolgt durch die Korrelation der Ergebnisse aus verschiedenen Messungen und erfordert daher die Wiederholung der Bewertungen (durch die Befragung mehrerer Pfleger) bzw. die mehrmalige Durchführung des Verhaltenstests bei demselben Individuum. Die Reliabilität und Validität werden für Verhaltensbewertungen in der Regel gezeigt, weshalb diese Methode auch in der Anwendung bei Tieren wissenschaftlich akzeptiert ist (Meagher, 2009). Jedoch wird nur selten die Reliabilität von

Verhaltensbeobachtungen hinterfragt, vermutlich da sie gemeinhin als objektiv und daher als verlässlich angesehen werden (Jones und Gosling, 2005; Tetley und O'Hara, 2012).

Die häufige Anwendung der Pflegerbewertungen liegt vermutlich in dem relativ geringen Aufwand begründet, mit dem sie in mehreren Zoos ohne Beeinflussung des Managements durchgeführt werden können (Tetley und O'Hara, 2012). Verhaltensbeobachtungen hingegen sind zeitlich und logistisch aufwendig, wenn mehrere Zoos involviert sind. Die Durchführung von Verhaltenstests erfordert zwar ebenfalls eine gewisse logistische Planung, ermöglicht jedoch die schnelle Einschätzung bestimmter Merkmale, wie der Kühnheit mit dem *Novel Object Test*, da die Tests in das Routinemanagement integriert werden können (Powell und Svoke, 2008, siehe Manuskript C).

Trotz der Nützlichkeit von Persönlichkeitsbeurteilungen für das Zoomanagement gibt es bisher noch keine standardisierte Methodik (Watters und Powell, 2012). Weitere Forschung ist daher nötig, um die Eingliederung von Persönlichkeitsbeurteilungen in das Routinemanagement voranzubringen (Tetley und O'Hara, 2012).

1.3.2 Umwultanreicherung (*environmental enrichment*)

Environmental enrichment (im Folgenden Enrichment) ist ein Prozess im Management eines Tieres, der das Ziel hat, durch zum Beispiel eine komplexe Umwelt und adäquate soziale Gruppen jene Umweltreize bereitzustellen, die für sein optimales körperliches und psychologisches Wohlbefinden nötig sind (Shepherdson, 1998). Ein wichtiger Teil dieser Definition ist, dass Enrichment der Zooumwelt des Tieres etwas hinzufügt, was ihm zuvor vorenthalten wurde, für sein optimales Wohlbefinden aber notwendig ist (Shepherdson, 2010). Enrichment ist somit die praktische Anwendung der Erkenntnisse aus der *animal welfare* Forschung (Shepherdson, 2010).

Enrichment umfasst eine Vielzahl von Aktivitäten, Vorrichtungen und Reizen, die zwei gemeinsame Ziele haben: Erstens die Erweiterung der Verhaltensoptionen und zweitens die Förderung von artspezifischen Verhaltensweisen und Fähigkeiten des Tieres (Shepherdson, 2010). Enrichment setzt somit genau dort an, wo Stress entsteht (siehe 1.3): Fehlende Kontrolle über die Umwelt und keine Möglichkeiten zur Erfüllung von Verhaltensbedürfnissen (Shepherdson et al., 1993; Swaisgood et al., 2001). Tatsächlich besteht die starke Vermutung, dass Enrichment physiologischen Stress verringert, weil es dem Tier mehr Möglichkeiten für Verhaltensantworten gibt, um den Stress zu bewältigen (Carlstead und Shepherdson, 2000). Zum Beispiel ermöglichen Verstecke, sich vor bedrohlichen Situationen zurückzuziehen

(Carlstead et al., 1993; Wielebnowski et al., 2002). Weiterhin schafft eine größere Umweltkomplexität durch Enrichment Bedingungen, unter denen die Exploration der Umwelt mit neuen und nützlichen Informationen belohnt wird (ein primäres Verhaltensbedürfnis, Boissy et al., 2007; Inglis et al., 2001; Mench, 1998). Diese Informationen ermöglichen es dem Tier, Entscheidungen über das eigene Verhalten zu treffen und damit eine gewisse Kontrolle über seine Umgebung zu erlangen (Olson, 2004). Exploration ist insbesondere für solche Arten ein Verhalten mit hoher Priorität, die als Generalisten an eine variable Umwelt angepasst sind, komplexe Anti-Räuber-Strategien zeigen oder eine komplexe Sozialstruktur und damit zusammenhängend hohe kognitive Fähigkeiten aufweisen (Mench, 1998). Zwei dieser Kriterien (generalistische Art [Roever et al., 2012] und komplexe Sozialstruktur [Archie et al., 2006; Evans und Harris, 2008]) treffen auf Elefanten zu. Es ist daher nicht überraschend, dass Enrichment einen integralen Bestandteil des Elefantenmanagements in Zoos darstellt (Olson, 2004; Sach et al., 2019). Basierend auf der Biologie von Elefanten definiert der Verband britischer und irischer Zoos (BIAZA) fünf Kategorien (Sach et al., 2019), wobei ein Enrichment mehreren dieser Kategorien zugeordnet werden kann: sozial, kognitiv, physisches Habitat, sensorisch und Nahrung. Holz, Äste und Laub bieten zum Beispiel ein sehr simples, aber wirkungsvolles Enrichment, da alle fünf Kategorien abgedeckt werden: Große Holzhaufen oder Baumstümpfe fördern das Fressen in der Gruppe (sozial) und die Benutzung des Rüssels (alle anderen Kategorien) (Abbildung 4b und d). Die Fütterung von Heu und Gras, des Hauptbestandteils der Ernährung von Zooelefanten (Hatt und Clauss, 2006), in erhöhten oder hinter Löchern liegenden Raufen begünstigt ebenfalls die Beschäftigung durch Verwendung des Rüssels zur Nahrungsbeschaffung und Exploration (Abbildung 4f und g). Auch unnatürliche (das heißt menschengemachte) Objekte, wie Pappen, Kanister, Bälle und Boxen, findet man häufig auf Elefantenanlagen. Diese Objekte dienen entweder als Spielzeuge (Abbildung 4a) oder als Futtercontainer (Abbildung 4c und e).



Abbildung 4: Beispiele für *environmental enrichment* der Elefanten.

Thüringer Zoopark Erfurt (a, b, c, e, f), Grüner Zoo Wuppertal (d) und Opel-Zoo Kronberg (g). Fotos: S. Hambrecht

Neuartige Objekte sind eine verbreitete Form von Enrichment (Gronqvist et al., 2013; Preutz und Bloomsmith, 1992; Swaisgood et al., 2005; Vick et al., 2000) und werden auch als sensorisches Enrichment für Elefanten empfohlen (Sach et al., 2019). Es wird davon ausgegangen, dass die Neuartigkeit aufgrund der Stimulierung der Exploration eine belohnende Wirkung hat (Mench, 1998; Poole, 1998; Wood-Gush und Vestergaard, 1991). Jedoch verringert sich die Wirkung des Objekts mit der Zeit, wenn sich das Tier an die Anwesenheit des Objekts gewöhnt (Bloomsmith et al., 1990; Wood-Gush und Vestergaard, 1991). Außerdem kann Neuartigkeit aufgrund der dadurch hervorgerufenen Angst ein Stressor sein (Mench, 1998; van Reenen et al., 2009). Tiere variieren in dem Ausmaß ihrer Neophobie (durch Neuartigkeit hervorgerufene Angstreaktion), sowohl in Abhängigkeit von ihrer Spezies (Day et al., 2003; Mettke-Hofmann et al., 2002) als auch individuell (Monestier et al., 2017; Walker und Mason, 2011). Das bedeutet, Individuen unterscheiden sich darin, wie stark sie einen neuartigen Gegenstand als Stressor

wahrnehmen. Daher unterscheiden sie sich sehr wahrscheinlich auch in ihrem Bedürfnis nach neuem Enrichment, das heißt dem individuellen Niveau von Neuartigkeit, das notwendig ist, um ein bestimmtes Maß an positiver Stimulation hervorzurufen oder aufrechtzuerhalten (Horback et al., 2013).

In vielen Motivationsmodellen der Exploration ist die Reaktion auf ein neuartiges Objekt ein Ergebnis der Interaktion von Neugier und Angst (Boissy et al., 2007). Aus ökologischer Sicht betrachtet, resultiert die Reaktion eines Tieres auf ein neuartiges Objekt aus dem Konflikt zwischen Nutzen und Kosten der Exploration dieses Objekts (Greenberg und Mettke-Hofmann, 2001). Die Exploration liefert dem Tier potenziell wichtige Informationen über seine Umwelt, kann aber gleichzeitig Risiken, wie ein verstecktes Raubtier, oder Kosten, wie Zeit und Energie, mit sich bringen. Tiere unterscheiden sich in ihren Reaktionen auf ein neuartiges Objekt, weil sie diesen Konflikt je nach artspezifischen und individuellen Kosten-Nutzen-Überlegungen, internen Faktoren (zum Beispiel Erfahrung) und externen Bedingungen (zum Beispiel Eigenschaften des Objekts und sozialer Kontext) unterschiedlich lösen (Mettke-Hofmann et al., 2006; Stöwe et al., 2006a). Dies macht sich die Persönlichkeitsforschung zunutze, denn viele Studien zeigen auf, dass die individuellen Unterschiede in der Reaktion auf neuartige Objekte zwischen Individuen derselben Art konsistent sind (siehe 1.3.1). Das entsprechende Merkmal (Neophobie, Kühnheit oder Explorationstendenz) wird häufig im *Novel Object Test* untersucht. Dieser Verhaltenstest liefert bei vielen Arten wiederholbare Ergebnisse und deckt daher bedeutsame Verhaltensunterschiede zwischen Individuen auf (zum Beispiel domestizierte Kaninchen: Andersson et al., 2014; Bärenpavian, *Papio ursinus*: Carter et al., 2012; siehe Manuskript C). Auch Zoostudien setzen diesen Test zunehmend ein (Baker und Pullen, 2013; Carlstead et al., 1999b), da er leicht in die Enrichmentprogramme integriert werden kann (Powell und Svoke, 2008). Zudem handelt es sich um eine optimale Methode, um das individuelle Enrichmentbedürfnis als angewandten Aspekt der Persönlichkeit zu untersuchen.

1.3.3 Training

Training ist ein Prozess, durch den ein Tier Assoziationen zwischen Ereignissen oder zwischen einem Ereignis und seinen eigenen Handlungen knüpft, wodurch sich seine Reaktion auf eine Situation nachhaltig ändert (Hosey et al., 2011). Die Aufgabe des Trainers ist es, die Herstellung dieser Assoziationen zu erleichtern, um das Wohlbefinden des Tieres zu verbessern (Mellen und MacPhee, 2010). Training ist daher ein essentielles Werkzeug in Pflege und Management von Zootieren (Laule und Desmond, 1998), einschließlich der Elefanten (Sach et al., 2019).

Der Lernprozess, der mit dem Training einhergeht, kann durch Habituation, klassische oder operante Konditionierung geschehen. Wie in 1.2.3 bereits beschrieben, kann die wiederholte Erfahrung eines Reizes, Ereignisses oder einer Situation zu einer Abschwächung der Stressantwort darauf führen. Zum Beispiel kann eine Gehegeveränderung eine Schreckreaktion hervorrufen. Mit zunehmender Gewöhnung an die Gehegeveränderung verringert sich dieses Verhalten. Wird Habituation durch aktive Manipulation der Umwelt herbeigeführt, handelt es sich um Desensitivierung, zum Beispiel durch wiederholte Paarung des aversiven Reizes mit Futter im Rahmen von positiver Konditionierung (Mellen und MacPhee, 2010). Das bedeutet, Training basierend auf Wiederholung manipuliert die Erfahrung eines Tieres insofern, dass in der Regel aversive Situationen durch neutrale oder positive Erfahrungen überschrieben werden (Laule und Desmond, 1998). In dieser Art und Weise können die Stressantworten auf unangenehme, aber notwendige Prozeduren, wie medizinische Behandlungen (Desportes et al., 2007; Reinhardt, 2003) und Transporte (Dembiec et al., 2004; Grandin, 2000), abgeschwächt werden.

Die beiden Arten der Konditionierung erhöhen die wahrgenommene Vorhersagbarkeit und Kontrollierbarkeit der Umwelt. Bei klassischer Konditionierung (oder „passivem Training“) wird der Zusammenhang zwischen zwei Reizen erlernt. Zum Beispiel kann schon die Wahrnehmung der Anwesenheit der Pfleger (nicht des Futters selbst) ausreichen, um mit Nahrungssuche und –aufnahme zusammenhängendes Verhalten auszulösen (Hosey et al., 2011). Das Angstverhalten aufgrund der Anwesenheit einer bestimmten Person (zum Beispiel des Tierarztes) basiert auf demselben Prozess. Bei operanter Konditionierung wird der Zusammenhang zwischen einem Reiz und einer Antwort (bzw. den Konsequenzen dieser Antwort) erlernt (Hosey et al., 2011). Zum Beispiel gehört das Bewegen (Sperren) von Tieren zwischen Gehegen, u.a. von draußen nach drinnen, zum täglichen Management von Elefanten. Grundsätzlich kann der Elefant eine Verknüpfung zwischen dem Reiz (dem Öffnen des Tores) und der Antwort (durch dieses Tor nach drinnen gehen) durch positive Verstärkung, Vermeidung („negative Verstärkung“) oder körperliche Bestrafung herstellen. Wie von Mellen und MacPhee (2010) erklärt, erhöht Verstärkung die Wahrscheinlichkeit, dass ein gewünschtes Verhalten erneut auftritt. Ein positiver Verstärker ist ein attraktiver Stimulus, der gesucht wird (zum Beispiel Futter). Ein negativer Verstärker stellt einen aversiven Reiz dar, der vermieden wird. Bestrafung hingegen eliminiert ein unerwünschtes Verhalten. Hinsichtlich des oben angeführten Beispiels des Elefanten, der von draußen nach drinnen gesperrt werden soll, hätte der Trainer bzw. Pfleger in absteigender Priorität folgende Optionen: 1. Der Pfleger nutzt die positive Verstärkung: Er gibt ein Signal (das Öffnen des Tores ggf. gepaart mit einem verbalen Kommando) und der Elefant wird für das gewünschte Verhalten, das Betreten des Innengeheges, belohnt.

Der Elefant lernt dadurch, dass er im Innengehege Futter erhält, wenn er auf Öffnen des Tores hin durch das Tor nach drinnen geht. 2. Der Pfleger verstärkt das gewünschte Verhalten in negativer Weise, zum Beispiel indem er den Elefanten mit einem Wasserstrahl durch das Tor nach drinnen treibt. Der Elefant lernt dadurch, dass er diesen negativen Reiz vermeiden kann, wenn er nach drinnen geht. 3. Der Pfleger bestraft den Elefanten, zum Beispiel durch Bespritzen mit Wasser, wenn er in den falschen Gehegebereich geht. Der Elefant lernt dadurch, dass er nicht in diesen Bereich gehen soll.

Training durch positive Verstärkung umfasst weitere Begriffe und Vorgehensweisen, die an dieser Stelle noch erwähnt werden sollten. Falls das Tier das gewünschte Verhalten (noch) nicht in seinem Repertoire hat, wird jede geringfügige Annäherung an das gewünschte Verhalten verstärkt, während inkorrekte Antworten durch Verweigerung der Belohnung oder ein *time out* „bestraft“ werden (Hosey et al., 2011; Mellen und MacPhee, 2010). Eine extra große Belohnung signalisiert das Ende des Trainings (Young und Cipreste, 2004). Schließlich erklären Mellen und MacPhee (2010) den Unterschied zwischen primären und sekundären Verstärkern. Verstärker wie Futter, Wasser oder Wärme sind primäre Verstärker, weil die verstärkende Wirkung auf biologischen Konsequenzen beruht, das heißt die verstärkende Wirkung setzt keine Erfahrung vonseiten des Tieres voraus. Wenn der primäre Verstärker wiederholt mit einem Pfiff oder Klicker gepaart wird, werden diese Geräusche zu sekundären Verstärkern. Diese überbrücken die Zeit zwischen dem korrekten Verhalten und dem primären Verstärker, zum Beispiel wenn das Tier aus weiterer Entfernung für den primären Verstärker zum Trainer zurückkehren muss (Mellen und MacPhee, 2010).

Es ist nachvollziehbar, dass positives Verstärkungstraining (*positive reinforcement training*, PRT) ausnahmslos bevorzugt wird, da es am besten für den Erfolg des Trainings und das Wohlbefinden des Tieres ist (Laule und Desmond, 1998). Beide Vorteile von PRT basieren darauf, dass das Tier durch PRT die Wahl über seine Handlungen und Kontrolle über seine Umwelt (die Belohnung) bekommt (Laule und Desmond, 1998). In einem auf positiver Verstärkung basierendem Training kann das Tier mit diversen Verhaltensreaktionen experimentieren, da es keine negativen Folgen für diese *trial and error* Strategie gibt. Tatsächlich belohnen qualifizierte Trainer die Tiere nicht nur für offenkundig richtige Antworten, sondern auch für subtilere und subjektivere Handlungen wie das „Lösen von Problemen“, das Anbieten „kreativer Lösungen“ und das „Bemühen“ (Laule und Desmond, 1998).

Auch im Elefantentraining wird die positive Verstärkung bevorzugt angewandt, um den Tieren diverse Kommandos beizubringen, die nicht nur für das tägliche Management unerlässlich sind, zum Beispiel in ein anderes Gehege sperren, sondern auch zum kognitiven

Enrichment beitragen (Sach et al., 2019). Außerdem existieren zwei Arten von Haltungssystemen, in deren Rahmen das Elefantentraining stattfinden kann. Im traditionellen Haltungssystem des freien oder direkten Kontakts halten sich Pfleger und Tiere ohne trennende Barrieren im selben Raum auf (Abbildung 5a und b). Außerdem ist der Pfleger in die soziale Hierarchie der Elefantengruppe integriert und nimmt darin die dominante Position ein. Vor allem aus Sicherheitsgründen werden Elefanten zunehmend im sogenannten geschützten Kontakt gehalten (BMEL, 2014). In diesem Haltungssystem sind Pfleger und Tiere physisch getrennt, zum Beispiel durch die Gehegebegrenzung, eine Gitter- oder Trainingswand. Eine Trainingswand hat spezielle Klappen und Aussparungen, durch die der Elefant auf Kommando bestimmte Körperteile präsentiert (BMEL, 2014; Abbildung 5c). Außerdem stehen die Pfleger im Gegensatz zum direkten Kontakt außerhalb der sozialen Hierarchie der Elefanten (Laule und Whittaker, 2009). Häufig setzen Trainer im geschützten Kontakt sogenannte Targets (ein oder zwei lange Stangen mit jeweils einem Ball an einem Ende) als Hilfsmittel ein. Ist das Tier darauf konditioniert, den Ball mit dem Kopf oder einer anderen Körperstelle zu berühren, kann es vom Trainer durch das Trainingsareal bewegt oder exakt für medizinische Behandlungen positioniert werden (Young und Cipreste, 2004; Abbildung 5d). Da das Training im geschützten Kontakt dem Elefanten mehr Wahlmöglichkeiten lässt und ein größeres Ausmaß an Kontrolle ermöglicht, wird der geschützte Kontakt als besser für das Wohlbefinden der Elefanten angesehen (Wilson et al., 2015). Jedoch ist es wichtig, diese Bewertung von Wilson et al. (2015) nicht zu pauschalisieren, da sie bisher, soweit bekannt, nicht empirisch nachgewiesen werden konnte. Außerdem ist es vorstellbar, dass andere Faktoren, wie das Ausmaß des Enrichments, die Beziehung zwischen Pfleger und Elefant und individuelle Eigenschaften des Elefanten, den Einfluss der Haltung auf das Wohlbefinden stärker bestimmen als das Haltungssystem (Proctor und Brown, 2015).



Abbildung 5: Beispiele für Interaktionen zwischen Pfleger und Elefant auf der Basis von Training durch Verstärkung.

Freier Kontakt im Grünen Zoo Wuppertal: Blutentnahme (a) und Abduschen (b); geschützter Kontakt im Thüringer Zoopark Erfurt: Fußpflege (c) und Positionierung des Elefanten mithilfe von Targets (d). Fotos: S. Hambrecht

Es kann nicht ausgeschlossen werden, dass Training selbst Stress hervorruft, zum Beispiel aufgrund der unmittelbaren Nähe zum Menschen. Jedoch beeinflusst auch in diesem Kontext die Erfahrung des Tieres maßgeblich das Ausmaß der Stressantwort (siehe 1.2.3). Nutztiere, die negative Erfahrungen mit Menschen gemacht haben (zum Beispiel geschlagen wurden), zeigen höhere Cortisolantworten auf den Kontakt zu Menschen als Tiere, die zum Beispiel gestreichelt wurden (Breuer et al., 2003; Hemsworth et al., 1981; Hemsworth und Barnett, 2000). Da das PRT vollkommen auf positiven Interaktionen beruht, sind folglich keine Stressantworten auf die bekannten routinemäßigen Trainingsabläufe aufgrund von Angst vor dem Menschen zu erwarten. Diese Annahme wird von den wenigen Studien, die die unmittelbare Cortisolantwort auf PRT untersuchten, unterstützt (Primaten: Behringer et al., 2014; O'Brien et al., 2008; Afrikanischer Elefant: Kelling Swilley, 2008; siehe Manuskript B). Jedoch kann die Neuartigkeit der zu erlernenden Verhaltensweisen eine Rolle spielen. Kelling Swilley (2008) zeigte, dass im Vergleich zum Routinetraing neuartiges Training bei drei Afrikanischen Elefanten eine Erhöhung der Cortisolwerte hervorrief. Des Weiteren scheint sich die Interaktion mit dem Menschen auch auf die basalen Cortisolspiegel von Elefanten auszuwirken. Carlstead et al. (2019) wiesen nach, dass positive Interaktionen mit Pflegern bei Asiatischen und Afrikanischen Elefanten mit geringeren basalen Cortisolspiegeln zusammenhängen. Speziell

bei Afrikanischen Elefanten begünstigte ein höherer Anteil an PRT einen geringeren basalen Cortisolspiegel (Carlstead et al., 2019).

Training kann Stress hervorrufen, wenn aufgrund von inkonsistenter Verstärkung beim Tier Frustration entsteht (Laule und Desmond, 1998). Folglich ist es für den positiven Effekt des Trainings ausschlaggebend, dass die einzelnen Verhaltensweisen auch über Trainer hinweg konsistent verstärkt bzw. nicht verstärkt werden (Mellen und MacPhee, 2010).

Das Training eines Tieres findet in der Regel getrennt von der Gruppe statt. Bei sozialen Arten, wie Elefanten, kann diese Trennung ein Stressor sein (Hennessy, 1997). Für die Studie in dieser Arbeit (Manuskript B) kann dies aus zwei Gründen mit großer Sicherheit ausgeschlossen werden: Zum einen gehörte die Trennung von der Gruppe und das anschließende Sperren des Tieres in das Trainingsareal zur täglichen Routine. Die Tiere waren daher an dieses Prozedere gewöhnt. Zum anderen befand sich der Rest der Gruppe wahrnehmbar für das abgetrennte Tier im angrenzenden Gehegebereich (siehe Manuskript B und C).

2 Umfang der Arbeit

Fragen bezüglich des Wohlbefindens von Zootieren müssen wissenschaftlich untersucht werden, um verlässliche Aussagen über die Auswirkungen bestimmter Managementsituationen auf Verhalten und Physiologie zu erhalten. Dies ermöglicht es, wissenschaftlich begründete Entscheidungen über Haltung und Management zu treffen, die das Wohlbefinden nachhaltig verbessern (Melfi, 2009). Eine solche Vorgehensweise ist insbesondere für Arten sinnvoll, deren Haltung in Zoos aufgrund von Bedenken über ihr Wohlbefinden immer wieder in Frage gestellt wird. Zu diesen Arten gehören der Asiatische und der Afrikanische Elefant (Kreger und Hutchins, 2010). Daher hatte die vorliegende Arbeit das übergeordnete Ziel, physiologische Stressantworten und individuelle Verhaltensreaktionen auf bestimmte Managementsituationen bei zehn Afrikanischen Elefanten aus drei Zoos zu untersuchen, um darauf basierend die Auswirkungen dieser Situationen auf das Wohlbefinden der Tiere zu evaluieren. Zum einen nimmt diese Arbeit die basalen und stressbedingten Änderungen der Cortisolkonzentrationen im Speichel als Indikator für physiologischen Stress in den Fokus. Zum anderen untersucht diese Arbeit, ob mithilfe eines standardisierten, aber bisher noch nicht bei Elefanten angewandten Verhaltenstests Unterschiede in individuellen Bedürfnissen für Enrichment identifiziert werden könnten.

2.1 Publikation A: Diurnal variation of salivary cortisol in captive African elephants (*Loxodonta africana*) under routine management conditions and in relation to a translocation event

Bevor die Wirkung eines Stressors auf den Cortisolspiegel beurteilt werden kann, muss das endogene tageszeitliche Muster der Cortisolsekretion in Abwesenheit von akuten Stressoren bestimmt werden, um zwischen akuten Reaktionen und tageszeitlichen Schwankungen unterscheiden zu können. Diese Studie untersuchte die diurnale Variation der Cortisolsekretion im Speichel bei zehn Afrikanischen Elefanten aus drei verschiedenen Zoos unter routinemäßigen Managementbedingungen und in Bezug zu einem Transport, einem Ereignis, das als potenzieller Stressor angesehen wird. Das Ziel bestand zum einen darin, die diurnale Variation des Speichelcortisols bei einer relativ großen Stichprobe von zehn Tieren, die in drei verschiedenen Zoos unter routinemäßigen Managementbedingungen untergebracht waren, nachzuweisen. Zum anderen sollte diese Studie erste Einblicke in die Wirkung eines Transports und der damit verbundenen Veränderungen der Haltungsbedingungen auf die diurnale Variation der Cortisolsekretion bei den drei Tieren geben, die am Translokationsprozess beteiligt waren. Die gewonnenen Erkenntnisse können die Interpretation von Schwankungen des Cortisolspiegels

im Speichel in Zusammenhang mit physiologischem Stress und Wohlbefinden beim Afrikanischen Elefanten unterstützen.

2.2 Manuskript B: Stress in the management of African elephants under human care? Salivary cortisol responses to positive reinforcement training and novel enrichment objects in captive African elephants (*Loxodonta africana*)

Um das Wohlbefinden Afrikanischer Elefanten in menschlicher Obhut zu verbessern, sind Kenntnisse über jene Managementsituationen essentiell, die physiologischen Stress verursachen und somit das Wohlbefinden potenziell beeinflussen können. Diese Studie untersuchte die Cortisolantworten im Speichel auf routinemäßiges positives Verstärkungstraining (PRT) und neue Enrichmentobjekte (NOV) bei zehn Afrikanischen Elefanten aus drei verschiedenen Zoos. Das Gesamtziel dieser Studie bestand darin, sowohl die durchschnittlichen Zeitverläufe als auch die individuelle Variation der Cortisolveränderungen im Speichel als Reaktion auf diese Situationen zu untersuchen, um die potenzielle Wirkung von PRT und NOV auf physiologischen Stress und Wohlbefinden zu bewerten. Die mehrmalige Untersuchung der Cortisolantworten auf spezifische Situationen bei einer solch relativ großen Anzahl von Tieren wurde bei Afrikanischen Elefanten bisher noch nicht durchgeführt. Ein solches Studiendesign ist aber Voraussetzung, um angesichts der diesbezüglichen großen individuellen Variation (Cockrem, 2013) generelle Aussagen über Cortisolantworten auf bestimmte Managementsituationen und damit deren Auswirkungen auf das individuelle Wohlbefinden treffen zu können.

2.3 Manuskript C: Individual variation and repeatability of the behavioral response to novel objects in captive African elephants (*Loxodonta africana*)

Individuen unterscheiden sich durchweg (konsistent) in ihren Verhaltensreaktionen auf neue Situationen. Bei Zootieren können solche Erkenntnisse dazu beitragen, Enrichmentprogramme zur Verbesserung des individuellen Wohlbefindens zu konzipieren. Der *Novel Object Test* (NOV) ist eine Standardmethode zur Messung von Verhaltensreaktionen auf Neuartigkeit bei vielen Arten, wurde aber bisher noch nicht bei Afrikanischen Elefanten durchgeführt. In der vorliegenden Studie wurden zehn Afrikanische Elefanten, die in drei verschiedenen Zoos untergebracht waren, insgesamt neunmal einem neuartigen Objekt ausgesetzt. Das Ziel bestand darin, herauszufinden, ob der NOV konsistente Verhaltensunterschiede zwischen den Elefanten detektieren kann. Ein Nachweis der Konsistenz des Verhaltens im NOV demonstriert die Zuverlässigkeit dieses Tests zur Messung individueller Verhaltensunterschiede und damit potenzieller individueller Unterschiede im Enrichmentbedürfnis Afrikanischer Elefanten.

3 Methodik

Diese Arbeit nutzte einen experimentellen Ansatz, um die diurnale Variation der Cortisolsekretion sowie den Einfluss bestimmter Managementsituationen auf den Cortisolspiegel im Speichel und das Verhalten zu untersuchen. Abbildung 6 zeigt den Aufbau des Experiments, das in allen beteiligten Zoos durchgeführt wurde. Dabei wurden die für die Tiere bekannten routinemäßigen Abläufe von Gehegewechseln, Fütterungszeiten, Training und Änderungen der Gruppenzusammensetzungen so wenig wie möglich verändert. Dadurch sollten Reaktionen auf Abweichungen von der Routine, die die Cortisolmessungen und Verhaltensbeobachtungen hätten beeinflussen können, vermieden werden. Aufgrund dieser Vorgehensweise gingen mit den Managementunterschieden zwischen den Zoos jedoch auch Unterschiede des experimentellen Aufbaus zwischen den Zoos einher, wie die Uhrzeit, zu der das Experiment stattfand.

3.1 Tiere, Haltung und Management

Wie in Abbildung 6 gezeigt, wurden insgesamt elf adulte (acht Jahre oder älter) Afrikanische Elefanten (*Loxodonta africana*), die im Opel-Zoo Kronberg, im Grünen Zoo Wuppertal und im Thüringer Zoopark Erfurt untergebracht waren, in die Studien der vorliegenden Arbeit miteinbezogen. Tabelle 1 in allen Manuskripten enthält weitere Informationen zu diesen Tieren. Alle Tiere außer CS waren Teil aller drei Studien. Sie durchliefen das ebenfalls in Abbildung 6 dargestellte Experiment jeweils mehrmals in zwei durch ein Jahr getrennte Untersuchungszeiträume (2016, 2017). Die Untersuchungen in demselben Zoo fanden in der gleichen Jahreszeit statt (Kronberg: Frühling, Wuppertal: Sommer, Erfurt: Herbst/Winter, Abbildung 6). Bei CS handelt es sich um das nach Erfurt transportierte Tier. Es wurde nur in der Studie der Publikation A untersucht.

Die Haltungsbedingungen der Elefanten aller Zoos waren durch naturalistische Außengehege sowie im Innenbereich liegende Laufflächen und Boxen zur Abtrennung einzelner Tiere gekennzeichnet. Zudem standen den Elefanten Wasserbecken, Schlammuhlen, Sandgruben und Kratzflächen zur Verfügung. Je nach den Wetterbedingungen hatten die Elefanten Zugang zu den Außengehegen. Die Weibchen und ihr Nachwuchs wurden in stabilen sozialen Gruppen gehalten. Bullen hatten gelegentlich Zugang zu den Weibchen. Eine neue Kuh (CS) erweiterte die Erfurter Gruppe im April 2017 (siehe 3.2.1 für den Ablauf des Transports und der Eingewöhnung in Erfurt) und war zu Beginn des Untersuchungszeitraums in diesem Jahr vollständig in die Gruppe integriert.



Abbildung 6: Experimenteller Aufbau, in die Studien einbezogene Zoos und Tiere sowie Untersuchungszeiträume.

Es wurden insgesamt elf Tiere aus drei verschiedenen deutschen Zoos untersucht. Die Untersuchungen innerhalb eines Zoos fanden in derselben Jahreszeit in 2016 und 2017 statt. Die Kuh CS war nur Teil der Transportstudie der Publikation A (Pub A).

Das Experiment lief bei einem Elefanten wie folgt ab: Entnahme einer Speichelprobe am Morgen; Entlassen des Tieres in das Routinemanagement; Entnahme einer Speichelprobe am Nachmittag, die zugleich die Probe vor der darauf folgenden Managementsituation (CORT0) darstellte; der Elefant durchläuft für 10 min die Managementsituation (positives Verstärkungstraining [PRT] oder neuartiges Enrichmentobjekt [NOV]), wobei das Verhalten in NOV mit Videokameras aufgezeichnet wurde; Entnahme der Speichelproben nach der Situation in 10-15 min Intervallen bis 60 min nach Beginn der Situation (CORT10 bis CORT60). Siehe 3.3.2.2 für weitere Informationen. Fotos: S. Hambrecht

Die in Kronberg und Erfurt untergebrachten Tiere sowie der Bulle in Wuppertal wurden im geschützten Kontakt (PC) gehalten, das heißt die Pfleger interagierten mit den Elefanten immer durch eine Barriere. Die Kühe in Wuppertal hingegen wurden im freien Kontakt (FC) trainiert. Die Pfleger interagierten somit frei ohne schützende Barriere mit diesen Tieren. Unabhängig vom Haltungssystem wurden alle Tiere zu medizinischen und Beschäftigungszwecken auf der Basis von positiver Verstärkung trainiert.

3.2 Managementsituationen

Das Experiment (Abbildung 6) diente zum einen der Untersuchung der diurnalen Variation der Cortisolsekretion unter Routinemanagement und der Cortisolantwort auf die beiden Managementsituationen des positiven Verstärkungstrainings und neuartigen Enrichmentobjekts (siehe 3.3.2.2). Zum anderen wurden die individuellen Verhaltensantworten auf ein neuartiges Enrichmentobjekt aufgezeichnet (siehe 3.4). Der Transport fand außerhalb der Untersuchungszeiträume statt und wurde daher unabhängig vom Experiment untersucht.

3.2.1 Transport (Publikation A)

Im Folgenden wird der Zeitplan des Transports in Bezug auf den Tag der Ankunft des transportierten Elefanten CS (Tag 0) beschrieben. Die adulte Kuh CS wurde vom Réserve Africaine du Sigean in Frankreich in den Thüringer Zoopark Erfurt in Deutschland transportiert (zurückgelegte Entfernung: 1350 km). Die Fahrt dauerte insgesamt etwa 36 Stunden einschließlich der obligatorischen Pausen zum Füttern, Tränken und Reinigen des Elefanten.

In der ersten Phase nach dem Transport (Tag 1 bis 9) hatten CS und die ansässigen Elefanten in Erfurt, einschließlich des Bullen, durch Absperrungen Sicht- und Tastkontakt. Außerdem wurde CS allmählich an die Innen- und Außengehege gewöhnt. Ab dem 12. Tag wurde CS mit den Kühen SF und CH gemeinsam untergebracht. Am 20. Tag wurde CS das erste Mal mit dem Bullen KB zusammengeführt. Die anderen beiden Tiere CH und SF befanden sich in einem anderen Gehegebereich. Zwischen den beiden Gruppen war Sicht- und Tastkontakt durch Barrieren möglich. Ab dem folgenden 13. Tag wurden die Kühe weiterhin zusammengehalten. Der Bulle blieb von den Kühen getrennt, wobei Sicht- und Tastkontakt durch Barrieren ermöglicht wurde. Circa vier Monate später wurden alle Elefanten (Kühe und der Bulle) in einer Gruppe gehalten.

3.2.2 Neuartiges Enrichmentobjekt (*Novel Object Test, NOV*) (Manuskript B und C)

Die Neuartigkeit eines Objekts schafft eine Situation, die einerseits als potenzieller Stressor eine akute Cortisolantwort hervorrufen (Manuskript B) und andererseits als *Novel Object Test* konsistente individuelle Verhaltensunterschiede detektieren kann (Manuskript C). Da der Ablauf von NOV in beiden Manuskripten beschrieben ist, werden an dieser Stelle nur die wichtigsten Punkte genannt.

NOV fand in einem allen Tieren vertrauten Gehegebereich statt, der aus der Testarena und einem Rückzugsort (meist einer Box) bestand. NOV dauerte 10 min und verlief wie folgt: Zunächst wurde das Tier von der Gruppe getrennt und in den Rückzugsort gebracht; ein Verfahren, an das die Tiere im Rahmen der täglichen Routine gewöhnt waren. Dann wurden Futter und Kot aus der Testarena entfernt und das neuartige Objekt in der Testarena positioniert. NOV begann, sobald das Tier in die Richtung des Objekts schaute, während sich die Tür zur Testarena öffnete. Das Tier betrat die Testarena freiwillig und durfte während des Tests in den Rückzugsort zurückkehren.

Mit Ausnahme der Kühe in Wuppertal durchliefen die Tiere NOV einzeln. Die Kühe in Wuppertal wurden zusammen mit ihrem Nachwuchs getestet, um sozialen Stress durch die Trennung zu vermeiden. Jedes Tier wurde einmal pro Tag einem NOV ausgesetzt. Mit Ausnahme von zwei Kühen (Mutter und Tochter), die zusammen untersucht wurden, wurde nur ein Tier pro Tag getestet.

Jedes Tier durchlief NOV insgesamt neun Mal mit drei Durchläufen (Trials) im Jahr 2016 und sechs Trials im Jahr 2017. Die Tiere wurden nacheinander in einer festen Reihenfolge einem Trial pro Woche ausgesetzt. In jedem Trial wurde ein anderes Objekt präsentiert und jedes Objekt wurde nur einmal verwendet. Die Objekte waren von unterschiedlicher Farbe und Größe sowie aus unterschiedlichen Materialien (Gymnastikball, Verkehrskegel, Fass, weiße Plane, Luftmatratze etc.) und wurden zuvor nicht im Routinemanagement verwendet. Überwiegend wurden allen Tieren die gleichen Objekte in der gleichen Reihenfolge präsentiert.

3.2.3 Positives Verstärkungstraining (*positive reinforcement training, PRT*) (Manuskript B)

Wie bereits in 1.3.3 ausführlich beschrieben, verstärkt der Pfleger im positiven Verstärkungstraining gewünschte Verhaltensreaktionen auf bestimmte Kommandos mit Belohnungen. Das positive Verstärkungstraining gehörte in allen drei Zoos zum Routinemanagement der Elefanten, das heißt die Tiere kannten den Ablauf des PRT: Trennung von der Gruppe (bei den

Kühen war die Gruppe stets in Sicht, um Trennungsstress zu vermeiden), Sperren in den Trainingsbereich, Durchführung von PRT und Entlassen in die Gruppe. Dieser grundsätzliche Ablauf galt für alle drei Zoos. Außerdem wurden nur bekannte Verhaltensweisen abgefragt, zum Beispiel Anheben des Fußes, die Körperseite präsentieren, Ablegen, Ohr präsentieren und vom Pfleger zurückweichen. Um den Einfluss des Pflegers (Trainers) auf die Cortisolmessungen zu minimieren, sollten, wenn möglich, immer dieselben Pfleger die Elefanten trainieren.

Das PRT selbst variierte entsprechend des Trainingslevels des jeweiligen Tieres und der routinemäßigen PRT-Durchführung des jeweiligen Zoos. Letzteres hing vor allem mit den beiden Haltungssystemen zusammen. Alle Elefanten in Kronberg und Erfurt sowie der adulte Bulle in Wuppertal wurden im geschützten Kontakt trainiert, während die Kühe in Wuppertal im direkten Kontakt trainiert wurden. Bei den primären Verstärkern handelte es sich immer um begehrtes Futter (Brot, Obst, Gemüse oder Pellets). Ein sekundärer Verstärker wurde nur in Kronberg und Erfurt in Form eines Klickers eingesetzt. Außerdem wurden die Elefanten in Kronberg und Wuppertal trainiert und gleichzeitig geduscht. Die Pfleger in Erfurt hingegen duschten die Tiere während des PRT nicht ab und trainierten die Elefanten zudem mit der Hilfe von zwei Targets. Das PRT wurde pro Tier dreimal (drei Trials) in 2016 durchgeführt.

3.3 Cortisoluntersuchung

3.3.1 Auswahl des Probenmaterials

Glucocorticoide und deren Metaboliten wurden bisher vor allem aus Blut, Speichel, Kot und Urin gemessen (Sheriff et al., 2011a). Jede dieser Probenmaterialien hat Vor- und Nachteile. Die Wahl des geeigneten Probenmaterials hängt von der Fragestellung, den Untersuchungsbedingungen, der Spezies, der Art des Stressors (akut oder chronisch) sowie von dem Ausmaß der Invasivität, das möglich oder gewünscht ist, ab (Sheriff et al., 2011a). Zudem gibt es einige Besonderheiten bei der Interpretation der Ergebnisse, die man beachten muss. Blut ermöglicht die Echtzeitmessung des Cortisolspiegels zu einem bestimmten Zeitpunkt, aber die Probenentnahme ist invasiv, was die Verwendung von Blut bei Wildtieren einschränkt. Kot und Urin können nicht-invasiv entnommen werden. Diese Probenmaterialien liefern integrierte Messungen der Menge des über einen bestimmten Zeitraum ausgeschütteten, verstoffwechselten und ausgeschiedenen Cortisols (Palme et al., 2005; Sheriff et al., 2011a). Daher sind Kot und Urin aufgrund der relativ langen Verzögerungszeit bis die Cortisolmetaboliten in den Exkrementen erscheinen (Darmdurchgangszeit des Afrikanischen Elefanten: 38 h, Ganswindt et al., 2003) nicht geeignet, um den circadianen Rhythmus und akute Cortisolantworten zu

messen. Speichel hingegen kann für Echtzeitmessungen verwendet werden. Die Cortisolkonzentrationen im Speichel korrelieren bei verschiedenen Arten gut mit den Werten im Blut (Beerda et al., 1996; Grand et al., 2012; Umeda et al., 1981), wobei eine Zeitverzögerung von 5-20 min beim Menschen (Kirschbaum und Hellhammer, 2000) und 10 min beim Rind (Hernandez et al., 2014) festgestellt wurde. Darüber hinaus kann Speichel minimal invasiv entnommen werden, sofern die Tiere an die Probenentnahme gewöhnt sind (Cook, 2012), was durch positives Verstärkungstraining erreicht werden kann. Zudem werden die Maulhöhlen der Elefanten regelmäßig inspiziert. Die Entnahme von Speichelproben kann daher leicht in die Routine integriert werden. Somit eignen sich Cortisolmessungen im Speichel ideal für wiederholte Probenentnahmen in kurzen Zeitabständen, um den diurnalen Rhythmus und akute Cortisolantworten bei im Zoo lebenden Afrikanischen Elefanten zu überwachen.

3.3.2 Entnahme der Speichelproben

Eine Speichelprobe wurde durch Ausstreichen des Mauls (Backentaschen, über und unter der Zunge) mit einem Tupfer (Salivette® Cortisol, Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland), der in einer Klemme oder einem Edelstahlrohr fixiert wurde, entnommen. Die Speichelproben wurden unmittelbar nach der Entnahme bei -18°C eingefroren. Die Tiere wurden während des routinemäßigen Trainings vor dem ersten Untersuchungszeitraum in 2016 an die Probenentnahme gewöhnt. Die Probenentnahme erfolgte nach einem festen Protokoll. Dies legte zum einen feste Zeiten für die Probenentnahme fest, um den Einfluss des Tagesrhythmus der Cortisolsekretion zu minimieren (Casares et al., 2016). Zum anderen wurden Faktoren wie der Pfleger, das Futter und der Ort so konstant wie möglich gehalten, um die Konsistenz der Bedingungen während der Probenentnahme zu gewährleisten.

Die Probenentnahme in Bezug zum Transport (Publikation A) wurde unabhängig von der Probenentnahme zur Erfassung der diurnalen Variation der Cortisolsekretion unter Routinemanagement und der Cortisolantwort auf die Managementsituationen PRT und NOV durchgeführt.

3.3.2.1 Transport (Publikation A)

Das Protokoll der Probensammlung in Bezug zu dem Transport der Kuh CS ist in Publikation A im Detail beschrieben. Kurz gesagt, wurden vor und nach dem Transport über mehrere Tage hinweg von CS und den beiden Erfurter Kühen jeweils morgens und abends Speichelproben gesammelt, um das Ausgangsniveau vor dem Transport und die physiologischen Stressantworten in der Eingewöhnungsphase nach dem Transport von jedem der untersuchten

Tiere zu erfassen. Außerdem wurde nach der ersten Zusammenführung von CS mit dem Bullen jeweils eine Speichelprobe von CS und den beiden anderen Kühen entnommen, um die individuellen Cortisolantworten auf diesen potenziellen Stressor zu messen.

3.3.2.2 Diurnale Variation der Cortisolsekretion (Publikation A) und Cortisolantwort auf die Managementsituationen PRT und NOV (Manuskript B)

Das Experiment und das Protokoll der Probenentnahme zur Ermittlung der diurnalen Variation der Cortisolsekretion unter Routinemanagement (Publikation A) sowie zur Messung der Cortisolantworten auf die Managementsituationen PRT und NOV (Manuskript B) sind in Abbildung 6 dargestellt und in den jeweiligen Manuskripten im Detail beschrieben. Kurz gesagt, wurde an jedem Tag, an dem das Experiment stattfand, das heißt in jedem Trial, von dem jeweiligen Tier an folgenden Zeitpunkten Speichelproben entnommen: morgens, nachmittags vor der Managementsituation (CORT0) und seriell in 10-15 min Intervallen nach der Situation bis 60 min nach Beginn der Situation (CORT10 bis CORT60). Dieses Schema der Proben-sammlung ermöglichte die Messung der unmittelbaren Cortisolantwort auf das Training bzw. das neue Enrichmentobjekt im Vergleich zum jeweiligen Cortisolwert vor der Situation. Zwischen der Probensammlung am Morgen und am Nachmittag durchlief das jeweilige Tier das Routinemanagement seines Zoos.

3.3.3 Cortisolanalyse

In dieser Arbeit wurde ein Mikrotiterplatten-Enzymimmunoassay (EIA) verwendet, um die Cortisolkonzentration im Speichel zu bestimmen. Der EIA basiert auf dem Prinzip der Immunreaktion und unterliegt dem Massenwirkungsgesetz (Abbildung 7): Ein unmarkiertes Antigen (Ag, der Analyt) und ein markiertes Antigen (Ag*) konkurrieren um die begrenzte Anzahl von Bindungsstellen auf einem gegen den Analyten gebildeten Antikörper (Ab).

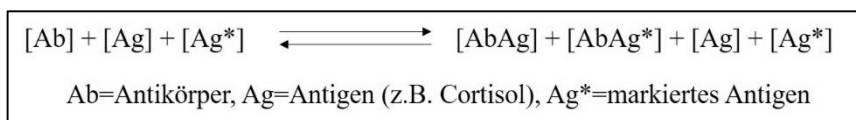


Abbildung 7: Gleichgewichtszustand der Immunreaktion zwischen Antikörper, Antigen und markiertem Antigen eines Enzymimmunoassays (EIA).

Je größer die Konzentration des Antigens (des Analyten) relativ zur Konzentration des markierten Antigens in der Probe ist, desto weniger markiertes Antigen ist an den Antikörper gebunden und umgekehrt. Da das markierte Antigen in der Lage ist, ein Signal (hier: Farbe) zu

liefern, kann das verbleibende freie oder das an den Antikörper gebundene markierte Antigen zur Quantifizierung der Konzentration des Analyten in der Probe verwendet werden. Dies geschieht, indem die Konzentration des Analyten in der Probe durch den Vergleich der Signalstärke in Gegenwart der unbekanntes Konzentration mit der Stärke des Signals in Gegenwart eines Standardpräparats bei mehreren Konzentrationen geschätzt wird. Wenn das Signal der gebundenen Fraktion gemessen wird (übliche Methode), steht die Stärke des Signals in umgekehrter Beziehung zur Konzentration des Analyten in der Probe. Aufgrund ihrer nicht-isotopischen Natur und der schnellen und einfachen Endpunktbestimmung (photometrische Messung einer Farbreaktion) sind EIAs heute ein weit verbreitetes analytisches Werkzeug für die Quantifizierung von biologischen Molekülen, wie Hormonen, in einer bestimmten Probe (Gan und Patel, 2013).

Der in dieser Arbeit verwendete EIA umfasste ein Antiserum gegen Cortisol-3-CMO und biotinyliertes Cortisol als Markierung. Der EIA wurde bereits von Palme und Möstl (1997) beschrieben und charakterisiert (einschließlich Kreuzreaktivitätsbestimmungen) und wurde erfolgreich zur Messung der adrenocorticalen Aktivität aus Speichelproben anderer Spezies eingesetzt (Behringer et al., 2009; Behringer et al., 2014). In der vorliegenden Arbeit bestätigte eine Vorstudie die biologische Validität des EIAs für die Anwendung beim Afrikanischen Elefanten durch den Nachweis von Cortisolanstiegen als Reaktion auf das Waschen, einen potenziellen Stressor.

Die Analyseschritte der Cortisolmessung aus Speichel sind im Detail in Publikation A beschrieben. Die Cortisolkonzentrationen im Speichel werden in ng/ml ausgedrückt.

3.4 Untersuchung des Verhaltens im *Novel Object Test* (Manuskript C)

Drei Kameras (zwei GoPro Hero 4 Silver und eine Sony Handycam HDR-CX405) zeichneten das Verhalten im *Novel Object Test* (NOV) auf. Diese erfassten zusammen den Bereich der Testarena (Abbildung 8) und des Rückzugsorts.



Abbildung 8: Kamerapositionen an den Testarenen des *Novel Object Tests*.

Opel-Zoo Kronberg (a), Grüner Zoo Wuppertal (b) und Thüringer Zoopark Erfurt (c). Fotos: S. Hambrecht

Das Verhalten gegenüber dem neuartigen Objekt wurde als *High-Interest-Activity* (HIA) bezeichnet (McComb et al., 2006) und war definiert als: Der Elefant berührt (bewegt das Objekt nicht) oder manipuliert (bewegt das Objekt) oder spielt mit dem neuartigen Objekt (manipuliert das Objekt intensiv, Lee und Moss, 2014). Abbildung 9 zeigt Beispiele für HIA.

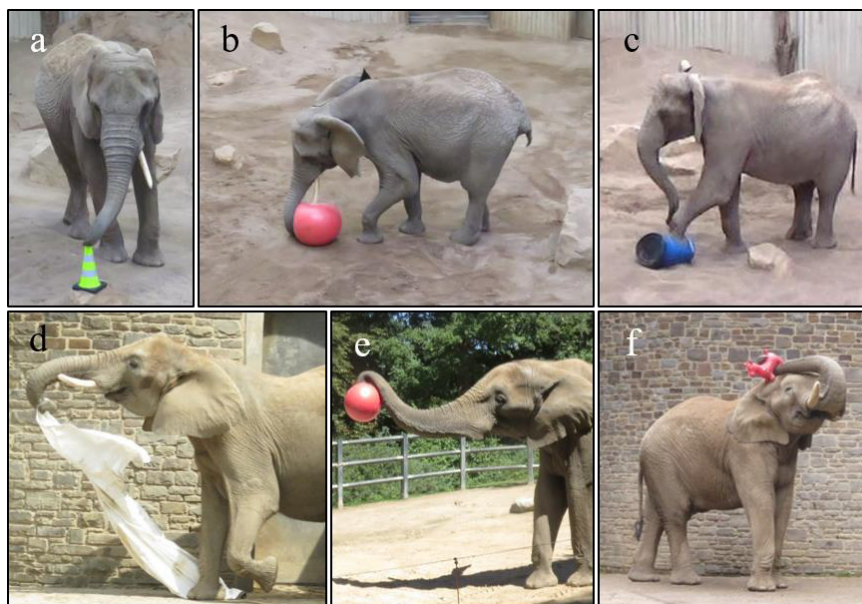


Abbildung 9: Beispiele für das Verhalten *High-Interest-Activity* (HIA) im *Novel Object Test* bei verschiedenen Elefanten.

Berühren bei SF (a), Aufspießen mit dem Stoßzahn bei SF (b), auf das Objekt treten bei CH (c), Manipulation mit dem Rüssel bei SW (d) und TU (e, f). Fotos: S. Hambrecht

Die Verhaltensmaße, die aus den Videoaufnahmen mithilfe der Open-Source-Software BORIS (Behavioral Observation Research Interactive Software, Version 4.1.4, Friard und

Gamba, 2016) ermittelt wurden, umfassten die Latenzzeit von HIA (Dauer bis zum ersten Mal HIA gezeigt wurde) und die relative Dauer von HIA. Diese wurde folgendermaßen berechnet:

$$\text{Relative Dauer} = \text{HIA Dauer} / (\text{NOV Dauer} - \text{OUT Dauer})$$

Die NOV Dauer betrug immer 600 sec. Während OUT (*out of view*) konnte das Verhalten des Tieres nicht bestimmt werden. Diese OUT Dauer unterschied sich zwischen den Trials, weshalb nicht die absolute, sondern die relative Dauer verwendet wurde. Wenn ein Tier das Objekt aus der Testarena trat oder hinauswarf, wurde das Objekt nicht zurück in die Testarena gelegt. Stattdessen wurde die Zeit, in der das Tier keinen Zugang zum Objekt hatte, zur OUT Dauer addiert.

3.5 Datenverarbeitung und -analyse

Die Daten der vorliegenden Arbeit teilten sich in die zu verschiedenen Zeitpunkten gemessenen Cortisolkonzentrationen und die Verhaltensdaten des *Novel Object Tests* auf.

Die Cortisolkonzentrationen und Verhaltensdaten wurden in Microsoft Excel 2016 vorbereitet und anschließend je nach Analysemethode mit IBM SPSS (Version 24) oder R (Version 3.6.0, R Core Team, 2019) statistisch ausgewertet. Das Signifikanzlevel ist $p < 0.05$, wobei bei $p < 0.1$ die Tendenz für Signifikanz angegeben wird. Als Lage- und Streuungsmaß wird der Median in Kombination mit dem 25% Quartil und dem 75% Quartil berichtet.

Die diurnale Variation der Cortisolsekretion unter Routinemanagement (Publikation A), der Zeitverlauf der Cortisolantworten auf die Managementsituationen (Manuskript B) und der Effekt individueller Faktoren auf den Cortisolspiegel (Manuskript B) wurden mit linearen gemischten Modellen (*linear mixed models*, LMM) untersucht. Dadurch wurde bei der Schätzung des Effekts der Messzeitpunkte und individuellen Faktoren auf die Cortisolkonzentrationen die geschachtelte Struktur des Datensatzes berücksichtigt. Von jedem Tier wurde zu jedem Messzeitpunkt (morgens, nachmittags vor und nach der Managementsituation, Abbildung 6) mehrmals Speichelproben entnommen, das heißt die Cortisolkonzentrationen zu einem bestimmten Zeitpunkt waren innerhalb der Elefanten gruppiert. Dieses *repeated measures design* resultierte in einer geschachtelten Datenstruktur, in der pro Tier mehrere Werte vorlagen, weshalb die für viele Verfahren (zum Beispiel lineare Modelle) bestehende Voraussetzung der Unabhängigkeit der Stichproben nicht erfüllt war.

Durch die Definition sogenannter Zufallseffekte (*random effects* oder Gruppierungsvariablen) im LMM wird bei der Schätzung der festen Effekte (*fixed effects* oder Prädikatoren) die intra- und interindividuelle Variation kontrolliert. Bei den festen Effekten handelt es sich um die mittleren Effekte der unabhängigen Variablen auf die abhängige Variable, die

letztendlich interpretiert werden sollen. In der vorliegenden Arbeit wurden die Messzeitpunkte (Untersuchungszeitraum [2016, 2017], Tageszeit [morgens, nachmittags] bzw. Zeitpunkt in Bezug zur Managementsituation [0 min bis 60 min]) als feste Effekte festgelegt. Bei dem Zufallseffekt handelte es sich um die Variable „Trial verschachtelt in Elefant“. Durch diese Variable konnte sowohl die interindividuelle Variation als auch die Streuung zwischen Trials innerhalb der Elefanten berücksichtigt werden. Um die Modellvoraussetzungen zu erfüllen, mussten die Cortisol-daten logarithmisch transformiert werden. Für alle weiteren Analysen und die graphische Darstellung der Cortisol-daten wurden die nicht-transformierten Originaldaten verwendet.

Das Verhalten im *Novel Object Test* wurde im Hinblick auf dessen Wiederholbarkeit (*repeatability*, absolute Übereinstimmung der Messungen über Trials hinweg) und Konsistenz (relative Übereinstimmung: Rangfolge der Tiere ist beständig über Trials hinweg) untersucht (siehe Manuskript C). Die Wiederholbarkeit der binären Reaktion auf das neuartige Objekt (Elefant zeigt HIA: ja oder nein) wurde mithilfe eines allgemeinen linearen gemischten Modells (*general linear mixed model*, GLMM) geschätzt. Dabei wird der Anteil der Varianz zwischen Individuen an der Gesamtvarianz berechnet. Die dafür nötigen Varianzanteile (zwischen und innerhalb von Elefanten) gibt das GLMM bei der Festlegung von „Elefant“ als Zufallseffekt aus. Die Konsistenz wurde durch Spearman-Rangkorrelationen geschätzt.

Bei allen weiteren Analysen handelte es sich um nicht-parametrische statistische Testverfahren, da sowohl die Cortisol- als auch die Verhaltensdaten keiner Normalverteilung folgten. Gepaarte Daten erforderten den Einsatz des Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Tests (zum Beispiel die diurnale Variation der Cortisolsekretion in Bezug zum Transport, siehe Publikation A) bzw. des Friedman-Tests in Kombination mit *post hoc* Tests (zum Beispiel interindividuelle Verhaltensunterschiede im *Novel Object Test*, siehe Manuskript C). Bei nicht-gepaarten Daten wurde der Kruskal-Wallis-Test zusammen mit Dunns-Tests verwendet (interindividuelle Unterschiede in den Cortisolspiegeln, siehe Manuskript B). Die Anpassung des Signifikanzlevels bei Mehrfachvergleichen erfolgte durch die Bonferroni- bzw. Bonferroni-Holm-Korrektur.

Qualitative und deskriptive Betrachtungen ergänzten die schließende Statistik (zum Beispiel der prozentuale Unterschied zwischen den Cortisolspiegeln am Morgen und am Nachmittag [siehe Publikation A], individuelle Variation der Cortisolzeitverläufe [siehe Manuskript B] und intraindividuelle Variation des Verhaltens im *Novel Object Test* [siehe Manuskript C]).

4 Ergebnisse

Dieses Kapitel gibt eine Übersicht der Ergebnisse der drei Studien. Da jede Studie eine eigenständige Fragestellung untersuchte, sind die Ergebnisse nochmals ausführlich in den jeweiligen Manuskripten beschrieben.

4.1 Publikation A: Diurnal variation of salivary cortisol in captive African elephants (*Loxodonta africana*) under routine management conditions and in relation to a translocation event

Unter routinemäßigen Managementbedingungen zeigten die Elefanten in beiden Untersuchungszeiträumen im Mittel die für tagaktive Arten erwartete diurnale Variation der Cortisolkonzentration im Speichel. Diese ist durch höhere Cortisolwerte am Morgen als am Nachmittag gekennzeichnet. Bei einigen wenigen Tieren war die diurnale Variation nicht signifikant. Diese potenzielle Abflachung ging vermutlich auf einzelne Proben tage zurück, an denen unerwartet niedrige Morgen- bzw. hohe Nachmittagswerte gemessen wurden. Daher ist die fehlende Signifikanz bzw. die geringe diurnale Variation sehr wahrscheinlich mit hoher intraindividuelle Variation erklärbar. Aus diesem Grund wurde die Abflachung der diurnalen Variation unter routinemäßigen Managementbedingungen als vorübergehend angesehen. In Bezug zum Transport war die diurnale Variation des Cortisolspiegels im Speichel vor dem Transport bei dem transferierten Tier und einem der Tiere im Bestimmungszoo tendenziell vorhanden. Jedoch konnte bei allen Tieren vor und nach dem Transport kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen dem Cortisolspiegel am Morgen und jenem am Nachmittag nachgewiesen werden. Auch unterschieden sich zu beiden Tageszeiten die Cortisolspiegel vor dem Transport nicht signifikant von jenen nach dem Transport. Dennoch könnte der Transport und die damit zusammenhängende Eingewöhnung in dem neuen Zoo ein potenzieller Stressor für das transportierte Tier gewesen sein, da die tageszeitliche Variation bei diesem Tier aufgrund erhöhter Nachmittagswerte nach dem Transport im Vergleich zu vor dem Transport wesentlich geringer war. Diese potenzielle Abflachung der diurnalen Variation wurde aufgrund der Rückkehr zur erwarteten tageszeitlichen Variation drei Wochen nach dem Transport als vorübergehend betrachtet. Es ist sehr wahrscheinlich, dass keine signifikanten Cortisolanstiege nach dem Transport gefunden wurden, da es nicht möglich war, unmittelbar nach der Ankunft des neuen Tieres Speichelproben zu sammeln. Daher spiegelten sporadisch erhöhte Cortisolwerte in den ersten neun Tagen nach dem Transport vermutlich weniger die physiologische Stressantwort auf den Transport selbst wider. Vielmehr könnte es sich dabei um Reaktionen auf akute Stressoren während der Gewöhnung des neuen Tieres an das neue Gehege und die neue Gruppe gehandelt haben.

Speichelproben, die unmittelbar nach dem ersten Zusammentreffen der neuen Kuh mit dem Bullen entnommen wurden, zeigten bei zwei der drei Tieren einen deutlichen Cortisolanstieg im Vergleich zum Cortisolspiegel vor dem Transport. Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass Stressoren den täglichen Cortisolrhythmus stören können. Darüber hinaus ist Speichelcortisol, sofern die Proben zeitnah entnommen werden können, ein nützlicher, minimal-invasiver Indikator für physiologischen Stress beim Afrikanischen Elefanten.

4.2 Manuskript B: Stress in the management of African elephants under human care?

Salivary cortisol responses to positive reinforcement training and novel enrichment objects in captive African elephants (*Loxodonta africana*)

Als Reaktion auf die gleiche Managementsituation gab es beträchtliche individuelle Unterschiede in den Zeitverläufen der Cortisolantworten. Die Analyse durch lineare gemischte Modelle ermöglichte es, diese zu kontrollieren und unterschiedliche durchschnittliche Cortisolzeitverläufe als Reaktion auf PRT und NOV aufzuzeigen: Während PRT im Durchschnitt einen cortisolsenkenden Effekt hatte, induzierte NOV eine moderate, akute Cortisolantwort mit einer schnellen Erholung des erhöhten Cortisols zurück auf das Niveau vor NOV. Die Unterschiede zwischen den Tieren in den Cortisolspiegeln hingen mit dem Alter (NOV) und dem Zoo (PRT) zusammen. Der Effekt des Geschlechts und des Haltungssystems war hingegen variabel. Der potenzielle stresspuffernde Effekt von PRT deutet darauf hin, dass diese Situation das Wohlbefinden fördert. NOV ähnelt einem akuten natürlichen Stressor, mit dem die Tiere erfolgreich umgehen können. Die Ergebnisse zeigen außerdem, wie wichtig es ist, individuelle Variation in Stressstudien bei Afrikanischen Zooelefanten zu berücksichtigen, um individuellen physiologischen Stress zuverlässig zu erkennen.

4.3 Manuskript C: Individual variation and repeatability of the behavioral response to novel objects in captive African elephants (*Loxodonta africana*)

Die Elefanten unterschieden sich konsistent in ihrer Antwort auf ein neuartiges Objekt (NOV-Antwort), das heißt das Verhalten im *Novel Object Test* war bei diesen Tieren wiederholbar (*repeatable*). Dieses Ergebnis legt nahe, dass die NOV-Antwort ein Persönlichkeitsmerkmal bei Afrikanischen Elefanten widerspiegeln könnte, das mit dem Merkmal „Kühnheit“ („*boldness*“) vergleichbar ist. Kühne Tiere waren konsistent durch eine extrem starke NOV-Antwort gekennzeichnet, während scheue Tiere über alle Trials hinweg und in beiden Untersuchungszeiträumen eine extrem schwache NOV-Antwort zeigten. Kühne und scheue Tiere unterschieden sich zudem signifikant in beiden Verhaltensmaßen der NOV-Antwort. Es ist

denkbar, dass unterschiedliche individuelle Erfahrungen bestimmen, ob sich ein Elefant angesichts eines neuartigen Objekts kühn oder scheu verhält. Darüber hinaus deutet die Konsistenz der NOV-Antwort darauf hin, dass das Verhalten im *Novel Object Test* ein zuverlässiger Indikator für das individuelle Bedürfnis Afrikanischer Elefanten nach Enrichment sein könnte. Kühne Tiere benötigen möglicherweise ein vielfältigeres Enrichmentprogramm, um die Stimulation aufrechtzuerhalten, während scheue Tiere womöglich einen weniger variablen Enrichmentplan benötigen (Horback et al., 2013).

5 Diskussion

Diese Arbeit zeigt den Einfluss des Zoomanagements auf Stressphysiologie und Verhalten von Afrikanischen Elefanten. Außerdem verdeutlicht sie den Nutzen der Messung von Cortisol aus Speichel sowie der Beobachtung des individuellen Verhaltens gegenüber neuartigen Objekten. Diese Methoden können eine wissenschaftliche Grundlage liefern, um das Management im Hinblick auf die Verbesserung des Wohlbefindens anzupassen. Die erste Studie (Publikation A) diente dabei als Grundlage für die Cortisoluntersuchung und zeigte die basale diurnale Variation der Cortisolsekretion bei (fast) allen der zehn untersuchten Elefanten und in allen drei Zoos. Außerdem untersuchte diese Arbeit nicht nur die Wirkung eines potenziell negativen, das heißt das Wohlbefinden gefährdenden, Ereignisses (Transport, Publikation A), sondern nahm gezielt auch solche Managementsituationen in den Fokus, die als positiv und vorteilhaft für das Wohlbefinden von Elefanten und Zootieren allgemein angesehen werden (positives Verstärkungstraining [PRT] und neuartiges Enrichment [NOV], Manuskript B und C). Die Zeit nach dem Transport schien beim transferierten Tier akute Stressoren beinhaltet zu haben, während PRT im Durchschnitt kein und NOV ein milder Stressor war.

Die Studien in dieser Arbeit gehen zudem auf die intra- und interindividuelle Variation in der basalen und stressbedingten Cortisolsekretion bzw. im Verhalten ein. Die individuelle Variation in den Cortisolantworten auf PRT und NOV spiegelt die Variabilität des In- und Outputs der HPA-Achse wider und veranschaulicht die Wichtigkeit, diese zu berücksichtigen, um physiologischen Stress zu erkennen. Schließlich unterschieden sich die untersuchten Elefanten konsistent in ihren Verhaltensreaktionen auf neuartige Objekte. Diese konsistenten Unterschiede könnten unterschiedliche individuelle Bedürfnisse für Enrichment widerspiegeln. Kenntnisse darüber, welche Tiere auf welche Managementsituationen in welchem Ausmaß reagieren, ermöglichen die Anpassung des Managements mit dem Ziel das Wohlbefinden einzelner Tiere zu gewährleisten.

Die folgenden Abschnitte diskutieren diese Ergebnisse im Hinblick auf den Zusammenhang zwischen Stress und Wohlbefinden (5.1), das Management von Stress (5.2), die methodischen Herausforderungen sowie die Möglichkeiten für weiterführende Studien (5.3). Dabei werden nicht nur Studien bei Zoo-, sondern auch bei Labor- und Nutztieren miteinbezogen, da die Erforschung von Stress und Wohlbefinden bei Tieren in Menschenobhut ihren Ursprung in diesen beiden letztgenannten Bereichen hat (Dantzer und Mormède, 1983; Meehan et al., 2016; Melfi, 2009).

5.1 Stress und Wohlbefinden

Cortisol wurde in dieser Arbeit als Indikator für physiologischen Stress verwendet, da die Aktivierung der HPA-Achse die am besten untersuchte physiologische Stressantwort darstellt (Matteri et al., 2000). Auch viele Studien über Stress beim Afrikanischen Elefanten stützen sich auf die Konzentration von Cortisol bzw. dessen Metaboliten, um den Effekt von Umweltbedingungen auf physiologischen Stress zu untersuchen, sowohl im Freiland (Foley et al., 2001; Hunninck et al., 2017; Viljoen et al., 2008) als auch in Menschenobhut (Boyle et al., 2015; Carlstead et al., 2019; Proctor und Brown, 2015; White et al., 2019).

Die vorliegende Arbeit interpretiert die beobachteten basalen diurnalen Cortisolschwankungen und die Cortisolantworten auf Transport, PRT und NOV nicht nur im Hinblick auf physiologischen Stress, sondern auch hinsichtlich des allgemeinen und individuellen Wohlbefindens der untersuchten Tiere. So deuten die Ergebnisse dieser Arbeit darauf hin, dass die Elefanten keinen schweren Stressoren und daher sehr wahrscheinlich keinem Distress ausgesetzt waren, der das Wohlbefinden beeinträchtigen könnte. Vorhergehende Zoostudien bei Elefanten stellten ebenfalls einen Zusammenhang zwischen den beobachteten Cortisolspiegeln und dem Wohlbefinden her. Zum Beispiel schlossen Boyle et al. (2015) aus den positiven Verhaltens- und minimalen Cortisoländerungen in Folge der Erneuerung des Bodenbelags, dass die neuen Bodenbeläge einen positiven Effekt auf das Wohlbefinden der Elefanten hatten. Diese Schlussfolgerung ist nachvollziehbar, da die geringen Cortisoländerungen zusammen mit Verhaltensindikatoren auftraten, die auf eine Verbesserung des Wohlbefindens hindeuteten (Boyle et al., 2015). Die Kombination verschiedener Stressindikatoren, zum Beispiel Verhalten und Cortisol, ist sinnvoll, um angesichts der Komplexität des Stresssystems im Allgemeinen und der Regulierung der HPA-Achse im Speziellen den Einfluss von Stress auf das Wohlbefinden zu untersuchen (Hill und Broom, 2009; Wielebnowski, 2003; Wielebnowski et al., 2002). Eine Studie bei Asiatischen Elefanten untersuchte den Effekt der Zooeröffnung auf das Wohlbefinden und nutzte zu diesem Zweck nur die Cortisolmessung aus Speichel (Menargues et al., 2008). Die Cortisolkonzentrationen waren während den Monaten, in denen der Zoo geöffnet war, signifikant höher als in der Zeit davor und danach. Folglich traten während den Öffnungszeiten Stressoren auf (Besucher, neue Gehege, Baulärm), die zu physiologischem Stress führten, wodurch das Wohlbefinden der Tiere womöglich beeinträchtigt wurde. Wie die Autoren richtigerweise anmerken, sind Schlussfolgerungen hinsichtlich der Effekte von erhöhten Cortisolspiegeln auf das Wohlbefinden nur durch Überwachung der biologischen Kosten, die durch diese Stressantwort entstehen, möglich (Fraser, 2008; Moberg, 2000). Dadurch kann rechtzeitig

der von Moberg (2000) als präpathologisch bezeichneter Zustand (zum Beispiel reduzierte Immunkompetenz oder Veränderungen im Fortpflanzungszyklus) erfasst werden, der dem „Zusammenbruch der normalen biologischen Funktionen“ vorausgeht (Abbildung 1). Ist dieser präpathologische Zustand erreicht, besteht ein Risiko für das Wohlbefinden (Fraser, 2008). Wie Fraser (2008) anmerkt, gilt dieses Kriterium eventuell nicht für Situationen, die zwar keine messbaren biologischen Kosten nach sich ziehen, aber nichtsdestotrotz die Lebensqualität reduzieren, zum Beispiel Situationen, die negative affektive Zustände, wie Angst und erlernte Hilflosigkeit (eine unangenehme Erfahrung wird als ausweglos angenommen) hervorrufen.

Die vorliegende Arbeit untersuchte keine Indikatoren für biologische Kosten aufgrund von stressbedingten Änderungen der Cortisolspiegel. Jedoch ließ die gemeinsame Betrachtung der Art der untersuchten Situationen und der jeweils hervorgerufenen Zeitverläufe der Cortisolveränderungen die (vorsichtige) Schlussfolgerung zu, dass die untersuchten Tiere keinen Distress erfuhren.

Die Elefanten zeigten überwiegend die erwartete Tagesvariation der basalen Cortisolsekretion. Auch der Effekt des Transports auf die diurnale Variation des transferierten Tieres war kurzfristig. Lediglich eine langfristige Abflachung der diurnalen Variation könnte auf Distress und eine Beeinträchtigung des Wohlbefindens hindeuten (Nicolaidis et al., 2017).

Der Transport und die damit assoziierten Umweltveränderungen hatten bei den untersuchten Elefanten keine langfristige und starke Cortisolerhöhung zur Folge. Da Transporte nachweislich Stressoren sind, die bei verschiedenen Arten, einschließlich Afrikanischer Elefanten (Millspaugh et al., 2007; Viljoen et al., 2008), Cortisolerhöhungen verursachen, ist es wahrscheinlich, dass zumindest das transferierte Tier eine Cortisolantwort auf den Transport zeigte. Leider konnte diese unmittelbare Cortisolantwort auf das Transportereignis im Speichel nicht erfasst werden, da die Tiere kurz nach der Ankunft bei der Speichelentnahme nicht kooperierten. In den folgenden Tagen nach der Ankunft des neuen Tieres wiesen die Tiere im Mittel keine im Vergleich zum Zeitraum vor dem Transport signifikant erhöhten Cortisolspiegel auf. Daher wurde davon ausgegangen, dass die Tiere den Stress des Transports und der damit verbundenen Umweltveränderungen bewältigen konnten.

PRT rief im Durchschnitt eine Cortisolerniedrigung hervor und könnte daher einen stresspuffernden und positiven Effekt auf das Wohlbefinden haben. Dies ist nachvollziehbar, da sich PRT durch ein hohes Maß an Vorhersagbarkeit und Kontrollierbarkeit auszeichnet (Bassett und Buchanan-Smith, 2007). Dabei handelt es sich um psychologische Faktoren, die nachweislich den Stress verringern (Buchanan-Smith und Badihi, 2012; Owen et al., 2005).

NOV war ein akuter, milder Stressor, mit dem die Tiere erfolgreich umgehen konnten; eine Beeinträchtigung des Wohlbefindens aufgrund dieser Situation war daher ebenfalls nicht zu erwarten. NOV kann als natürlicher Stressor betrachtet werden (Greenberg und Mettke-Hofmann, 2001), der aufgrund der Möglichkeit zur Exploration positive affektive Zustände hervorgerufen haben könnte (Boissy et al., 2007; Mench, 1998; Poole, 1998). Das häufig beobachtete Spielverhalten, ein vielversprechender Indikator für gutes Wohlbefinden (Held und Špinková, 2011), könnte diese positiven affektiven Zustände widergespiegelt haben. Nicht nur unangenehme Situationen oder negative affektive Zustände, wie Angst und Schmerz, rufen erhöhte Cortisolspiegel hervor, sondern auch natürliche und positive Situationen, die mit positiven affektiven Zuständen einhergehen (Ralph und Tilbrook, 2016). Zudem wurde nachgewiesen, dass adaptiver kurzzeitiger Stress sogar das Wohlbefinden erhöhen kann (Lyons et al., 2010; Ralph und Tilbrook, 2016). Außerdem besteht die Möglichkeit, dass neuartige Objekte in der geschützten Zooumgebung nur mit mildem Stress verbunden sind, da der potenzielle Nutzen (die Informationsbeschaffung durch Exploration) die potenziellen Kosten (zum Beispiel ein verstecktes Raubtier) der Erforschung neuartiger Objekte überwiegt (siehe 1.3.2 für den ökologischen Hintergrund der Reaktion auf Neuartigkeit). Dies gilt insbesondere für adulte Afrikanische Elefanten, die keine natürlichen Räuber haben (Wittemyer et al., 2005).

Der Zeitverlauf der Cortisolantwort auf NOV deutet ebenfalls darauf hin, dass die Tiere den Stress in dieser Situation bewältigen konnten. Er war im Mittel durch einen Peak bei 30 bis 45 min nach Beginn von NOV gekennzeichnet, auf den unmittelbar der Abfall des Cortisolspiegels auf das Ausgangsniveau vor NOV folgte. Es ist allgemein anerkannt, dass akute, kurzfristige Cortisolanstiege adaptiv sind, da sie durch schnelle Anpassungen der Körperfunktionen (zum Beispiel erhöhter Blutdruck, höhere Herzrate, verstärkte Gluconeogenese) eine sofortige Bewältigung des Stressors ermöglichen. Langfristig erhöhte Cortisolspiegel, das heißt Cortisolantworten mit einer langen Erholungsphase, aufgrund von schweren Stressoren können jedoch Distress widerspiegeln und daher schädlich sein (Moberg, 2000; Turner et al., 2012). Folglich kann der Zeitverlauf der Cortisolantwort Rückschlüsse auf die Schwere eines Stressors zulassen und damit potenzielle Risiken für das Wohlbefinden aufzeigen. Entsprechende Schlussfolgerungen sollten jedoch vorsichtig formuliert werden, da, wie oben bereits erwähnt, die Klärung des Zusammenhangs zwischen Cortisolschwankungen und Wohlbefinden die Untersuchung des Effekts auf die biologischen Funktionen erfordert. Dieser ist aus peripheren Cortisolmessungen nicht ersichtlich (Ralph und Tilbrook, 2016).

5.2 Reaktives und proaktives Management von Stress und Wohlbefinden

Ein Schwerpunkt dieser Arbeit war die Untersuchung des Effekts des Zoomanagements Afrikanischer Elefanten auf deren Cortisolspiegel im Speichel. Dabei handelt es sich um eine reaktive Vorgehensweise, da die physiologische Stressreaktion auf existierende Situationen untersucht wird, um anschließend zu entscheiden, ob die Haltungsbedingungen gegebenenfalls verändert werden müssen. Wie bereits in 5.1 erläutert, gaben die basalen Cortisolspiegel und die Cortisolantworten der in dieser Arbeit untersuchten Tiere keinen Anlass, entsprechende Empfehlungen auszusprechen. Ähnlich verhielt es sich bei Boyle et al. (2015), deren Studie im vorherigen Abschnitt bereits zitiert wurde. Im Gegensatz dazu, zeigte die epidemiologische Studie von Wielebnowski et al. (2002) bei Nebelpardern (*Neofelis nebulosa*) einen signifikanten Zusammenhang zwischen bestimmten Faktoren des Managements (zum Beispiel geringe Höhe des Geheges, Nähe zu Räubern in benachbarten Gehegen), chronisch erhöhten Cortisolmetaboliten im Kot und Indikatoren von geringem Wohlbefinden (abnormales Verhalten und geringer Fortpflanzungserfolg). Die Autoren reagierten in dieser Studie nicht mit entsprechenden Haltungs- und Managementänderungen, sondern empfahlen, zunächst in weiterführenden experimentellen Studien den Effekt der einzelnen Faktoren auf physiologischen Stress sowie die diesbezügliche interindividuelle Variation zu untersuchen. Die Studie von Carlstead et al. (1993) hingegen ist ein typisches Beispiel für reaktives Stressmanagement: Bengalkatzen (*Felis bengalensis*) zeigten während der Haltung in karg eingerichteten Käfigen chronisch erhöhte Cortisolkonzentrationen im Urin sowie Verhalten, das auf geringes Wohlbefinden hindeutete (stereotypes Auf- und Ablaufen, kein Explorationsverhalten). Nachdem die Käfige mit Ästen und Versteckmöglichkeiten ausgestattet worden waren, sanken die Cortisolspiegel sowie das abnormale Verhalten und die Exploration stieg an. Diese Ergebnisse verdeutlichen nebenbei die Nützlichkeit von Enrichment für das Management von Stress und Wohlbefinden.

Die Ergebnisse dieser Arbeit liefern außerdem Erkenntnisse, die proaktives Stressmanagement durch Training und Enrichment unterstützen können. Zum einen schien PRT eine stresspuffernde Wirkung zu haben. Zum anderen können neue Enrichmentobjekte verwendet werden, um die Persönlichkeit und damit das individuelle Enrichmentbedürfnis einzuschätzen. Proaktiv bedeutet, man wartet nicht bis Probleme auftreten (Hill und Broom, 2009), sondern vermeidet von vornherein jene Bedingungen, die Distress hervorrufen. Da es unangenehme Managementsituationen gibt, die nicht zu vermeiden sind (zum Beispiel Transporte), bieten positive Situationen, wie Training und Enrichment, Tieren die Möglichkeit, solche potenziell aversiven Stressoren zu bewältigen. Studien, die die Wirkung von Training auf die Cortisolantworten auf Transporte oder veterinärmedizinische Verfahren untersuchten, bestätigen diesen

Effekt: Erfahrene (das heißt trainierte) Tiere hatten stets geringere Cortisolspiegel nach dem Transport bzw. der Behandlung als naive (das heißt nicht-trainierte) Tiere (Dembiec et al., 2004; Desportes et al., 2007; Fell und Shutt, 1986; Grandin, 2000; Stockman et al., 2011). Folglich besteht der stresspuffernde Effekt nicht nur beim Training (quasi der Simulation der Managementsituation), sondern auch bei dem tatsächlichen Ereignis. Außerdem scheinen PRT und Enrichment die generelle Fähigkeit zur Stressbewältigung zu erhöhen (Bassett et al., 2003; Renner, 1988; Swaisgood et al., 2005) und die Tiere damit proaktiv vor exzessivem Stress (Distress) zu schützen. Studien der Effekte dieser Managementwerkzeuge betonen, dass die Möglichkeit zur Auseinandersetzung mit Neuartigkeit, zur Exploration und zur Ausübung eines größeren Verhaltensrepertoires die Entwicklung von Stressbewältigungs-, Anpassungs- und Lernfähigkeiten und damit das Wohlbefinden fördert (Carlstead und Shepherdson, 1994; Jones und Waddington, 1992; Laule und Desmond, 1998; Meehan und Mench, 2002; Swaisgood et al., 2005).

Darüber hinaus deckte in dieser Arbeit der *Novel Object Test* (NOV) konsistente Unterschiede in dem Ausmaß der Interaktion mit einem neuartigen Enrichmentobjekt zwischen den untersuchten Elefanten auf. Dieses Ergebnis deutet auf die Existenz des Persönlichkeitsmerkmals „Kühnheit“ bei den untersuchten Tieren hin, das auch vorherige Persönlichkeitsstudien bei Afrikanischen Elefanten nachweisen konnten (Horback et al., 2013; Lee und Moss, 2012; Williams et al., 2019; Yasui et al., 2013). Der NOV ist ein Standardtest in der Persönlichkeitsforschung bei Tieren (zum Beispiel Andersson et al., 2014; Bergvall et al., 2011; Logan, 2016) und kann leicht in das Zootiermanagement integriert werden (Powell und Svoke, 2008). Er stellt somit eine vielversprechende Methode dar, um auf standardisierte Art und Weise die Persönlichkeit eines Elefanten einzuschätzen. Persönlichkeitsstudien können Einblicke in die subjektiven psychischen Erfahrungen, Tendenzen und Veranlagungen von Zootieren geben und wichtige für das Wohlbefinden relevante Managemententscheidungen beeinflussen (Tetley und O'Hara, 2012; Watters und Powell, 2012). So ermöglichen Kenntnisse über das Ausmaß der individuellen Kühnheit nicht nur Vorhersagen über die Reaktion auf neue Enrichmentobjekte, sondern auch über die Geschwindigkeit von assoziativem Lernen, zum Beispiel im Training (Coleman et al., 2005; Dugatkin und Alfieri, 2003; Guenther et al., 2014), den Erfolg der Auswilderung (Bremner-Harrison et al., 2004; Sinn et al., 2014), den Fortpflanzungserfolg eines Zuchtpaares (Martin-Wintle et al., 2017) und die Bildung sozialer Gruppen (Williams et al., 2019). Folglich sollten Haltungs- und Managementbedingungen proaktiv entsprechend der Persönlichkeit der Tiere gestaltet werden, was Distress zum Beispiel aufgrund von Unter- oder

Überstimulierung durch Enrichment oder aufgrund von Gruppenhaltung inkompatibler Individuen vorbeugen kann (Hill und Broom, 2009; Tetley und O'Hara, 2012; Watters und Powell, 2012).

Diese Arbeit zeigte, dass PRT und NOV keinen exzessiven physiologischen Stress auslösen (reaktive Vorgehensweise) und befürwortet dadurch den Einsatz dieser Werkzeuge im proaktiven Stressmanagement. Folglich müssen sich reaktives und proaktives Stressmanagement ergänzen (Hill und Broom, 2009). Wissen über den Input, der physiologischen Stress hervorruft, und den Output, der das Wohlbefinden beeinflusst, bildet die Grundlage dafür. Darauf basierend können schließlich reaktive, zum Beispiel Bereitstellung von Versteckmöglichkeiten, und proaktive Maßnahmen, zum Beispiel regelmäßiges Training, ergriffen werden, um Distress zu vermeiden.

5.3 Herausforderungen und Möglichkeiten der Cortisolmessung aus Speichel und des *Novel Object Tests*

Die folgenden Abschnitte sollen zukünftigen Studien methodische Herausforderungen, Einschränkungen bei der Interpretation der Ergebnisse sowie Möglichkeiten für weiterführende Untersuchungen aufzeigen. Bevor diese Punkte speziell für die Cortisolmessung aus Speichel und den *Novel Object Test* erläutert werden, wird im Folgenden noch auf zwei allgemeine Aspekte eingegangen, die beide Methoden betreffen: die Unterstützung durch das Zoopersonal und die Kontrolle von Störvariablen.

5.3.1 Die Unterstützung der Forschung durch Zoopersonal

Die Planung und Durchführung der Studie erforderte die enge Zusammenarbeit mit dem Zoopersonal. Der Ablauf der Studie insgesamt und des Experiments wurde in jedem Zoo vor Beginn des ersten Untersuchungszeitraums in 2016 zusammen mit dem jeweiligen Kurator und Zoodirektor sowie den Elefantenpflegern festgelegt. Während der Untersuchungszeiträume war die kontinuierliche Anwesenheit im Revier und gute Kommunikation mit den Pflegern unerlässlich, um über jegliche Ereignisse informiert zu bleiben, die die Ergebnisse oder den Ablauf der Studie hätten beeinflussen können. Dazu gehörten Änderungen des Managements, die Dienstpläne der Pfleger sowie anstehende tiermedizinische Untersuchungen. Bei der Durchführung der Studie übernahmen die Pfleger nicht nur die essentiellen Aufgaben des Sperrens der Elefanten für das Experiment und der Entnahme der Speichelproben, sondern leisteten darüber hinaus vorausschauend Unterstützung, zum Beispiel bei der Positionierung der Kameras und der Organisation von Equipment. Wie von Hill und Broom (2009) treffend zusammengefasst,

hängt daher vieles von dem, was in der Praxis durchgeführt werden kann, vom guten Willen der Tierpfleger, Kuratoren etc. und der Zeit ab, die sie für die Unterstützung des Forschers aufwenden können oder wollen. Dies kann je nach Zoo und Tierpfleger unterschiedlich sein und kann zudem von der Einstellung des Forschers und seinem Verhalten vor Ort im Zoo abhängen.

5.3.2 Die Kontrolle von Störvariablen

Die vorliegende Arbeit bezog Elefanten aus drei verschiedenen Zoos in die Untersuchungen mit ein. Dies brachte aufgrund der unterschiedlichen Haltungsbedingungen viele potenzielle Störvariablen mit sich (zum Beispiel Gehege, Gruppenstruktur, Arbeitsroutine, etc.; Bishop et al., 2013; Hosey et al., 2011). Diese wurden überwiegend nicht gemessen, könnten aber die Unterschiede in Cortisolspiegel und Verhalten zwischen Elefanten und Zeitpunkten beeinflusst haben (Hosey et al., 2011). Eine Multi-Zoo-Studie war jedoch angesichts der geringen Anzahl an Tieren pro Zoo unumgänglich. Um den Einfluss von Störvariablen insbesondere auf die Cortisolsekretion zu minimieren, folgte diese Arbeit der Leitlinie, die Arbeitsroutinen der Pfleger so wenig wie möglich zu verändern, um die Untersuchungen unter den Bedingungen durchzuführen, die die Tiere kennen (Bishop et al., 2013). Dies schloss das positive Verstärkungstraining innerhalb des Experiments mit ein, da die Tiere so trainiert werden sollten, wie sie es nach der zoospezifischen Routine gewöhnt waren. Lediglich die Bedingungen während des Experiments wurden entsprechend der lokalen Gegebenheiten so gut wie möglich konstant gehalten, um die Vergleichbarkeit zwischen Elefanten zu gewährleisten. Umweltbedingungen, die nicht kontrolliert werden konnten, umfassten zum Beispiel das Verhalten von Besuchern, Pflegern und den anderen Elefanten, Wiedereinflüsse und individuelle Faktoren (vor allem vorangegangene Erfahrungen). Der Umgang mit nicht-kontrollierbaren Störvariablen besteht zum einen darin, anzuerkennen, dass diese einen Einfluss auf die Ergebnisse haben könnten (zum Beispiel das Enrichmentniveau, siehe Manuskript C; Hosey et al., 2011). Zum anderen kann durch gutes experimentelles Design der Einfluss von Störvariablen minimiert werden (Bishop et al., 2013; Hosey et al., 2011). Zum Beispiel wurden für diese Arbeit nur adulte Elefanten ausgewählt. Außerdem ähnelten sich die Konstellationen der Gruppen in Kronberg und Erfurt (ein Bulle, zwei Kühe). Schließlich diente jedes Individuum als seine eigene Kontrolle, zum Beispiel waren die Cortisolwerte vor und nach einem PRT und NOV-Trial stets innerhalb des Individuums und Trials gepaart. Durch ein solches *repeated measures design* können Störvariablen vermieden werden, die mit Unterschieden zwischen Tieren zusammenhängen und das

Ergebnis eines Experiments beeinflussen können (Martin and Bateson, 2007; Wielebnowski et al., 2002).

5.3.3 Cortisolmessung aus Speichel

Die Herausforderungen der Cortisolmessung aus Speichel betrafen die Einhaltung des Protokolls der Probenentnahme, die Festlegung der Häufigkeit und Dauer der Probenentnahme sowie die Interpretation der gemessenen Werte angesichts großer individueller Variation.

In den in dieser Arbeit vorgestellten Studien wurde versucht, die Speichelproben unter möglichst konstanten Bedingungen zu sammeln. Trotzdem kann nicht ausgeschlossen werden, dass unbekannte Stressoren vor und während des Experiments die gemessenen Werte beeinflussten, da vollkommen unklar ist, welche Situationen und Reize bei welchen Individuen zu Cortisolantworten führen. Tageszeit- und stressbedingte Änderungen der Aktivität der HPA-Achse erscheinen mit kurzer Zeitverzögerung als Cortisolantworten im Speichel (Heistermann, 2010). Daher ist die Einhaltung eines Protokolls, das konstante Bedingungen während der Probenentnahme vorgibt, bei der Messung von Cortisol aus Speichel essentiell, um verzerrende Cortisolchwankungen aufgrund unterschiedlicher Uhrzeiten oder Bedingungen während der Probenentnahme zu vermeiden.

Um den Verlauf der Cortisolantwort auf PRT bzw. NOV zu erfassen, wurde nach der jeweiligen Situation für 45 min alle 10-15 min eine Speichelprobe von dem zu untersuchenden Elefanten entnommen. Diese zeitliche Auflösung entspricht dem Intervall, das vorherige Studien gewählt haben, um die Cortisolantworten auf Stressoren zu untersuchen (Beerda et al., 1998; Heintz et al., 2011; Hernandez et al., 2014; Kirschbaum et al., 1993). Falls logistisch möglich, ist eine länger andauernde Probenentnahme zu empfehlen, um, im Falle einer akuten Cortisolantwort, die Dauer der Erholungsphase nach dem Peak und damit die Schwere des Stressors genauer zu untersuchen.

Die Cortisolantwort auf den Transport und die Eingewöhnung des transferierten Elefanten (CS) im neuen Zoo (Erfurt) wurde ebenfalls im Speichel gemessen. Die Ergebnisse zeigen zum einen, dass die relativen Cortisolanstiege bei CS nach dem Transfer und bei allen Tieren nach der Zusammenführung mit dem Bullen am Nachmittag höher als am Morgen waren. Zum anderen enthielt der zeitliche Verlauf der Cortisolwerte über die Tage nach dem Transport immer wieder Peaks, die vermutlich aufgrund von akuten, aber leider nicht identifizierbaren Stressoren ausgelöst wurden. Aufgrund dieser „Anfälligkeit“ des Speichelcortisols für tageszeitliche Schwankungen und unbekannte Stressoren wird überwiegend Kot verwendet, um physiologischen Stress durch länger andauernde potenzielle Stressoren (wie Transporte) oder bestimmte

Umweltbedingungen zu erfassen (Goymann et al., 1999; Laws et al., 2007; Sheriff et al., 2009; Wielebnowski et al., 2002). Dieses Probenmaterial liefert integrierte Messungen der Menge des über einen bestimmten Zeitraum ausgeschütteten, verstoffwechselten und ausgeschiedenen Cortisols (Palme et al., 2005; Sheriff et al., 2011a). Daher ist die Konzentration von Cortisolmetaboliten im Kot insbesondere bei Arten mit einer langen Darmdurchgangszeit (wie dem Afrikanischen Elefanten: 38 h, Ganswindt et al., 2003) wenig anfällig für kurzfristige Schwankungen der Cortisolsekretion (Heistermann, 2010). In der vorliegenden Studie konnte die unmittelbare Cortisolantwort auf den Transport nicht gemessen werden, da die Tiere kurz nach dem Transport, vermutlich aufgrund von Erschöpfung, bei der Speichelentnahme nicht kooperierten. Die Sammlung von Kotproben ist nicht invasiv und hat daher gegenüber der Entnahme von Speichelproben den Vorteil, dass die Kooperation des Tieres für Cortisolmessungen nicht erforderlich ist.

Die vorliegende Arbeit fand beachtliche intra- und interindividuelle Variation in der basalen Cortisolsekretion und in den Cortisolantworten auf die drei untersuchten Management-situationen. Insbesondere die individuelle Variation der Zeitverläufe der Cortisolantworten auf PRT und NOV verdeutlicht die Variabilität der Cortisolsekretion, wenn diese im Speichel gemessen wird. Um trotz dieser Variabilität generelle Muster im Verlauf der Cortisolantwort und den Einfluss von Faktoren erkennen zu können, wurde diese individuelle Variation durch lineare gemischte Modelle statistisch kontrolliert (Bishop et al., 2013). Die möglichen Ursachen für die Variation innerhalb von und zwischen Individuen wurden in 1.2.3 bereits ausführlich dargestellt und werden in Publikation A und Manuskript B diskutiert.

Im Falle einer ausbleibenden Cortisolantwort auf einen potenziellen Stressor kann nicht ausgeschlossen werden, dass die Stressbewältigung über eine andere Stressantwort erfolgte, das heißt, dass das Individuum Stress ausgesetzt war, der nicht durch eine erhöhte Aktivität der HPA-Achse deutlich wurde. Es ist sehr wahrscheinlich, dass potenzieller Stress durch PRT und NOV durch Verhaltensantworten bewältigt wurde, da diese Situationen den Tieren Kontrolle bzw. viele Verhaltensoptionen ermöglichen, was nachweislich die Stressbewältigung fördert (siehe 1.3.2 und 1.3.3). Es besteht auch die Möglichkeit, dass die Stressantwort des sympathischen Nervensystems in Abhängigkeit von der Wahrnehmung der Kontrollierbarkeit der Situation zu der Bewältigung des Stressors beigetragen hat. Zum Beispiel reagierten Mäuse auf kontrollierbare Situationen mit einem starken Anstieg von Noradrenalin, keiner Erhöhung von Adrenalin und einer antizipatorischen Cortisolantwort, das heißt der Peak trat vor dem Auftreten des eigentlichen Stressors auf (letzteres wurde im Mittel bei PRT beobachtet). Als die Tiere die Kontrolle über die Situation verloren, kehrte sich dieses Muster teilweise um: Noradrenalin

blieb konstant niedrig, während Adrenalin und Cortisol anstiegen, wobei das Cortisol im Gegensatz zum Adrenalin erhöht blieb (de Boer et al., 1990). Um die Stressantwort sicher zu erfassen, sollten zukünftige Studien daher Cortisolmessungen mit der Untersuchung anderer potenzieller Stressantworten kombinieren.

5.3.4 *Novel Object Test*

Die Durchführung des NOV umfasste folgende methodische Entscheidungen: Welche neuartigen Objekte sollen verwendet werden? In welchem sozialen Kontext sollen die Elefanten getestet werden (das heißt alleine oder in der Gruppe)? Sollen die Bedingungen experimentell kontrolliert oder soll der Test ad libitum in die tägliche Arbeitsroutine integriert werden? Diese Herausforderungen liefern jedoch gleichzeitig neue interessante Anknüpfungspunkte für zukünftige Studien, die den NOV bei Elefanten durchführen wollen.

In der vorliegenden Studie wurden neuartige Objekte mit unterschiedlichen Eigenschaften verwendet, um Habituation zu vermeiden, die bei der Verwendung ähnlicher Objekttypen hätte auftreten können (Christensen et al., 2008; Wuerz und Krüger, 2015). Die vorliegende Studie konnte keine Habituation (das heißt keine abnehmende Reaktion) gegenüber verschiedenen neuartigen Objekten feststellen und stimmt daher mit Studien bei Pferden überein (Leiner und Fendt, 2011). Jedoch ist das Pferd als Fluchttier eine eher neophobe Art (Christensen et al., 2005). Parallelen zu dem Elefanten, einer Spezies ohne natürliche Feinde, sollten daher mit Vorsicht gezogen werden.

Auf der Grundlage der Erkenntnisse dieser Arbeit sollten alltägliche Objekte, die nicht regelmäßig im Routinemanagement der Elefanten verwendet werden, ausreichend neuartig sein. Ein Objekt in Wuppertal musste ausgeschlossen werden, weil die Elefanten in diesem Zoo erst kurz vor der Studie diesem Objekt ausgesetzt waren. Darüber hinaus sollten die Objekte nach Einschätzung der Pfleger natürlich sicher, nicht essbar (Powell und Svoke, 2008) und ausreichend robust sein, das heißt nicht leicht zerstört werden können. Es wurde entschieden, im Laufe der Studie ein Objekt (eine aufblasbare Palme) gegen ein anderes Objekt (einen Verkehrskegel) auszutauschen, da ersteres bereits nach geringfügiger Manipulation kaputtging. Außerdem werden Objekte potenziell aus der Testarena hinausgeworfen und man muss sich in diesem Fall entscheiden, wie man mit diesem Problem umgeht. Entweder wird das Objekt wieder in die Testarena zurückgeworfen (was das Verhalten des Tieres beeinflussen könnte) oder die Zeit, in der sich das Objekt außerhalb der Testarena befindet, wird als OUT (Verhalten des Tieres kann nicht aufgezeichnet werden) registriert.

Zukünftige Studien könnten systematisch die Wirkung verschiedener Eigenschaften von neuartigen Objekten auf das Verhalten testen. In dieser Hinsicht ist das Ausmaß der Komplexität und Kontrollierbarkeit des Objekts besonders interessant (Sambrook und Buchanan-Smith, 1997). Zudem könnte das gleiche Objekt mehrmals präsentiert werden, um Lerneffekte zu untersuchen. Solche Untersuchungen können nicht nur als Grundlage zur Verfeinerung der Methodik des NOV dienen, sondern geben auch Aufschluss über die Wirksamkeit verschiedener Objekte als Enrichment (Altman, 1999; Bloomsmith et al., 1990; Swaisgood et al., 2001; Swaisgood et al., 2005; Vick et al., 2000). Die Evaluierung der Wirksamkeit von Enrichment ist für die Gestaltung von Enrichmentprogrammen, die nachhaltig einen Effekt auf das Wohlbefinden haben sollen, essentiell (Sach et al., 2019; Shepherdson, 2010).

Die Elefanten wurden in der vorliegenden Studie überwiegend alleine getestet, da weitere Tiere das Verhalten des getesteten Tieres hätten beeinflussen können (Boissy und Le Neindre, 1990; Stöwe et al., 2006a; Stöwe et al., 2006b). Durch experimentelle Manipulation des sozialen Kontexts, in dem der NOV stattfindet, könnte untersucht werden, wie sich das Verhalten gegenüber dem neuartigen Objekt je nach Gruppengröße oder dem Status des/der anderen Elefanten (dominant, untergeordnet, verwandt, befreundet) ändert. Solche Untersuchungen können Aufschluss darüber geben, ob die Sozialstruktur der Gruppe die Wirksamkeit von Enrichment, durch zum Beispiel Monopolisierung durch dominante Tiere (Ryan et al., 2012) oder soziales Lernen (Greco et al., 2013), beeinflusst.

In der vorliegenden Arbeit folgte der Ablauf des NOV einem festgelegten experimentellen Aufbau, um die Variation in den Umweltbedingungen zwischen Elefanten und Trials zu kontrollieren: Innerhalb eines Zoos fand der NOV immer zur selben Zeit in demselben Gehegebereich statt, Futter stand nicht zur Verfügung und das Objekt wurde immer an dieselbe Stelle gelegt. Unter diesen relativ konstanten Bedingungen konnte die vorliegende Studie anhand der Wiederholbarkeit (*repeatability*) und Konsistenz der Unterschiede zwischen den Tieren die Reliabilität des NOV zeigen. Das Ausmaß der Umweltvariation zwischen Trials kann den Grad der Wiederholbarkeit des individuellen Verhaltens und gegebenenfalls auch die Konsistenz der Verhaltensunterschiede beeinflussen, wobei höhere Umweltvariation mit einer geringeren Wiederholbarkeit und gegebenenfalls einer geringeren Konsistenz einhergehen kann (Hayes und Jenkins, 1997). Folglich stellt sich die Frage, ob die Konsistenz der interindividuellen Verhaltensunterschiede im NOV auch dann gegeben ist, wenn der NOV ad libitum in die tägliche Arbeitsroutine integriert wird, sprich immer dann das Verhalten der Elefanten aufgezeichnet wird, wenn neues Enrichment eingesetzt wird. In diesem Fall würde die Variation der Umweltbedingungen zwischen Elefanten und Trials nicht kontrolliert. Soll der NOV ad libitum

durchgeführt werden, sollte diese Frage untersucht werden, um sicherzugehen, dass die interindividuellen Verhaltensunterschiede auch bei größerer Umweltvariation (zum Beispiel aufgrund verschiedener Tageszeiten) über Wiederholungen des Tests hinweg konsistent sind.

Der Nachweis der Validität des NOV zur Untersuchung der Persönlichkeit bei Afrikanischen Elefanten ist der nächste Schritt nach der Überprüfung der Reliabilität (Meagher, 2009). Meistens geschieht dies durch die Korrelation der Ergebnisse des Tests mit Verhaltensbewertungen (zum Beispiel Carlstead et al., 1999b; Powell und Svoke, 2008), um zu zeigen, dass beide Methoden dasselbe und damit sehr wahrscheinlich das Phänomen von Interesse messen (Meagher, 2009). Die Kombination des NOV mit anderen Methoden (Verhaltensbewertungen durch Pfleger, ethologische Beobachtungen) kann zudem ein umfassenderes Bild der Persönlichkeit liefern, da der NOV nur den spezifischen Aspekt der Kühnheit/Neophobie misst.

Wie von Horback et al. (2013) vorgeschlagen, wurde auch in dieser Arbeit ein Zusammenhang zwischen der individuellen Kühnheit und dem individuellen Enrichmentbedürfnis vermutet. Diese Interpretation der individuellen Reaktion auf neuartige Objekte ist in dieser Arbeit nur eingeschränkt möglich. Um die Validität des NOV zur Messung des individuellen Enrichmentbedürfnisses zu überprüfen, könnten zukünftige Studien das Enrichmentniveau vor dem NOV experimentell kontrollieren. Im Allgemeinen sollten niedrigere Enrichmentniveaus mit größerem Interesse an dem neuartigen Objekt verbunden sein und umgekehrt (Bloomsmith et al., 1990; Bracke und Spoolder, 2008; Meehan und Mench, 2002; Schulze Westerath et al., 2009). Darüber hinaus sollten Tiere mit höherem Enrichmentbedürfnis (das heißt kühne Tiere) im Allgemeinen mehr Interesse an dem neuartigen Objekt zeigen als Tiere mit niedrigerem Enrichmentbedürfnis, unabhängig von dem Enrichmentniveau vor dem NOV. Dieser Nachweis des Zusammenhangs zwischen Kühnheit und Enrichmentbedürfnis liefert die wissenschaftliche Grundlage für die Entwicklung individueller Enrichmentprogramme. Individuell zugeschnittenes Enrichment kann Distress durch zu wenig Enrichment (bei kühnen Tieren) und Distress durch zu viel Enrichment (bei scheuen Tieren) proaktiv vermeiden.

Die in dieser Arbeit vorgestellte NOV-Methodik wurde im Hinblick auf die Integration in das tägliche Elefantenmanagement vereinfacht. Das Verhalten ist eindeutig definiert, weshalb dessen Erkennung im Allgemeinen keine umfassenden Kenntnisse von Elefantenverhalten erfordert. Zudem scheint bereits das Verhalten in den ersten 90 sec des Tests den Grad der Kühnheit des Elefanten widerzuspiegeln. Folglich könnte eine Testdauer von 90 sec genügen. Trotz der relativen Einfachheit der Methodik muss deren Reliabilität und Validität bei einer großen Anzahl von Tieren und Haltungen gezeigt werden. Dies ist Voraussetzung für die

Standardisierung des NOV als objektives, schnelles und praktisches Werkzeug in der Persönlichkeitsforschung bei Elefanten, denn nur, wenn die Verhaltensunterschiede konsistent sind, sind sie auch bedeutsam.

6 Schlussfolgerung

Die vorliegende Arbeit untersuchte den Input, der beim Afrikanischen Elefanten im Rahmen des Zoomanagements physiologischen Stress hervorrufen und potenziell das Wohlbefinden beeinträchtigen kann: Das Routinemanagement ging mit der erwarteten diurnalen Variation der basalen Cortisolsekretion einher. Der Transport könnte ein Stressor gewesen sein, führte aber nicht zu dauerhaft erhöhten Cortisolspiegeln. Managementsituationen, die allgemein als positiv für das Wohlbefinden angesehen werden, schienen im Mittel eine stresspuffernde Wirkung bzw. eine adaptive kurzfristige Cortisolantwort hervorgerufen zu haben. Jedoch muss bei Cortisolmessungen allgemein unbedingt die individuelle Variation in den Cortisolantworten berücksichtigt werden, um der Subjektivität der Wahrnehmung und Bewältigung von Stress gerecht zu werden.

Die Ergebnisse dieser Arbeit lassen vermuten, dass die untersuchten Elefanten keinen Distress erfuhren. Jedoch kann erst die Untersuchung des Outputs, das heißt der Effekte des physiologischen Stresses auf die biologischen Funktionen (zum Beispiel die Fortpflanzung), diese Schlussfolgerung validieren.

Die Untersuchung der Effekte des Managements auf Stress und Wohlbefinden unterstützt in reaktiver Art und Weise Entscheidungen darüber, welche Bedingungen bereitgestellt und welche Situationen vermieden werden müssen, um Distress vorzubeugen und das Wohlbefinden zu fördern. Ein reaktiver Ansatz ist aber auch die Voraussetzung, um zukünftig proaktiv das Management umzugestalten. Diese Arbeit schlägt vor, den *Novel Object Test* in das Enrichmentprogramm des Routinemanagements zu integrieren, um schnell und objektiv die Persönlichkeit von Elefanten einzuschätzen. Die Persönlichkeit bestimmt maßgeblich die Wahrnehmung von Stress und Wohlbefinden in den Situationen, denen ein Elefant in seinem alltäglichen und nicht-alltäglichen Zoomanagement gegenübersteht. Die weitere Erforschung dieses Konzepts und seiner Konsequenzen für Stress und Wohlbefinden stellt daher die Grundlage für zukunftsweisendes proaktives Zoomanagement von Elefanten dar.

7 Literaturverzeichnis

- Aich, P., Potter, A. A., & Griebel, P. J. (2009). Modern approaches to understanding stress and disease susceptibility: A review with special emphasis on respiratory disease. *International Journal of General Medicine*, 2, 19–32. <https://doi.org/10.2147/ijgm.s4843>.
- Altman, J. D. (1999). Effects of inedible, manipulable objects on captive bears. *Journal of Applied Animal Welfare Science*, 2, 123–132. https://doi.org/10.1207/s15327604jaws0202_4.
- Andersson, A., Laikre, L., & Bergvall, U. A. (2014). Two shades of boldness: Novel object and anti-predator behavior reflect different personality dimensions in domestic rabbits. *Journal of Ethology*, 32, 123–136. <https://doi.org/10.1007/s10164-014-0401-9>.
- Anestis, S. F., Bribiescas, R. G., & Hasselschwert, D. L. (2006). Age, rank, and personality effects on the cortisol sedation stress response in young chimpanzees. *Physiology & Behavior*, 89, 287–294. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2006.06.010>.
- Archie, E. A., Morrison, T. A., Foley, C. A. H., Moss, C. J., & Alberts, S. C. (2006). Dominance rank relationships among wild female African elephants, *Loxodonta africana*. *Animal Behaviour*, 71, 117–127. <https://doi.org/10.1016/j.anbehav.2005.03.023>.
- Baker, K., & Pullen, P. K. (2013). The impact of housing and husbandry on the personality of cheetah (*Acinonyx jubatus*). *Journal of Zoo and Aquarium Research*, 1, 35–40. <https://doi.org/10.19227/jzar.v1i1.11>.
- Bassett, L., & Buchanan-Smith, H. M. (2007). Effects of predictability on the welfare of captive animals. *Applied Animal Behaviour Science*, 102, 223–245. <https://doi.org/10.1016/j.applanim.2006.05.029>.
- Bassett, L., Buchanan-Smith, H. M., McKinley, J., & Smith, T. E. (2003). Effects of training on stress-related behavior of the common marmoset (*Callithrix jacchus*) in relation to coping with routine husbandry procedures. *Journal of Applied Animal Welfare Science*, 6, 221–233. https://doi.org/10.1207/S15327604JAWS0603_07.
- Bates, L. A., Poole, J. H., & Byrne, R. W. (2008). Elephant cognition. *Current Biology*, 18, R544–546. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2008.04.019>.
- Beerda, B., Schilder, M. B., Janssen, N. S., & Mol, J. A. (1996). The use of saliva cortisol, urinary cortisol, and catecholamine measurements for a noninvasive assessment of stress responses in dogs. *Hormones and Behavior*, 30, 272–279. <https://doi.org/10.1006/hbeh.1996.0033>.

- Beerda, B., Schilder, M. B. H., van Hooff, J. A. R. A. M., de Vries, H. W., & Mol, J. A. (1998). Behavioural, saliva cortisol and heart rate responses to different types of stimuli in dogs. *Applied Animal Behaviour Science*, *58*, 365–381. [https://doi.org/10.1016/S0168-1591\(97\)00145-7](https://doi.org/10.1016/S0168-1591(97)00145-7).
- Behringer, V., Clauss, W., Hachenburger, K., Kuchar, A., Möstl, E., & Selzer, D. (2009). Effect of giving birth on the cortisol level in a bonobo groups' (*Pan paniscus*) saliva. *Primates*, *50*, 190–193. <https://doi.org/10.1007/s10329-008-0121-2>.
- Behringer, V., Stevens, J. M. G., Hohmann, G., Möstl, E., Selzer, D., & Deschner, T. (2014). Testing the effect of medical positive reinforcement training on salivary cortisol levels in bonobos and orangutans. *PLOS ONE*, *9*, e108664. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0108664>.
- Bergvall, U. A., Schäpers, A., Kjellander, P., & Weiss, A. (2011). Personality and foraging decisions in fallow deer, *Dama dama*. *Animal Behaviour*, *81*, 101–112. <https://doi.org/10.1016/j.anbehav.2010.09.018>.
- Bhatnagar, S., & Dallman, M. (1998). Neuroanatomical basis for facilitation of hypothalamic-pituitary-adrenal responses to a novel stressor after chronic stress. *Neuroscience*, *84*, 1025–1039. [https://doi.org/10.1016/S0306-4522\(97\)00577-0](https://doi.org/10.1016/S0306-4522(97)00577-0).
- Bhatnagar, S., & Vining, C. (2003). Facilitation of hypothalamic–pituitary–adrenal responses to novel stress following repeated social stress using the resident/intruder paradigm. *Hormones and Behavior*, *43*, 158–165. [https://doi.org/10.1016/S0018-506X\(02\)00011-9](https://doi.org/10.1016/S0018-506X(02)00011-9).
- Birkett, L. P., & Newton-Fisher, N. E. (2011). How abnormal is the behaviour of captive, zoo-living chimpanzees? *PLOS ONE*, *6*, e20101. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0020101>.
- Bishop, J., Hosey, G., Plowman, A. (2013). Handbook of zoo research, guidelines for conducting research in zoos. British and Irish Association of Zoos and Aquariums (BIAZA). Abgerufen 27.04.2020, von <https://biaza.org.uk/research-resources>.
- Blecha, F. (2000). Immune system response to stress. In Moberg, G. P., Mench, J. A. (Hrsg.), *The biology of animal stress: Basic principles and implications for animal welfare* (S. 111–121). Wallingford: CABI Publishing.
- Bloomsmith, M. A., Finlay, T. W., Merhalski, J. J., & Maple, T. L. (1990). Rigid plastic balls as enrichment devices for captive chimpanzees. *Laboratory Animal Science*, *40*, 319–322.

- BMEL. Bundesministerium für Ernährung und Landwirtschaft (2014). Gutachten über Mindestanforderungen an die Haltung von Säugetieren. Abgerufen 27.04.2020, von https://www.bmel.de/DE/Tier/Tierschutz/Tierschutzgutachten/_texte/HaltungSaeugetiere.html.
- Bohák, Z., Szabó, F., Beckers, J.-F., Melo de Sousa, N., Kutasi, O., Nagy, K., & Szenci, O. (2013). Monitoring the circadian rhythm of serum and salivary cortisol concentrations in the horse. *Domestic Animal Endocrinology*, *45*, 38–42. <https://doi.org/10.1016/j.domaniend.2013.04.001>.
- Boissy, A., & Le Neindre, P. (1990). Social influences on the reactivity of heifers: Implications for learning abilities in operant conditioning. *Applied Animal Behaviour Science*, *25*, 149–165. [https://doi.org/10.1016/0168-1591\(90\)90077-Q](https://doi.org/10.1016/0168-1591(90)90077-Q).
- Boissy, A., Manteuffel, G., Jensen, M. B., Moe, R. O., Spruijt, B., Keeling, L. J., Winckler, C., Forkman, B., Dimitrov, I., Langbein, J., Bakken, M., Veissier, I., & Aubert, A. (2007). Assessment of positive emotions in animals to improve their welfare. *Physiology & Behavior*, *92*, 375–397. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2007.02.003>.
- Boonstra, R., Hik, D., Singleton, G. R., & Tinnikov, A. (1998). The impact of predator-induced stress on the snowshoe hare cycle. *Ecological Monographs*, *68*, 371–394. [https://doi.org/10.1890/0012-9615\(1998\)068\[0371:TIOPIS\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1890/0012-9615(1998)068[0371:TIOPIS]2.0.CO;2).
- Boyle, S. A., Roberts, B., Pope, B. M., Blake, M. R., Leavelle, S. E., Marshall, J. J., Smith, A., Hadicke, A., Falcone, J. F., Knott, K., & Kouba, A. J. (2015). Assessment of flooring renovations on African elephant (*Loxodonta africana*) behavior and glucocorticoid response. *PLOS ONE*, *10*, e0141009. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0141009>.
- Bracke, M. B. M., & Spooler, H. A. M. (2008). Novel object test can detect marginal differences in environmental enrichment in pigs. *Applied Animal Behaviour Science*, *109*, 39–48. <https://doi.org/10.1016/j.applanim.2007.01.014>.
- Bremner-Harrison, S., Prodohl, P. A., & Elwood, R. W. (2004). Behavioural trait assessment as a release criterion: Boldness predicts early death in a reintroduction programme of captive-bred swift fox (*Vulpes velox*). *Animal Conservation*, *7*, 313–320. <https://doi.org/10.1017/S1367943004001490>.
- Breuer, K., Hemsworth, P.H., & Coleman, G.J. (2003). The effect of positive or negative handling on the behavioural and physiological responses of nonlactating heifers. *Applied Animal Behaviour Science*, *84*, 3–22. [https://doi.org/10.1016/S0168-1591\(03\)00146-1](https://doi.org/10.1016/S0168-1591(03)00146-1).

- Broom, D. M. (1986). Indicators of poor welfare. *British Veterinary Journal*, *142*, 524–526. [https://doi.org/10.1016/0007-1935\(86\)90109-0](https://doi.org/10.1016/0007-1935(86)90109-0).
- Buchanan-Smith, H. M. (1997). Considerations for the housing and handling of New World primates in the laboratory. Animal Welfare Institute. Abgerufen 27.04.2020, von <https://www.awionline.org/content/considerations-housing-and-handling-new-world-primates-laboratory>.
- Buchanan-Smith, H. M., & Badihi, I. (2012). The psychology of control: Effects of control over supplementary light on welfare of marmosets. *Applied Animal Behaviour Science*, *137*, 166–174. <https://doi.org/10.1016/j.applanim.2011.07.002>.
- Byrne, R. W., & Bates, L. A. (2011). Elephant cognition: What we know about what elephants know. In Moss, C., Croze, H., Lee, P. C. (Hrsg.), *The Amboseli elephants: A long-term perspective on a long-lived mammal* (S. 174–182). Chicago: University of Chicago Press.
- Carere, C., Caramaschi, D., & Fawcett, T. W. (2010). Covariation between personalities and individual differences in coping with stress: Converging evidence and hypotheses. *Current Zoology*, *56*, 728–740. <https://doi.org/10.1093/czoolo/56.6.728>.
- Carlstead, K., Brown, J. L., & Seidensticker, J. (1993). Behavioral and adrenocortical responses to environmental changes in leopard cats (*Felis bengalensis*). *Zoo Biology*, *12*, 321–331. <https://doi.org/10.1002/zoo.1430120403>.
- Carlstead, K., & Shepherdson, D. J. (2000). Alleviating stress in zoo animals with environmental enrichment. In Moberg, G. P., Mench, J. A. (Hrsg.), *The biology of animal stress: Basic principles and implications for animal welfare* (S. 337–354). Wallingford: CABI Publishing.
- Carlstead, K., Fraser, J., Bennett, C., & Kleiman, D. G. (1999a). Black rhinoceros (*Diceros bicornis*) in U.S. zoos: II. behavior, breeding success, and mortality in relation to housing facilities. *Zoo Biology*, *18*, 35–52. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1098-2361\(1999\)18:1%3C35::AID-ZOO5%3E3.0.CO;2-L](https://doi.org/10.1002/(SICI)1098-2361(1999)18:1%3C35::AID-ZOO5%3E3.0.CO;2-L).
- Carlstead, K., Mellen, J., & Kleiman, D. G. (1999b). Black rhinoceros (*Diceros bicornis*) in U.S. zoos: I. individual behavior profiles and their relationship to breeding success. *Zoo Biology*, *18*, 17–34. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1098-2361\(1999\)18:1<17::AID-ZOO4>3.3.CO;2-B](https://doi.org/10.1002/(SICI)1098-2361(1999)18:1<17::AID-ZOO4>3.3.CO;2-B).

- Carlstead, K., Paris, S., & Brown, J. L. (2019). Good keeper-elephant relationships in North American zoos are mutually beneficial to welfare. *Applied Animal Behaviour Science*, *211*, 103–111. <https://doi.org/10.1016/j.applanim.2018.11.003>.
- Carlstead, K., & Shepherdson, D. (1994). Effects of environmental enrichment on reproduction. *Zoo Biology*, *13*, 447–458. <https://doi.org/10.1002/zoo.1430130507>.
- Carter, A. J., Marshall, H. H., Heinsohn, R., & Cowlshaw, G. (2012). How not to measure boldness: Novel object and antipredator responses are not the same in wild baboons. *Animal Behaviour*, *84*, 603–609. <https://doi.org/10.1016/j.anbehav.2012.06.015>.
- Casares, M., Silván, G., Carbonell, M. D., Gérique, C., Martinez-Fernandez, L., Cáceres, S., & Illera, J. C. (2016). Circadian rhythm of salivary cortisol secretion in female zoo-kept African elephants (*Loxodonta africana*). *Zoo Biology*, *35*, 65–69. <https://doi.org/10.1002/zoo.21262>.
- Christensen, J. W., Keeling, L. J., & Nielsen, B. L. (2005). Responses of horses to novel visual, olfactory and auditory stimuli. *Applied Animal Behaviour Science*, *93*, 53–65. <https://doi.org/10.1016/j.applanim.2005.06.017>.
- Christensen, J. W., Zharkikh, T., & Ladewig, J. (2008). Do horses generalise between objects during habituation? *Applied Animal Behaviour Science*, *114*, 509–520. <https://doi.org/10.1016/j.applanim.2008.03.007>.
- Cockrem, J. F. (2007). Stress, corticosterone responses and avian personalities. *Journal of Ornithology*, *148*, 169–178. <https://doi.org/10.1007/s10336-007-0175-8>.
- Cockrem, J. F. (2013). Individual variation in glucocorticoid stress responses in animals. *General and Comparative Endocrinology*, *181*, 45–58. <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2012.11.025>.
- Colborn, D. R., Thompson, D. L., Roth, T. L., Capehart, J. S., & White, K. L. (1991). Responses of cortisol and prolactin to sexual excitement and stress in stallions and geldings. *Journal of Animal Science*, *69*, 2556–2562. <https://doi.org/10.2527/1991.6962556x>.
- Coleman, K., Tully, L. A., & McMillan, J. L. (2005). Temperament correlates with training success in adult rhesus macaques. *American Journal of Primatology*, *65*, 63–71. <https://doi.org/10.1002/ajp.20097>.
- Cook, N. J. (2012). Minimally invasive sampling media and the measurement of corticosteroids as biomarkers of stress in animals. *Canadian Journal of Animal Science*, *92*, 227–259. <https://doi.org/10.4141/cjas2012-045>.

- Dallman, M. F., Akana, S. F., Scribner, K. A., Bradbury, M. J., Walker, C. D., Strack, A. M., & Cascio, C. S. (1992). Stress, feedback and facilitation in the hypothalamo-pituitary-adrenal axis. *Journal of Neuroendocrinology*, *4*, 517–526. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2826.1992.tb00200.x>.
- Dantzer, R., & Mormède, P. (1983). Stress in farm animals: A need for reevaluation. *Journal of Animal Science*, *57*, 6–18. <https://doi.org/10.2527/jas1983.5716>.
- Davenport, M. D., Lutz, C. K., Tiefenbacher, S., Novak, M. A., & Meyer, J. S. (2008). A rhesus monkey model of self-injury: Effects of relocation stress on behavior and neuroendocrine function. *Biological Psychiatry*, *63*, 990–996. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2007.10.025>.
- Day, R. L., Coe, R. L., Kendal, J. R., & Laland, K. N. (2003). Neophilia, innovation and social learning: A study of intergeneric differences in callitrichid monkeys. *Animal Behaviour*, *65*, 559–571. <https://doi.org/10.1006/anbe.2003.2074>.
- De Boer, S. F., de Beun, R., Slangen, J. L., & van der Gugten, J. (1990). Dynamics of plasma catecholamine and corticosterone concentrations during reinforced and extinguished operant behavior in rats. *Physiology & Behavior*, *47*, 691–698. [https://doi.org/10.1016/0031-9384\(90\)90079-J](https://doi.org/10.1016/0031-9384(90)90079-J).
- De Kloet, E. R., Helmerhorst, F. M., Schmidt, M. V., Schmidt, M., & Sibug, R. M. (2005). Stress, genes and the mechanism of programming the brain for later life. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, *29*, 271–281. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2004.10.008>.
- Dembiec, D. P., Snider, R. J., & Zanella, A. J. (2004). The effects of transport stress on tiger physiology and behavior. *Zoo Biology*, *23*, 335–346. <https://doi.org/10.1002/zoo.20012>.
- Desportes, G., Buholzer, L., Anderson-Hansen, K., Blanchet, M.-A., Acquarone, M., Shephard, G., Brando, S., Vossen, A., & Siebert, U. (2007). Decrease stress; train your animals: The effect of handling methods on cortisol levels in harbour porpoises (*Phocoena phocoena*) under human care. *Aquatic Mammals*, *33*, 286–292. <https://doi.org/10.1578/AM.33.3.2007.286>.
- Dobson, H., Tebble, J. E., Phogat, J. B., & Smith, R. F. (1999). Effect of transport on pulsatile and surge secretion of LH in ewes in the breeding season. *Journal of Reproduction and Fertility*, *116*, 1–8. <https://doi.org/10.1530/jrf.0.1160001>.
- Dosmann, A. J., Brooks, K. C., & Mateo, J. M. (2015). Within-individual correlations reveal link between a behavioral syndrome, condition and cortisol in free-ranging Belding's ground squirrels. *Ethology*, *121*, 125–134. <https://doi.org/10.1111/eth.12320>.

- Dugatkin, L. A., & Alfieri, M. S. (2003). Boldness, behavioral inhibition and learning. *Ethology Ecology & Evolution*, *15*, 43–49.
<https://doi.org/10.1080/08927014.2003.9522689>.
- EAZA. European Association of Zoos and Aquaria (2020a). Animal Welfare. Abgerufen 27.04.2020, von <https://www.eaza.net/about-us/areas-of-activity/animal-welfare/>.
- EAZA. European Association of Zoos and Aquaria (2020b). Best practice guidelines. Abgerufen 27.04.2020, von <https://www.eaza.net/conservation/programmes/#BPG>.
- Evans, K. E., & Harris, S. (2008). Adolescence in male African elephants, *Loxodonta africana*, and the importance of sociality. *Animal Behaviour*, *76*, 779–787.
<https://doi.org/10.1016/j.anbehav.2008.03.019>.
- Fanson, K. V., Keeley, T., & Fanson, B. G. (2014). Cyclic changes in cortisol across the estrous cycle in parous and nulliparous Asian elephants. *Endocrine Connections*, *3*, 57–66.
<https://doi.org/10.1530/EC-14-0025>.
- Fell, L. R., & Shutt, D. A. (1986). Use of salivary cortisol as an indicator of stress due to management practices in sheep and calves. *Proceedings of the Australian Society of Animal Production*, *16*, 203–206.
- Foley, C. A. H., Papageorge, S., & Wasser, S. K. (2001). Noninvasive stress and reproductive measures of social and ecological pressures in free-ranging African elephants. *Conservation Biology*, *15*, 1134–1142. <https://doi.org/10.1046/j.1523-1739.2001.0150041134.x>.
- Fraser, D. G. (2008). Understanding animal welfare: The science in its cultural context. Oxford: Wiley-Blackwell.
- Friard, O., & Gamba, M. (2016). BORIS: A free, versatile open-source event-logging software for video/audio coding and live observations. *Methods in Ecology and Evolution*, *7*, 1325–1330. <https://doi.org/10.1111/2041-210X.12584>.
- Gan, S. D., & Patel, K. R. (2013). Enzyme immunoassay and enzyme-linked immunosorbent assay. *The Journal of Investigative Dermatology*, *133*, e12.
<https://doi.org/10.1038/jid.2013.287>.
- Ganswindt, A., Münscher, S., Henley, M., Henley, S., Heistermann, M., Palme, R., Thompson, P., & Bertschinger, H. (2010). Endocrine correlates of musth and the impact of ecological and social factors in free-ranging African elephants (*Loxodonta africana*). *Hormones and Behavior*, *57*, 506–514. <https://doi.org/10.1016/j.yhbeh.2010.02.009>.

- Ganswindt, A., Palme, R., Heistermann, M., Borragan, S., & Hodges, J.K. (2003). Non-invasive assessment of adrenocortical function in the male African elephant (*Loxodonta africana*) and its relation to musth. *General and Comparative Endocrinology*, *134*, 156–166. [https://doi.org/10.1016/S0016-6480\(03\)00251-X](https://doi.org/10.1016/S0016-6480(03)00251-X).
- García, A., Martí, O., Vallès, A., Dal-Zotto, S., & Armario, A. (2000). Recovery of the hypothalamic-pituitary-adrenal response to stress: Effect of stress intensity, stress duration and previous stress exposure. *Neuroendocrinology*, *72*, 114–125. <https://doi.org/10.1159/000054578>.
- Gilliam, T. C., Kandel, E. R., & Jessel, T. M. (2000). Genes and behavior. In Kandel, E. R., Schwartz, J. H. (Hrsg.), *Principles of neural science* (S. 36–62). New York: McGraw-Hill.
- Gosling, S. D. (2001). From mice to men: What can we learn about personality from animal research? *Psychological Bulletin*, *127*, 45–86. <https://doi.org/10.1037/0033-2909.127.1.45>.
- Goymann, W., Möstl, E., Van't Hof, T., East, M. L., & Hofer, H. (1999). Noninvasive fecal monitoring of glucocorticoids in spotted hyenas, *Crocuta crocuta*. *General and Comparative Endocrinology*, *114*, 340–348. <https://doi.org/10.1006/gcen.1999.7268>.
- Grand, A. P., Kuhar, C. W., Leighty, K. A., Bettinger, T. L., & Laudenslager, M. L. (2012). Using personality ratings and cortisol to characterize individual differences in African elephants (*Loxodonta africana*). *Applied Animal Behaviour Science*, *142*, 69–75. <https://doi.org/10.1016/j.applanim.2012.09.002>.
- Grandin, T. (2000). Habituating antelope and bison to cooperate with veterinary procedures. *Journal of Applied Animal Welfare Science*, *3*, 253–261. https://doi.org/10.1207/S15327604JAWS0303_6.
- Greco, B. J., Brown, T. K., Andrews, J. R. M., Swaisgood, R. R., & Caine, N. G. (2013). Social learning in captive African elephants (*Loxodonta africana africana*). *Animal Cognition*, *16*, 459–469. <https://doi.org/10.1007/s10071-012-0586-7>.
- Greenberg, R., & Mettke-Hofmann, C. (2001). Ecological aspects of neophobia and neophilia in birds. *Current Ornithology*, *16*, 119–178. https://doi.org/10.1007/978-1-4615-1211-0_3.
- Gregory, N. G. (2004). *Physiology and behaviour of animal suffering*. Oxford: Wiley-Blackwell. <https://doi.org/10.1002/9780470752494>.
- Grissom, N., & Bhatnagar, S. (2009). Habituation to repeated stress: Get used to it. *Neurobiology of Learning and Memory*, *92*, 215–224. <https://doi.org/10.1016/j.nlm.2008.07.001>.

- Grissom, N., Iyer, V., Vining, C., & Bhatnagar, S. (2007). The physical context of previous stress exposure modifies hypothalamic-pituitary-adrenal responses to a subsequent homotypic stress. *Hormones and Behavior*, *51*, 95–103.
<https://doi.org/10.1016/j.yhbeh.2006.08.011>.
- Gronqvist, G., Kingston-Jones, M., May, A., & Lehmann, J. (2013). The effects of three types of environmental enrichment on the behaviour of captive Javan gibbons (*Hylobates moloch*). *Applied Animal Behaviour Science*, *147*, 214–223.
<https://doi.org/10.1016/j.applanim.2013.04.021>.
- Groothuis, T. G. G., & Carere, C. (2005). Avian personalities: Characterization and epigenesis. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, *29*, 137–150.
<https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2004.06.010>.
- Guenther, A., Brust, V., Dersen, M., & Trillmich, F. (2014). Learning and personality types are related in cavies (*Cavia aperea*). *Journal of Comparative Psychology*, *128*, 74–81.
<https://doi.org/10.1037/a0033678>.
- Guimont, F. S., & Wynne-Edwards, K. E. (2006). Individual variation in cortisol responses to acute "on-back" restraint in an outbred hamster. *Hormones and Behavior*, *50*, 252–260.
<https://doi.org/10.1016/j.yhbeh.2006.03.008>.
- Hall, B. A., Melfi, V., Burns, A., McGill, D. M., & Doyle, R. E. (2018). Curious creatures: A multi-taxa investigation of responses to novelty in a zoo environment. *PeerJ*, *6*, e4454.
<https://doi.org/10.7717/peerj.4454>.
- Hastings, M. H., Duffield, G. E., Smith, E. J. D., Maywood, E. S., & Ebling, F. J. P. (1998). Entrainment of the circadian system of mammals by nonphotic cues. *Chronobiology International*, *15*, 425–445. <https://doi.org/10.3109/07420529808998700>.
- Hatt, J.-M., & Clauss, M. (2006). Feeding Asian and African elephants *Elephas maximus* and *Loxodonta africana* in captivity. *International Zoo Yearbook*, *40*, 88–95.
<https://doi.org/10.1111/j.1748-1090.2006.00088.x>.
- Hayes, J. P., & Jenkins, S. H. (1997). Individual variation in mammals. *Journal of Mammalogy*, *78*, 274–293. <https://doi.org/10.2307/1382882>.
- Heintz, M. R., Santymire, R. M., Parr, L. A., & Lonsdorf, E. V. (2011). Validation of a cortisol enzyme immunoassay and characterization of salivary cortisol circadian rhythm in chimpanzees (*Pan troglodytes*). *American Journal of Primatology*, *73*, 903–908.
<https://doi.org/10.1002/ajp.20960>.

- Heistermann, M. (2010). Non-invasive monitoring of endocrine status in laboratory primates: Methods, guidelines and applications. *Advances in Science and Research*, 5, 1–9. <https://doi.org/10.5194/asr-5-1-2010>.
- Held, S. D. E., & Špinka, M. (2011). Animal play and animal welfare. *Animal Behaviour*, 81, 891–899. <https://doi.org/10.1016/j.anbehav.2011.01.007>.
- Hemsworth, P. H., & Barnett, J. L. (2000). Human-animal interactions and animal stress. In Moberg, G. P., Mench, J. A. (Hrsg.), *The biology of animal stress: Basic principles and implications for animal welfare* (S. 309–336). Wallingford: CABI Publishing.
- Hemsworth, P. H., Barnett, J. L., & Hansen, C. (1981). The influence of handling by humans on the behavior, growth, and corticosteroids in the juvenile female pig. *Hormones and Behavior*, 15, 396–403. [https://doi.org/10.1016/0018-506X\(81\)90004-0](https://doi.org/10.1016/0018-506X(81)90004-0).
- Hennessy, M. B. (1997). Hypothalamic-pituitary-adrenal responses to brief social separation. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 21, 11–29. [https://doi.org/10.1016/S0149-7634\(96\)00013-9](https://doi.org/10.1016/S0149-7634(96)00013-9).
- Hennessy, M. B., Kaiser, S., & Sachser, N. (2009). Social buffering of the stress response: Diversity, mechanisms, and functions. *Frontiers in Neuroendocrinology*, 30, 470–482. <https://doi.org/10.1016/j.yfrne.2009.06.001>.
- Herman, J. P., Figueiredo, H., Mueller, N. K., Ulrich-Lai, Y., Ostrander, M. M., Choi, D. C., & Cullinan, W. E. (2003). Central mechanisms of stress integration: Hierarchical circuitry controlling hypothalamo-pituitary-adrenocortical responsiveness. *Frontiers in Neuroendocrinology*, 24, 151–180. <https://doi.org/10.1016/j.yfrne.2003.07.001>.
- Hernandez, C. E., Thierfelder, T., Svennersten-Sjaunja, K., Berg, C., Orihuela, A., & Lidfors, L. (2014). Time lag between peak concentrations of plasma and salivary cortisol following a stressful procedure in dairy cattle. *Acta Veterinaria Scandinavica*, 56, 61. <https://doi.org/10.1186/s13028-014-0061-3>.
- Highfill, L. E. (2008). The use of personality assessments in designing environmental enrichment for Garnett's bushbabies (*Otolemur garnettii*) (Dissertation). The University of Southern Mississippi, Hattiesburg. Abgerufen 27.04.2020, von <https://aquila.usm.edu/dissertations/1143>.
- Highfill, L., Hanbury, D., Kristiansen, R., Kuczaj, S., & Watson, S. (2010). Rating vs. coding in animal personality research. *Zoo Biology*, 29, 509–516. <https://doi.org/10.1002/zoo.20279>.

- Hik, D. S. (1994). Predation risk and the 10-year snowshoe hare cycle (Dissertation). The University of British Columbia, Vancouver. Abgerufen 27.04.2020, von <https://open.library.ubc.ca/cIRcle/collections/ubctheses/831/items/1.0088088>.
- Hill, S. P., & Broom, D. M. (2009). Measuring zoo animal welfare: Theory and practice. *Zoo Biology*, 28, 531–544. <https://doi.org/10.1002/zoo.20276>.
- Horback, K. M., Miller, L. J., & Kuczaj, S. A. (2013). Personality assessment in African elephants (*Loxodonta africana*): Comparing the temporal stability of ethological coding versus trait rating. *Applied Animal Behaviour Science*, 149, 55–62. <https://doi.org/10.1016/j.applanim.2013.09.009>.
- Hosey, G. R., Melfi, V., & Pankhurst, S. (2011). Zoo animals: Behaviour, management, and welfare. Oxford: Oxford University Press.
- Hughes, B. O., & Duncan, I. J. H. (1988). The notion of ethological "need", models of motivation and animal welfare. *Animal Behaviour*, 36, 1696–1707. [https://doi.org/10.1016/S0003-3472\(88\)80110-6](https://doi.org/10.1016/S0003-3472(88)80110-6).
- Hunninck, L., Ringstad, I. H., Jackson, C. R., May, R., Fossøy, F., Uiseb, K., Killian, W., & Røskaft, E. (2017). Being stressed outside the park - conservation of African elephants (*Loxodonta africana*) in Namibia. *Conservation Physiology*, 5, cox067. <https://doi.org/10.1093/conphys/cox067>.
- Hutchins, M. (2006). Variation in nature: Its implications for zoo elephant management. *Zoo Biology*, 25, 161–171. <https://doi.org/10.1002/zoo.20087>.
- Ichikawa, Y., Nishikai, M., Kawagoe, M., Yoshida, K., & Homma, M. (1972). Plasma corticotropin, cortisol and growth hormone responses to hypoglycemia in the morning and in the evening. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 34, 895–898. <https://doi.org/10.1210/jcem-34-5-895>.
- Inglis, I. R., Langton, S., Forkman, B., & Lazarus, J. (2001). An information primacy model of exploratory and foraging behaviour. *Animal Behaviour*, 62, 543–557. <https://doi.org/10.1006/anbe.2001.1780>.
- Ingram, J. R., Crockford, J. N., & Matthews, L. R. (1999). Ultradian, circadian and seasonal rhythms in cortisol secretion and adrenal responsiveness to ACTH and yarding in unrestrained red deer (*Cervus elaphus*) stags. *Journal of Endocrinology*, 162, 289–300. <https://doi.org/10.1677/joe.0.1620289>.

- Irvine, C. H. G., & Alexander, S. L. (1994). Factors affecting the circadian rhythm in plasma cortisol concentrations in the horse. *Domestic Animal Endocrinology*, *11*, 227–238. [https://doi.org/10.1016/0739-7240\(94\)90030-2](https://doi.org/10.1016/0739-7240(94)90030-2).
- Iverson, S., Iverson, L., & Saper, C. B. (2000). The autonomic nervous system and the hypothalamus. In Kandel, E. R., Schwartz, J. H. (Hrsg.), *Principles of neural science* (S. 960–981). New York: McGraw-Hill.
- Jachowski, D. S., Slotow, R., & Millspaugh, J. J. (2012). Physiological stress and refuge behavior by African elephants. *PLOS ONE*, *7*, e31818. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0031818>.
- Jones, A. C., & Gosling, S. D. (2005). Temperament and personality in dogs (*Canis familiaris*): A review and evaluation of past research. *Applied Animal Behaviour Science*, *95*, 1–53. <https://doi.org/10.1016/j.applanim.2005.04.008>.
- Jones, B. R., & Waddington, D. (1992). Modification of fear in domestic chicks, *Gallus gallus domesticus*, via regular handling and early environmental enrichment. *Animal Behaviour*, *43*, 1021–1033. [https://doi.org/10.1016/S0003-3472\(06\)80015-1](https://doi.org/10.1016/S0003-3472(06)80015-1).
- Kalsbeek, A., van der Spek, R., Lei, J., Endert, E., Buijs, R. M., & Fliers, E. (2012). Circadian rhythms in the hypothalamo-pituitary-adrenal (HPA) axis. *Molecular and Cellular Endocrinology*, *349*, 20–29. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2011.06.042>.
- Kanitz, E., Tuchscherer, M., Puppe, B., Tuchscherer, A., & Stabenow, B. (2004). Consequences of repeated early isolation in domestic piglets (*Sus scrofa*) on their behavioural, neuroendocrine, and immunological responses. *Brain, Behavior, and Immunity*, *18*, 35–45. [https://doi.org/10.1016/S0889-1591\(03\)00085-0](https://doi.org/10.1016/S0889-1591(03)00085-0).
- Kelling Swilley, A. (2008). An examination of salivary cortisol concentrations and behavior in three captive African elephants (*Loxodonta africana*) at Zoo Atlanta (Dissertation). Georgia Institute of Technology, Atlanta. Abgerufen 27.04.2020, von <https://smartech.gatech.edu/handle/1853/26586>.
- King, J. E., Weiss, A., & Farmer, K. H. (2005). A chimpanzee (*Pan troglodytes*) analogue of cross-national generalization of personality structure: Zoological parks and an African sanctuary. *Journal of Personality*, *73*, 389–410. <https://doi.org/10.1111/j.1467-6494.2005.00313.x>.
- Kirschbaum, C., & Hellhammer, D. H. (2000). Salivary cortisol. In Fink, G. (Hrsg.), *Encyclopedia of stress* (S. 379–383). San Diego: Academic Press.

- Kirschbaum, C., Pirke, K. M., & Hellhammer, D. H. (1993). The "Trier Social Stress Test": A tool for investigating psychobiological stress responses in a laboratory setting. *Neuropsychobiology*, *28*, 76–81. <https://doi.org/10.1159/000119004>.
- Koch, H., McCormack, K., Sanchez, M. M., & Maestripieri, D. (2014). The development of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in rhesus monkeys: Effects of age, sex, and early experience. *Developmental Psychobiology*, *56*, 86–95. <https://doi.org/10.1002/dev.21093>.
- Koolhaas, J. M., Bartolomucci, A., Buwalda, B., de Boer, S. F., Flügge, G., Korte, S.M., Meerlo, P., Murison, R., Olivier, B., Palanza, P., Richter-Levin, G., Sgoifo, A., Steimer, T., Stiedl, O., van Dijk, G., Wöhr, M., & Fuchs, E. (2011). Stress revisited: A critical evaluation of the stress concept. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, *35*, 1291–1301. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2011.02.003>.
- Koolhaas, J. M., de Boer, S. F., Coppens, C. M., & Buwalda, B. (2010). Neuroendocrinology of coping styles: Towards understanding the biology of individual variation. *Frontiers in Neuroendocrinology*, *31*, 307–321. <https://doi.org/10.1016/j.yfrne.2010.04.001>.
- Koolhaas, J. M., Korte, S. M., de Boer, S. F., van der Vegt, B. J., van Reenen, C. G., Hopster, H., de Jong, I. C., Ruis, M. A. W., & Blokhuis, H. J. (1999). Coping styles in animals: Current status in behavior and stress-physiology. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, *23*, 925–935. [https://doi.org/10.1016/S0149-7634\(99\)00026-3](https://doi.org/10.1016/S0149-7634(99)00026-3).
- Kreger, M. D., & Hutchins, M. (2010). Ethics of keeping mammals in zoos and aquariums. In Kleiman, D. G., Thompson, K. V., Baer, C. K. (Hrsg.), *Wild mammals in captivity: Principles and techniques for zoo management* (S. 3–10). Chicago: University of Chicago Press.
- Kutsukake, N., Ikeda, K., Honma, S., Teramoto, M., Mori, Y., Hayasaka, I., Yamamoto, R., Ishida, T., Yoshikawa, Y., & Hasegawa, T. (2009). Validation of salivary cortisol and testosterone assays in chimpanzees by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *American Journal of Primatology*, *71*, 696–706. <https://doi.org/10.1002/ajp.20708>.
- Ladewig, J. (2000). Chronic intermittent stress: A model for the study of long-term stressors. In Moberg, G. P., Mench, J. A. (Hrsg.), *The biology of animal stress: Basic principles and implications for animal welfare* (S. 159–169). Wallingford: CABI Publishing.
- Ladewig, J., & Smidt, D. (1989). Behavior, episodic secretion of cortisol, and adrenocortical reactivity in bulls subjected to tethering. *Hormones and Behavior*, *23*, 344–360. [https://doi.org/10.1016/0018-506X\(89\)90048-2](https://doi.org/10.1016/0018-506X(89)90048-2).

- Laule, G., & Desmond, T. (1998). Positive reinforcement training as an enrichment strategy. In Shepherdson, D. J., Mellen, J. D., Hutchins, M. (Hrsg.), *Second nature: Environmental enrichment for captive animals* (S. 302–313). Washington DC: Smithsonian Institution Press.
- Laule, G., Whittaker, M. (2009). Protected contact and elephant welfare. Abgerufen 27.04.2020, von https://www.academia.edu/27112851/Protected_Contact_and_Elephant_Welfare.
- Laws, N., Ganswindt, A., Heistermann, M., Harris, M., Harris, S., & Sherwin, C. (2007). A case study: Fecal corticosteroid and behavior as indicators of welfare during relocation of an Asian elephant. *Journal of Applied Animal Welfare Science*, *10*, 349–358. <https://doi.org/10.1080/10888700701555600>.
- Lee, P. C., & Moss, C. J. (2014). African elephant play, competence and social complexity. *Animal Behavior and Cognition*, *1*, 144–156. <https://doi.org/10.12966/abc.05.05.2014>.
- Lee, P. C., & Moss, C. J. (2012). Wild female African elephants (*Loxodonta africana*) exhibit personality traits of leadership and social integration. *Journal of Comparative Psychology*, *126*, 224–232. <https://doi.org/10.1037/a0026566>.
- Leiner, L., & Fendt, M. (2011). Behavioural fear and heart rate responses of horses after exposure to novel objects: Effects of habituation. *Applied Animal Behaviour Science*, *131*, 104–109. <https://doi.org/10.1016/j.applanim.2011.02.004>.
- Leliavski, A., Dumbell, R., Ott, V., & Oster, H. (2015). Adrenal clocks and the role of adrenal hormones in the regulation of circadian physiology. *Journal of Biological Rhythms*, *30*, 20–34. <https://doi.org/10.1177/0748730414553971>.
- Logan, C. J. (2016). Behavioral flexibility in an invasive bird is independent of other behaviors. *PeerJ*, *4*, e2215. <https://doi.org/10.7717/peerj.2215>.
- Lyons, D. M., Parker, K. J., & Schatzberg, A. F. (2010). Animal models of early life stress: Implications for understanding resilience. *Developmental Psychobiology*, *52*, 616–624. <https://doi.org/10.1002/dev.20500>.
- Martin, P., & Bateson, P. P. G. (2007). *Measuring behaviour: An introductory guide*. New York: Cambridge University Press.
- Martin-Wintle, M. S., Shepherdson, D., Zhang, G., Huang, Y., Luo, B., & Swaisgood, R. R. (2017). Do opposites attract? Effects of personality matching in breeding pairs of captive giant pandas on reproductive success. *Biological Conservation*, *207*, 27–37. <https://doi.org/10.1016/j.biocon.2017.01.010>.

- Matteri, R. L., Carroll, J. A., & Dyer, C. J. (2000). Neuroendocrine responses to stress. In Moberg, G. P., Mench, J. A. (Hrsg.), *The biology of animal stress: Basic principles and implications for animal welfare* (S. 43–76). Wallingford: CABI Publishing.
- McComb, K., Baker, L., & Moss, C. (2006). African elephants show high levels of interest in the skulls and ivory of their own species. *Biology Letters*, *2*, 26–28.
<https://doi.org/10.1098/rsbl.2005.0400>.
- Meagher, R. K. (2009). Observer ratings: Validity and value as a tool for animal welfare research. *Applied Animal Behaviour Science*, *119*, 1–14.
<https://doi.org/10.1016/j.applanim.2009.02.026>.
- Meaney, M. J., Mitchell, J. B., Aitken, D. H., Bhatnagar, S., Bodnoff, S. R., Iny, L. J., & Sarrieau, A. (1991). The effects of neonatal handling on the development of the adrenocortical response to stress: Implications for neuropathology and cognitive deficits in later life. *Psychoneuroendocrinology*, *16*, 85–103. [https://doi.org/10.1016/0306-4530\(91\)90072-2](https://doi.org/10.1016/0306-4530(91)90072-2).
- Meehan, C. L., & Mench, J. A. (2002). Environmental enrichment affects the fear and exploratory responses to novelty of young Amazon parrots. *Applied Animal Behaviour Science*, *79*, 75–88. [https://doi.org/10.1016/S0168-1591\(02\)00118-1](https://doi.org/10.1016/S0168-1591(02)00118-1).
- Meehan, C. L., Mench, J. A., Carlstead, K., & Hogan, J. N. (2016). Determining connections between the daily lives of zoo elephants and their welfare: An epidemiological approach. *PLOS ONE*, *11*, e0158124. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0158124>.
- Melfi, V. A. (2009). There are big gaps in our knowledge, and thus approach, to zoo animal welfare: A case for evidence-based zoo animal management. *Zoo Biology*, *28*, 574–588.
<https://doi.org/10.1002/zoo.20288>.
- Mellen, J., & MacPhee, M. (2010). Animal learning and husbandry training for management. In Kleiman, D. G., Thompson, K. V., Baer, C. K. (Hrsg.), *Wild mammals in captivity: Principles and techniques for zoo management* (S. 314–328). Chicago: University of Chicago Press.
- Menargues, A., Urios, V., Limiñana, R., & Mauri, M. (2012). Circadian rhythm of salivary cortisol in Asian elephants (*Elephas maximus*): A factor to consider during welfare assessment. *Journal of Applied Animal Welfare Science*, *15*, 383–390.
<https://doi.org/10.1080/10888705.2012.709157>.

- Menargues, A., Urios, V., & Mauri, M. (2008). Welfare assessment of captive Asian elephants (*Elephas maximus*) and Indian rhinoceros (*Rhinoceros unicornis*) using salivary cortisol measurement. *Animal Welfare*, *17*, 305–312.
- Menargues Marcilla, M., Urios, V., & Limiñana, R. (2012). Seasonal rhythms of salivary cortisol secretion in captive Asian elephants (*Elephas maximus*). *General and Comparative Endocrinology*, *176*, 259–264. <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2012.02.001>.
- Mench, J. A. (1998). Environmental enrichment and the importance of exploratory behavior. In Shepherdson, D. J., Mellen, J. D., Hutchins, M. (Hrsg.), *Second nature: Environmental enrichment for captive animals* (S. 30–46). Washington DC: Smithsonian Institution Press.
- Mettke-Hofmann, C., Rowe, K. C., Hayden, T. J., & Canoine, V. (2006). Effects of experience and object complexity on exploration in garden warblers (*Sylvia borin*). *Journal of Zoology*, *268*, 405–413. <https://doi.org/10.1111/j.1469-7998.2005.00037.x>.
- Mettke-Hofmann, C., Winkler, H., & Leisler, B. (2002). The significance of ecological factors for exploration and neophobia in parrots. *Ethology*, *108*, 249–272. <https://doi.org/10.1046/j.1439-0310.2002.00773.x>.
- Miller, D. B., & O'Callaghan, J. P. (2002). Neuroendocrine aspects of the response to stress. *Metabolism*, *51*, 5–10. <https://doi.org/10.1053/meta.2002.33184>.
- Millspaugh, J. J., Burke, T., Dyk, G. U. S., Slotow, R. O. B., Washburn, B. E., & Woods, R. J. (2007). Stress response of working African elephants to transportation and safari adventures. *Journal of Wildlife Management*, *71*, 1257–1260. <https://doi.org/10.2193/2006-015>.
- Mistlberger, R. E. (2011). Neurobiology of food anticipatory circadian rhythms. *Physiology & Behavior*, *104*, 535–545. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2011.04.015>.
- Moberg, G. P. (2000). Biological response to stress: Implications for animal welfare. In Moberg, G. P., Mench, J. A. (Hrsg.), *The biology of animal stress: Basic principles and implications for animal welfare* (S. 1–21). Wallingford: CABI Publishing.
- Monestier, C., Morellet, N., Verheyden, H., Gaillard, J.-M., Bideau, E., Denailhac, A., Lourtet, B., Cebe, N., Picot, D., Rames, J.-L., & Hewison, A. M. (2017). Neophobia is linked to behavioural and haematological indicators of stress in captive roe deer. *Animal Behaviour*, *126*, 135–143. <https://doi.org/10.1016/j.anbehav.2017.01.019>.
- Morgan, K. N., & Tromborg, C. T. (2007). Sources of stress in captivity. *Applied Animal Behaviour Science*, *102*, 262–302. <https://doi.org/10.1016/j.applanim.2006.05.032>.

- Munck, A., Guyre, P. M., & Holbrook, N. J. (1984). Physiological functions of glucocorticoids in stress and their relation to pharmacological actions. *Endocrine Reviews*, 5, 25–44. <https://doi.org/10.1210/edrv-5-1-25>.
- Nesse, R. M., Bhatnagar, S., & Ellis B. (2016). Evolutionary origins and functions of the stress response system. In Fink, G. (Hrsg.), *Stress: Concepts, cognition, emotion, and behavior* (S. 95–101). San Diego: Academic Press.
- Nicolaides, N. C., Charmandari, E., Kino, T., & Chrousos, G. P. (2017). Stress-related and circadian secretion and target tissue actions of glucocorticoids: Impact on health. *Frontiers in Endocrinology*, 8, 1–11. <https://doi.org/10.3389/fendo.2017.00070>.
- O'Brien, J. K., Heffernan, S., Thomson, P. C., & McGreevy, P. D. (2008). Effect of positive reinforcement training on physiological and behavioural stress responses in the hamadryas baboon (*Papio hamadryas*). *Animal Welfare*, 17, 125–138.
- Olson, D. (2004). Elephant husbandry resource guide. International Elephant Foundation. Abgerufen 27.04.2020, von <https://elephantconservation.org/resources/elephant-care-resources/>.
- Owen, M. A., Swaisgood, R. R., Czekala, N. M., & Lindburg, D. G. (2005). Enclosure choice and well-being in giant pandas: Is it all about control? *Zoo Biology*, 24, 475–481. <https://doi.org/10.1002/zoo.20064>.
- Padgett, D. A., & Glaser, R. (2003). How stress influences the immune response. *Trends in Immunology*, 24, 444–448. [https://doi.org/10.1016/S1471-4906\(03\)00173-X](https://doi.org/10.1016/S1471-4906(03)00173-X).
- Palme, R., & Möstl, E. (1997). Measurement of cortisol metabolites in faeces of sheep as a parameter of cortisol concentration in blood. *Mammalian Biology*, 62, 192–197.
- Palme, R., Rettenbacher, S., Touma, C., El-Bahr, S. M., & Möstl, E. (2005). Stress hormones in mammals and birds: Comparative aspects regarding metabolism, excretion, and noninvasive measurement in fecal samples. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1040, 162–171. <https://doi.org/10.1196/annals.1327.021>.
- Parrott, R. F., & Misson, B. H. (1989). Changes in pig salivary cortisol in response to transport simulation, food and water deprivation, and mixing. *British Veterinary Journal*, 145, 501–505. [https://doi.org/10.1016/0007-1935\(89\)90110-3](https://doi.org/10.1016/0007-1935(89)90110-3).
- Pearson, B. L., Reeder, D. M., & Judge, P. G. (2015). Crowding increases salivary cortisol but not self-directed behavior in captive baboons. *American Journal of Primatology*, 77, 462–467. <https://doi.org/10.1002/ajp.22363>.

- Polansky, L., Kilian, W., & Wittemyer, G. (2015). Elucidating the significance of spatial memory on movement decisions by African savannah elephants using state-space models. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 282, 20143042. <https://doi.org/10.1098/rspb.2014.3042>.
- Poole, T. B. (1998). Meeting a mammal's psychological needs: Basic principles. In Shepherdson, D. J., Mellen, J. D., Hutchins, M. (Hrsg.), *Second nature: Environmental enrichment for captive animals* (S. 83–94). Washington DC: Smithsonian Institution Press.
- Powell, D. M., & Svoke, J. T. (2008). Novel environmental enrichment may provide a tool for rapid assessment of animal personality: A case study with giant pandas (*Ailuropoda melanoleuca*). *Journal of Applied Animal Welfare Science*, 11, 301–318. <https://doi.org/10.1080/10888700802329673>.
- Preutz, J. D., & Bloomsmith, M. A. (1992). Comparing two manipulable objects as enrichment for captive chimpanzees. *Animal Welfare*, 1, 127–137.
- Proctor, C. M., & Brown, J. L. (2015). A preliminary analysis of the influence of handling method on adrenal activity in zoo African and Asian elephants. *Journal of Zoo and Aquarium Research*, 3, 1–5. <https://doi.org/10.19227/jzar.v3i1.100>.
- R Core Team (2019). R: A language and environment for statistical computing: R Foundation for Statistical Computing. Abgerufen 27.04.2020, von <https://www.R-project.org/>.
- Ralph, C. R., & Tilbrook, A. J. (2016). The usefulness of measuring glucocorticoids for assessing animal welfare. *Journal of Animal Science*, 94, 457–470. <https://doi.org/10.2527/jas.2015-9645>.
- Reeder, D. M., & Kramer, K. M. (2005). Stress in free-ranging mammals: Integrating physiology, ecology, and natural history. *Journal of Mammalogy*, 86, 225–235. <https://doi.org/10.1644/BHE-003.1>.
- Reinhardt, V. (2003). Working with rather than against macaques during blood collection. *Journal of Applied Animal Welfare Science*, 6, 189–197. https://doi.org/10.1207/S15327604JAWS0603_04.
- Renner, M. J. (1988). Learning during exploration: The role of behavioral topography during exploration in determining subsequent adaptive behavior in the Sprague-Dawley rat (*Rattus norvegicus*). *International Journal of Comparative Psychology*, 2, 43–56.
- Roever, C. L., van Aarde, R. J., & Leggett, K. (2012). Functional responses in the habitat selection of a generalist mega-herbivore, the African savannah elephant. *Ecography*, 35, 972–982. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0587.2012.07359.x>.

- Romero, L. M. (2004). Physiological stress in ecology: Lessons from biomedical research. *Trends in Ecology & Evolution*, *19*, 249–255. <https://doi.org/10.1016/j.tree.2004.03.008>.
- Rushen, J. (2000). Some issues in the interpretation of behavioural responses to stress. In Moberg, G. P., Mench, J. A. (Hrsg.), *The biology of animal stress: Basic principles and implications for animal welfare* (S. 23–42). Wallingford: CABI Publishing.
- Rüth, K. (2018, Mai 23). Kritik an Elefanten-Haltung im Zoo Wuppertal. Westdeutsche Zeitung. Abgerufen 27.04.2020, von https://www.wz.de/nrw/wuppertal/wuppertal-kritik-an-elefanten-haltung-im-zoo_aid-25486723.
- Ryan, E. B., Proudfoot, K. L., & Fraser, D. (2012). The effect of feeding enrichment methods on the behavior of captive Western lowland gorillas. *Zoo Biology*, *31*, 235–241. <https://doi.org/10.1002/zoo.20403>.
- Sach, F., Tatchley, C., Needham, N., Pullen, K. (2019). Guidelines for the management of elephants within BIAZA zoos. British and Irish Association of Zoos and Aquariums (BIAZA).
- Sambrook, T. D., & Buchanan-Smith, H. M. (1997). Control and complexity in novel object enrichment. *Animal Welfare*, *6*, 207–216.
- Santos, J., Benjamin, M., Yang, P. C., Prior, T., & Perdue, M. H. (2000). Chronic stress impairs rat growth and jejunal epithelial barrier function: Role of mast cells. *American Journal of Physiology. Gastrointestinal and Liver Physiology*, *278*, G847-854. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.2000.278.6.G847>.
- Sapolsky, R. M., Romero, L. M., & Munck, A. U. (2000). How do glucocorticoids influence stress responses? Integrating permissive, suppressive, stimulatory, and preparative actions. *Endocrine Reviews*, *21*, 55–89. <https://doi.org/10.1210/edrv.21.1.0389>.
- Schulze Westerath, H., Laister, S., Winckler, C., & Knierim, U. (2009). Exploration as an indicator of good welfare in beef bulls: An attempt to develop a test for on-farm assessment. *Applied Animal Behaviour Science*, *116*, 126–133. <https://doi.org/10.1016/j.applanim.2008.08.012>.
- Seeman, T. E., Singer, B., Wilkinson, C. W., & McEwen, B. (2001). Gender differences in age-related changes in HPA axis reactivity. *Psychoneuroendocrinology*, *26*, 225–240. [https://doi.org/10.1016/S0306-4530\(00\)00043-3](https://doi.org/10.1016/S0306-4530(00)00043-3).
- Shepherdson, D. J. (1998). Tracing the path of environmental enrichment in zoos. In Shepherdson, D. J., Mellen, J. D., Hutchins, M. (Hrsg.), *Second nature: Environmental enrichment for captive animals* (S. 1–12). Washington DC: Smithsonian Institution Press.

- Shepherdson, D. J. (2010). Principles of and research on environmental enrichment for mammals. In Kleiman, D. G., Thompson, K. V., Baer, C. K. (Hrsg.), *Wild mammals in captivity: Principles and techniques for zoo management* (S. 62–67). Chicago: University of Chicago Press.
- Shepherdson, D. J., Carlstead, K., Mellen, J. D., & Seidensticker, J. (1993). The influence of food presentation on the behavior of small cats in confined environments. *Zoo Biology*, *12*, 203–216. <https://doi.org/10.1002/zoo.1430120206>.
- Sheriff, M. J., Dantzer, B., Delehanty, B., Palme, R., & Boonstra, R. (2011a). Measuring stress in wildlife: Techniques for quantifying glucocorticoids. *Oecologia*, *166*, 869–887. <https://doi.org/10.1007/s00442-011-1943-y>.
- Sheriff, M. J., Krebs, C. J., & Boonstra, R. (2009). The sensitive hare: Sublethal effects of predator stress on reproduction in snowshoe hares. *The Journal of Animal Ecology*, *78*, 1249–1258. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2656.2009.01552.x>.
- Sheriff, M. J., Krebs, C. J., & Boonstra, R. (2011b). From process to pattern: How fluctuating predation risk impacts the stress axis of snowshoe hares during the 10-year cycle. *Oecologia*, *166*, 593–605. <https://doi.org/10.1007/s00442-011-1907-2>.
- Sinn, D. L., Cawthen, L., Jones, S. M., Pukk, C., & Jones, M. E. (2014). Boldness towards novelty and translocation success in captive-raised, orphaned Tasmanian devils. *Zoo Biology*, *33*, 36–48. <https://doi.org/10.1002/zoo.21108>.
- Skibins, J. C., Dunstan, E., & Pahlow, K. (2017). Exploring the influence of charismatic characteristics on flagship outcomes in zoo visitors. *Human Dimensions of Wildlife*, *22*, 157–171. <https://doi.org/10.1080/10871209.2016.1276233>.
- Stockman, C. A., Collins, T., Barnes, A. L., Miller, D., Wickham, S. L., Beatty, D. T., Blache, D., Wemelsfelder, F., & Fleming, P. A. (2011). Qualitative behavioural assessment and quantitative physiological measurement of cattle naïve and habituated to road transport. *Animal Production Science*, *51*, 240–249. <https://doi.org/10.1071/AN10122>.
- Stöwe, M., Bugnyar, T., Heinrich, B., & Kotrschal, K. (2006a). Effects of group size on approach to novel objects in ravens (*Corvus corax*). *Ethology*, *112*, 1079–1088. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0310.2006.01273.x>.
- Stöwe, M., Bugnyar, T., Loretto, M.-C., Schloegl, C., Range, F., & Kotrschal, K. (2006b). Novel object exploration in ravens (*Corvus corax*): Effects of social relationships. *Behavioural Processes*, *73*, 68–75. <https://doi.org/10.1016/j.beproc.2006.03.015>.

- Swaisgood, R. R., White, A. M., Zhou, X., Zhang, G., & Lindburg, D. G. (2005). How do giant pandas (*Ailuropoda melanoleuca*) respond to varying properties of enrichments? A comparison of behavioral profiles among five enrichment items. *Journal of Comparative Psychology*, *119*, 325–334. <https://doi.org/10.1037/0735-7036.119.3.325>.
- Swaisgood, R. R., White, A. M., Zhou, X., Zhang, H., Zhang, G., Wei, R., Hare, V. J., Tepper, E. M., & Lindburg, D. G. (2001). A quantitative assessment of the efficacy of an environmental enrichment programme for giant pandas. *Animal Behaviour*, *61*, 447–457. <https://doi.org/10.1006/anbe.2000.1610>.
- Tetley, C. L., & O'Hara, S. J. (2012). Ratings of animal personality as a tool for improving the breeding, management and welfare of zoo mammals. *Animal Welfare*, *21*, 463–476. <https://doi.org/10.7120/09627286.21.4.463>.
- Turner, A. I., Rivalland, E. T. A., Clarke, I. J., & Tilbrook, A. J. (2010). Stressor specificity of sex differences in hypothalamo-pituitary-adrenal axis activity: Cortisol responses to exercise, endotoxin, wetting, and isolation/restraint stress in gonadectomized male and female sheep. *Endocrinology*, *151*, 4324–4331. <https://doi.org/10.1210/en.2010-0234>.
- Turner, A. I., Keating, C. L., & Tilbrook, A. J. (2012). Sex differences and the role of sex steroids in sympatho-adrenal medullary system and hypothalamo-pituitary adrenal axis responses to stress. In Kahn, S. M. (Hrsg.), *Sex steroids* (S. 115–136). Rijeka: InTech.
- Umeda, T., Hiramatsu, R., Iwaoka, T., Shimada, T., Miura, F., & Sato, T. (1981). Use of saliva for monitoring unbound free cortisol levels in serum. *Clinica Chimica Acta*, *110*, 245–253. [https://doi.org/10.1016/0009-8981\(81\)90353-3](https://doi.org/10.1016/0009-8981(81)90353-3).
- Van Reenen, C. G., Hopster, H., van der Werf, J. T. N., Engel, B., Buist, W. G., Jones, R. B., Blokhuis, H. J., & Korte, S. M. (2009). The benzodiazepine brotizolam reduces fear in calves exposed to a novel object test. *Physiology & Behavior*, *96*, 307–314. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2008.10.016>.
- Van Rooijen, J. (1991). Predictability and boredom. *Applied Animal Behaviour Science*, *31*, 283–287. [https://doi.org/10.1016/0168-1591\(91\)90014-O](https://doi.org/10.1016/0168-1591(91)90014-O).
- Veasey, J. (2006). Concepts in the care and welfare of captive elephants. *International Zoo Yearbook*, *40*, 63–79. <https://doi.org/10.1111/j.1748-1090.2006.00063.x>.
- Vick, S.-J., Anderson, J. R., & Young, R. (2000). Maracas for *Macaca*? Evaluation of three potential enrichment objects in two species of zoo-housed macaques. *Zoo Biology*, *19*, 181–191. [https://doi.org/10.1002/1098-2361\(2000\)19:3<181::AID-ZOO2>3.0.CO;2-W](https://doi.org/10.1002/1098-2361(2000)19:3<181::AID-ZOO2>3.0.CO;2-W).

- Viljoen, J. J., Ganswindt, A., du Toit, J. T., & Langbauer, W. R. (2008). Translocation stress and faecal glucocorticoid metabolite levels in free-ranging African savanna elephants. *South African Journal of Wildlife Research*, 38, 146–152. <https://doi.org/10.3957/0379-4369-38.2.146>.
- Waite, C., & Buchanan-Smith, H. M. (2001). What time is feeding? How delays and anticipation of feeding schedules affect stump-tailed macaque behavior. *Applied Animal Behaviour Science*, 75, 75–85. [https://doi.org/10.1016/S0168-1591\(01\)00174-5](https://doi.org/10.1016/S0168-1591(01)00174-5).
- Walker, M. D., & Mason, G. (2011). Female C57BL/6 mice show consistent individual differences in spontaneous interaction with environmental enrichment that are predicted by neophobia. *Behavioural Brain Research*, 224, 207–212. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2011.06.003>.
- Watters, J. V., & Powell, D. M. (2012). Measuring animal personality for use in population management in zoos: Suggested methods and rationale. *Zoo Biology*, 31, 1–12. <https://doi.org/10.1002/zoo.20379>.
- White, B. C., Taylor, S. R., Gyimesi, Z. S., Rieskamp, C. L., Sarros, W., & Burton, S. D. II (2019). Serum cortisol concentrations associated with artificial insemination events in an African elephant (*Loxodonta africana*). *Journal of Zoo and Aquarium Research*, 7, 134–137. <https://doi.org/10.19227/jzar.v7i3.379>.
- Wielebnowski, N. C. (1999). Behavioral differences as predictors of breeding status in captive cheetahs. *Zoo Biology*, 18, 335–349. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1098-2361\(1999\)18:4%3C335::AID-ZOO8%3E3.0.CO;2-X](https://doi.org/10.1002/(SICI)1098-2361(1999)18:4%3C335::AID-ZOO8%3E3.0.CO;2-X).
- Wielebnowski, N. (2003). Stress and distress: Evaluating their impact for the well-being of zoo animals. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 223, 973–977. <https://doi.org/10.2460/javma.2003.223.973>.
- Wielebnowski, N. C., Fletchall, N., Carlstead, K., Busso, J. M., & Brown, J. L. (2002). Noninvasive assessment of adrenal activity associated with husbandry and behavioral factors in the North American clouded leopard population. *Zoo Biology*, 21, 77–98. <https://doi.org/10.1002/zoo.10005>.
- Williams, E., Carter, A., Hall, C., & Bremner-Harrison, S. (2019). Exploring the relationship between personality and social interactions in zoo-housed elephants: Incorporation of keeper expertise. *Applied Animal Behaviour Science*, 221, 104876. <https://doi.org/10.1016/j.applanim.2019.104876>.

- Wilson, D. S., Clark, A. B., Coleman, K., & Dearstyne, T. (1994). Shyness and boldness in humans and other animals. *Trends in Ecology & Evolution*, *9*, 442–446. [https://doi.org/10.1016/0169-5347\(94\)90134-1](https://doi.org/10.1016/0169-5347(94)90134-1).
- Wilson, M. L., Perdue, B. M., Bloomsmith, M. A., & Maple, T. L. (2015). Rates of reinforcement and measures of compliance in free and protected contact elephant management systems. *Zoo Biology*, *34*, 431–437. <https://doi.org/10.1002/zoo.21229>.
- Wittemyer, G., Daballen, D., Rasmussen, H., Kahindi, O., & Douglas-Hamilton, I. (2005). Demographic status of elephants in the Samburu and Buffalo Springs National Reserves, Kenya. *African Journal of Ecology*, *43*, 44–47. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2028.2004.00543.x>.
- Wood-Gush, D. G. M., & Vestergaard, K. (1991). The seeking of novelty and its relation to play. *Animal Behaviour*, *42*, 599–606. [https://doi.org/10.1016/S0003-3472\(05\)80243-X](https://doi.org/10.1016/S0003-3472(05)80243-X).
- Wuerz, Y., & Krüger, O. (2015). Personality over ontogeny in zebra finches: Long-term repeatable traits but unstable behavioural syndromes. *Frontiers in Zoology*, *12*, S9. <https://doi.org/10.1186/1742-9994-12-S1-S9>.
- Yasui, S., Konno, A., Tanaka, M., Idani, G.'i., Ludwig, A., Lieckfeldt, D., & Inoue-Murayama, M. (2013). Personality assessment and its association with genetic factors in captive Asian and African elephants. *Zoo Biology*, *32*, 70–78. <https://doi.org/10.1002/zoo.21045>.
- Yeates, J. W., & Main, D. C. J. (2008). Assessment of positive welfare: A review. *The Veterinary Journal*, *175*, 293–300. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2007.05.009>.
- Young, A. J., Carlson, A. A., Monfort, S. L., Russell, A. F., Bennett, N. C., & Clutton-Brock, T. (2006). Stress and the suppression of subordinate reproduction in cooperatively breeding meerkats. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *103*, 12005–12010. <https://doi.org/10.1073/pnas.0510038103>.
- Young, R. J., & Cipreste, C. F. (2004). Applying animal learning theory: Training captive animals to comply with veterinary and husbandry procedures. *Animal Welfare*, *13*, 225–232.

Danksagung

Zuallererst möchte ich mich herzlichst bei meinem betreuenden Professor Paul Dierkes für die Möglichkeit bedanken, diese Arbeit im Arbeitskreis Zootierbiologie durchzuführen. Danke für dein stets offenes Ohr und dein Vertrauen in meine Fähigkeiten!

Mein besonderer Dank gilt Dr. Michael Heistermann für die unerlässliche Unterstützung bei der Planung der Cortisoluntersuchung, die prompte und ausführliche Beantwortung jeglicher Fragen sowie die Genauigkeit bei der Korrektur der Manuskripte.

Ein weiteres großes Dankeschön geht an Dr. Ann-Kathrin Oerke für das Herstellen der Zookontakte, das kritische Lesen der Manuskripte, die Unterstützung bei der Planung und Durchführung der Studie sowie bei allen sonstigen Problemen und Sorgen.

Ein herzliches Dankeschön geht an Professor Johannes Hartig für die Einführung in das *linear mixed modelling* und das Ausknobeln der passenden Modelle.

Außerdem möchte ich mich bei der von Opel Hessische Zoostiftung bedanken. Die Stiftungsprofessur Zootierbiologie hat diese Arbeit erst möglich gemacht.

Mein besonderer Dank gilt dem Opel-Zoo Kronberg, Grünen Zoo Wuppertal und Thüringer Zoopark Erfurt sowohl für die Möglichkeit, diese Forschung an ihren Tieren durchzuführen als auch für die Unterstützung vor, während und nach der „Feldarbeit“. Alle drei Elefantenteams nahmen mich offen und freundlich auf und gewährten mir einmalige Einblicke in ihr Elefantenmanagement.

Ein herzliches Dankeschön an Dr. Thomas Kauffels, Dr. Martin Becker und Jörg Beckmann für die Unterstützung der Studie im Opel-Zoo Kronberg. Ein weiteres großes Dankeschön an Tim Viereck, Marcel König, Stephen Moser und Niklas Huber für die freiwilligen Überstunden zugunsten der Forschung und die insgesamt tolle Zusammenarbeit bei der Planung und Durchführung der Experimente. Danke für Euer Vertrauen!

Vielen lieben Dank an das Elefantenteam des Zoo Wuppertal: Dr. Arne Lawrenz, Filipe von Gilsa, Vanessa Hagedorn, Gustav Röckener, Jörn Karger, Claus Kühn und Oliver Schiefelbusch. Danke für Euer Engagement, Eure Gastfreundlichkeit und die lustige Zusammenarbeit. Das „Abspeicheln“ und die „Mundwüste“ mit Euch werde ich nie vergessen!

Auch bei Dr. Dr. Sabine Merz und Tina Risch aus dem Zoopark Erfurt möchte ich mich herzlichst für die Unterstützung der Studie bedanken. Außerdem geht ein großes Dankeschön an

Dirk Hebs, Jörg Werner, Sven Büchner und Sven Schubert für die vertrauensvolle Zusammenarbeit, die gleichzeitig von Witz und Charme sowie Disziplin geprägt war. Euer Engagement war von unschätzbarem Wert!

Vielen Dank auch an Professor Manfred Kössl für die Übernahme des Zweitgutachtens.

Vielen lieben Dank an Tanja, Felix und Steffi fürs Zuhören, den motivierenden Zuspruch und das Korrekturlesen.

Last but not least hat die mentale (aber auch materielle) Unterstützung meiner Familie maßgeblich zum erfolgreichen Abschluss dieser Arbeit beigetragen. Danke für Eure Zuversicht, Euer Vertrauen in meine Fähigkeiten und Eure motivierenden Worte!

Lebenslauf

[Redacted]
[Redacted]
[Redacted]

[Redacted]

[Redacted]
[Redacted]
[Redacted]
[Redacted]

[Redacted]
[Redacted]
[Redacted]
[Redacted]
[Redacted]
[Redacted]
[Redacted]
[Redacted]
[Redacted]

[Redacted]
[Redacted]
[Redacted]
[Redacted]

[Redacted]

[Redacted]
[Redacted]
[Redacted]
[Redacted]
[Redacted]
[Redacted]
[Redacted]
[Redacted]

[Redacted]

[Redacted]
[Redacted]
[Redacted]
[Redacted]
[Redacted]
[Redacted]
[Redacted]

[Redacted text block containing multiple paragraphs of blacked-out content]

Anhang**Publikation A****Diurnal variation of salivary cortisol in captive African elephants (*Loxodonta africana*) under routine management conditions and in relation to a translocation event**

Status: accepted in Zoo Biology

Beteiligte Autoren:

Susan Hambrecht (SH, Promovierender),

Ann-Kathrin Oerke (AO),

Michael Heistermann (MH),

Paul Wilhelm Dierkes (PD)

(1) zu Entwicklung und Planung
Promovierender SH: 80% Co-Autor AO: 10% Co-Autor MH: 5% Co-Autor PD: 5%
(2) zur Durchführung der einzelnen Untersuchungen und Experimente
Promovierender SH: 90% (Probensammlung in allen drei Zoos in 2016 und 2017) Co-Autor AO: 10% (Probensammlung in Bezug zum Transport)
(3) zur Erstellung der Datensammlung und Abbildungen
Promovierender SH: 95% (Erstellung) Co-Autor PD: 5% (Besprechung)
(4) zur Analyse und Interpretation der Daten
Promovierender SH: 70% (Statistische Analyse und Interpretation) Co-Autor AO: 5% (Interpretation der Transportdaten) Co-Autor MH: 20% (Analyse & Interpretation der Transportdaten, Interpretation hinsichtlich methodischer Effekte) Co-Autor PD: 5% (Besprechung)
(5) zum Verfassen des Manuskripts
Promovierender SH: 65% Co-Autor AO: 10% Co-Autor MH: 15% Co-Autor PD: 10%

Datum/Ort: /Frankfurt am Main

Unterschrift Promovierender_____
Unterschrift Betreuer

Diurnal variation of salivary cortisol in captive African elephants (*Loxodonta africana*) under routine management conditions and in relation to a translocation event

Susan Hambrecht¹  | Ann-Kathrin Oerke² | Michael Heistermann² | Paul Wilhelm Dierkes¹ 

¹Bioscience Education and Zoo Biology, Goethe University Frankfurt, Frankfurt am Main, Germany

²Endocrinology Laboratory, German Primate Centre, Leibniz Institute for Primate Research, Göttingen, Germany

Correspondence

Susan Hambrecht, Bioscience Education and Zoo Biology, Goethe University Frankfurt, Max-von-Laue-Straße 13, 60438 Frankfurt am Main, Germany.
Email: hambrecht@em.uni-frankfurt.de

Funding information

Opel-Zoo foundation professorship (von Opel Hessische Zoostiftung)

Abstract

The present study assessed the diurnal variation in salivary cortisol in captive African elephants during routine management (baseline) and in relation to a potential stressor (translocation) to evaluate to what extent acute stress may affect diurnal cortisol patterns. Under baseline conditions, we collected morning and afternoon saliva samples of 10 animals (three zoos) on different days in two study periods ($n = 3-10$ per animal, daytime and period). Under stress conditions, we sampled the transported cow (newcomer) and the two cows of the destination zoo before and after the transport in the morning and afternoon ($n = 3-9$ per animal, daytime and transport phase), as well as after the first introduction of the newcomer to the bull ($n = 1$ per animal). Cortisol was measured in unextracted samples by enzyme immunoassay. Under baseline conditions, we observed the expected diurnal variation with higher cortisol levels in the morning than in the afternoon. Under stress conditions, neither a significant difference between pre- and posttransport, nor between morning and afternoon levels was found. The percentage difference between morning and afternoon cortisol after the transport, however, was remarkably lower than before the transport in the newcomer potentially indicating a stress response to familiarization. Saliva samples taken immediately after the introduction of the newcomer to the bull revealed a marked cortisol increase. Our findings indicate that stressors may disturb the diurnal cortisol rhythm. Furthermore, provided that samples can be collected promptly, salivary cortisol is a useful minimally invasive measure of physiological stress in the African elephant.

KEYWORDS

baseline, captive management, cortisol secretion, social introduction, stress

This is an open access article under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits use, distribution and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

© 2020 The Authors. *Zoo Biology* published by Wiley Periodicals, Inc.

1 | INTRODUCTION

1.1 | Diurnal variation of cortisol secretion

In vertebrates, glucocorticoid (GC; cortisol/corticosterone) secretion from the hypothalamus–pituitary–adrenal axis (HPA-axis) follows an endogenous circadian rhythm. This rhythm is primarily entrained by the light–dark–cycle, but other periodic occurring environmental or behavioral stimuli may also influence the daily rhythm of HPA-axis secretory activity. The daily peak of GC secretion is synchronized with the onset of the major activity phase, which is associated with significant changes in environmental conditions and an increase in behavioral activity (for a review of the regulation of the circadian rhythm of the HPA-axis see Kalsbeek et al., 2012). In diurnal species, GC levels peak in the morning, decrease towards the afternoon, reach the trough around midnight and increase again in the second half of the night (Bohák et al., 2013; Coe & Levine, 1995; Ekkel et al., 1996; Kutsukake et al., 2009; Menargues, Urios, Limiñana, & Mauri, 2012, but see Giannetto et al., 2014 for dogs). This general pattern of diurnal GC dynamics has also been described for the African elephant, for which studies have shown that cortisol, the major glucocorticoid in this species, is secreted in high levels in the morning and low levels in the afternoon (Brown, Kersey, Freeman, & Wagener, 2010; Casares et al., 2016; Grand, Kuhar, Leighty, Bettinger, & Laudenslager, 2012; Kelling Swilley, 2008).

1.2 | Effect of stressors on the circadian GC rhythm

Stress-related and circadian HPA-axis activity mutually influence each other (reviewed in Nicolaidis, Charmandari, Kino, & Chrousos, 2017). First, the stress responsiveness of the HPA-axis is greater during the trough than during the acrophase of the circadian rhythm (Charmandari et al., 2011). Consequently, short-term conditions that are perceived as stressful or physically demanding (here called acute stressors) are associated with a flattening of the circadian changes in GC secretion due to a greater increment of GC levels in the circadian trough than in the circadian peak (Bartlang et al., 2012; Ichikawa, Nishikai, Kawagoe, Yoshida, & Homma, 1972; Lassourd et al., 1996). Second, the effect on the circadian GC rhythm differs between acute and chronic stressors. Upon termination of an acute stressor, the circadian rhythm is reset within a few days (Balsalobre et al., 2000; Bartlang et al., 2014) and the flattening, therefore, is a transient phenomenon. Chronic stressors, however, disturb the circadian GC rhythm substantially, as the prolonged and/or deficient adaptive GC response to the stressor does not allow the quick resetting of the circadian rhythm (Nicolaidis et al., 2017). This is reflected in the long-term flattening of the circadian rhythm, which, for example, was found in relation to poor housing conditions during rearing in pigs (De Jong et al., 2000) and different pathological conditions in humans and rodents (reviewed in Leliavski, Dumbell, Ott, & Oster, 2015). It has been suggested that, therefore, the circadian GC pattern could be used as another stress indicator beside the change in GC levels themselves (De Jong et al., 2000; Ekkel et al., 1996). In animals, transports are considered as stressors, as they are generally associated with GC level increases

(Dembiec, Snider, & Zanella, 2004; Goymann, Möstl, Van't Hof, East, & Hofer, 1999; Laws et al., 2007; Schmidt et al., 2010a), which persist during the transport independent of daytime (Forhead, Smart, Smith, & Dobson, 1995; Schmidt et al., 2010b; Stull & Rodiek, 2000). To the best of our knowledge, the effect of transports on the diurnal cortisol rhythm was not examined yet. Changes in housing conditions, however, which are an inherent part of translocations, largely caused a transient flattening of the diurnal rhythm based on a greater increment of afternoon relative to morning levels (Barnett, Cronin, & Winfield, 1981; Becker et al., 1985; Irvine & Alexander, 1994; Pedersen, Rojkittikhun, Einarsson, & Edqvist, 1993). Thus, the change in housing in these studies produced rather acute than chronic stress. Transport is also associated with elevated GC secretion in African elephants as indicated by increases in levels of fecal GC metabolites in response to transportation (Millsbaugh et al., 2007; Viljoen, Ganswindt, du Toit, & Langbauer, 2008). In addition, flattening of the diurnal GC profile in this species was attributed to an acute social stressor (Casares et al., 2016), personality (Grand et al., 2012) and potentially chronic stress conditions (Kelling Swilley, 2008). To what extent transportation stress also affects the diurnal GC dynamics in the African elephant has not yet been described.

1.3 | Measuring GC levels

GCs and their metabolites can be measured in different sampling matrices (reviewed in Heistermann, 2010 and Sheriff, Dantzer, Delehanty, Palme, & Boonstra, 2011). Blood allows real-time assessment of GC levels but requires invasive sampling, which limits its feasibility in wildlife. Sampling of urine and feces, in contrast, is noninvasive. However, fecal and urinary cortisol metabolites represent integrative measures of cortisol secretion and, concerning the African elephant, occur in the sample after a relatively long lag time of up to 38 hr in feces and 4.5 hr in urine (Ganswindt, Palme, Heistermann, Borrigan, & Hodges, 2003). They are, therefore, not suitable to measure acute responses and are of limited use for understanding the diurnal variation of cortisol secretion. Saliva, in contrast, is ideally suited for these purposes. Salivary cortisol concentrations reliably reflect circulating cortisol in the blood (Grand et al., 2012) with a time lag of approximately 5–20 min in humans (Kirschbaum & Hellhammer, 2000) and 10 min in cattle (Hernandez et al., 2014). Furthermore, saliva can be collected minimally invasively and repeatedly from captive elephants provided that the animals are habituated to sampling through positive reinforcement training.

1.4 | Objectives

Before assessing the effect of a stressor on cortisol levels, the endogenous diurnal cortisol pattern in the absence of acute stressors has to be determined to be able to discriminate between acute responses and diurnal variation. The present study on captive African elephants had two objectives: (a) to assess the diurnal variation of salivary cortisol in ten animals housed in three different zoos under routine management

conditions and (b) to give first insights into the effect of a stressor, namely a transport and associated changes in housing conditions, on the diurnal variation of cortisol secretion in three animals involved in the translocation process. Concerning (a), we expected that the diurnal variation would be characterized by significantly higher salivary cortisol levels in the morning compared to the afternoon. Regarding (b), we expected a significant diurnal variation to occur before the transport and a disturbance (flattening or loss) of the diurnal variation in association with elevated afternoon levels to occur after the transport.

2 | METHODS

2.1 | Animals and management

Ten African elephants (*Loxodonta africana*) housed in three different German zoos (Opel-Zoo Kronberg, Grüner Zoo Wuppertal, Thüringer Zoopark Erfurt) were examined in two study periods separated by one year (2016, 2017). Animals of the same zoo were sampled in the same season in both years (Kronberg: spring, Wuppertal: summer, Erfurt: fall/winter). Table 1 summarizes information on the animals and the number of samples of each animal.

The elephant enclosures in all three zoos consisted of an outdoor enclosure and an indoor area with several boxes to separate individual animals. Enclosure furnishing included mud wallows, sandpits, and natural scratching surfaces. Hay was provided in hay nets or racks (Kronberg in 2017, Erfurt) respectively on the ground (Kronberg in 2016, Wuppertal). Additionally, browse, fruits, vegetables, and pellets were provided. Cows and their offspring were maintained in stable herds, whereas the bulls were separated during the night and temporarily during the day. Differences in management between 2016 and 2017 included change of feeding type (from ground to rack) and night housing (from outdoors to

indoors) in AR and ZI (Kronberg), separation of the oldest young bull from the herd and socialization with TU (Wuppertal) and presence of a new cow (Erfurt, see Section 2.2.2).

2.2 | Saliva sampling

Before the beginning of the study, the animals were habituated to the sampling procedure through positive reinforcement training. To collect saliva, a swab (Salivette® Cortisol, Sarstedt, Nümbrecht, Germany) fixed in a clamp respectively a stainless-steel tube was used to wipe the inside of the mouth. The saliva samples were frozen at -18°C immediately following collection.

2.2.1 | Baseline diurnal cortisol variation

Baseline refers to cortisol levels during routine management conditions, that is the conditions the animals were regularly facing and habituated to. Therefore, we assumed that routine management did not present a stressful condition for the animals.

On a sampling day, a morning (08:00–08:30) and an afternoon (Kronberg: 18:00, Wuppertal: 14:00, Erfurt: 13:00) saliva sample was collected from one animal, which was separated from the group for this purpose. Cows, however, were not separated from their calves to prevent confounding social stress. This also applied to the animals SA and TI (mother and daughter), which were, therefore, sampled on the same day directly after one another. Between the morning and afternoon samples, the animal was handled according to the routine management of the respective zoo. The same animal was sampled in roughly weekly intervals. Three to ten samples per animal, daytime and study period were collected (Table 1) representing 3–10 assessments of diurnal variation per

TABLE 1 Information on animals (sorted by zoo) and number of samples of each animal in the morning (08:00) and in the afternoon (13:00, 14:00, 18:00) in the first (2016) and second (2017) study period

Zoo	Animal-ID	Year of birth	Sex	Sample size 2016		Sample size 2017	
				08:00 ^a	13:00 ^b	08:00	13:00
Kronberg	AR	1979	Female	7	7	7	7
	ZI	1982	Female	6	6	10	7
	TA	2008	Male	5	6	7	7
Wuppertal	SA	1992	Female	6	6	6	5
	SW	1993	Female	3	6	6	5
	TI	2007	Female	6	6	5	5
	TU	1992	Male	5	6	6	6
Erfurt	SF	1971	Female	9	9	9	9
	CH	2003	Female	9	9	9	9
	KB	2005	Male	6	6	6	6

Note: Saliva samples were paired, which is on each sampling day a morning and an afternoon sample was collected from the same animal.

^aMorning.

^bAfternoon: 13:00, Erfurt; 14:00, Wuppertal; 18:00, Kronberg.

Animal-ID		PRE		POST1		Introduction	POST2	
		Day -18/-11 to -1 ^a		Day 1-9		Day 20	Day 21-23	
		08:30/10:30 ^a	14:30	10:30	14:30	11:45	10:30	14:30
CS	Newcomer	6	6	6	6	1	3	3
SF	Resident	6	6	9	7	1	3	3
CH	Resident	6	6	9	7	1	3	3

Note: Number and timing of saliva samples of the newcomer CS and the residents SF and CH in the four transport phases (PRE, POST1, Introduction, POST2), as well as timing of the transport phases in relation to Day 0 (arrival of CS). Not all animals were sampled on each day and not all daily samples were paired, which is on some sampling days either a morning or an afternoon sample was collected from an animal.

^aCH, SF: 08:30 and Day -18 to -1; CS: 10:30 and Day -11 to -1.

animal. In 3.4% of samples saliva volume was too low (i.e., <50 µl) for the analysis, which reduced the sample size in some animals.

2.2.2 | Translocation (stressor)

We report the timeline of the transport in relation to the day of the arrival of the transported newcomer CS (Day 0). The adult cow CS was transported from Réserve Africaine du Sigean in France to Thüringer Zoopark Erfurt in Germany (distance traveled: 1,350 km). CS was loaded in the morning of Day -1 and arrived in the evening of Day 0 and therefore traveled about 36 hr including the compulsory stops to feed, drink and clean the elephant. Table 2 shows the timing of the four transport phases (PRE, POST1, Introduction, and POST2), the time of sampling in the morning and afternoon, as well as the number of samples of CS and the two resident cows CH and SF of the destination zoo in Erfurt. Due to arousal and refusal to respond to keepers, the first sample of CS after her transport could only be taken in the afternoon on Day 2. The first samples of CH and SF after CS's arrival were collected in the morning on Day 1. During the first phase after the transport (POST1: Day 1-9), CS and the resident elephants, including the bull, had visual and tactile contact through barriers. Moreover, CS was habituated gradually to the indoor and outdoor enclosures. From Day 12 onwards, CS, SF, and CH were housed together. On Day 20, CS was introduced to the bull KB for the first time. The introduction took place between 10:00 and 11:45 and the samples were collected immediately thereafter. CH and SF were separated in the outdoor bull enclosure, while CS and KB had access to the whole indoor area and the cow outdoor enclosure. Visual and tactile contact through barriers was possible between the two groups. On Day 21-23 (POST2), the cows were housed together and the bull was separated from the cows, allowing visual and tactile contact through barriers.

2.3 | Cortisol analysis

Salivary cortisol was determined by a microtiter plate enzyme immunoassay (EIA) using an antiserum against cortisol-3-CMO and biotinylated cortisol as a label. The EIA has been previously described and characterized (including cross-reactivity determinations) by Palme and Möstl (1997) and has been used successfully to monitor adrenocortical

TABLE 2 Translocation sampling scheme

activity from saliva samples in other species (Behringer et al., 2009, 2014). Before the study, we confirmed its biological validity for use in African elephants by demonstrating a rise in cortisol levels in response to washing, a potentially stressful event ($n = 3$ cases; cortisol level before: 1.28 ± 0.51 ng/ml; cortisol level after 2.28 ± 0.82 ng/ml; percentages of increase in response to each event: (a) 60.22%, (b) 50.00%, and (c) 133.96%).

For analysis, saliva samples were diluted 1:3 to 1:50 in assay buffer (phosphate-buffered saline with 1% bovine serum albumin, pH 7.2) to bring the cortisol concentrations into the working range of the assay and duplicate 50 µl aliquots of diluted samples and cortisol standard (50 µl, 0.6–40 pg/50 µl) were combined with biotinylated cortisol (50 µl) and cortisol antiserum (50 µl) and incubated overnight at 4°C. After incubation, the plates were washed four times, followed by the addition of 150 µl (667 ng) streptavidin-peroxidase (S5512; Sigma Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen, Germany) in assay buffer and a further incubation of the plate on a plate shaker for 1 hr at room temperature in the dark. Thereafter, the plate was washed again four times and TMB substrate solution (100 µl; 1-Step Ultra TMB, Thermo Fisher Scientific Inc., Rockford) was subsequently added and the plates incubated at room temperature in the dark for 45–60 min. The enzyme reaction was finally stopped by adding 50 µl of 2 M H₂SO₄ to each well and absorbance measured at 450 nm (reference 630 nm) in a spectrophotometer. Samples with a coefficient of variation (CV) >10% between duplicates were remeasured. The sensitivity of the assay at 90% binding was 12 pg/ml. Saliva samples of different animals gave displacement curves that run parallel to the cortisol standard curve. Inter-assay coefficients of variation (CV), assessed by replicate determinations of high- and low-value quality controls run in each assay, were 7.5% (high) and 10.4% (low), and intra-assay CVs were 5.0% (high) and 6.8% (low). Salivary cortisol concentrations are expressed as ng/ml.

2.4 | Data analysis

2.4.1 | Baseline diurnal cortisol variation

We applied a linear mixed model (LMM) using the function lmer of the R package lme4 (version 1.1-21; Bates, Mächler, Bolker, &

Walker, 2015) to examine if the daytime had an effect on the cortisol level. To meet LMM assumptions of homoscedasticity and normality of residuals, we \log_{10} -transformed the cortisol data. Daytime (morning, afternoon) was included as a fixed effect. Furthermore, we controlled for the effect of the study period (2016, 2017) by fitting it as a covariate fixed effect. Each animal was measured twice per day on several sampling days. We accounted for this nested data structure by fitting sampling day nested in animal-ID as a random intercept. In this way, we controlled for effects on the cortisol levels generated by variation within and between animals, as well as within and between sampling days nested in animals. We used REML for model fitting and included the function BOBYQA (Bound Optimization BY Quadratic Approximation, Powell, 2009) as the optimizer. We applied t-tests (Satterthwaite's method) of the R package lmerTest (version 3.1-0; Kuznetsova, Brockhoff, & Christensen, 2017) to test for significance of fixed effects. For visualization of the average difference between morning and afternoon cortisol levels, we calculated the median morning and afternoon cortisol level of each animal separately for 2016 and 2017 using the original non-transformed data. Furthermore, we analyzed the diurnal variation on the individual level separately for 2016 and 2017. We used the Shapiro–Wilks test to check if data were normally distributed. Due to nonnormality of the original and \log_{10} -transformed data and low sample sizes per animal we chose the nonparametric Wilcoxon signed-rank test for paired samples (Martin & Bateson, 2007; Siegel & Castellan, 1988) to test for differences in the central tendency of morning and afternoon cortisol levels.

In addition, we calculated the percentage difference between morning and afternoon cortisol levels by (morning-afternoon)/afternoon $\times 100$ (formula 1) for each morning-afternoon pair to assess the average magnitude of the diurnal cortisol change of each animal. This was done to evaluate what magnitude of the difference between morning and afternoon cortisol levels corresponded to a nonsignificant, potentially disturbed, diurnal variation.

2.4.2 | Translocation (stressor)

To analyze the effect of the transport on the cortisol level, we used the Wilcoxon signed-rank test with Bonferroni-correction and compared the cortisol level in PRE to the cortisol level in POST1 separately for each animal and daytime (morning, afternoon). POST2 was not included in the statistical testing due to the low individual sample sizes in this transport phase. Regarding the introduction of CS to the bull, we calculated the percentage increase in relation to the individual median cortisol level in PRE for each animal and daytime with the formula: (Introduction-PRE)/PRE $\times 100$. We considered the increase as significant if the cortisol level after the introduction was higher than the individual median morning respectively afternoon cortisol level in PRE plus 1.5 interquartile range. To analyze the effect of the transport on the diurnal variation, we used the same approach as

in the analysis of the baseline diurnal variation on the individual level (see Section 2.4.1). First, we applied the Wilcoxon signed-rank test with Bonferroni-correction to compare morning with afternoon levels separately for the transport phases PRE and POST1. Second, we calculated the average percentage diurnal variation with formula 1 and compared the values of the three transport phases. As not all morning and afternoon samples were paired, that is on some sampling days either a morning or an afternoon sample was collected from an animal, we determined the percentage diurnal variation based on morning and afternoon individual median cortisol levels.

Average salivary cortisol levels, respectively, percentage differences are reported as median (25% quartile, 75% quartile). The LMM and calculation of medians and exclusive quartiles were conducted in R Studio (version 1.2.1335). Shapiro–Wilks and Wilcoxon signed-rank tests were carried out in IBM SPSS (version 24). The significance level was $p < .05$. If $.05 \leq p \leq .09$, the tendency for significance is reported.

3 | RESULTS

3.1 | Baseline diurnal cortisol variation

The effect of daytime on salivary cortisol levels was highly significant when controlling for the effect of the study period and individual variation (Table 3). On average, salivary cortisol levels were lower in the afternoon than in the morning (Figure 1).

The same result was found on the individual level in most animals. In 2016, one animal (SW) was excluded from the statistical analysis due to low sample size ($n = 3$). From the remaining nine animals, seven animals had significantly higher morning than afternoon cortisol levels in 2016 (AR: $Z = -1.527$, $p = .128$, $n = 7$, ZI: $Z = -2.201$, $p = .028$, $n = 6$, TA: $Z = -2.023$, $p = .043$, $n = 5$, SA: $Z = -1.992$, $p = .046$, $n = 6$, TI: $Z = -1.997$, $p = .046$, $n = 6$, TU: $Z = -0.944$, $p = .345$, $n = 5$, SF: $Z = -2.073$, $p = .038$, $n = 9$; CH: $Z = -2.547$, $p = .011$, $n = 9$; KB: $Z = -2.201$; $p = .028$; $n = 6$; Figure 2). In 2017, salivary cortisol levels significantly decreased from morning to afternoon in eight animals (AR: $Z = -2.117$, $p = .034$, $n = 7$, ZI: $Z = -2.366$, $p = .018$, $n = 7$, TA: $Z = -2.366$, $p = .018$, $n = 7$, TI: $Z = -2.023$, $p = .043$, $n = 5$, TU: $Z = -2.207$, $p = .027$, $n = 6$, SF: $Z = -2.310$, $p = .021$, $n = 9$, CH:

TABLE 3 Fixed effects resulting from the linear mixed model examining the effect of daytime (morning, afternoon) and study period (2016, 2017) on salivary cortisol concentrations ($n = 266$)

Fixed effect	Estimate	SE	df	t	p
Intercept	0.427	0.055	35.257	7.765	<.001
Daytime	-0.350	0.024	196.089	-14.465	<.001
Study period	-0.115	0.024	200.527	-4.750	<.001

Note: Animal-ID ($n = 10$) and sampling day nested in animal-ID ($n = 72$) were included as random effects. Bold values indicate statistical significance ($p < .05$) shown by t tests (Satterthwaite's method).

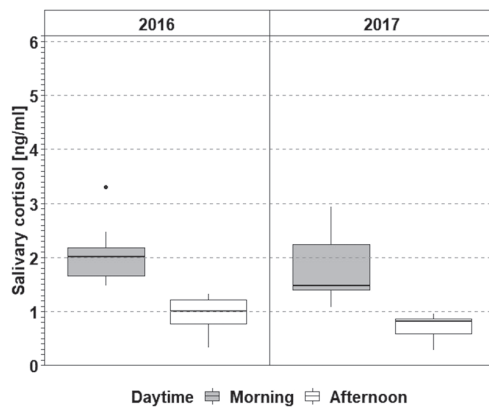


FIGURE 1 Difference between the average morning and afternoon salivary cortisol level in the first (2016, $n = 10$, left) and second study period (2017, $n = 10$, right). The boxes illustrate the 25% and 75% quartiles, bars indicate medians, the black dot indicates one outlier

$Z = -2.666$, $p = .008$, $n = 9$, KB: $Z = -2.201$, $p = .028$, $n = 6$; Figure 2) and showed a tendency for a significant decrease in the two remaining animals (SA: $Z = -1.753$, $p = .080$, $n = 5$, SW: $Z = -1.753$, $p = .080$, $n = 5$).

Table 4 shows the average percentage diurnal variation of each animal. The values respectively averages that corresponded to a nonsignificant, potentially absent, diurnal variation ranged from -7.05% and -54.42% [SW, 2016] to 245.24% (-2.14% , 445.88%) [SW, 2017].

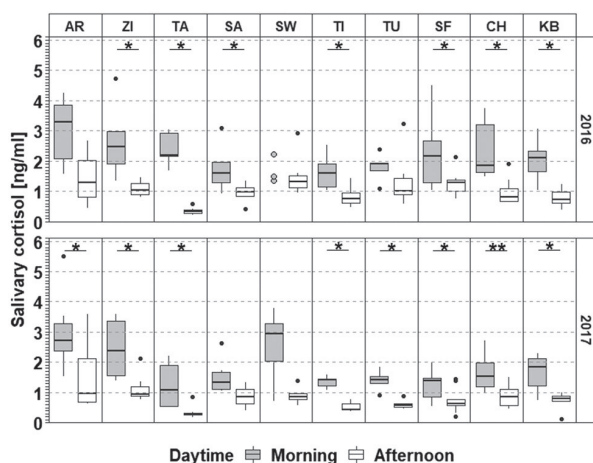


FIGURE 2 Difference between the morning and afternoon salivary cortisol level of each animal in the first (2016, top) and second study period (2017, bottom). The boxes illustrate the 25% and 75% quartiles, bars indicate medians, black dots indicate outliers. Sample sizes are given in Table 1. In SW in 2016, single values instead of a boxplot are depicted and no statistical test was conducted due to low sample size. Significance level $p < .05$, stars indicate significance: * $p < .05$, ** $p < .01$

TABLE 4 Average percentage diurnal variation (median [25% quartile, 75% quartile], $n =$ sample size) of each animal in the first (2016) and the second (2017) study period

Animal-ID	Study period	
	2016	2017
AR	225.00% (-30.08%, 407.14%) $n = 7$	143.75% (57.14%, 338.71%) $n = 7$
ZI	144.51% (56.58%, 242.30%) $n = 6$	115.38% (39.22%, 276.19%) $n = 7$
TA	500.00% (404.52%, 837.97%) $n = 5$	200.00% (55.56%, 685.71%) $n = 7$
SA	74.86% (30.47%, 205.70%) $n = 6$	83.87% (15.59%, 242.33%) $n = 5$
SW	-7.50% (-54.42%, 113.46%) ^a $n = 3$	245.24% (-2.14%, 445.88%) $n = 5$
TI	135.33% (23.68%, 179.67%) $n = 6$	145.45% (117.08%, 224.16%) $n = 5$
TU	22.78% (-17.49%, 178.37%) $n = 5$	169.90% (97.23%, 193.33%) $n = 6$
SF	57.81% (12.92%, 195.66%) $n = 9$	75.00% (14.24%, 183.97%) $n = 9$
CH	171.01% (59.29%, 327.47%) $n = 9$	86.29% (39.12%, 141.68%) $n = 9$
KB	185.55% (81.48%, 278.15%) $n = 6$	161.67% (57.63%, 276.96%) $n = 6$

Note: Italic values indicate diurnal variation was not significant.

^aMedian (minimum, maximum).

3.2 | Cortisol in relation to translocation (stressor)

Figure 3 depicts the morning and afternoon cortisol level in PRE and POST1. The Bonferroni-corrected Wilcoxon test showed no significant difference between PRE and POST1 salivary cortisol levels at both day-times in all cows but a tendency for significantly higher afternoon cortisol levels in POST1 than in PRE in CH (CS: morning: $Z = -0.314$, $p = 1.000$, $n = 6$; afternoon: $Z = -1.992$, $p = .093$, $n = 6$; SF: morning: $Z = -0.631$, $p = 1.000$, $n = 6$, afternoon: $Z = -1.153$, $p = .498$, $n = 6$; CH: morning: $Z = -0.943$, $p = .691$, $n = 6$; afternoon: $Z = -2.207$, $p = .055$, $n = 6$).

Figure 3 shows the cortisol concentrations of the three cows after the introduction to the bull. The introduction of CS to the bull

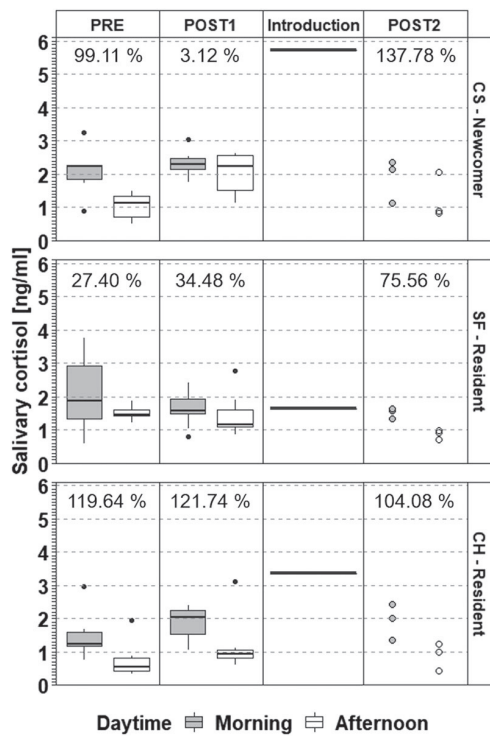


FIGURE 3 Morning and afternoon salivary cortisol level and median percentage difference between them in the newcomer cow (CS, top) and the two resident cows (SF, middle, CH, bottom) before the transport (PRE), after the transport between Day 1 and Day 9 (POST1) and between Day 21–23 (POST2), as well as the salivary cortisol concentrations of these animals after the first introduction of CS to the bull on Day 20 (Introduction). The boxes illustrate the 25% and 75% quartiles, bars indicate medians, black dots indicate outliers. Sample sizes are given in Table 2

resulted in a significant cortisol increase in CH and in CS compared to both morning and afternoon levels in PRE. In SF, cortisol was not significantly elevated after the introduction. Compared to afternoon PRE cortisol levels, CH and CS responded with a 496.43%, respectively, 410.71% increase to CS's introduction to the bull, whereas SF did hardly respond (12.33% increase). The response relative to the morning PRE cortisol level was lower than to the afternoon PRE cortisol level with a 171.54% increase in CH, a 156.50% increase in CS and no increase in SF.

Except for the strong tendency for a significant difference in CS before the transport (CS: PRE: $Z = -2.201$, $p = .055$, $n = 6$), morning and afternoon cortisol levels did not differ significantly in both PRE and POST1 in all cows (CH: PRE: $Z = -1.992$, $p = .093$, $n = 6$, POST1: $Z = -1.690$, $p = .182$, $n = 7$; CS: POST1: $Z = -0.943$, $p = .691$, $n = 6$; SF: PRE: $Z = -0.943$, $p = .691$, $n = 6$, POST1: $Z = -0.845$, $p = .796$, $n = 7$).

As shown in Figure 3, the percentage diurnal variation was slightly higher in POST1 than in PRE in the residents. CS, in contrast, showed a remarkably lower percentage diurnal variation in POST1 than in PRE. The percentage diurnal variation of POST2 was higher than in PRE and POST1 in CS and SF but lower than in the previous transport phases in CH.

4 | DISCUSSION

4.1 | Baseline diurnal cortisol variation

The present study found a significant diurnal variation of salivary cortisol levels when controlling for individual variation and the effect of the study period. The average cortisol level was higher in the morning than in the afternoon, which is in accordance with previous studies of the diurnal variation of cortisol in captive African elephants (Casares et al., 2016; Grand et al., 2012; Kelling Swilley, 2008) and numerous other mammal species (Aurich et al., 2015; Ekkel et al., 1996; Kutsukake et al., 2009; Suzuki et al., 2003). Generally, the high HPA-axis activity in the morning is considered as an anticipatory response to awakening (Born, Hansen, Marshall, Mölle, & Fehm, 1999; Moore-Ede, 1986). In the present study, the high morning cortisol level may presumably reflect the anticipation of management events occurring in the morning, which, therefore, may function as additional cues that entrain the diurnal cortisol rhythm (reviewed in Kalsbeek et al., 2012). These included feeding, shifting to outdoor enclosures, and changes in group composition.

The study period had a highly significant effect on the cortisol level. Assay drift may have accounted for a small proportion of this difference between study periods. Although the assay was stable across time, indicated by an average inter-assay CV value <10% across the two study periods, in 2016 quality control values were measured about 10% higher than in 2017/2018. Thus, sample concentrations may have been measured as well about 10% higher in 2016 than in 2017/2018. Furthermore, the sampling procedure might have produced a cortisol increase, which might have been lower in 2017 due to habituation to the procedure (reviewed in Grissom & Bhatnagar, 2009). Moreover, the management alterations in 2017 (see Section 2.1) may have been associated with an increase in environmental complexity (e.g., feeding on the ground to feeding from a rack), which was shown to lower cortisol levels (Carlstead, Brown, & Seidensticker, 1993). In addition, in Wuppertal, the keepers reported that the aggression in the group was higher in 2016 due to aggressive interactions between one cow and a young bull, which may have increased the average baseline cortisol level in this year (Alberts, Sapolsky, & Altman, 1992; Muller & Wrangham, 2004; Parrott & Misson, 1989). The temporary separation of the young bull reduced the aggression in the herd considerably, which may have contributed to overall lower cortisol levels in 2017.

On the individual level, most animals exhibited a significant diurnal variation in both study periods. The lack of a significant diurnal variation may have reflected a flat diurnal rhythm in the remaining animals. Flat diurnal rhythms, that is a low difference between morning and afternoon cortisol levels, may indicate compromised welfare due to chronic stress or disease (reviewed in Heim, Ehler, & Hellhammer, 2000 and Oster et al., 2017). However, data must be interpreted with caution in this regard, as individuals differ in diurnal rhythms and flat rhythms do not necessarily reflect stress- or disease-related conditions (Cordero, Brorsen, & McFarlane, 2012; Smyth et al., 1997; Stone et al., 2001). In addition, assessing repeatability of the diurnal cortisol rhythm (Selmaoui

& Touitou, 2003) is important to distinguish between transient and stable flat rhythms and to ensure its validity as a potential welfare indicator (Stone et al., 2001). In the present study, we considered the flatness or loss of the expected diurnal variation in some animals as rather transient than permanent and assumed a statistical explanation for the non-significance of the diurnal variation. Despite nonsignificance, the average percentage diurnal variation was still positive in the respective animals. This means, individual average cortisol levels still followed the expected diurnal pattern with lower cortisol levels in the afternoon. The lack of significance was presumably based on one or two sampling days in the individual samples when the morning-afternoon difference was reversed with morning levels being lower than afternoon levels (i.e., a negative percentage diurnal variation). Therefore, it is highly likely that a larger sample size would have increased the power of the statistical test by balancing the variation between sampling days, that is the within-individual variation. Within-individual variation in salivary cortisol concentrations can arise from the cortisol responses to different acute stressors, which may have occurred 5–20 min (the time lag between peak cortisol levels in the blood and in saliva, Hernandez et al., 2014; Kirschbaum & Hellhammer, 2000) before sampling. In the present study, the animals were roaming in the enclosure at that point in time, which made it difficult to control for differences in the pre-sampling situation.

4.2 | Cortisol in relation to translocation

Although transports are evidently stressors producing cortisol elevations in different species including African elephants (Millsbaugh et al., 2007; Viljoen et al., 2008), the salivary cortisol levels before (PRE) and directly after the transport (POST1) did not differ significantly in the present study. The tendency for a higher afternoon level in POST1 than in PRE was found in CH though. It is highly likely that the present study failed to find the predicted significant elevations after the transport due to the inability of collecting samples immediately after CS's arrival. In other studies, increased levels of fecal cortisol metabolites were found 6–48 hr after the transport depending on the digestion time of the species and the sampling interval (Goymann et al., 1999; Laws et al., 2007; Morrow, Kolver, Verkerk, & Matthews, 2002; Schmidt et al., 2010a, 2010b, 2010c). Salivary cortisol levels, in contrast, were reported to increase during the transport and to decrease within a few hours after the transport (Schmidt et al., 2010a, 2010b, 2010c). Unfortunately, the animals in the present study were not willing to cooperate immediately after CS's arrival, which made prompt saliva sampling impossible. Rather than reflecting the transport itself, sporadically elevated cortisol levels in POST1 could have been responses to acute stressors during the familiarization of the newcomer with the new enclosure and group (Alexander & Irvine, 1998; Carlstead et al., 1993; Dathe, Kuckelkorn, & Minnemann, 1992; Irvine & Alexander, 1994; Laws et al., 2007; Morrow et al., 2002).

The results regarding the introduction of CS to the bull supported the need for prompt sampling when measuring the salivary cortisol response. In this case, we were able to sample immediately after the stressor and found a marked increase in the cortisol levels of CS and CH. Similar results have been obtained in Asian elephants

(Dathe et al., 1992). SF already gained experience in stressors associated with transports and introductions, which may have explained her low cortisol response compared to the other resident CH (Dembiec et al., 2004; reviewed in Koolhaas et al., 2011).

The lack of a significant diurnal cortisol variation in PRE was unexpected considering that respective samples were collected 2 to 3 weeks before the translocation event, which makes an effect of management changes due to the upcoming transport unlikely. The lack of significance may be related to the statistical approach used. When uncorrected for multiple comparisons, the Wilcoxon test reached significance regarding the diurnal variation in PRE in CS and CH, but not in SF, whereas the diurnal variation in POST1 remained not significant in all animals. Furthermore, a larger sample size and a more balanced sampling design (i.e., consistently paired morning and afternoon samples) would have potentially lowered variability between samples clarifying the diurnal variation.

The minimal percentage diurnal variation between median morning and afternoon cortisol levels in POST1 indicated an effect of the transport on the diurnal variation in the newcomer CS. Based on comparisons between PRE, POST1 and POST2 in this animal and the residents, this flattening of the diurnal variation resulted from the elevation of the afternoon level, which was potentially caused by the changes in housing conditions (e.g., Irvine & Alexander, 1994). The increase of the percentage diurnal variation in POST2 may have indicated a normalization of the diurnal cortisol rhythm. Thus, the potential flattening of the diurnal rhythm in POST1 could be considered as a transient phenomenon reflecting acute stress. In both residents, the percentage diurnal variation in POST1 was slightly higher than in PRE making an effect of the transport rather unlikely. In POST2, the percentage diurnal variation of SF increased and approached the values in the baseline condition, which may have indicated a normalization of the diurnal variation like in CS. The percentage diurnal variation of CH decreased in POST2, but, like the values in PRE and POST1, it was still in the range of those during baseline management.

5 | CONCLUSION

The present study demonstrated that salivary cortisol levels of captive African elephants follow the expected diurnal variation characterized by high morning and low afternoon levels during baseline conditions (routine management). Salivary cortisol was sporadically but not significantly higher after the transport. Still, the translocation may have been a potential stressor for the transported animal, as the diurnal variation was absent based on elevated afternoon levels after the transport compared to before the transport. The first introduction of the transported animal to the bull, in contrast, produced significant cortisol increases. Furthermore, flattening of the diurnal variation was considered as transient both during baseline and in relation to the transport. Therefore, salivary cortisol is a useful minimally invasive measure of physiological stress provided that the animals are willing to cooperate and samples can be collected during or immediate (i.e., within a few hours) after the stressor.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors would like to thank all persons involved in the study in Opel-Zoo Kronberg, Grüner Zoo Wuppertal, Thüringer Zoopark Erfurt and Réserve Africaine du Sigean for their cooperation and interest, especially Dr. Thomas Kauffels, Dr. Martin Becker and Jörg Beckmann (Opel-Zoo), Dr. Arne Lawrenz (Wuppertal), Dr. Sabine Merz and Tina Risch (Erfurt) and Marianne Bilbaut, Marielle Vandenburg-Beltrame and Alix Ortega (Sigean). The authors are also grateful to the keepers for integrating the study into their daily routine, giving valuable inputs on the experimental procedure and sampling saliva according to a strict protocol. Finally, we also thank Miriam Polten for conducting the cortisol analyses. This work was financed by the Opel-Zoo foundation professorship in Zoo Biology from the von Opel Hessische Zoostiftung.

CONFLICT OF INTERESTS

The authors declare that there are no conflict of interests.

ORCID

Susan Hambrecht  <http://orcid.org/0000-0003-2024-6510>

Paul Wilhelm Dierkes  <http://orcid.org/0000-0002-6046-6406>

REFERENCES

- Alberts, S. C., Sapolsky, R. M., & Altman, J. (1992). Behavioral, endocrine, and immunological correlates of immigration by an aggressive male into a natural primate group. *Hormones and Behavior*, 26, 167–178. [https://doi.org/10.1016/0018-506X\(92\)90040-3](https://doi.org/10.1016/0018-506X(92)90040-3)
- Alexander, S., & Irvine, C. H. G. (1998). The effect of social stress on adrenal axis activity in horses: The importance of monitoring corticosteroid-binding globulin capacity. *Journal of Endocrinology*, 157, 425–432. <https://doi.org/10.1677/joe.0.1570425>
- Aurich, J., Wulf, M., Ille, N., Erber, R., von Lewinski, M., Palme, R., & Aurich, C. (2015). Effects of season, age, sex, and housing on salivary cortisol concentrations in horses. *Domestic Animal Endocrinology*, 52, 11–16. <https://doi.org/10.1016/j.domaniend.2015.01.003>
- Balsalobre, A., Brown, S. A., Marcacci, L., Tronche, F., Kellendonk, C., Reichardt, H. M., ... Schibler, U. (2000). Resetting of circadian time in peripheral tissues by glucocorticoid signaling. *Science*, 289, 2344–2347. <https://doi.org/10.1126/science.289.5488.2344>
- Barnett, J. L., Cronin, G. M., & Winfield, C. G. (1981). The effects of individual and group penning of pigs on total and free plasma corticosteroids and the maximum corticosteroid binding capacity. *General and Comparative Endocrinology*, 44, 219–225. [https://doi.org/10.1016/0016-6480\(81\)90251-3](https://doi.org/10.1016/0016-6480(81)90251-3)
- Bartlang, M. S., Neumann, I. D., Slattey, D. A., Uschold-Schmidt, N., Kraus, D., Helfrich-Förster, C., & Reber, S. O. (2012). Time matters: Pathological effects of repeated psychosocial stress during the active, but not inactive, phase of male mice. *The Journal of Endocrinology*, 215, 425–437. <https://doi.org/10.1530/JOE-12-0267>
- Bartlang, M. S., Savelyev, S. A., Johansson, A. -S., Reber, S. O., Helfrich-Förster, C., & Lundkvist, G. B. S. (2014). Repeated psychosocial stress at night, but not day, affects the central molecular clock. *Chronobiology International*, 31, 996–1007. <https://doi.org/10.3109/07420528.2014.940085>
- Bates, D., Mächler, M., Bolker, B., & Walker, S. (2015). Fitting linear mixed-effects models using lme4. *Journal of Statistical Software*, 67, 1–48. <https://doi.org/10.18637/jss.v067.i01>
- Becker, B. A., Ford, J. J., Christenson, R. K., Manak, R. C., Hahn, G. L., & DeShazer, J. A. (1985). Cortisol response of gilts in tether stalls. *Journal of Animal Science*, 60, 264–270. <https://doi.org/10.2527/jas1985.601264x>
- Behringer, V., Clauss, W., Hachenburger, K., Kuchar, A., Möstl, E., & Selzer, D. (2009). Effect of giving birth on the cortisol level in a bonobo groups' (*Pan paniscus*) saliva. *Primates*, 50, 190–193. <https://doi.org/10.1007/s10329-008-0121-2>
- Behringer, V., Stevens, J. M. G., Hohmann, G., Möstl, E., Selzer, D., & Deschner, T. (2014). Testing the effect of medical positive reinforcement training on salivary cortisol levels in bonobos and orangutans. *PLOS One*, 9, e108664. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0108664>
- Bohák, Z., Szabó, F., Beckers, J. -F., Melo de Sousa, N., Kutasi, O., Nagy, K., & Szenci, O. (2013). Monitoring the circadian rhythm of serum and salivary cortisol concentrations in the horse. *Domestic Animal Endocrinology*, 45, 38–42. <https://doi.org/10.1016/j.domaniend.2013.04.001>
- Born, J., Hansen, K., Marshall, L., Mölle, M., & Fehm, H. L. (1999). Timing the end of nocturnal sleep. *Nature*, 397, 29–30. <https://doi.org/10.1038/16166>
- Brown, J. L., Kersey, D. C., Freeman, E. W., & Wagener, T. (2010). Assessment of diurnal urinary cortisol excretion in Asian and African elephants using different endocrine methods. *Zoo Biology*, 29, 274–283. <https://doi.org/10.1002/zoo.20268>
- Carlstead, K., Brown, J. L., & Seidensticker, J. (1993). Behavioral and adrenocortical responses to environmental changes in leopard cats (*Felis bengalensis*). *Zoo Biology*, 12, 321–331. <https://doi.org/10.1002/zoo.1430120403>
- Casares, M., Silván, G., Carbonell, M. D., Gerique, C., Martínez-Fernandez, L., Cáceres, S., & Illera, J. C. (2016). Circadian rhythm of salivary cortisol secretion in female zoo-kept African elephants (*Loxodonta africana*). *Zoo Biology*, 35, 65–69. <https://doi.org/10.1002/zoo.21262>
- Charmandari, E., Chrousos, G. P., Lambrou, G. I., Pavlaki, A., Koide, H., Ng, S. S. M., & Kino, T. (2011). Peripheral CLOCK regulates target-tissue glucocorticoid receptor transcriptional activity in a circadian fashion in man. *PLOS One*, 6, e25612. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0025612>
- Coe, C. L., & Levine, S. (1995). Diurnal and annual variation of adrenocortical activity in the squirrel monkey. *American Journal of Primatology*, 35, 283–292. <https://doi.org/10.1002/ajp.1350350404>
- Cordero, M., Brorsen, B. W., & McFarlane, D. (2012). Circadian and circannual rhythms of cortisol, ACTH, and α -melanocyte-stimulating hormone in healthy horses. *Domestic Animal Endocrinology*, 43, 317–324. <https://doi.org/10.1016/j.domaniend.2012.05.005>
- Dathe, H. H., Kuckelkorn, B., & Minnemann, D. (1992). Salivary cortisol assessment for stress detection in the Asian elephant (*Elephas maximus*): A pilot study. *Zoo Biology*, 11, 285–289.
- De Jong, I. C., Prelle, I. T., Van de Burgwal, J. A., Lambooij, E., Korte, S. M., Blokhuis, H. J., & Koolhaas, J. M. (2000). Effects of environmental enrichment on behavioral responses to novelty, learning, and memory, and the circadian rhythm in cortisol in growing pigs. *Physiology & Behavior*, 68, 571–578. [https://doi.org/10.1016/S0031-9384\(99\)00212-7](https://doi.org/10.1016/S0031-9384(99)00212-7)
- Dembiec, D. P., Snider, R. J., & Zanella, A. J. (2004). The effects of transport stress on tiger physiology and behavior. *Zoo Biology*, 23, 335–346. <https://doi.org/10.1002/zoo.20012>
- Ekkel, E. D., Dieleman, S. J., Schouten, W. G. P., Portela, A., Cornélissen, G., Tielen, M. J. M., & Halberg, F. (1996). The circadian rhythm of cortisol in the saliva of young pigs. *Physiology & Behavior*, 60, 985–989. [https://doi.org/10.1016/0031-9384\(96\)00107-2](https://doi.org/10.1016/0031-9384(96)00107-2)
- Forhead, A. J., Smart, D., Smith, R. F., & Dobson, H. (1995). Transport-induced stress responses in fed and fasted donkeys. *Research in Veterinary Science*, 58, 144–151. [https://doi.org/10.1016/0034-5288\(95\)90068-3](https://doi.org/10.1016/0034-5288(95)90068-3)
- Ganswindt, A., Palme, R., Heistermann, M., Borrigan, S., & Hodges, J. K. (2003). Non-invasive assessment of adrenocortical function in the male African elephant (*Loxodonta africana*) and its relation to musth. *General and Comparative Endocrinology*, 134, 156–166. [https://doi.org/10.1016/S0016-6480\(03\)00251-X](https://doi.org/10.1016/S0016-6480(03)00251-X)

- Giannetto, C., Fazio, F., Assenza, A., Alberghina, D., Panzera, M., & Piccione, G. (2014). Parallelism of circadian rhythmicity of salivary and serum cortisol concentration in normal dogs. *Journal of Applied Biomedicine*, 12, 229–233. <https://doi.org/10.1016/j.jab.2014.01.009>
- Goymann, W., Möstl, E., Van't Hof, T., East, M. L., & Hofer, H. (1999). Noninvasive fecal monitoring of glucocorticoids in spotted hyenas, *Crocuta crocuta*. *General and Comparative Endocrinology*, 114, 340–348. <https://doi.org/10.1006/gcen.1999.7268>
- Grand, A. P., Kuhar, C. W., Leighty, K. A., Bettinger, T. L., & Laudenslager, M. L. (2012). Using personality ratings and cortisol to characterize individual differences in African Elephants (*Loxodonta africana*). *Applied Animal Behaviour Science*, 142, 69–75. <https://doi.org/10.1016/j.applanim.2012.09.002>
- Grissom, N., & Bhatnagar, S. (2009). Habituation to repeated stress: Get used to it. *Neurobiology of Learning and Memory*, 92, 215–224. <https://doi.org/10.1016/j.nlm.2008.07.001>
- Heim, C., Ehler, U., & Hellhammer, D. H. (2000). The potential role of hypocortisolism in the pathophysiology of stress-related bodily disorders. *Psychoneuroendocrinology*, 25, 1–35. [https://doi.org/10.1016/S0306-4530\(99\)00035-9](https://doi.org/10.1016/S0306-4530(99)00035-9)
- Heistermann, M. (2010). Non-invasive monitoring of endocrine status in laboratory primates: Methods, guidelines and applications. *Advances in Science and Research*, 5, 1–9. <https://doi.org/10.5194/asr-5-1-2010>
- Hernandez, C. E., Thierfelder, T., Svennersten-Sjaunja, K., Berg, C., Orihuela, A., & Lidfors, L. (2014). Time lag between peak concentrations of plasma and salivary cortisol following a stressful procedure in dairy cattle. *Acta Veterinaria Scandinavica*, 56, 61. <https://doi.org/10.1186/s13028-014-0061-3>
- Ichikawa, Y., Nishikai, M., Kawagoe, M., Yoshida, K., & Homma, M. (1972). Plasma corticotropin, cortisol and growth hormone responses to hypoglycemia in the morning and in the evening. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 34, 895–898. <https://doi.org/10.1210/jcem-34-5-895>
- Irvine, C. H. G., & Alexander, S. L. (1994). Factors affecting the circadian rhythm in plasma cortisol concentrations in the horse. *Domestic Animal Endocrinology*, 11, 227–238. [https://doi.org/10.1016/0739-7240\(94\)90030-2](https://doi.org/10.1016/0739-7240(94)90030-2)
- Kalsbeek, A., van der Spek, R., Lei, J., Endert, E., Buijs, R. M., & Fliers, E. (2012). Circadian rhythms in the hypothalamo-pituitary-adrenal (HPA) axis. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 349, 20–29. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2011.06.042>
- Kelling Swilley, A. (2008). *An examination of salivary cortisol concentrations and behavior in three captive African elephants (Loxodonta africana) at Zoo Atlanta (Dissertation)*. Atlanta, GA: Georgia Institute of Technology.
- Kirschbaum, C., & Hellhammer, D. H. (2000). Salivary cortisol. In G. Fink (Ed.), *Encyclopedia of stress* (pp. 379–383). San Diego, CA: Academic Press.
- Koolhaas, J. M., Bartolomucci, A., Buwalda, B., de Boer, S. F., Flügge, G., Korte, S. M., ... Fuchs, E. (2011). Stress revisited: A critical evaluation of the stress concept. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 35, 1291–1301. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2011.02.003>
- Kutsukake, N., Ikeda, K., Honma, S., Teramoto, M., Mori, Y., Hayasaka, I., ... Hasegawa, T. (2009). Validation of salivary cortisol and testosterone assays in chimpanzees by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *American Journal of Primatology*, 71, 696–706. <https://doi.org/10.1002/ajp.20708>
- Kuznetsova, A., Brockhoff, P. B., & Christensen, R. H. B. (2017). ImerTest package: Tests in linear mixed effects models. *Journal of Statistical Software*, 82, 1–26. <https://doi.org/10.18637/jss.v082.i13>
- Lassourd, V., Gayraud, V., Laroute, V., Alvinerie, M., Benard, P., Courtot, D., & Toutain, P. L. (1996). Cortisol disposition and production rate in horses during rest and exercise. *The American Journal of Physiology*, 271(1), R25–R33. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.1996.271.1.R25>
- Laws, N., Ganswindt, A., Heistermann, M., Harris, M., Harris, S., & Sherwin, C. (2007). A case study: Fecal corticosteroid and behavior as indicators of welfare during relocation of an Asian elephant. *Journal of Applied Animal Welfare Science*, 10, 349–358. <https://doi.org/10.1080/10888700701555600>
- Leliavski, A., Dumbell, R., Ott, V., & Oster, H. (2015). Adrenal clocks and the role of adrenal hormones in the regulation of circadian physiology. *Journal of Biological Rhythms*, 30, 20–34. <https://doi.org/10.1177/0748730414553971>
- Martin, P., & Bateson, P. P. G. (2007). *Measuring behaviour: an introductory guide* (3rd Ed.). Cambridge, UK: Cambridge University Press.
- Menargues, A., Urios, V., Limiñana, R., & Mauri, M. (2012). Circadian rhythm of salivary cortisol in Asian elephants (*Elephas maximus*): A factor to consider during welfare assessment. *Journal of Applied Animal Welfare Science*, 15, 383–390. <https://doi.org/10.1080/10888705.2012.709157>
- Millspough, J. J., Burke, T., Dyk, G. U. S., Slotow, R. O. B., Washburn, B. E., & Woods, R. J. (2007). Stress response of working African elephants to transportation and safari adventures. *Journal of Wildlife Management*, 71, 1257–1260. <https://doi.org/10.2193/2006-015>
- Moore-Ede, M. C. (1986). Physiology of the circadian timing system: Predictive versus reactive homeostasis. *The American Journal of Physiology*, 250(5), R737–R752. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.1986.250.5.R737>
- Morrow, C. J., Kolver, E. S., Verkerk, G. A., & Matthews, L. R. (2002). Fecal glucocorticoid metabolites as a measure of adrenal activity in dairy cattle. *General and Comparative Endocrinology*, 126, 229–241. <https://doi.org/10.1006/gcen.2002.7797>
- Muller, M. N., & Wrangham, R. W. (2004). Dominance, cortisol and stress in wild chimpanzees (*Pan troglodytes schweinfurthii*). *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 55, 332–340. <https://doi.org/10.1007/s00265-003-0713-1>
- Nicolaidis, N. C., Charmandari, E., Kino, T., & Chrousos, G. P. (2017). Stress-related and circadian secretion and target tissue actions of glucocorticoids: Impact on health. *Frontiers in Endocrinology*, 8, 1–11. <https://doi.org/10.3389/fendo.2017.00070>
- Oster, H., Challet, E., Ott, V., Arvat, E., de Kloet, E. R., Dijk, D. -J., ... van Cauter, E. (2017). The functional and clinical significance of the 24-hour rhythm of circulating glucocorticoids. *Endocrine Reviews*, 38, 3–45. <https://doi.org/10.1210/er.2015-1080>
- Palme, R., & Möstl, E. (1997). Measurement of cortisol metabolites in faeces of sheep as a parameter of cortisol concentration in blood. *Mammalian Biology*, 62, 192–197.
- Parrott, R. F., & Misson, B. H. (1989). Changes in pig salivary cortisol in response to transport simulation, food and water deprivation, and mixing. *British Veterinary Journal*, 145, 501–505. [https://doi.org/10.1016/0007-1935\(89\)90110-3](https://doi.org/10.1016/0007-1935(89)90110-3)
- Pedersen, L. J., Rojkittikhun, T., Einarsson, S., & Edqvist, L.-E. (1993). Postweaning grouped sows: Effects of aggression on hormonal patterns and oestrous behaviour. *Applied Animal Behaviour Science*, 38, 25–39. [https://doi.org/10.1016/0168-1591\(93\)90039-R](https://doi.org/10.1016/0168-1591(93)90039-R)
- Powell, M. J. D. (2009). *The BOBYQA algorithm for bound constrained optimization without derivatives* (No. Technical Report DAMTP 2009/NA06). Centre for Mathematical Sciences, University of Cambridge, Cambridge, UK. Retrieved from <http://www.cityu.edu.hk/rcms/publications/preprint26.pdf>
- Schmidt, A., Biau, S., Möstl, E., Becker-Birck, M., Morillon, B., Aurich, J., ... Aurich, C. (2010a). Changes in cortisol release and heart rate variability in sport horses during long-distance road transport. *Domestic Animal Endocrinology*, 38, 179–189. <https://doi.org/10.1016/j.domaniend.2009.10.002>
- Schmidt, A., Hödl, S., Möstl, E., Aurich, J., Müller, J., & Aurich, C. (2010b). Cortisol release, heart rate, and heart rate variability in transport-naïve horses during repeated road transport. *Domestic Animal Endocrinology*, 39, 205–213. <https://doi.org/10.1016/j.domaniend.2010.06.002>
- Schmidt, A., Möstl, E., Wehnert, C., Aurich, J., Müller, J., & Aurich, C. (2010c). Cortisol release and heart rate variability in horses during road transport. *Hormones and Behavior*, 57, 209–215. <https://doi.org/10.1016/j.yhbeh.2009.11.003>

- Selmaoui, B., & Touitou, Y. (2003). Reproducibility of the circadian rhythms of serum cortisol and melatonin in healthy subjects: A study of three different 24-h cycles over six weeks. *Life Sciences*, 73, 3339–3349. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2003.05.007>
- Sheriff, M. J., Dantzer, B., Delehanty, B., Palme, R., & Boonstra, R. (2011). Measuring stress in wildlife: Techniques for quantifying glucocorticoids. *Oecologia*, 166, 869–887. <https://doi.org/10.1007/s00442-011-1943-y>
- Siegel, S., & Castellan, N. J. (1988). *Nonparametric statistics for the behavioral sciences* (2. ed.). Boston, MA: McGraw-Hill.
- Smyth, J. M., Ockenfels, M. C., Gorin, A. A., Catley, D., Porter, L. S., Kirschbaum, C., ... Stone, A. A. (1997). Individual differences in the diurnal cycle of cortisol. *Psychoneuroendocrinology*, 22, 89–105. [https://doi.org/10.1016/S0306-4530\(96\)00039-X](https://doi.org/10.1016/S0306-4530(96)00039-X)
- Stone, A. A., Schwartz, J. E., Smyth, J., Kirschbaum, C., Cohen, S., Hellhammer, D., & Grossman, S. (2001). Individual differences in the diurnal cycle of salivary free cortisol: A replication of flattened cycles for some individuals. *Psychoneuroendocrinology*, 26, 295–306. [https://doi.org/10.1016/S0306-4530\(00\)00057-3](https://doi.org/10.1016/S0306-4530(00)00057-3)
- Stull, C. L., & Rodiek, A. V. (2000). Physiological responses of horses to 24 hours of transportation using a commercial van during summer conditions. *Journal of Animal Science*, 78, 1458–1466. <https://doi.org/10.2527/2000.7861458x>
- Suzuki, M., Uchida, S., Ueda, K., Tobayama, T., Katsumata, E., Yoshioka, M., & Aida, K. (2003). Diurnal and annual changes in serum cortisol concentrations in Indo-Pacific bottlenose dolphins *Tursiops aduncus* and killer whales *Orcinus orca*. *General and Comparative Endocrinology*, 132, 427–433. [https://doi.org/10.1016/S0016-6480\(03\)00100-X](https://doi.org/10.1016/S0016-6480(03)00100-X)
- Viljoen, J. J., Ganswindt, A., du Toit, J. T., & Langbauer, W. R. (2008). Translocation stress and faecal glucocorticoid metabolite levels in free-ranging African savanna elephants. *South African Journal of Wildlife Research*, 38, 146–152. <https://doi.org/10.3957/0379-4369-38.2.146>

How to cite this article: Hambrecht S, Oerke A-K, Heistermann M, Dierkes PW. Diurnal variation of salivary cortisol in captive African elephants (*Loxodonta africana*) under routine management conditions and in relation to a translocation event. *Zoo Biology*. 2020;1–11. <https://doi.org/10.1002/zoo.21537>

Manuskript B

Stress in the management of African elephants under human care? Salivary cortisol responses to positive reinforcement training and novel enrichment objects in captive African elephants (*Loxodonta africana*)

Status: submitted

Beteiligte Autoren:

Susan Hambrecht (SH, Promovierender),

Ann-Kathrin Oerke (AO),

Michael Heistermann (MH),

Johannes Hartig (JH),

Paul Wilhelm Dierkes (PD)

(1) zu Entwicklung und Planung
Promovierender SH: 75% Co-Autor AO: 10% Co-Autor MH: 10% Co-Autor PD: 5%
(2) zur Durchführung der einzelnen Untersuchungen und Experimente
Promovierender SH: 100% (Durchführung aller Experimente)
(3) zur Erstellung der Datensammlung und Abbildungen
Promovierender SH: 90% (Erstellung) Co-Autor JH: 10% (Anleitung der Datenvorbereitung und Erstellung von Abbildungen mit R)
(4) zur Analyse und Interpretation der Daten
Promovierender SH: 60% (Statistische Analyse und Interpretation) Co-Autor JH: 20% (Entwicklung und Interpretation der Modelle) Co-Autor PD: 10% (Besprechung)
(5) zum Verfassen des Manuskripts
Promovierender SH: 55% Co-Autor AO: 15% Co-Autor MH: 15% Co-Autor JH: 5% Co-Autor PD: 10%

Datum/Ort: /Frankfurt am Main

Unterschrift Promovierender

Unterschrift Betreuer

Stress in the management of African elephants under human care? Salivary cortisol responses to positive reinforcement training and novel enrichment objects in captive African elephants (*Loxodonta africana*)

Susan Hambrecht^{a}, Ann-Kathrin Oerke^b, Michael Heistermann^b, Johannes Hartig^c, Paul Wilhelm Dierkes^a*

^aBioscience Education and Zoo Biology, Goethe-University Frankfurt, Max-von-Laue-Straße 13, 60438 Frankfurt am Main, Germany.

^bEndocrinology Laboratory, German Primate Centre, Leibniz Institute for Primate Research, Kellnerweg 4, 37077 Göttingen, Germany.

^cEducational Measurement, Educational Quality and Evaluation, Leibniz-Institute for Research and Information on Education, Rostocker Straße 6, 60323 Frankfurt am Main.

*Corresponding author: S. Hambrecht, Bioscience Education and Zoo Biology, Goethe-University Frankfurt, Max-von-Laue-Straße 13, 60438 Frankfurt am Main, Germany.

Email addresses: susan.hambrecht@gmx.de (Susan Hambrecht), akoerke@dpz.eu (Ann-Kathrin Oerke), MHeistermann@dpz.eu (Michael Heistermann), hartig@dipf.de (Johannes Hartig), dierkes@bio.uni-frankfurt.de (Paul Wilhelm Dierkes)

Abstract

In order to improve the welfare of African elephants under human care, knowledge of those management situations that may cause physiological stress and thus potentially influence welfare is important. The present study, therefore, examines the average time courses of the salivary cortisol response to positive reinforcement training (PRT) and a novel enrichment object (NOV) as well as describes the individual variation of the cortisol responses to these management situations in order to evaluate the effect of PRT and NOV on physiological stress and welfare. We repeatedly sampled saliva of ten animals (three zoos) for cortisol concentrations before and up to 60 min (in 10-15 min intervals) after the onset of the situation, which lasted 10-15 min. There was considerable individual variation in the time courses in response to the same situation. Using mixed models, we were able to control these and to reveal situation-specific average cortisol time courses: While PRT had a cortisol-lowering effect, NOV induced a moderate, short-term cortisol response. Inter-individual differences in the baseline and elevated cortisol levels were related to age (NOV) and zoo (PRT), while the effect of sex and handling method (free vs. protected contact) was variable. The results suggest a potential stress-buffering effect of PRT which thus likely promotes welfare. By contrast, presentation of NOV resembles an acute natural stressor with which the animals can successfully cope. Our results also demonstrate how important it is to consider individual variation in stress studies in order to reliably detect individual physiological stress in captive African elephants.

Keywords

Zoo; cortisol profile; individual variation; welfare; physiological stress

Highlights

- Positive reinforcement training (PRT) acted as a stress-buffering event.
- A novel object (NOV) was perceived as a stressor.
- Short-term cortisol response to NOV with fast recovery to pre-treatment levels
- Individual variation in the cortisol time courses and levels in PRT and NOV
- Inter-individual variation of cortisol in relation to age in NOV and zoo in PRT

1. Introduction

1.1 Glucocorticoid levels as an indicator of stress in animals

Increased glucocorticoid (GC; cortisol/corticosterone) secretion by the hypothalamus-pituitary-adrenal-axis (HPA-axis) is part of a suite of behavioral and physiological responses which occur in the state of stress, that is when there is a real or perceived challenge to homeostasis called stressor (Tilbrook and Clarke, 2006). As reviewed in Chrousos (2009), short-term GC responses to stressors are usually adaptive and help to re-establish homeostasis, while repeatedly or continuously elevated GC levels can have adverse effects on welfare. GC levels are, therefore, frequently used as an indicator of physiological stress and welfare in wild and captive animals. In this respect, studies on wild animals increasingly rely on GC levels (or levels of their metabolites in excreta) to assess the impact of environmental changes in the natural habitat on welfare-related indices including health, survival and reproductive success (predation risk: Creel et al., 2009; Sheriff et al., 2009; anthropogenic disturbance: Hunnink et al., 2017, Tecot et al., 2019; weather extremes: Fardi et al., 2018; Foley et al., 2001). Such studies help to understand the effect of natural and anthropogenic environmental changes on animal stress and welfare which, in turn, may help to improve the conservation of species and their natural habitats (Baker et al., 2013). Similar studies in captive animals aim to evaluate the influence of the environment and management under human care on GC levels and welfare in order to improve housing and management conditions (e.g., Boyle et al., 2015; Carlstead et al., 1993; Desportes et al., 2007; Duarte et al., 2018; Majchrzak et al., 2015). Generally, under captive conditions GC increases are not restricted to specific types of stressors. Both potentially aversive and natural situations as well as appetitive and rewarding stimuli have been found to elevate GC levels (Koolhaas et al., 2011). For example, management situations which are, from a human perspective, potentially detrimental to animal welfare have been shown to be accompanied by GC increases (restraint and handling: Schmitt et al., 2010; Solano et al., 2004; Turner et al., 2010; social separation: Boissy and Le Neindre, 1997; Norcross and Newman, 1999; sedation: Anestis et al., 2006; transports: Schmidt et al., 2010). However, stress responses with GC elevations are also observed in naturally occurring situations (birth: Behringer et al., 2009; sexual behavior: Wang et al., 1986; food competition: Hohmann et al., 2009). Studies on GC responses to management situations enriching the environment and behavior of captive animals, like the introduction of novel objects (Kuczaj et al., 2002) and positive reinforcement training (PRT) (Laule und Desmond, 1998), are relatively scarce. The exposure to novel objects was found to induce GC increases in cattle (van Reenen et al., 2005; van Reenen et al., 2009)

and birds (European starling, *Sturnus vulgaris*: Apfelbeck and Raess, 2008; great tit, *Parus major*: Baugh et al., 2017; Japanese quail, *Coturnix japonica*: Richard et al., 2008). Since novel stimuli also occur in natural habitats (Greenberg and Mettke-Hofmann, 2001), a novel object introduced to a captive-housed animal can be considered as a natural stressor. In contrast, PRT is usually considered beneficial for the animals (Ward and Melfi, 2013). Yet, it may be a source of stress, because it interrupts the ongoing activity of the animal (Behringer et al., 2014), the animal is physically separated from social partners (see above) and is in close proximity to humans (Chelluri et al., 2013; Carlstead et al., 2019). So far, however, studies examining the effect of routine PRT on GC levels could not find any GC increases (primates: Behringer et al., 2014; O'Brien et al., 2008; African elephant: Kelling Swilley, 2008) suggesting that PRT is not perceived as stressful by the animals involved. Compared to routine training, however, novel training can induce elevations in GC levels as shown in the African elephant (Kelling Swilley, 2008).

1.2 Time course of the acute GC stress response

In general, the time course of the acute GC stress response is highly conserved across vertebrate taxa (Sheriff et al., 2011a). The GC level starts to increase immediately and reaches the peak approximately 10-40 min after the onset of the stressor in different species (domestic dog: Beerda et al., 1998; chimpanzee, *Pan troglodytes*: Heintz et al., 2011; cattle: Hernandez et al., 2014; Rushen et al., 1999; human: Kirschbaum und Hellhammer, 2000). Recovery to baseline levels is mediated by the negative feedback of GC levels on HPA-axis activity (Dallman et al., 1992) and takes 60-90 min in relation to the onset of the stressor (domestic dog: Beerda et al., 1998; cattle: Rushen et al., 1999).

Yet, there is variation in the time course and magnitude of the stress-related GC elevation depending on the stressor (García et al., 2000; Skoluda et al., 2015). As reviewed by Sheriff et al. (2011a), the GC response is often greater when the animal experiences more severe stressors. In addition, the GC responses to acute and severe stressors differ in the phase after the peak (recovery phase). In acute stressors, the feedback mechanism works effectively, that is the GC level begins to return to its initial level immediately after the peak. Severe and chronic stressors, in contrast, are associated with prolonged elevations of GC levels due to weak feedback signals (Koolhaas et al., 2011; Sheriff et al., 2011a). Furthermore, animals differ in the GC stress response to the same stressor (Cockrem, 2013). This inter-individual variation was found to be related to age (chimpanzee: Anestis et al., 2006), sex (dwarf hamster, *Phodopus campbelli*: Guimont and Wynne-Edwards, 2006; domestic sheep: Turner et al., 2010),

personality/coping style (reviewed in Carere et al., 2010) or unknown factors (spotted hyena, *Crocuta crocuta*: van Jaarsveld and Skinner, 1992; beluga, *Delphinapterus leucas*: Schmitt et al., 2010; domestic dog: Vincent and Michell, 1992). In addition, studies showed that learning processes can influence the GC stress response in mice and rats (reviewed in Koolhaas et al., 2011) probably because repeated exposure to the same stressor results in increased experience and thus habituation of the HPA-axis to this stressor, which lowers the magnitude of the GC response (Grissom and Bhatnagar, 2009). This effect may explain not only the variation in GC responses between (tiger, *Panthera tigris*: Dembiec et al., 2004; domestic dog: Rooney et al., 2007) but also within individuals when the same animal is exposed to the same stressor multiple times (cattle: Stockman et al., 2011; human: Wüst et al., 2005).

We are aware of only one study in captive African elephants (Kelling Swilley, 2008) which collected several samples in 15 min intervals after different management situations. In this study, GC levels did not show a consistent pattern of increase or change in response to training and enrichment in the three cows studied. In response to 15 min of isolation with a dominant conspecific, however, GC levels were elevated 15 min after the end (30 min after the onset) and began to decline by 30 min after the end in all animals.

1.3 Measuring acute GC responses

Blood, feces, urine and saliva are the four main sampling matrices that have been utilized to measure the levels of GCs and their metabolites (reviewed in Sheriff et al., 2011a). Blood allows real-time assessment of GC levels, but sampling is invasive. Using blood, therefore, is often not feasible in wildlife. Feces and urine can be collected non-invasively, but because of the relatively long lag time of GC metabolites appearing in the sample (Palme et al., 2005) these matrices have a limited suitability for the assessment of acute GC responses. Saliva, in contrast, can be used for real-time measurements of GC responses. Salivary GC levels correlate well with blood GC levels (Beerda et al., 1996; Grand et al., 2012; Umeda et al., 1981) showing a time lag of 5-20 min in humans (Kirschbaum und Hellhammer, 2000) and 10 min in cattle (Hernandez et al., 2014). Thus, activation of the HPA-axis as part of a physiological stress response is reflected in salivary GC level elevations within minutes of encountering the stressor. In addition, saliva can be collected minimally invasively (Cook, 2012) from captive African elephants as part of routine training, as the mouth cavities of the animals are routinely inspected and the animals can therefore be easily accustomed to saliva collection. Thus, salivary GC measurements are ideally suited for repeated sampling in short time intervals to monitor acute GC responses in this species.

1.4 Objectives

Stress responses vary depending on many extrinsic (e.g., habitat) and intrinsic factors (e.g., age and sex) (Sheriff et al., 2011a). General statements on the effects of certain management situations on physiological stress and welfare, therefore, require the repeated study of several animals in a group in different zoos. The present study repeatedly examined salivary cortisol responses to two management situations (routine positive reinforcement training [PRT], novel enrichment object [NOV]) in ten African elephants housed in three different zoos. The overall aim was to examine both the average time courses and the individual variation of the salivary cortisol changes in response to these situations in order to evaluate the potential effect of PRT and NOV on physiological stress and welfare. We predicted to find that, on average, i) salivary cortisol levels should rise in response to NOV (see 1.1), ii) salivary cortisol levels should not rise in response to PRT (see 1.1) and iii) that there is a strong individual variation in GC responses to both management situations and that these responses may be related to the age, sex, zoo and/or handling method (free vs. protected contact) of the individual.

2. Material and methods

2.1 Animals and management

We sampled ten adult African elephants (*Loxodonta africana*), which were housed in the following German zoos: Opel-Zoo Kronberg, Grüner Zoo Wuppertal and Thüringer Zoopark Erfurt. The study was conducted during two periods separated by one year (2016, 2017). The study periods within each zoo took place in the same season (Kronberg: spring, Wuppertal: summer, Erfurt: fall/winter). Table 1 presents the information on the individual animals examined.

Table 1: Information on the animals included in the present study.

Zoo	Animal-ID	Age class [†]	Sex [‡]	Handling [§]
Kronberg	AR	3	F	PC
	ZI	3	F	PC
	TA	1	M	PC
Wuppertal	SA	2	F	FC
	SW	2	F	FC
	TI	1	F	FC
	TU	2	M	PC
Erfurt	SF	3	F	PC
	CH	1	F	PC
	KB	1	M	PC

[†]1=5-19.9 years (adolescent/young adult), 2=20-34.9 years (adult), 3=35-49.9 years (older adult) (Lee and Moss, 2014),

[‡]F=female, M=male, [§]PC=protected contact, FC=free contact.

The elephant housing in all zoos was characterized by naturalistic outdoor enclosures and indoor free stalls with water basins, mud wallows, sandpits and scratching surfaces as well as several boxes to separate individual animals. Depending on the weather conditions, elephants had access to outdoor enclosures. Females and their offspring were housed in stable social groups. Bulls had occasionally access to the females. A new cow joined the Erfurt group in April 2017 and was fully integrated by the beginning of the study period in that year. The animals housed in Kronberg and Erfurt as well as the adult bull in Wuppertal were managed in protected contact (PC), that is the keepers always interacted with the elephants through a barrier. The cows in Wuppertal, in contrast, were handled and trained in free contact (FC). In the traditional FC method, the keepers enter the elephant enclosure and handle the elephants freely without a protecting barrier. Regardless of the handling method, all animals received PRT regularly for medical and enrichment purposes.

2.2 Management situations

We took saliva samples before (pre) and after (post) positive reinforcement training (PRT) and the exposure to a novel enrichment object (NOV).

2.2.1 Positive reinforcement training (PRT)

In PRT, the keeper reinforces desired behavioral responses to specific commands with pleasurable rewards (Laule und Desmond, 1998). In the present study, PRT included only commands known to the animals and took place in the known training location (mostly a box).

2.2.2 Novel enrichment object (NOV)

In NOV, the animals were exposed singly to one novel object each. Two animals (mother and daughter) formed an exception to this rule (SA and TI, see 2.3). They were tested simultaneously to prevent social stress due to separation and were offered two equal objects four to five meters apart. After the pre saliva sample was collected, the object was placed in the arena, a familiar part of the enclosure, not visible to the animal. NOV began when, as the door between box and test arena opened, the animal looked in the direction of the object for the first time. The animal could enter and leave the arena voluntarily (the door to the box remained open). Objects were considered as novel, as they were not used in routine management before. They were of different colors, materials and sizes (ball, traffic cone, white tarpaulin, barrel, air mattress, etc.). A different object was presented in each trial (for the number of repeats per animal see 2.3) and each object was used only once. Except for three trials, the same novel objects were presented to all animals in the same order.

2.3 Sample collection

Saliva was sampled by wiping out the mouth (cheek pouches, over and below the tongue) with a swab (Salivette® Cortisol, Sarstedt, Nümbrecht, Germany), which was fixed in a clamp or stainless-steel tube. The saliva samples were frozen at -18°C immediately following collection. The animals were habituated to the sampling procedure during regular training prior to the first study period and were sampled according to a standardized protocol. Sampling occurred at fixed daytimes to minimize the influence of the diurnal rhythm of cortisol secretion (Casares et al., 2016). In addition, factors like the keeper, food and location were held as constant as possible to promote consistency in the sampling context.

The experimental set-up was the same for both situations: Initially, the animal was separated from the group and shifted into the box, a procedure to which the animals were used as part of daily routines. Following the separation of the animal, the first saliva sample was collected in order to obtain the cortisol level before the management situation (CORT0). The subsequent management situation (PRT or NOV) lasted 10-15 min, that is after this time PRT or NOV was terminated. In NOV, this was achieved by moving the animal into the box where the saliva sampling took place. Both situations were followed by a series of saliva sample collections in 10-min (Kronberg) respectively 15-min intervals (Wuppertal and Erfurt) for a total period of 60 min after onset of the situation to examine the cortisol response to the situation (CORT10-CORT60). The animals remained separated from the group in the box after the situation to facilitate saliva sample collection and to allow for recovery of cortisol levels in a

constant environment. After the collection of the last sample the animal received a special reward (fruit, vegetables and concentrate feed) and was released back into the group.

Since the separation of females from their group might trigger social stress, which interferes with cortisol changes due to management situations, cows were never separated from their calves and all cows, except for one cow and her calf, had visual and limited tactile contact with the rest of the group throughout the saliva sampling period and during the management situation.

The number of repeats (trials) of each management situation was the same for each animal. PRT was conducted three times in 2016 and was not carried out in 2017. NOV was examined in three trials per animal in 2016 and in six trials per animal in 2017. Each animal was tested only once per day and only one animal was sampled per day, except for a cow (SA) and her adult daughter (TI) which were examined simultaneously on the same day in both situations. The animals were consecutively exposed to one trial of the same situation per week in a stable order, that is the second trial followed in the next week, the third one in the subsequent week and so on. Table S1 shows the number of saliva samples collected in each situation, animal and sampling time. Lower samples sizes than respective number of trials per situation, animal and sampling time are due to saliva volume being too low for analysis (i.e., <50 µl) or shortening of the sampling period after the management situation to the samples at 10 to 30 min.

Table S1: Number of saliva samples in each situation (positive reinforcement training [PRT], novel enrichment object in the first study period [NOV2016] and in the second study period [NOV2017]), animal (sorted by zoo, then sex and age class) and sampling time as well as total number of samples per animal and situation.

Situation/ study period	Animal- ID	Number of samples per sampling time [min]									Total
		0	10	15	20	30	40	45	50	60	
PRT	AR	3	3	-	3	3	3	-	3	3	21
	ZI	3	3	-	3	3	3	-	3	3	21
	TA	3	3	-	3	3	3	-	3	3	21
	SA	3	-	3	-	3	-	3	-	3	15
	SW	3	-	3	-	3	-	3	-	3	15
	TI	3	-	2	-	3	-	3	-	3	14
	TU	3	-	3	-	3	-	3	-	3	15
	SF	3	-	3	-	3	-	3	-	3	15
	CH	3	-	3	-	3	-	3	-	3	15
	KB	3	-	3	-	3	-	3	-	3	15
NOV2016	AR	3	3	-	3	3	3	-	3	3	21
	ZI	3	3	-	3	3	3	-	3	3	21
	TA	3	3	-	3	3	3	-	3	3	21
	SA	3	-	2	-	2	-	3	-	3	13
	SW	3	-	3	-	3	-	3	-	2	14
	TI	3	-	3	-	2	-	3	-	3	14
	TU	3	-	2	-	3	-	3	-	3	14
	SF	3	-	3	-	3	-	3	-	3	15
	CH	3	-	3	-	3	-	3	-	3	15
	KB	3	-	3	-	3	-	3	-	3	15
NOV2017	AR	6	6	-	6	6	3	-	3	3	33
	ZI	6	6	-	6	6	3	-	3	3	33
	TA	6	6	-	6	6	3	-	3	3	33
	SA	5	-	6	-	6	-	3	-	3	23
	SW	5	-	5	-	6	-	3	-	3	22
	TI	5	-	4	-	6	-	3	-	3	21
	TU	6	-	5	-	5	-	3	-	3	22
	SF	6	-	6	-	6	-	3	-	3	24
	CH	6	-	6	-	6	-	3	-	3	24
	KB	6	-	6	-	6	-	3	-	3	24

2.4 Cortisol analysis

We measured salivary cortisol with a microtiter plate enzyme immunoassay (EIA; Palme and Möstl, 1997), which has been used successfully for the assessment of physiological stress via salivary cortisol analysis in a number of other species (Behringer et al., 2009;

Behringer et al., 2014). We also biologically validated and successfully applied this assay previously to assess the diurnal rhythm of cortisol secretion in our study subjects (Hambrecht et al., 2020). All samples were measured in duplicate as described in detail by Hambrecht et al. (2020).

Samples with a coefficient of variation (CV) of >10 % between duplicates, were re-measured. Assay sensitivity at 90% binding was 12 pg/ml. Inter-assay CV, assessed by replicate determinations of high- and low-value quality controls run in each assay, were 7.5% (high) and 10.4% (low), and intra-assay CVs were 5.0% (high) and 6.8% (low). Salivary cortisol is expressed as ng/ml.

2.5 Statistical analysis

We used R (version 3.6.0, R Core Team, 2019) for data analysis. Significance level was $p < 0.05$. We state the tendency for significance if $p < 0.1$.

2.5.1 Positive reinforcement training (PRT) and novel enrichment object (NOV) – Average cortisol responses

We analyzed the average cortisol time courses in response to PRT and NOV with linear mixed models (LMMs) using the function `lmer` of the R-package `lme4` (version 1.1-21; Bates et al., 2015). We defined two LMMs in order to examine (1) if the situations produced cortisol changes within 60 min compared to CORT0 (model M1) and (2) the average cortisol time course across sampling times 0, 10, 15, 20, 30, 40, 45, 50 and 60 min in each situation (model M2). We \log_{10} -transformed cortisol ($\log_{10}\text{CORT}$) in order to fulfill the normality assumptions of the model (assessed by Q-Q-plots and histograms). For visualization of average cortisol time courses in PRT, NOV in 2016 (NOV2016) and NOV in 2017 (NOV2017) and the calculation of the relative cortisol increases and decreases we used the original non-transformed data. We calculated the relative cortisol increase respectively decrease between CORT0 and the maximum respectively minimum cortisol level by $([\textit{maximum} - \textit{CORT0}]/\textit{CORT0} * 100)$ respectively $([\textit{minimum} - \textit{CORT0}]/\textit{CORT0} * 100)$ for the average cortisol time courses and the individual profiles shown as examples.

Each animal was sampled several times at all sampling times. We considered this nested data structure by fitting trial nested in animal-ID as random intercept in both M1 and M2. Sampling time (PRT and NOV) and study period (only NOV) were added as fixed effects. Regarding M1, based on the expected trend of an acute cortisol response (see 1.2), we defined a model including sampling time as a linear effect and a quadratic sampling time term defining

30 min as the peak of the parabola ($[sampling\ time - 30]^2$). In M2, sampling time was converted into a factor variable, which allowed us to calculate the coefficient and significance level for each factor level, that is sampling time, in contrast to the intercept (CORT0).

Models were fitted using the restricted maximum likelihood estimation (REML) and included the function BOBYQA (Bound Optimization BY Quadratic Approximation; Powell, 2009) as optimizer. The significance of fixed effects was tested using t-tests (Satterthwaite's method) of the R package lmerTest (version 3.1-0, Kuznetsova et al., 2017). As we expected a cortisol increase relative to the intercept in response to NOV (see 1.4), the t-tests in the case of the fixed effects of the NOV models related to the sampling time (M1 and M1*: linear and quadratic sampling time term, M2 and M2*: sampling time as factor) were one-sided. The remaining t-tests were two-sided.

In a few trials, CORT0 concentrations were clearly elevated (i.e., $\log_{10}CORT0$ exceeded the mean $\log_{10}CORT0$, calculated across all trials per situation, by $2*SD$), suggesting that these CORT0 levels were likely affected by a potential stressor encountered prior to the collection of the CORT0 sample (Baugh et al., 2014; Cook et al., 2011). Because of this, we applied a second set of models (M1* and M2*) in which we excluded these trials (one trial in PRT and three trials in NOV) from analysis. All other model characteristics were like in M1 and M2 described above.

2.5.2 Individual variation in the cortisol levels and time courses

In order to examine the intra- and inter-individual variation in the cortisol time courses (temporal profiles), we visually compared the individual profiles with the average time courses for PRT and NOV obtained by the modelling procedure (see 2.5.1). Specifically, we checked to what extent the timing of maximal cortisol changes in the individual profiles correspond to the sampling times of significant cortisol changes predicted by M2 and M2* for the average time courses of the respective situation.

We analyzed the effect of age class (1=5-19.9 years [adolescent/young adult], 2=20-34.9 years [adult], 3=35-49.9 years [older adult], Lee and Moss, 2014), sex (male, female), zoo (Kronberg, Wuppertal, Erfurt) and handling method (protected contact [PC], free contact [FC]) on baseline cortisol levels and elevated cortisol levels separately. For this purpose, we first determined the baseline and elevated cortisol levels for each animal in each situation und study period (PRT, NOV2016, NOV2017) as follows: All cortisol concentrations exceeding the median plus $2*IQR$ (interquartile range) of all cortisol concentrations measured in the respective animal in the respective situation were defined as outliers and, therefore, as elevated

cortisol concentrations in this animal in this situation. Accordingly, all cortisol concentrations below this threshold were defined as individual baseline levels. In contrast to the identification of \log_{10} CORT0 outliers (see 2.5.1), we used the median and IQR to account for the non-normal distribution of the original non-transformed data.

Initially, we applied the Kruskal-Wallis One Way ANOVA (R-package stats, version 3.6.0, R Core Team, 2019) followed by post hoc pairwise comparisons using Dunn's tests with Bonferroni-Holm-correction (R-package FSA, version 0.8.26, Ogle et al., 2019) to test for significant differences between animals in the baseline cortisol levels for each situation. We used the information on the animals regarding the age class, sex, zoo and handling method in Table 1 to assess the effect of these factors on the baseline cortisol levels. In detail, it was examined in which of these factors the animals with significantly ($p < 0.05$) or marginally significantly ($p < 0.1$) different baseline values differed and whether there were tendencies in this respect, for example, whether always the younger or the older animal of the two animals compared showed significantly lower cortisol values. To further support these qualitative analyses, we modelled the effect of the age class, sex, zoo and handling method on the \log_{10} -transformed baseline cortisol levels (baseline \log_{10} CORT0) by including these factors as fixed effects into a LMM with trial nested in animal-ID as random intercept. We defined a model for each situation and study period.

Across all animals, the elevated levels included six values in PRT, ten values in NOV2016 and 13 values in NOV2017 (total number of elevated values was 29 of 603 cortisol measurements). We could not statistically test for significant inter-individual differences in the elevated levels because of the small number of elevated values in most animals. Instead, we describe the differences in the elevated levels and timing of these values between the animals qualitatively considering also age class, sex, zoo and handling method as potential influencing factors.

3. Results

3.1 Positive reinforcement training (PRT)

PRT was followed by a moderate but significant cortisol decrease compared to CORT0. The average cortisol time course depicted in Figure 1 shows that the average level of CORT0 was higher than all average cortisol levels after PRT (CORT10 to CORT60). Furthermore, the lowest average cortisol level reached at 15 min was 23% lower than the average CORT0 level.

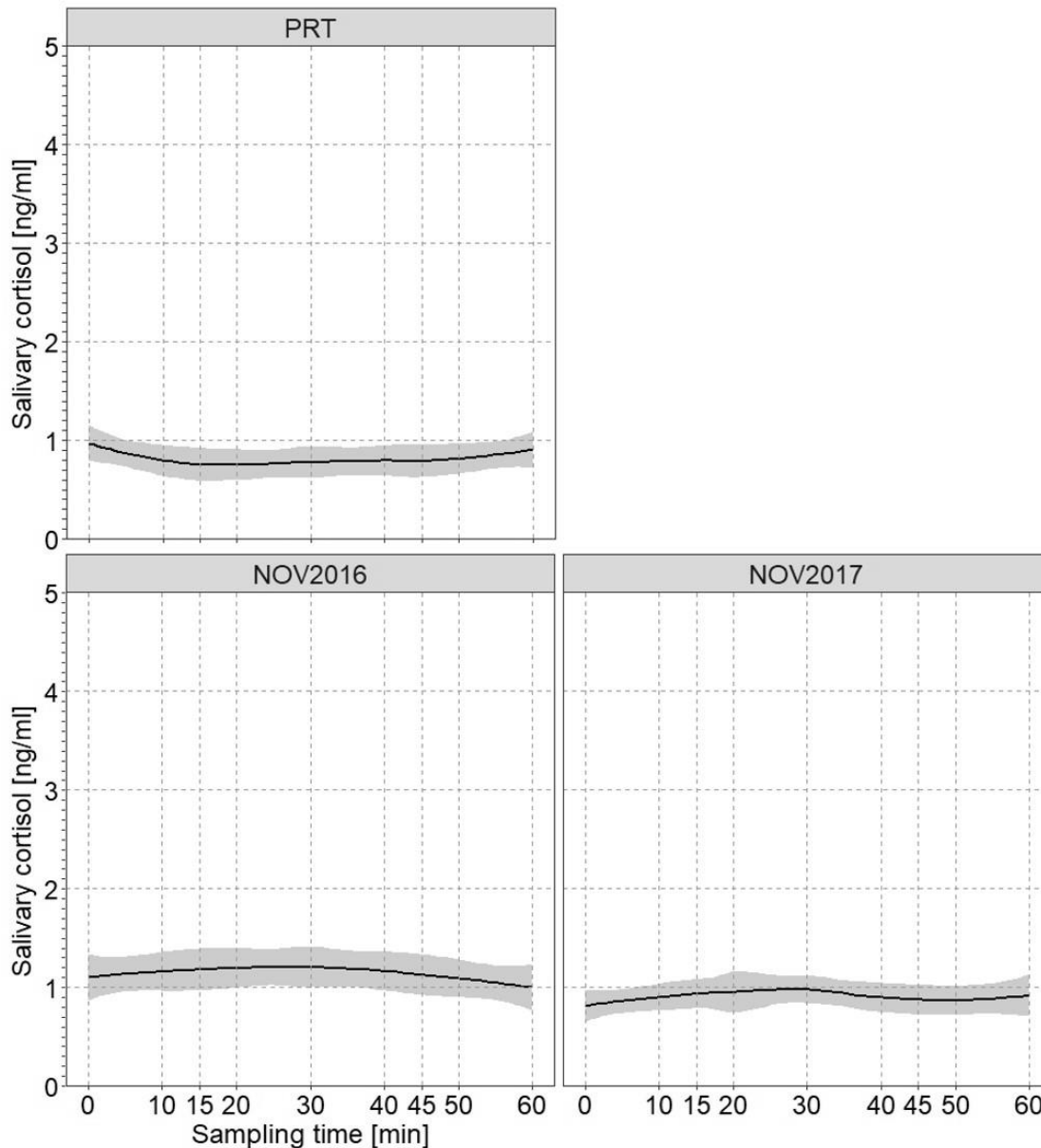


Figure 1: Average salivary cortisol time course across sampling times (0-60 min) including 95% confidence intervals (shaded areas) in response to positive reinforcement training (PRT) and novel enrichment object in the first (NOV2016) and second study period (NOV2017). LOESS smoothing (solid line) was applied to cortisol concentrations conditional on time.

The results of the models M1 and M1* are presented in Table 2. M1 made predictions based on the whole PRT data set, whereas M1* was based on the PRT data set excluding the single outlier trial (see 2.5.1). The time course of this trial is shown in Figure 2 (SW trial 3). Both models predicted that PRT produced an average cortisol decrease within 60 min compared to the intercept (average $\log_{10}\text{CORT}_0$). In both models, only the quadratic sampling time term (but not the linear term) was a significant predictor of $\log_{10}\text{CORT}$, that is $\log_{10}\text{CORT}$ decreased initially, reached a minimum at 30 min and increased afterwards. M1* predicted a slightly lower

coefficient for the quadratic sampling time term than M1, that is the quadratic trend of the PRT time course was weaker when the outlier was excluded.

The models M2 and M2* predicted significant \log_{10} CORT decreases at 15 and 30 min compared to the intercept. In addition, the \log_{10} CORT decrease was marginally significant ($p < 0.1$) at 10, 50 and 60 min. Moreover, the coefficients of 45 and 60 min were lower than those of most other sampling times, that is \log_{10} CORT at 45 and 60 min approached \log_{10} CORT₀ again, which reflects the recovery to the pre-PRT level at the end of the sampling period seen in Figure 1.

Table 2: Fixed effects resulting from the linear mixed models examining the effect of sampling time on the cortisol level in relation to positive reinforcement training (PRT) including the outlier (n=167) and excluding the outlier (*, n=162). In M1, a linear (sampling time) and a quadratic term (sampling time sq=[sampling time – 30]²) of sampling time were added as fixed effects. In M2, sampling time as factor was fitted as fixed effect. In both models, animal-ID (n=10) and trial nested in animal-ID (n=30) were included as random effects.

M1					
Fixed effect	Coefficient	SE	df	t	p
Intercept	-0.153	0.067	11.070	-2.295	0.042
Sampling time	-5.356E-04	5.278E-04	135.300	-1.015	0.312
Sampling time sq	7.357E-05	2.997E-05	135.400	2.455	0.015
M1*					
Fixed effect	Coefficient	SE	df	t	p
Intercept	-0.156	0.066	11.180	-2.370	0.037
Sampling time	-4.378E-04	5.316E-04	131.300	-0.824	0.412
Sampling time sq	6.178E-05	3.019E-05	131.300	2.046	0.043
M2					
Fixed effect	Coefficient	SE	df	t	p
Intercept	-0.067	0.068	11.428	-0.998	0.339
<i>10 min</i>	<i>-0.102</i>	<i>0.059</i>	<i>131.210</i>	<i>-1.736</i>	<i>0.085</i>
15 min	-0.115	0.042	130.141	-2.713	0.008
20 min	-0.083	0.059	131.210	-1.416	0.159
30 min	-0.101	0.037	129.157	-2.751	0.007
40 min	-0.066	0.059	131.210	-1.123	0.264
45 min	-0.061	0.042	129.927	-1.453	0.149
<i>50 min</i>	<i>-0.098</i>	<i>0.059</i>	<i>131.210</i>	<i>-1.672</i>	<i>0.097</i>
<i>60 min</i>	<i>-0.064</i>	<i>0.037</i>	<i>129.157</i>	<i>-1.735</i>	<i>0.085</i>
M2*					
Fixed effect	Coefficient	SE	df	t	p
Intercept	-0.082	0.066	11.621	-1.231	0.243
10 min	-0.095	0.058	127.165	-1.636	0.104
15 min	-0.101	0.043	126.139	-2.351	0.020
20 min	-0.077	0.058	127.165	-1.315	0.191
30 min	-0.089	0.037	125.117	-2.385	0.019
40 min	-0.059	0.058	127.165	-1.020	0.310
45 min	-0.042	0.042	125.930	-0.996	0.321
50 min	-0.092	0.058	127.165	-1.572	0.119
60 min	-0.057	0.037	125.117	-1.547	0.124

Note: Two-sided t-test (Satterthwaite's method). Statistical significance (p<0.05) in bold, tendency for statistical significance (p<0.1) in italics.

3.2 Novel enrichment object (NOV)

The presentation of NOV was followed by a moderate but significant cortisol increase compared to pre-NOV CORT0 levels. Figure 1 shows that all average post-NOV levels except for CORT60 in 2016 were higher than CORT0 suggesting an acute cortisol response to NOV. The average cortisol increase was, however, very moderate, with highest cortisol levels reached at 30 min post-NOV being 10% (NOV2016) and 20% (NOV2017) higher compared to CORT0 values.

Table 3 presents the LMM results. Like described above with respect to PRT, the outlier trials were excluded in M1* and M2* (the time course of one of these outliers is shown in Figure 3 [trial 2 of AR]). M1 and M1* predicted that NOV produced an average cortisol increase within 60 min compared to \log_{10} CORT0. In both models, the quadratic sampling time term (but not the linear term) was a significant predictor of \log_{10} CORT, that is \log_{10} CORT increased initially, reached a peak at 30 min and decreased afterwards. M1* predicted slightly higher coefficients for both the linear and the quadratic sampling time term, a marginally significant effect of the linear term and a significant effect of the quadratic term on \log_{10} CORT. Therefore, both the linear and the quadratic trend became stronger with the exclusion of the outliers, but still only the quadratic trend was significant.

The average cortisol level was lower in 2017 than in 2016 (Figure 1). Furthermore, all models identified the study period as a significant predictor of \log_{10} CORT, with \log_{10} CORT levels predicted to be lower in 2017 than in 2016 (Table 3). As depicted in Figure 1, in both study periods though cortisol increased from 0 to 30 min and decreased thereafter. Table 3 shows that M2 predicts a marginally significant effect of the sampling times 20, 30 and 45 min on \log_{10} CORT. Therefore, the trend of the \log_{10} CORT changes is in accordance with the time course of an acute cortisol response, that is \log_{10} CORT increased initially, was highest between 10 and 45 min and decreased afterwards. The exclusion of the outliers strengthened the acute trend of the cortisol response: M2* predicted a significant \log_{10} CORT increase at 30 and 45 min (Table 3).

Table 3: Fixed effects resulting from the linear mixed models examining the effect of sampling time on the cortisol level in relation to novel enrichment object (NOV) including the outliers (n=422) and excluding the outliers (*, n=403). In M1, a linear (sampling time) and a quadratic term (sampling time sq=[sampling time – 30]²) of sampling time were added as fixed effects. In M2, sampling time as factor was fitted as fixed effect. In both models, animal-ID (n=10) and trial nested in animal-ID (n=60) were included as random effects.

M1					
Fixed effect	Coefficient	SE	df	t	p
Intercept	0.007	0.059	11.480	0.128	0.900
Study period	-0.113	0.018	387.600	-6.331	6.730E-10
Sampling time	1.217E-04	4.196E-04	372.900	0.290	0.386
Sampling time sq	-3.778E-05	2.229E-05	359.400	-1.695	0.045
M1*					
Fixed effect	Coefficient	SE	df	t	p
Intercept	-0.017	0.058	11.580	-0.289	0.777
Study period	-0.101	0.018	371.800	-5.579	4.670E-08
Sampling time	6.109E-04	4.131E-04	352.800	1.479	0.070
Sampling time sq	-3.990E-05	2.184E-05	340.700	-1.827	0.034
M2					
Fixed effect	Coefficient	SE	df	t	p
Intercept	-0.031	0.059	11.678	-0.532	0.605
Study period	-0.113	0.018	380.995	-6.297	8.350E-10
10 min	0.048	0.040	352.592	1.204	0.115
15 min	0.027	0.029	352.659	0.929	0.177
20 min	0.052	0.040	352.592	1.302	0.097
30 min	0.041	0.025	351.500	1.603	0.055
40 min	0.024	0.047	357.378	0.514	0.304
45 min	0.046	0.033	359.347	1.405	0.081
50 min	-0.020	0.047	357.378	-0.417	0.339
60 min	0.020	0.029	358.298	0.679	0.249
M2*					
Fixed effect	Coefficient	SE	df	t	p
Intercept	-0.056	0.058	11.751	-0.962	0.356
Study period	-0.101	0.018	365.344	-5.535	5.950E-08
10 min	0.046	0.040	334.057	1.153	0.125
15 min	0.038	0.029	334.022	1.317	0.094
20 min	0.054	0.040	334.057	1.345	0.090
30 min	0.055	0.025	332.831	2.226	0.013
40 min	0.055	0.047	338.334	1.156	0.124
45 min	0.066	0.032	339.704	2.069	0.020
50 min	0.013	0.047	338.334	0.283	0.389
60 min	0.045	0.028	338.909	1.590	0.056

Note: Two-sided t-test (Satterthwaite's method) in the fixed effects intercept and study period in all models. One-sided t-tests (Satterthwaite's method) in the fixed effects related to sampling time (M1 and M1*: sampling time and sampling time sq, M2 and M2*: sampling time as factor). Statistical significance ($p < 0.05$) in bold, tendency for statistical significance ($p < 0.1$) in italics.

3.3 Individual variation in the cortisol response

We found intra- and inter-individual variation in the salivary cortisol responses to PRT, NOV2016 and NOV2017. The individual variation in the cortisol time courses is illustrated in Figure 2, Figure 3 and Figure 4. Each figure shows the cortisol profiles of some animals as representative examples for the individual variation found in the respective situation. The inter-individual variation in the cortisol levels is depicted in Figure 5 (baseline cortisol levels in PRT) and Figure 6 (elevated cortisol levels).

3.3.1 Intra- and inter-individual variation in the cortisol time course

In general, the cortisol profiles differed between trials of the same situation. Approximately half of the trials of all animals were characterized by a cortisol profile that showed the characteristics of the modelled average cortisol time course found for the respective situation. These included PRT trial 2 of TI and PRT trial 2 of SW in which CORT15 and CORT30 were minimal (Figure 2), as predicted by M2 and M2* for the average PRT time course (Table 2). The relative cortisol decreases between CORT0 and CORT15 in these examples were 86% respectively 42%. The profiles of trial 3 of NOV2016 in AR (Figure 3) and trial 2 of NOV2017 in ZI (Figure 4), for example, showed cortisol peaks at 30 min and therefore corresponded to the predictions of M2 and M2* for this situation (Table 3). The relative cortisol increases between CORT0 and CORT30 in these examples of acute responses to NOV were 341% respectively 64%. The other half of individual cortisol profiles corresponded only partly, for example, PRT trial 3 in TA (Figure 2) and trial 2 of NOV2016 in TI (Figure 3), or not at all, for example, PRT trial 1 of TU (Figure 2) and trial 3 of NOV2017 in SF (Figure 4), to the modelled average time course found for the respective situation. In addition, there was one acute cortisol response to PRT (trial 1 in TA) with a relative cortisol increase of 250%. Moreover, some cortisol peaks after the situation were earlier or delayed compared to the expected peak time of 30 min (based on the quadratic sampling term, see 2.5.1), for example, CORT15 in trial 2 of NOV2016 in TI and CORT60 in PRT trial 1 in TU. In these examples, cortisol rose by 588% respectively 159% compared to CORT0.

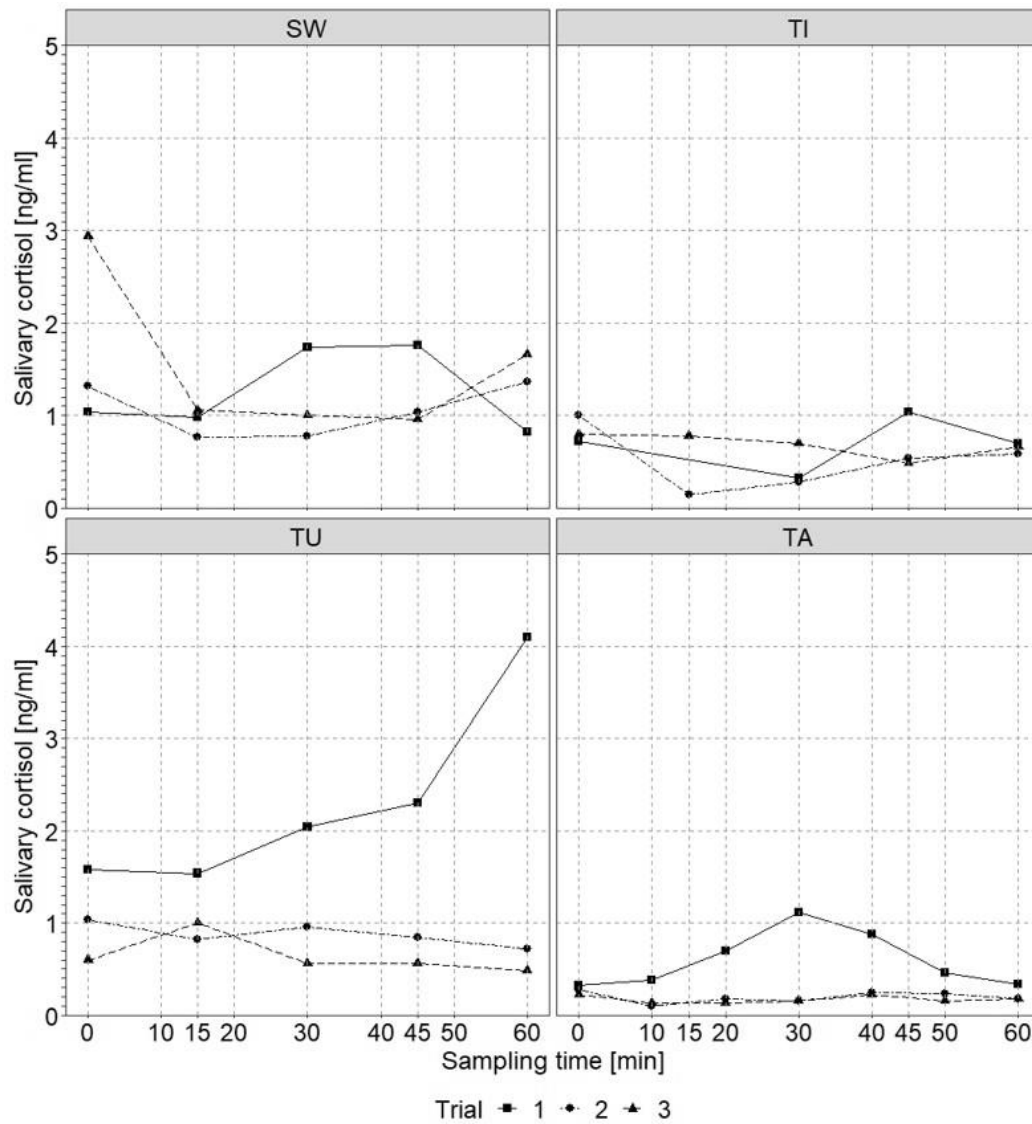


Figure 2: Salivary cortisol profiles of the three trials of positive reinforcement training (PRT) in four animals (SW, TI, TU, TA). Information on animals is given in Table 1.

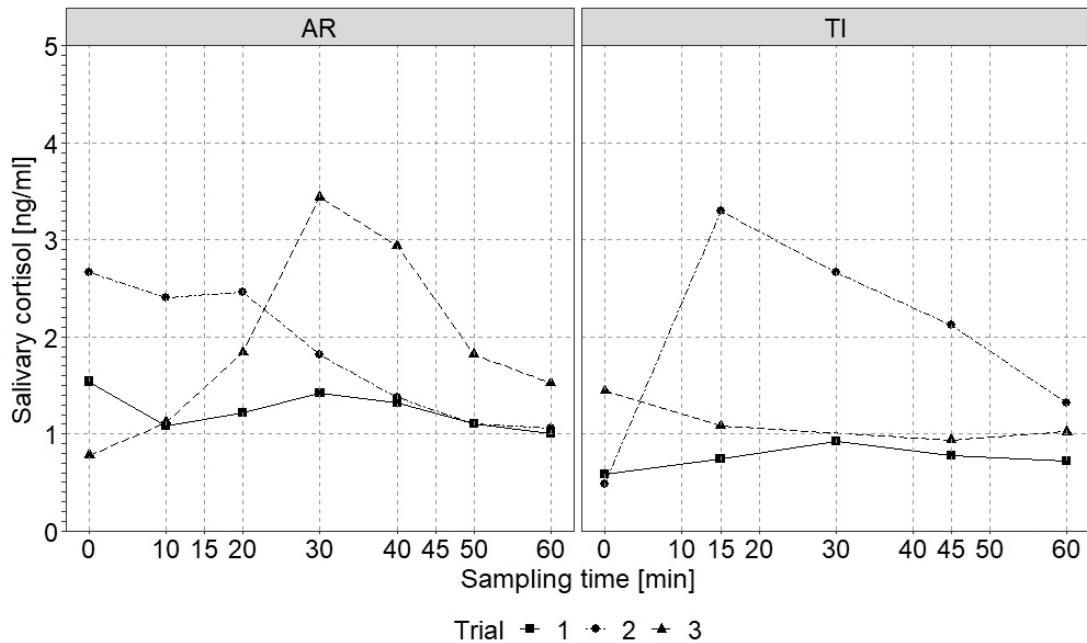


Figure 3: Salivary cortisol profiles of the three trials of novel enrichment object in the first study period (NOV2016) in two animals (AR, TI). Information on animals is given in Table 1.

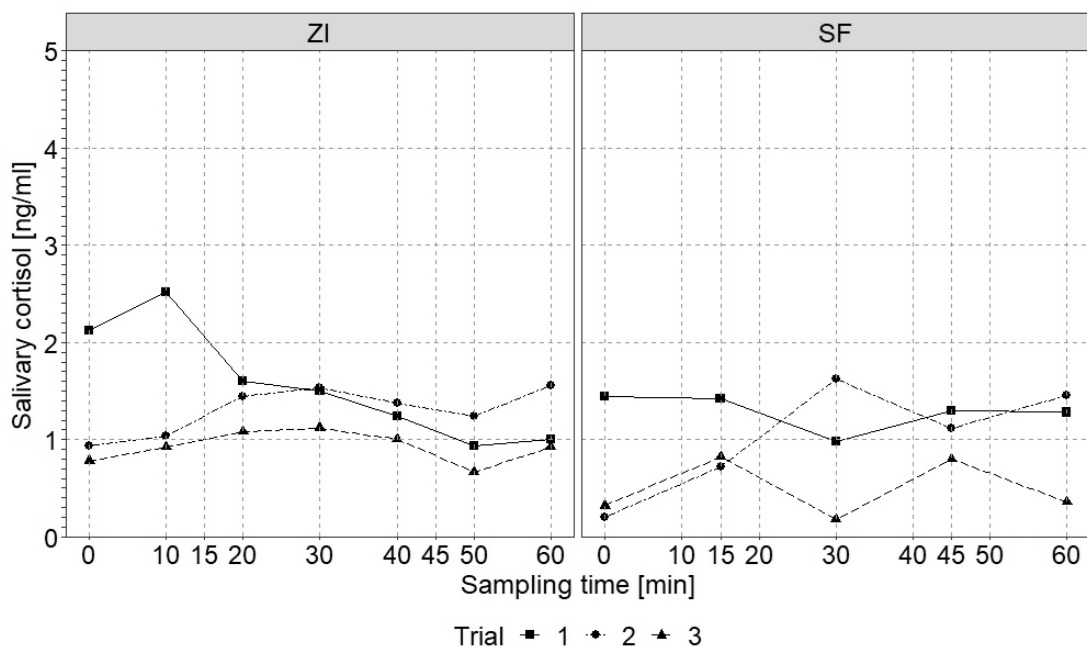


Figure 4: Salivary cortisol profiles of the first three trials of novel enrichment object in the second study period (NOV2017) in two animals (ZI, SF). Information on animals is given in Table 1.

3.3.2 Inter-individual variation in the baseline and elevated cortisol levels

As shown in Figure 5 using PRT as an example, the animals differed in their cortisol baseline values. These inter-individual differences were highly significant for PRT (Kruskal

Wallis, $X^2=85.85$, $df=9$, $p<0.001$), NOV2016 (Kruskal Wallis, $X^2=98.13$, $df=9$, $p<0.001$) and NOV2017 (Kruskal Wallis, $X^2=128.72$, $df=9$, $p<0.001$). Table S2 in the supplemental material shows the results of the post hoc pairwise comparisons of animals using Dunn's tests. In general, in each management situation about half of the 45 pairwise comparisons showed significant or marginally significant differences in baseline levels between the respective two animals after Bonferroni-Holm correction. Table 4 presents the results of the LMMs that modelled the average effect of the age class, sex, zoo and handling method on the \log_{10} -transformed baseline cortisol levels (baseline \log_{10} CORT) in PRT, NOV2016 and NOV2017. In the following, we will first present the qualitative results of the effect of each of these factors on the baseline cortisol levels and then report whether the LMM predictions support them or not.

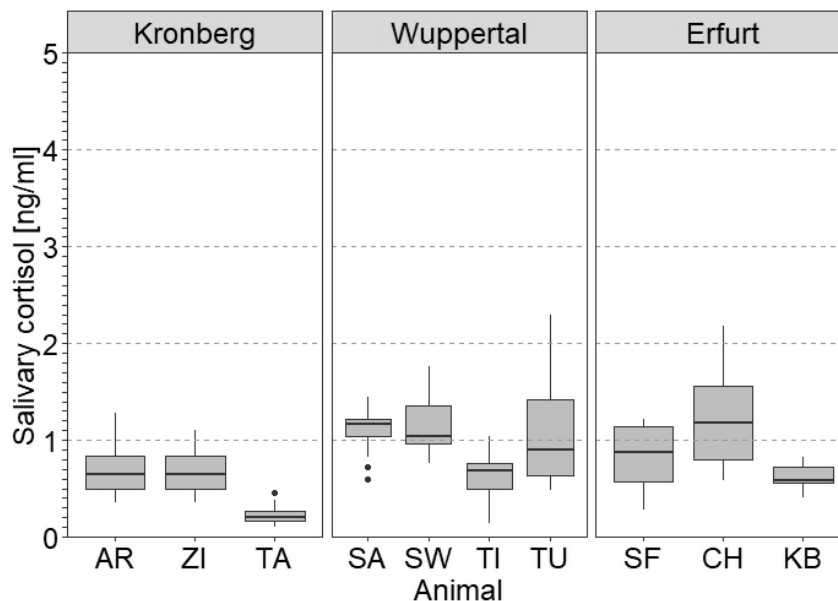


Figure 5: Inter-individual differences in the baseline salivary cortisol level (see 2.5.2 for the definition) in relation to positive reinforcement training (PRT). Animals are grouped according to their zoos. The boxes illustrate the 25% and 75% quartiles, bars indicate medians, dots indicate outliers. Sample sizes of each animal are given in Table S1. The results of the Kruskal-Wallis One Way ANOVA are in the text (see 3.3.2). The results of the pairwise post hoc Dunn's tests are presented in Table S2. Information on animals is given in Table 1.

Age class appears to affect the baseline cortisol levels. In most cases (PRT: 48%, NOV2016: 100%, NOV2017: 71%) of significant or marginally significant pairwise differences based on Dunn's tests, the respective younger animal had lower baseline levels regardless of differences in sex, zoo and handling method of the two animals compared (e.g., KB-SA and TA-ZI, Figure 5). Deviations from this age trend were more common in PRT than in NOV2016 and NOV2017. The predictions of the LMMs support these findings regarding the effect of age class: Age class was a significant respectively marginally significant predictor of baseline \log_{10} CORT only in NOV2016 and NOV2017 but not in PRT (Table 4). Housing in different zoos could explain significant or marginally significant differences between animals in baseline cortisol levels that did not follow the average age trend described above: Younger animals had higher baseline levels than older animals when the two animals compared were housed in different zoos (e.g., AR-SA and CH-ZI in PRT, Figure 5). This was observed more frequently in PRT. Accordingly, the LMMs predicted a marginally significant effect of zoo on baseline \log_{10} CORT in PRT but not in NOV (Table 4). The influence of handling method on the baseline cortisol levels of cows was variable: Cows housed in different zoos differed in their baseline levels both when handled in the same way (e.g., CH-ZI in PRT, Figure 5) and when handled differently (e.g., AR-SA in PRT, Figure 5). Furthermore, the old cows in PC (AR, ZI and SF) did not differ significantly from the young cow in FC (TI) in all situations (Table S2). The young cow in PC (CH), however, had significantly higher PRT baseline levels than the young cow in FC (TI) (Figure 5). In accordance with this descriptively observed variability in the effect of handling method, the LMMs of all situations predicted no effect of this factor on baseline \log_{10} CORT (Table 4). Finally, the Dunn's tests and qualitative assessments indicated an effect of sex with males always having lower baseline cortisol levels than females in all situations (e.g., KB-CH, Table S2). This finding, however, could not be confirmed by the LMMs, which predicted no effect of sex on baseline \log_{10} CORT (Table 4).

Table S2: Results of the pairwise post hoc Dunn's tests for inter-individual differences in the baseline cortisol level in relation to positive reinforcement training (PRT), novel enrichment object in the first (NOV2016) and second study period (NOV2017). The pairs of animals are sorted alphabetically first by the first animal, then by the second animal. Sample sizes for each animal are given in Table S1. The results of the Kruskal-Wallis One Way ANOVA are in the text (see 3.3.2). Information on animals is given in Table 1.

PRT							
Animals compared	Z	p unadjusted	p adjusted	Animals compared	Z	p unadjusted	p adjusted
AR-CH	-3.183	0.001	0.041	SA-SF	1.896	0.058	1
AR-KB	0.506	0.613	1	SA-SW	0.042	0.967	1
AR-SA	-3.532	<0.001	0.015	SA-TA	6.910	<0.001	<0.001
AR-SF	-1.484	0.138	1	SA-TI	3.514	<0.001	0.015
AR-SW	-3.416	<0.001	0.021	SA-TU	1.232	0.218	1
AR-TA	3.803	<0.001	0.006	SA-ZI	3.525	<0.001	0.015
AR-TI	0.324	0.746	1	SF-SW	-1.821	0.069	1
AR-TU	-2.134	0.033	0.722	SF-TA	4.930	<0.001	<0.001
AR-ZI	-0.008	0.993	0.993	SF-TI	1.651	0.099	1
CH-KB	3.366	<0.001	0.023	SF-TU	-0.631	0.528	1
CH-SA	-0.323	0.747	1	SF-ZI	1.477	0.140	1
CH-SF	1.573	0.116	1	SW-TA	6.735	<0.001	<0.001
CH-SW	-0.276	0.783	1	SW-TI	3.414	<0.001	0.020
CH-TA	6.572	<0.001	<0.001	SW-TU	1.170	0.242	1
CH-TI	3.197	0.001	0.040	SW-ZI	3.408	<0.001	0.020
CH-TU	0.914	0.361	1	TA-TI	-3.114	0.002	0.048
CH-ZI	3.175	0.001	0.040	TA-TU	-5.495	<0.001	<0.001
KB-SA	-3.683	<0.001	0.009	TA-ZI	-3.811	<0.001	0.006
KB-SF	-1.820	0.069	1	TI-TU	-2.244	0.025	0.571
KB-SW	-3.580	<0.001	0.013	TI-ZI	-0.332	0.740	1
<i>KB-TA</i>	<i>2.938</i>	<i>0.003</i>	<i>0.083</i>	TU-ZI	2.127	0.033	0.702
KB-TI	-0.166	0.868	1				
KB-TU	-2.411	0.016	0.382				
KB-ZI	-0.514	0.607	1				
NOV2016							
Animals compared	Z	p unadjusted	p adjusted	Animals compared	Z	p unadjusted	p adjusted
AR-CH	3.895	<0.001	0.004	SA-SF	-0.353	0.724	1
AR-KB	4.631	<0.001	<0.001	SA-SW	1.465	0.143	1
AR-SA	0.210	0.834	1	SA-TA	6.278	<0.001	<0.001
AR-SF	-0.169	0.866	0.866	SA-TI	1.858	0.063	1
AR-SW	1.817	0.069	1	SA-TU	2.748	0.006	0.168
AR-TA	7.235	<0.001	<0.001	SA-ZI	0.663	0.507	1
AR-TI	2.222	0.026	0.605	SF-SW	1.879	0.060	1

<i>AR-TU</i>	<i>3.189</i>	<i>0.001</i>	<i>0.046</i>	SF-TA	6.949	<0.001	<0.001
AR-ZI	0.977	0.328	1	SF-TI	2.266	0.023	0.563
CH-KB	0.675	0.500	1	SF-TU	3.186	0.001	0.045
CH-SA	-3.382	<0.001	0.024	SF-ZI	1.087	0.277	1
CH-SF	-3.854	<0.001	0.004	SW-TA	4.785	<0.001	<0.001
CH-SW	-1.979	0.048	1	SW-TI	0.456	0.648	1
CH-TA	2.519	0.012	0.306	SW-TU	1.362	0.173	1
CH-TI	1.456	0.145	1	SW-ZI	-0.958	0.338	1
CH-TU	-0.565	0.572	1	TA-TI	-4.067	<0.001	0.002
<i>CH-ZI</i>	<i>-3.096</i>	<i>0.002</i>	<i>0.059</i>	<i>TA-TU</i>	<i>-3.082</i>	<i>0.002</i>	<i>0.060</i>
KB-SA	-4.057	<0.001	0.002	TA-ZI	-6.421	<0.001	<0.001
KB-SF	-4.552	<0.001	<0.001	TI-TU	0.873	0.383	1
KB-SW	-2.666	0.008	0.207	TI-ZI	-1.409	0.159	1
KB-TA	1.768	0.077	1	TU-ZI	-2.394	0.017	0.417
KB-TI	-2.117	0.034	0.753				
KB-TU	-1.227	0.220	1				
KB-ZI	-3.846	<0.001	0.004				

NOV2017

Animals compared	Z	p unadjusted	p adjusted	Animals compared	Z	p unadjusted	p adjusted
AR-CH	-0.197	0.844	1	SA-SF	0.410	0.682	1
AR-KB	1.128	0.260	1	SA-SW	-1.041	0.298	1
AR-SA	-1.895	0.058	1	SA-TA	7.241	<0.001	<0.001
AR-SF	-1.486	0.137	1	SA-TI	4.220	<0.001	<0.001
<i>AR-SW</i>	<i>-2.935</i>	<i>0.003</i>	<i>0.087</i>	SA-TU	3.403	<0.001	0.019
AR-TA	5.608	<0.001	<0.001	SA-ZI	-0.981	0.327	1
AR-TI	2.586	0.010	0.204	SF-SW	-1.452	0.147	1
AR-TU	1.691	0.091	1	SF-TA	6.891	<0.001	<0.001
<i>AR-ZI</i>	<i>-3.063</i>	<i>0.002</i>	<i>0.061</i>	SF-TI	3.866	<0.001	0.003
CH-KB	1.276	0.202	1	<i>SF-TU</i>	<i>3.033</i>	<i>0.002</i>	<i>0.065</i>
CH-SA	-1.640	0.101	1	SF-ZI	-1.430	0.153	1
CH-SF	-1.243	0.214	1	SW-TA	8.158	<0.001	<0.001
CH-SW	-2.652	0.008	0.176	SW-TI	5.135	<0.001	<0.001
CH-TA	5.581	<0.001	<0.001	SW-TU	4.356	<0.001	<0.001
CH-TI	2.681	0.007	0.169	SW-ZI	0.149	0.882	0.882
CH-TU	1.818	0.069	1	TA-TI	-2.483	0.013	0.248
CH-ZI	-2.739	0.006	0.148	TA-TU	-3.534	<0.001	0.012
<i>KB-SA</i>	<i>-2.902</i>	<i>0.004</i>	<i>0.093</i>	TA-ZI	-8.825	<0.001	<0.001
KB-SF	-2.519	0.012	0.236	TI-TU	-0.891	0.373	1
KB-SW	-3.885	<0.001	0.003	TI-ZI	-5.411	<0.001	<0.001
KB-TA	4.236	<0.001	<0.001	TU-ZI	-4.584	<0.001	<0.001
KB-TI	1.464	0.143	1				
KB-TU	0.570	0.569	1				

KB-ZI -4.085 <0.001 0.001

Note: Statistical significance ($p < 0.05$) in bold, tendency for statistical significance ($p < 0.1$) in italics.

Table 4: Fixed effects resulting from the linear mixed models examining the effect of age class, sex, zoo and handling method on the baseline cortisol levels (see 2.5.2 for the definition) in relation to positive reinforcement training (PRT, $n=161$), novel enrichment object in the first (NOV2016, $n=153$) and second study period (NOV2017, $n=246$). In all models, animal-ID ($n=10$) and trial nested in animal-ID (PRT and NOV2016: $n=30$, NOV2017: $n=60$) were included as random effects.

PRT					
Fixed effect	Coefficient	SE	df	t	p
Intercept	-0.515	0.436	4.993	-1.180	0.291
Age class	0.116	0.095	4.997	1.220	0.277
Sex	0.045	0.178	5.001	0.251	0.811
Zoo	<i>0.165</i>	<i>0.081</i>	<i>4.966</i>	<i>2.050</i>	<i>0.096</i>
Handling method	-0.153	0.160	4.991	-0.959	0.382

NOV2016					
Fixed effect	Coefficient	SE	df	t	p
Intercept	-0.507	0.196	5.170	-2.583	0.048
Age class	0.178	0.043	5.208	4.162	0.008
Sex	0.115	0.080	5.329	1.428	0.209
Zoo	0.069	0.036	4.892	1.944	0.111
Handling method	-0.121	0.072	5.212	-1.685	0.150

NOV2017					
Fixed effect	Coefficient	SE	df	t	p
<i>Intercept</i>	<i>-0.623</i>	<i>0.284</i>	<i>4.994</i>	<i>-2.193</i>	<i>0.080</i>
<i>Age class</i>	<i>0.124</i>	<i>0.062</i>	<i>4.997</i>	<i>2.015</i>	<i>0.100</i>
Sex	0.138	0.115	4.987	1.197	0.285
Zoo	0.079	0.052	4.955	1.508	0.193
Handling method	-0.084	0.104	5.009	-0.807	0.456

Note: Two-sided t-tests (Satterthwaite's method). Statistical significance ($p < 0.05$) in bold, tendency for statistical significance ($p < 0.1$) in italics.

The inter-individual differences in elevated cortisol levels showed similar trends in the effect of age, sex, zoo and handling method as those in the baseline levels. Figure 6 indicates that the elevated levels of the younger animals were mostly lower than those of the older animals (e.g., AR-TA). In addition, only young bulls (KB and TA, not TU) showed consistently lower values than cows (e.g., KB-SW, Figure 6). Furthermore, we could not find any differences between the animals depending on the zoo or the handling method. The timing of the peak was also variable and we could not observe an effect of age class, sex, zoo or handling

method. Finally, the relatively high cortisol level in PRT in the cow SW was CORT0 of the outlier trial, that is this value did not reflect a response to PRT. All other elevated levels in response to PRT occurred in the bulls.

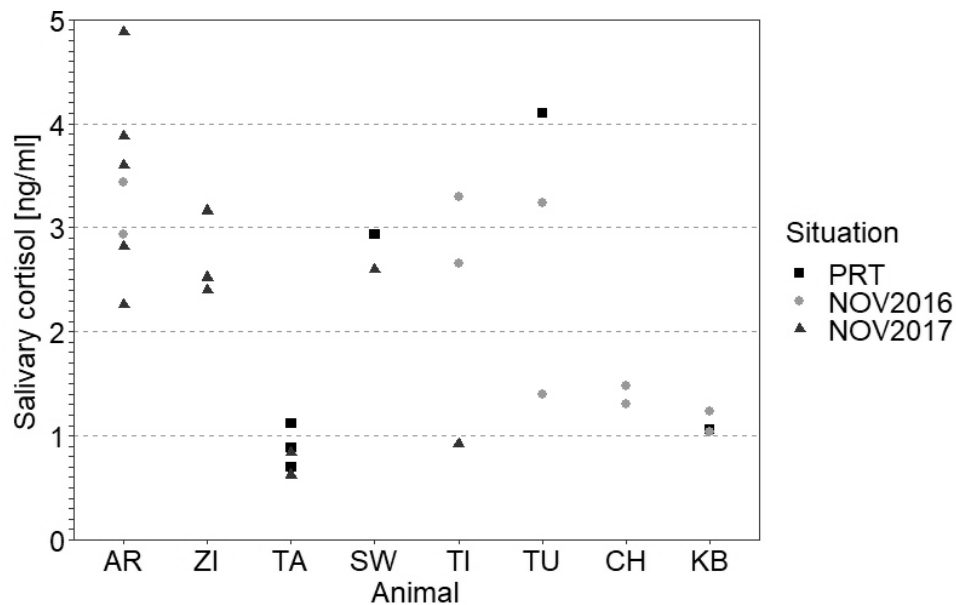


Figure 6: Inter-individual differences in elevated cortisol levels (see 2.5.2 for the definition) in relation to positive reinforcement training (PRT) and novel enrichment object in the first (NOV2016) and second (NOV2017) study period. SA and SF are missing in this figure because these animals did not show elevated cortisol levels. Information on animals is given in Table 1.

4. Discussion

The results of the present study show that the salivary cortisol changes in response to positive reinforcement training (PRT) and a novel enrichment object (NOV) were characterized by different average time courses in captive African elephants. While PRT was followed by a small significant decline in the average cortisol level compared to the pre-PRT level, the time course in response to NOV indicated a moderate acute significant cortisol increase. However, the present study also demonstrates large intra- and inter-individual variation in the cortisol levels and time courses in response to both management situations and study periods. Finally, the results indicate that the inter-individual variation in the baseline and elevated cortisol levels was related to differences in age and zoo, while the effect of sex and handling method was variable.

4.1 Positive reinforcement training (PRT)

The finding of the present study supports the evidence found in previous studies in primates and African elephants that routine PRT does not elicit a cortisol increase (Behringer et al., 2014; Kelling Swilley, 2008; O'Brien et al., 2008). Since the average decline in the cortisol level at 15 and 30 min was significant in the present study, the results even suggest a potential stress-lowering effect of PRT in the African elephants studied. Such an effect is reasonable, as PRT in general allows the animal to control access to rewards through its behavior under voluntary cooperation and free choice of actions without fearing negative consequences (Laule und Desmond, 1998). This perception of control is well-known to exert a stress-buffering and cortisol-lowering effect (Buchanan-Smith and Badihi, 2012; Hanson et al., 1976; Koolhaas et al., 2011). The more distinct cortisol increase between 45 and 60 min in the average PRT time course is in line with this explanation: It indicates that the stress-buffering effect of PRT was short-term and ceased quickly after its ending, as shown by the cortisol level returning to the higher pre-PRT level at the end of the sampling period.

The alternative explanation that the average decrease in cortisol levels post-PRT was the result of elevated CORT0 is also conceivable. According to Koolhaas et al. (2011), situations which are perceived as predictable elicit an anticipatory cortisol response, that is the cortisol concentration before and after the situation are on the same level or the cortisol level before is highest. Such a time course characterizes a situation which is not perceived as a stressor. It is highly likely that this also applies to PRT. PRT was a routine treatment in the management of the elephants studied, which was indicated by the individual separation as well as the presence of the training tools and feed buckets next to the training location. Therefore, the animals probably were able to predict the rewarding stimuli in the course of PRT, which resulted in anticipatory responses, that is high pre-PRT and lower post-PRT cortisol levels.

In summary, both lines of explanations for the relatively high CORT0 and low post-PRT cortisol levels indicate that PRT was not perceived as a stressor by the African elephants studied. Instead, PRT was probably characterized by a high level of predictability and controllability, which are psychological factors shown to lower stress (Buchanan-Smith and Badihi, 2012; Owen et al., 2005) and assumed to underlie the animal welfare benefit of PRT (Bassett and Buchanan-Smith, 2007).

4.2 Novel enrichment object (NOV)

The exposure to a novel object resulted in elevated cortisol levels in the group of African elephants included in the present study. The respective average cortisol time course followed a negative quadratic trend in both study periods, a pattern also found for the acute serum cortisol response to anesthetic administration in southern elephant seals (*Mirounga leonina*) (Engelhard et al., 2002). By excluding outlier trials with significantly elevated CORT0 in the present study, the model fitting to this quadratic trend could be further improved and the model predicted significant increases compared to CORT0 at 30 and 45 min followed by a cortisol recovery to the pre-NOV level. Therefore, the salivary cortisol changes after NOV in the present study resembled an acute cortisol response with the average peak level occurring at 30 and 45 min. Comparative data on the effect of the presentation of novel objects on HPA-axis activity in other species are scarce. However, taking into account the 10-min delay between the increase in plasma and salivary cortisol (Hernandez et al., 2014), plasma cortisol in cattle increased at a similar time (at 20 min) in response to a novel object (van Reenen et al., 2009) as in the elephants in the present study. In addition, Baugh et al. (2017) report moderate plasma cortisol elevations at 10 min and maximum plasma cortisol increases at 30 min in great tits but also note that these cortisol changes most likely reflect the cumulative responses to human contact and NOV respectively to NOV and restraint. However, in both studies cited, no further samples were taken after 20 respectively 30 min, so it is unknown if NOV was an acute or more severe stressor for the animals.

Studies monitoring acute salivary cortisol changes in 10-15 min intervals in response to other stressors reported peak cortisol elevations after 20 to 45 min. For example, cortisol in dogs reached maximum concentrations after 16-20 min following different types of stressors including restraint (Beerda et al., 1998). Cortisol levels in cattle were highest 20 min after social separation (Hernandez et al., 2014). Social-evaluative threat in humans induced a cortisol response peak 30 min after stressor onset (Kirschbaum et al., 1993). In African elephants, the cortisol levels at 30 min were higher than at 15 min after a mild social stressor and began to decline at 45 min (Kelling Swilley, 2008). In chimpanzees, cortisol reached maximal values 45 min following HPA-axis activation after stimulation with ACTH (Heintz et al., 2011). The average peak time of salivary cortisol levels found in the present study, therefore, matches the time of maximum levels reported previously for African elephants and other mammal species.

The assessment of the magnitude of the cortisol response to NOV revealed two interesting findings: First, although the average cortisol level was overall lower in 2017 than in 2016, the average relative cortisol increase between CORT0 and the peak level at 30 min was

actually greater in 2017 than in 2016. This contradicts the occurrence of habituation of the HPA-axis activity due to repeated NOV exposure, as the habituation would manifest itself by a lower magnitude of the cortisol increase in 2017 compared to 2016 (Grissom and Bhatnagar, 2009). Second, the average relative cortisol increase in response to NOV in both study periods was lower than the magnitude of the response to situations defined as stressors in other studies. Dwarf hamsters responded with a relative cortisol increase of 45% to on-back restraint (Guimont and Wynne-Edwards, 2006) and the average cortisol levels in cattle rose by 118% after social separation (Hernandez et al., 2014). In Kelling Swilley (2008), cortisol increased by 271%, 94% respectively 1833% in three African elephant cows in response to a mild social stressor.

Both the time course and the magnitude of the cortisol increase reflects the severity of the stressor (Fleming, 1997; Sheriff et al., 2011a; Smith and French, 1997). Severe (uncontrollable) stressors were associated with prolonged elevated cortisol levels, which may result in pathological conditions (Koolhaas et al., 2011). NOV in the present study, in contrast, induced a short-term and moderate cortisol increase, which indicates that NOV was a mild stressor and/or not all animals mounted a cortisol response (Cockrem, 2013). NOV can be considered as a natural stressor (Greenberg and Mettke-Hofmann, 2001). In the protected zoo environment, however, it is possible that novel objects are associated with only mild stress because the potential benefits (e.g., food acquisition) outweigh the potential costs (e.g., a hidden predator) of exploring novel objects. This applies especially to African elephants, a species which lacks natural predators (Wittemyer et al., 2005). Furthermore, the behavioral responses to the novel object observed in the present study frequently included play behavior, which is a promising indicator of good welfare (Held and Špinka, 2011). Therefore, the acute cortisol response observed in the African elephants examined here may reflect the physiological stress response to a natural or even positive situation which may promote welfare.

4.3 Individual variation in the cortisol stress response

4.3.1 Intra- and inter-individual variation in the cortisol time course

In the present study, there was individual variation both within and between animals in the time courses of the cortisol responses to PRT and NOV, respectively. A study in southern elephant seals found individual variation in the average level but not in the average quadratic time course of the serum cortisol response to sedation based on the lactation stage of the females studied (Engelhard et al., 2002). However, as in the African elephants studied here, the time courses of the individual profiles in the elephant seals varied markedly between and within the

animals. In humans, the salivary cortisol time course changed within the same individual either because of habituation or sensitization (Wüst et al., 2005). We can only speculate about the possible causes for the individual variation in the present study. In general, many internal (e.g., reproductive status: Brown et al., 2004) and environmental factors (e.g., Sheriff et al., 2011b) can contribute to variations in the cortisol response. In the present study, we cannot exclude an effect of habituation in PRT (based on the single acute response in the first trial in TA) or of the novel object itself on the cortisol response to NOV.

The mixed models used in the present study controlled for the individual variation when estimating the average effect of the sampling time on the cortisol level. By using this approach, we were able to reveal situation-specific average response patterns despite high individual variation in the individual profiles in response to the same situation. This result emphasizes the need to use such an approach when there is a great deal of individual variation, because in this case average patterns cannot be detected by the naked eye.

4.3.2 Inter-individual variation in the baseline and elevated cortisol levels

The present study found inter-individual variation in the baseline and elevated cortisol levels. This result is in line with the general finding across studies and species that some animals mount a cortisol response to an acute stressor or any situation which was not considered as a stressor (like PRT in the present study). Other animals, in contrast, show a response with a smaller increase or a different time course, for example, a different peak time (Anestis et al., 2006; Guimont and Wynne-Edwards, 2006), or do not respond at all (Cockrem, 2013).

Since differences in the cortisol levels between African elephants were also reported in previous studies (Grand et al., 2012; Kelling Swilley, 2008; Stead et al., 2000; Wilson et al., 2004), our results give further insights into the factors potentially explaining this inter-individual variation. First, there is a strong tendency for younger animals having lower baseline and elevated cortisol levels, which is in line with the results of previous studies in African elephants (Brown et al., 2007; Carlstead et al., 2019) but contradicts the findings in chimpanzees (Anestis et al., 2006). Second, our results could not clearly show an effect of sex on the baseline cortisol levels. Pairwise Dunn's tests in combination with qualitative assessments of the effect of sex indicated that the males studied here tended to have lower baseline and elevated levels than females. The LMM of the baseline levels, however, did not confirm this observation. The finding that sex has no effect on cortisol levels is supported by the study of Carlstead et al. (2019). Evidence from other species partly supports (dwarf hamster: Guimont and Wynne-Edwards, 2006; human: Kirschbaum et al., 1992) and partly contradicts

the sex difference found in the present study (great apes: Anestis et al., 2006; Behringer et al., 2014; spotted hyena: van Jaarsveld and Skinner, 1992; domestic pig: Sutherland et al., 2005).

The potential zoo/handling effect on the baseline cortisol levels was more pronounced in PRT. This is plausible, as PRT is a specific routine management situation which inevitably differed between zoos based on the keeper experience, training status of the animals and tools (e.g., targets, clicker) used. Previously, an effect of zoo on serum cortisol levels was found in both elephant species (Proctor and Brown, 2015). The same study, however, could not demonstrate an effect of handling method on serum cortisol levels in female elephants. Also the present study did not show a clear difference in baseline salivary cortisol levels between cows in free contact (FC) and cows in protected contact (PC). In addition, our results could not clarify if cows in FC or PC are more (physiologically) stressed, as the cows in both handling systems had no elevated cortisol levels after PRT. Three of the four elevated post-PRT values of bulls represent the acute response of TA to PRT. Based on the long delay between PRT and the peak at 60 min, the elevated level of TU at 60 min probably did not reflect a response to PRT but rather a response to an unknown stressor during the post-PRT sampling period. Finally, we could not find a relationship between age, sex, zoo or handling method and the time of peak values in response to PRT or NOV. This was probably due to the generally low level of physiological stress caused by both situations and thus the low number of elevated values. In chimpanzees, however, it has been shown that an acute, severe stressor (sedation) leads to an earlier peak in younger animals than in older animals (Anestis et al., 2006).

In general, inter-individual differences in cortisol levels cannot be attributed to a single factor because there are many factors that can modulate individual cortisol levels and which can vary from animal to animal. Future studies, therefore, interested in the effect of the handling method on cortisol levels, for example, should monitor the same animals in both handling systems, that is when handling is changed from FC to PC (the respective effect on behavior has been described by Wilson et al., 2015). This would limit the number of factors differing between animals and confounding the effect of handling method on the cortisol levels. Besides the factors discussed above, in African elephants these include personality (Grand et al., 2012), reproductive status (Brown et al., 2004) and/or origin (i.e., born in the wild vs. in captivity; Carlstead et al., 2019).

5. Conclusion

The present study demonstrates distinct average time courses of salivary cortisol in response to PRT and NOV in captive African elephants. These time courses suggest that while PRT probably acts as a stress-buffering event, NOV is perceived as a stressor by the animals, which, however, results only in a moderate short-term elevation of HPA-axis activity with fast recovery of cortisol levels back to the levels before NOV. Therefore, we are convinced that both PRT and NOV are no severe stressors and even assume that these situations are perceived as positive according to the intended enriching effect when used in the zoo management of African elephants. Furthermore, the present study points out the importance of considering individual variation in cortisol assessments in order to reliably detect individual physiological stress, as the individual profiles may deviate from the average time course. Finally, age and zoo, and possibly sex and handling method, may determine inter-individual differences in cortisol levels in captive African elephants. Future studies of physiological stress in this species could build on our findings by assessing the effect of these factors on the time courses of cortisol responses as well as on baseline and elevated cortisol levels in a larger sample of animals.

Acknowledgments

We thank Opel-Zoo Kronberg (Dr. Thomas Kauffels, Dr. Martin Becker and Jörg Beckmann), Grüner Zoo Wuppertal (Dr. Arne Lawrenz) and Thüringer Zoopark Erfurt (Dr. Dr. Sabine Merz and Tina Risch) for supporting the present study. We are also grateful to the keepers for their cooperation in conducting the experiments and collecting the saliva samples. Finally, we also thank Miriam Polten from the Endocrinology Laboratory of the German Primate Centre (Leibniz Institute for Primate Research, Göttingen, Germany) for all cortisol analyses.

Funding

This work was supported by the Opel-Zoo Foundation Professorship Zoo Biology, which is financed by the von Opel Hessische Zoostiftung.

Declaration of interest

The authors declare no conflict of interest.

References

- Anestis, S. F., Bribiescas, R. G., & Hasselschwert, D. L. (2006). Age, rank, and personality effects on the cortisol sedation stress response in young chimpanzees. *Physiology & Behavior*, *89*, 287–294. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2006.06.010>.
- Apfelbeck, B., & Raess, M. (2008). Behavioural and hormonal effects of social isolation and neophobia in a gregarious bird species, the European starling (*Sturnus vulgaris*). *Hormones and Behavior*, *54*, 435–441. <https://doi.org/10.1016/j.yhbeh.2008.04.003>.
- Baker, M. R., Gobush, K. S., & Vynne, C. H. (2013). Review of factors influencing stress hormones in fish and wildlife. *Journal for Nature Conservation*, *21*, 309–318. <https://doi.org/10.1016/j.jnc.2013.03.003>.
- Bassett, L., & Buchanan-Smith, H. M. (2007). Effects of predictability on the welfare of captive animals. *Applied Animal Behaviour Science*, *102*, 223–245. <https://doi.org/10.1016/j.applanim.2006.05.029>.
- Bates, D., Mächler, M., Bolker, B., & Walker, S. (2015). Fitting linear mixed-effects models using lme4. *Journal of Statistical Software*, *67* (1), 1–48. <https://doi.org/10.18637/jss.v067.i01>.
- Baugh, A. T., van Oers, K., Dingemans, N. J., & Hau, M. (2014). Baseline and stress-induced glucocorticoid concentrations are not repeatable but covary within individual great tits (*Parus major*). *General and Comparative Endocrinology*, *208*, 154–163. <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2014.08.014>.
- Baugh, A. T., Witonsky, K. R., Davidson, S. C., Hyder, L., Hau, M., & van Oers, K. (2017). Novelty induces behavioural and glucocorticoid responses in a songbird artificially selected for divergent personalities. *Animal Behaviour*, *130*, 221–231. <https://doi.org/10.1016/j.anbehav.2017.06.028>.
- Beerda, B., Schilder, M. B., Janssen, N. S., & Mol, J. A. (1996). The use of saliva cortisol, urinary cortisol, and catecholamine measurements for a noninvasive assessment of stress responses in dogs. *Hormones and Behavior*, *30*, 272–279. <https://doi.org/10.1006/hbeh.1996.0033>.
- Beerda, B., Schilder, M. B. H., van Hooff, J. A. R. A. M., de Vries, H. W., & Mol, J. A. (1998). Behavioural, saliva cortisol and heart rate responses to different types of stimuli in dogs. *Applied Animal Behaviour Science*, *58*, 365–381. [https://doi.org/10.1016/S0168-1591\(97\)00145-7](https://doi.org/10.1016/S0168-1591(97)00145-7).

- Behringer, V., Clauss, W., Hachenburger, K., Kuchar, A., Möstl, E., & Selzer, D. (2009). Effect of giving birth on the cortisol level in a bonobo groups' (*Pan paniscus*) saliva. *Primates*, *50*, 190–193. <https://doi.org/10.1007/s10329-008-0121-2>.
- Behringer, V., Stevens, J. M. G., Hohmann, G., Möstl, E., Selzer, D., & Deschner, T. (2014). Testing the effect of medical positive reinforcement training on salivary cortisol levels in bonobos and orangutans. *PLOS ONE*, *9*, e108664. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0108664>.
- Boissy, A., & Le Neindre, P. (1997). Behavioral, cardiac and cortisol responses to brief peer separation and reunion in cattle. *Physiology & Behavior*, *61*, 693–699. [https://doi.org/10.1016/S0031-9384\(96\)00521-5](https://doi.org/10.1016/S0031-9384(96)00521-5).
- Boyle, S. A., Roberts, B., Pope, B. M., Blake, M. R., Leavelle, S. E., Marshall, J. J., Smith, A., Hadicke, A., Falcone, J. F., Knott, K., & Kouba, A. J. (2015). Assessment of flooring renovations on African elephant (*Loxodonta africana*) behavior and glucocorticoid response. *PLOS ONE*, *10*, e0141009. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0141009>.
- Brown, J. L., Somerville, M., Riddle, H. S., Keele, M., Duer, C. K., & Freeman, E. W. (2007). Comparative endocrinology of testicular, adrenal and thyroid function in captive Asian and African elephant bulls. *General and Comparative Endocrinology*, *151*, 153–162. <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2007.01.006>.
- Brown, J. L., Walker, S. L., & Moeller, T. (2004). Comparative endocrinology of cycling and non-cycling Asian (*Elephas maximus*) and African (*Loxodonta africana*) elephants. *General and Comparative Endocrinology*, *136*, 360–370. <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2004.01.013>.
- Buchanan-Smith, H. M., & Badihi, I. (2012). The psychology of control: Effects of control over supplementary light on welfare of marmosets. *Applied Animal Behaviour Science*, *137*, 166–174. <https://doi.org/10.1016/j.applanim.2011.07.002>.
- Carere, C., Caramaschi, D., & Fawcett, T. W. (2010). Covariation between personalities and individual differences in coping with stress: Converging evidence and hypotheses. *Current Zoology*, *56*, 728–740. <https://doi.org/10.1093/czoolo/56.6.728>.
- Carlstead, K., Brown, J. L., & Seidensticker, J. (1993). Behavioral and adrenocortical responses to environmental changes in leopard cats (*Felis bengalensis*). *Zoo Biology*, *12*, 321–331. <https://doi.org/10.1002/zoo.1430120403>.

- Carlstead, K., Paris, S., & Brown, J. L. (2019). Good keeper-elephant relationships in North American zoos are mutually beneficial to welfare. *Applied Animal Behaviour Science*, *211*, 103–111. <https://doi.org/10.1016/j.applanim.2018.11.003>.
- Casares, M., Silván, G., Carbonell, M. D., Gerique, C., Martinez-Fernandez, L., Cáceres, S., & Illera, J. C. (2016). Circadian rhythm of salivary cortisol secretion in female zoo-kept African elephants (*Loxodonta africana*). *Zoo Biology*, *35*, 65–69. <https://doi.org/10.1002/zoo.21262>.
- Chelluri, G. I., Ross, S. R., & Wagner, K. E. (2013). Behavioral correlates and welfare implications of informal interactions between caretakers and zoo-housed chimpanzees and gorillas. *Applied Animal Behaviour Science*, *147*, 306–315. <https://doi.org/10.1016/j.applanim.2012.06.008>.
- Chrousos, G. P. (2009). Stress and disorders of the stress system. *Nature Reviews Endocrinology*, *5*, 374–381. <https://doi.org/10.1038/nrendo.2009.106>.
- Cockrem, J. F. (2013). Individual variation in glucocorticoid stress responses in animals. *General and Comparative Endocrinology*, *181*, 45–58. <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2012.11.025>.
- Cook, K. V., O'Connor, C. M., Gilmour, K. M., & Cooke, S. J. (2011). The glucocorticoid stress response is repeatable between years in a wild teleost fish. *Journal of Comparative Physiology A, Neuroethology, Sensory, Neural, and Behavioral Physiology*, *197*, 1189–1196. <https://doi.org/10.1007/s00359-011-0680-3>.
- Cook, N. J. (2012). Minimally invasive sampling media and the measurement of corticosteroids as biomarkers of stress in animals. *Canadian Journal of Animal Science*, *92*, 227–259. <https://doi.org/10.4141/cjas2012-045>.
- Creel, S., Winnie, J. A., & Christianson, D. (2009). Glucocorticoid stress hormones and the effect of predation risk on elk reproduction. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *106*, 12388–12393. <https://doi.org/10.1073/pnas.0902235106>.
- Dallman, M. F., Akana, S. F., Scribner, K. A., Bradbury, M. J., Walker, C. D., Strack, A. M., & Cascio, C. S. (1992). Stress, feedback and facilitation in the hypothalamo-pituitary-adrenal axis. *Journal of Neuroendocrinology*, *4*, 517–526. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2826.1992.tb00200.x>.
- Dembiec, D. P., Snider, R. J., & Zanella, A. J. (2004). The effects of transport stress on tiger physiology and behavior. *Zoo Biology*, *23*, 335–346. <https://doi.org/10.1002/zoo.20012>.

- Desportes, G., Buholzer, L., Anderson-Hansen, K., Blanchet, M.-A., Acquarone, M., Shephard, G., Brando, S., Vossen, A., & Siebert, U. (2007). Decrease stress; train your animals: The effect of handling methods on cortisol levels in harbour porpoises (*Phocoena phocoena*) under human care. *Aquatic Mammals*, *33*, 286–292. <https://doi.org/10.1578/AM.33.3.2007.286>.
- Duarte, R. B., Maior, R. S., & Barros, M. (2018). Behavioral and cortisol responses of adult marmoset monkeys (*Callithrix penicillata*) to different home-cage social disruption intervals. *Applied Animal Behaviour Science*, *201*, 117–124. <https://doi.org/10.1016/j.applanim.2017.12.005>.
- Engelhard, G. H., Brasseur, S. M. J. M., Hall, A. J., Burton, H. R., & Reijnders, P. J. H. (2002). Adrenocortical responsiveness in southern elephant seal mothers and pups during lactation and the effect of scientific handling. *Journal of Comparative Physiology B, Biochemical, Systemic, and Environmental Physiology*, *172*, 315–328. <https://doi.org/10.1007/s00360-002-0257-0>.
- Fardi, S., Sauther, M. L., Cuzzo, F. P., Jacky, I. A. Y., & Bernstein, R. M. (2018). The effect of extreme weather events on hair cortisol and body weight in a wild ring-tailed lemur population (*Lemur catta*) in southwestern Madagascar. *American Journal of Primatology*, *80*, 1–16. <https://doi.org/10.1002/ajp.22731>.
- Fleming, M. W. (1997). Cortisol as an indicator of severity of parasitic infections of *Haemonchus contortus* in lambs (*Ovis aries*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, *116*, 41–44. [https://doi.org/10.1016/S0305-0491\(96\)00157-5](https://doi.org/10.1016/S0305-0491(96)00157-5).
- Foley, C. A. H., Papageorge, S., & Wasser, S. K. (2001). Noninvasive stress and reproductive measures of social and ecological pressures in free-ranging African elephants. *Conservation Biology*, *15*, 1134–1142. <https://doi.org/10.1046/j.1523-1739.2001.0150041134.x>.
- García, A., Martí, O., Vallès, A., Dal-Zotto, S., & Armario, A. (2000). Recovery of the hypothalamic-pituitary-adrenal response to stress: Effect of stress intensity, stress duration and previous stress exposure. *Neuroendocrinology*, *72*, 114–125. <https://doi.org/10.1159/000054578>.

- Grand, A. P., Kuhar, C. W., Leighty, K. A., Bettinger, T. L., & Laudenslager, M. L. (2012). Using personality ratings and cortisol to characterize individual differences in African Elephants (*Loxodonta africana*). *Applied Animal Behaviour Science*, *142*, 69–75. <https://doi.org/10.1016/j.applanim.2012.09.002>.
- Greenberg, R., & Mettke-Hofmann, C. (2001). Ecological aspects of neophobia and neophilia in birds. *Current Ornithology*, *16*, 119–178. https://doi.org/10.1007/978-1-4615-1211-0_3.
- Grissom, N., & Bhatnagar, S. (2009). Habituation to repeated stress: Get used to it. *Neurobiology of Learning and Memory*, *92*, 215–224. <https://doi.org/10.1016/j.nlm.2008.07.001>.
- Guimont, F. S., & Wynne-Edwards, K. E. (2006). Individual variation in cortisol responses to acute “on-back” restraint in an outbred hamster. *Hormones and Behavior*, *50*, 252–260. <https://doi.org/10.1016/j.yhbeh.2006.03.008>.
- Hambrech, S., Oerke, A.-K., Heistermann, M., & Dierkes, P. W. (2020). Diurnal variation of salivary cortisol in captive African elephants (*Loxodonta africana*) under routine management conditions and in relation to a translocation event. *Zoo Biology*, *in press*. <https://doi.org/10.1002/zoo.21537>.
- Hanson, J. D., Larson, M. E., & Snowdon, C. T. (1976). The effects of control over high intensity noise on plasma cortisol levels in rhesus monkeys. *Behavioral Biology*, *16*, 333–340. [https://doi.org/10.1016/S0091-6773\(76\)91460-7](https://doi.org/10.1016/S0091-6773(76)91460-7).
- Heintz, M. R., Santymire, R. M., Parr, L. A., & Lonsdorf, E. V. (2011). Validation of a cortisol enzyme immunoassay and characterization of salivary cortisol circadian rhythm in chimpanzees (*Pan troglodytes*). *American Journal of Primatology*, *73*, 903–908. <https://doi.org/10.1002/ajp.20960>.
- Held, S. D. E., & Špinka, M. (2011). Animal play and animal welfare. *Animal Behaviour*, *81*, 891–899. <https://doi.org/10.1016/j.anbehav.2011.01.007>.
- Hernandez, C. E., Thierfelder, T., Svennersten-Sjaunja, K., Berg, C., Orihuela, A., & Lidfors, L. (2014). Time lag between peak concentrations of plasma and salivary cortisol following a stressful procedure in dairy cattle. *Acta Veterinaria Scandinavica*, *56*, 61. <https://doi.org/10.1186/s13028-014-0061-3>.
- Hohmann, G., Mundry, R., & Deschner, T. (2009). The relationship between socio-sexual behavior and salivary cortisol in bonobos: Tests of the tension regulation hypothesis. *American Journal of Primatology*, *71*, 223–232. <https://doi.org/10.1002/ajp.20640>.

- Hunninck, L., Ringstad, I. H., Jackson, C. R., May, R., Fossøy, F., Uiseb, K., Killian, W., & Røskaft, E. (2017). Being stressed outside the park - conservation of African elephants (*Loxodonta africana*) in Namibia. *Conservation Physiology*, *5*, cox067.
<https://doi.org/10.1093/conphys/cox067>.
- Kelling Swilley, A. (2008). An examination of salivary cortisol concentrations and behavior in three captive African elephants (*Loxodonta africana*) at Zoo Atlanta (Dissertation). Georgia Institute of Technology, Atlanta. Accessed 13 April 2020, retrieved from <https://smartech.gatech.edu/handle/1853/26586>.
- Kirschbaum, C., & Hellhammer, D. H. (2000). Salivary cortisol. In Fink, G. (Ed.), *Encyclopedia of stress* (pp. 379–383). San Diego: Academic Press.
- Kirschbaum, C., Pirke, K. M., & Hellhammer, D. H. (1993). The “Trier Social Stress Test”: A tool for investigating psychobiological stress responses in a laboratory setting. *Neuropsychobiology*, *28*, 76–81. <https://doi.org/10.1159/000119004>.
- Kirschbaum, C., Wüst, S., & Hellhammer, D. (1992). Consistent sex differences in cortisol responses to psychological stress. *Psychosomatic Medicine*, *54*, 648–657.
<https://doi.org/10.1097/00006842-199211000-00004>.
- Koolhaas, J. M., Bartolomucci, A., Buwalda, B., de Boer, S. F., Flügge, G., Korte, S. M., Meerlo, P., Murison, R., Olivier, B., Palanza, P., Richter-Levin, G., Sgoifo, A., Steimer, T., Stiedl, O., van Dijk, G., Wöhr, M., & Fuchs, E. (2011). Stress revisited: A critical evaluation of the stress concept. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, *35*, 1291–1301.
<https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2011.02.003>.
- Kuczaj, S., Lacinak, T., Fad, O., Trone, M., Solangi, M., & Ramos, J. (2002). Keeping environmental enrichment enriching. *International Journal of Comparative Psychology*, *15*. Accessed 13 April 2020, retrieved from <https://escholarship.org/uc/item/1bj376tj>.
- Kuznetsova, A., Brockhoff, P. B., & Christensen, R. H. B. (2017). lmerTest package: Tests in linear mixed effects models. *Journal of Statistical Software*, *82* (13), 1–26.
<https://doi.org/10.18637/jss.v082.i13>.
- Laule, G., & Desmond, T. (1998). Positive reinforcement training as an enrichment strategy. In Shepherdson, D. J., Mellen, J. D., Hutchins, M. (Eds.), *Second nature: Environmental enrichment for captive animals* (pp. 302–313). Washington DC: Smithsonian Institution Press.
- Lee, P. C., & Moss, C. J. (2014). African elephant play, competence and social complexity. *Animal Behavior and Cognition*, *1*, 144–156. <https://doi.org/10.12966/abc.05.05.2014>.

- Majchrzak, Y. N., Mastromonaco, G. F., Korver, W., & Burness, G. (2015). Use of salivary cortisol to evaluate the influence of rides in dromedary camels. *General and Comparative Endocrinology*, *211*, 123–130. <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2014.11.007>.
- Norcross, J. L., & Newman, J. D. (1999). Effects of separation and novelty on distress vocalizations and cortisol in the common marmoset (*Callithrix jacchus*). *American Journal of Primatology*, *47*, 209–222. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1098-2345\(1999\)47:3<209::AID-AJP3>3.0.CO;2-0](https://doi.org/10.1002/(SICI)1098-2345(1999)47:3<209::AID-AJP3>3.0.CO;2-0).
- O'Brien, J. K., Heffernan, S., Thomson, P. C., & McGreevy, P. D. (2008). Effect of positive reinforcement training on physiological and behavioural stress responses in the hamadryas baboon (*Papio hamadryas*). *Animal Welfare*, *17*, 125–138.
- Ogle, D. H., Wheeler P., Dinno A. (2019). FSA: Fisheries Stock Analysis. Accessed 13 April 2020, retrieved from <https://CRAN.R-project.org/package=FSA>.
- Owen, M. A., Swaisgood, R. R., Czekala, N. M., & Lindburg, D. G. (2005). Enclosure choice and well-being in giant pandas: Is it all about control? *Zoo Biology*, *24*, 475–481. <https://doi.org/10.1002/zoo.20064>.
- Palme, R., & Möstl, E. (1997). Measurement of cortisol metabolites in faeces of sheep as a parameter of cortisol concentration in blood. *Mammalian Biology*, *62*, 192–197.
- Palme, R., Rettenbacher, S., Touma, C., El-Bahr, S. M., & Möstl, E. (2005). Stress hormones in mammals and birds: Comparative aspects regarding metabolism, excretion, and noninvasive measurement in fecal samples. *Annals of the New York Academy of Sciences*, *1040*, 162–171. <https://doi.org/10.1196/annals.1327.021>.
- Powell, M. J. D. (2009). The BOBYQA algorithm for bound constrained optimization without derivatives: Technical Report DAMTP 2009/NA06. Centre for Mathematical Sciences, University of Cambridge. Accessed 13 April 2020, retrieved from <http://www.cityu.edu.hk/rcms/publications/preprint26.pdf>.
- Proctor, C. M., & Brown, J. L. (2015). A preliminary analysis of the influence of handling method on adrenal activity in zoo African and Asian elephants. *Journal of Zoo and Aquarium Research*, *3*, 1–5. <https://doi.org/10.19227/jzar.v3i1.100>.
- R Core Team (2019). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing. Accessed 13 April 2020, retrieved from <https://www.R-project.org/>.

- Richard, S., Wacrenier-Céré, N., Hazard, D., Saint-Dizier, H., Arnould, C., & Faure, J. M. (2008). Behavioural and endocrine fear responses in Japanese quail upon presentation of a novel object in the home cage. *Behavioural Processes*, *77*, 313–319. <https://doi.org/10.1016/j.beproc.2007.07.005>.
- Rooney, N. J., Gaines, S. A., & Bradshaw, J. W. S. (2007). Behavioural and glucocorticoid responses of dogs (*Canis familiaris*) to kennelling: Investigating mitigation of stress by prior habituation. *Physiology & Behavior*, *92*, 847–854. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2007.06.011>.
- Rushen, J., Boissy, A., Terlouw, E. M., & de Passillé, A. M. (1999). Opioid peptides and behavioral and physiological responses of dairy cows to social isolation in unfamiliar surroundings. *Journal of Animal Science*, *77*, 2918–2924. <https://doi.org/10.2527/1999.77112918x>.
- Schmidt, A., Möstl, E., Wehnert, C., Aurich, J., Müller, J., & Aurich, C. (2010). Cortisol release and heart rate variability in horses during road transport. *Hormones and Behavior*, *57*, 209–215. <https://doi.org/10.1016/j.yhbeh.2009.11.003>.
- Schmitt, T. L., St. Aubin, D. J., Schäfer, A. M., & Dunn, J. L. (2010). Baseline, diurnal variations, and stress-induced changes of stress hormones in three captive beluga, *Delphinapterus leucas*. *Marine Mammal Science*, *26*, 635–647. <https://doi.org/10.1111/j.1748-7692.2009.00366.x>.
- Sheriff, M. J., Dantzer, B., Delehanty, B., Palme, R., & Boonstra, R. (2011a). Measuring stress in wildlife: Techniques for quantifying glucocorticoids. *Oecologia*, *166*, 869–887. <https://doi.org/10.1007/s00442-011-1943-y>.
- Sheriff, M. J., Krebs, C. J., & Boonstra, R. (2009). The sensitive hare: Sublethal effects of predator stress on reproduction in snowshoe hares. *The Journal of Animal Ecology*, *78*, 1249–1258. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2656.2009.01552.x>.
- Sheriff, M. J., Krebs, C. J., & Boonstra, R. (2011b). From process to pattern: How fluctuating predation risk impacts the stress axis of snowshoe hares during the 10-year cycle. *Oecologia*, *166*, 593–605. <https://doi.org/10.1007/s00442-011-1907-2>.
- Skoluda, N., Strahler, J., Schlotz, W., Niederberger, L., Marques, S., Fischer, S., Thoma, M. V., Spoerri, C., Ehlert, U., & Nater, U. M. (2015). Intra-individual psychological and physiological responses to acute laboratory stressors of different intensity. *Psychoneuroendocrinology*, *51*, 227–236. <https://doi.org/10.1016/j.psyneuen.2014.10.002>.

- Smith, T., & French, J. (1997). Psychosocial stress and urinary cortisol excretion in marmoset monkeys (*Callithrix kuhli*). *Physiology & Behavior*, *62*, 225–232. [https://doi.org/10.1016/S0031-9384\(97\)00103-0](https://doi.org/10.1016/S0031-9384(97)00103-0).
- Solano, J., Galindo, F., Orihuela, A., & Galina, C. S. (2004). The effect of social rank on the physiological response during repeated stressful handling in Zebu cattle (*Bos indicus*). *Physiology & Behavior*, *82*, 679–683. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2004.06.005>.
- Stead, S. K., Meltzer, D. G. A., & Palme, R. (2000). The measurement of glucocorticoid concentrations in the serum and faeces of captive African elephants (*Loxodonta africana*) after ACTH stimulation. *Journal of the South African Veterinary Association*, *71*, 192–196. <https://doi.org/10.4102/jsava.v71i3.712>.
- Stockman, C. A., Collins, T., Barnes, A. L., Miller, D., Wickham, S. L., Beatty, D. T., Blache, D., Wemelsfelder, F., & Fleming, P. A. (2011). Qualitative behavioural assessment and quantitative physiological measurement of cattle naïve and habituated to road transport. *Animal Production Science*, *51*, 240. <https://doi.org/10.1071/AN10122>.
- Sutherland, M. A., Rodriguez-Zas, S. L., Ellis, M., & Salak-Johnson, J. L. (2005). Breed and age affect baseline immune traits, cortisol, and performance in growing pigs. *Journal of Animal Science*, *83*, 2087–2095. <https://doi.org/10.2527/2005.8392087x>.
- Tecot, S. R., Irwin, M. T., & Raharison, J. (2019). Faecal glucocorticoid metabolite profiles in diademed sifakas increase during seasonal fruit scarcity with interactive effects of age/sex class and habitat degradation. *Conservation Physiology*, *7*, coz001. <https://doi.org/10.1093/conphys/coz001>.
- Tilbrook, A. J., & Clarke, I. J. (2006). Neuroendocrine mechanisms of innate states of attenuated responsiveness of the hypothalamo-pituitary adrenal axis to stress. *Frontiers in Neuroendocrinology*, *27*, 285–307. <https://doi.org/10.1016/j.yfrne.2006.06.002>.
- Turner, A. I., Rivalland, E. T. A., Clarke, I. J., & Tilbrook, A. J. (2010). Stressor specificity of sex differences in hypothalamo-pituitary-adrenal axis activity: Cortisol responses to exercise, endotoxin, wetting, and isolation/restraint stress in gonadectomized male and female sheep. *Endocrinology*, *151*, 4324–4331. <https://doi.org/10.1210/en.2010-0234>.
- Umeda, T., Hiramatsu, R., Iwaoka, T., Shimada, T., Miura, F., & Sato, T. (1981). Use of saliva for monitoring unbound free cortisol levels in serum. *Clinica Chimica Acta*, *110*, 245–253. [https://doi.org/10.1016/0009-8981\(81\)90353-3](https://doi.org/10.1016/0009-8981(81)90353-3).

- Van Jaarsveld, A. S., & Skinner, J. D. (1992). Adrenocortical responsiveness to immobilization stress in spotted hyenas (*Crocuta crocuta*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Comparative Physiology*, *103*, 73–79. [https://doi.org/10.1016/0300-9629\(92\)90243-j](https://doi.org/10.1016/0300-9629(92)90243-j).
- Van Reenen, C. G., Hopster, H., van der Werf, J. T. N., Engel, B., Buist, W. G., Jones, R. B., Blokhuis, H. J., & Korte, S. M. (2009). The benzodiazepine brotizolam reduces fear in calves exposed to a novel object test. *Physiology & Behavior*, *96*, 307–314. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2008.10.016>.
- Van Reenen, C. G., O’Connell, N. E., van der Werf, J. T. N., Korte, S. M., Hopster, H., Jones, R. B., & Blokhuis, H. J. (2005). Responses of calves to acute stress: Individual consistency and relations between behavioral and physiological measures. *Physiology & Behavior*, *85*, 557–570. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2005.06.015>.
- Vincent, I. C., & Michell, A. R. (1992). Comparison of cortisol concentrations in saliva and plasma of dogs. *Research in Veterinary Science*, *53*, 342–345. [https://doi.org/10.1016/0034-5288\(92\)90137-Q](https://doi.org/10.1016/0034-5288(92)90137-Q).
- Wang, L. X., Huether, P., Doble, E., & Liptrap, R. M. (1986). Effect of cortisol on luteinizing hormone release during sexual behavior in the boar. *Canadian Journal of Veterinary Research*, *50*, 540–542.
- Ward, S. J., & Melfi, V. (2013). The implications of husbandry training on zoo animal response rates. *Applied Animal Behaviour Science*, *147*, 179–185. <https://doi.org/10.1016/j.applanim.2013.05.008>.
- Wilson, M. L., Bloomsmith, M. A., & Maple, T. L. (2004). Stereotypic swaying and serum cortisol concentrations in three captive African elephants (*Loxodonta africana*). *Animal Welfare*, *13*, 39–43.
- Wilson, M. L., Perdue, B. M., Bloomsmith, M. A., & Maple, T. L. (2015). Rates of reinforcement and measures of compliance in free and protected contact elephant management systems. *Zoo Biology*, *34*, 431–437. <https://doi.org/10.1002/zoo.21229>.
- Wittemyer, G., Daballen, D., Rasmussen, H., Kahindi, O., & Douglas-Hamilton, I. (2005). Demographic status of elephants in the Samburu and Buffalo Springs National Reserves, Kenya. *African Journal of Ecology*, *43*, 44–47. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2028.2004.00543.x>.

Wüst, S., Federenko, I. S., van Rossum, E. F. C., Koper, J. W., & Hellhammer, D. H. (2005). Habituation of cortisol responses to repeated psychosocial stress - further characterization and impact of genetic factors. *Psychoneuroendocrinology*, *30*, 199–211.
<https://doi.org/10.1016/j.psyneuen.2004.07.002>.

Manuskript C**Individual variation and repeatability of the behavioral response to novel objects in captive African elephants (*Loxodonta africana*)**

Status: submitted

Beteiligte Autoren:

Susan Hambrecht (SH, Promovierender),

Paul Wilhelm Dierkes (PD)

(1) zu Entwicklung und Planung
Promovierender SH: 100%
(2) zur Durchführung der einzelnen Untersuchungen und Experimente
Promovierender SH: 100% (Durchführung aller Experimente)
(3) zur Erstellung der Datensammlung und Abbildungen
Promovierender SH: 100% (Erstellung aller Datensammlungen und Abbildungen)
(4) zur Analyse und Interpretation der Daten
Promovierender SH: 95% (Statistische Analyse und Interpretation)
Co-Autor PD: 5% (Besprechung)
(5) zum Verfassen des Manuskripts
Promovierender SH: 90%
Co-Autor PD: 10%

Datum/Ort: /Frankfurt am Main

 Unterschrift Promovierender

 Unterschrift Betreuer

Individual variation and repeatability of the behavioral response to novel objects in captive African elephants (*Loxodonta africana*)

Susan Hambrecht^{a}, Paul Wilhelm Dierkes^a*

^aBioscience Education and Zoo Biology, Goethe-University Frankfurt, Max-von-Laue-Straße 13, 60438 Frankfurt am Main, Germany

*Corresponding author: Susan Hambrecht, Bioscience Education and Zoo Biology, Goethe-University Frankfurt, Max-von-Laue-Straße 13, 60438 Frankfurt am Main, Germany.

Email address: hambrecht@em.uni-frankfurt.de

Abstract

Individuals differ consistently in their behavioral responses to novel situations. In zoo animals, such evidence can help to design enrichment programs to improve individual welfare, an issue under constant debate, particularly in African elephants. The Novel Object Test (NOV) is a standard method for measuring behavioral responses to novelty in many species but has not yet been performed in African elephants. The present study aimed to find out whether ten African elephants from three different zoos consistently differ in their responses to a novel object (NOV response) in order to determine the reliability of the NOV to measure individual behavioral differences in this species. Therefore, we conducted three NOV trials in 2016 and six trials in 2017 in all 10 animals and examined the repeatability of the NOV response as well as the intra- and inter-individual variation. We estimated consistency repeatability of the latency until first contact and the relative duration of the interaction with the NOV based on Spearman rank correlations. In addition, we determined agreement repeatability of the binary response (the animal touched the NOV within 90 sec or not) based on a general linear mixed model approach. Both the latency and relative duration correlated significantly between years (latency: two-sided $r_s=0.88$, $p<0.001$, $n=10$; relative duration: two-sided $r_s=0.91$, $p<0.001$, $n=10$). Furthermore, the Spearman correlations of the latency and relative duration between trials were strong (two-sided $r_s>0.5$) in all but a few cases and significant ($p<0.05$, $n=10$) or marginally significant ($p<0.1$, $n=10$) in approximately half of the pairwise correlations. The binary response was also significantly repeatable ($R=0.71$, $CI=0.23-0.97$, $p<0.001$ [LRT], $p=0.001$ [permutation]). The analysis of the individual variation showed that the animals differed significantly in both the latency and the relative duration (Friedman test: latency: $X^2=62.28$, $p<0.001$, $n=9$; relative duration: $X^2=66.21$, $p<0.001$, $n=9$). Furthermore, significant differences between animals with extreme NOV responses (Nemenyi post hoc tests: $p<0.05$) and low intra-individual variation were indicative of repeatability. The results suggest that the NOV response was temporally stable. Therefore, the Novel Object Test reliably detected behavioral differences between the African elephants studied. This consistent inter-individual variation may have been due to differences in a personality trait similar to "boldness/shyness". Furthermore, the findings imply differences in the need for enrichment between elephants depending on this trait and thus emphasize the requirement for individual-specific enrichment.

Keywords

Zoo; animal welfare; environmental enrichment; consistency; Novel Object Test

Highlights

- Behavioral responses in novel object tests (NOV) are repeatable in African zoo elephants.
- Animals with extremely low and high responses behave consistently across trials.
- NOV could reflect a personality trait in African elephants comparable to boldness.
- NOV could be a reliable indicator of the individual enrichment needs of African elephants.

1. Introduction

1.1 Theoretical background: The Novel Object Test and repeatability

Studies in both captive and wild animals used the Novel Object Test (NOV) to examine behavioral differences between individuals in the response to a novel object (NOV) (e.g., domestic horse: Visser et al., 2001; black bear, *Ursus americanus*: Myers and Young, 2018; vervet monkey, *Chlorocebus pygerythrus*: Blaszczyk, 2017). The latency to approach or to contact and the duration interacting with the NOV is mostly used to measure the response to the NOV (NOV response) (e.g., Stöwe et al., 2006; van Reenen et al., 2005). As described by Greenberg and Mettke-Hofmann (2001), the NOV response of an animal results from the conflict between the benefits and costs of exploring that object. Exploration provides the animal with potentially important environmental information but at the same time may pose risks, like a hidden predator, or costs, like time and energy. Animals differ in their NOV responses, because they solve this conflict differently depending on cost-benefit considerations and both internal (e.g., experience) and external factors (e.g., properties of the NOV) (Mettke-Hofmann et al., 2006). These factors can also cause variation within an individual, for example, decreasing NOV responses due to habituation to similar NOVs (Christensen et al., 2008) or different responses to NOVs with different properties (Heinrich et al., 1995).

The NOV is a widely used behavioral test, especially in animal personality studies, as the animals differ consistently in their NOV responses, that is the NOV response is a repeatable behavior in many species (e.g., domestic rabbits: Andersson et al., 2014; chacma baboon, *Papio ursinus*: Carter et al., 2012; barnacle goose, *Branta leucopsis*: Kurvers et al., 2010; mouse lemur, *Microcebus murinus*: Verdolin and Harper, 2013).

In general, a behavior is repeatable if the variance within individuals is relatively small compared to the variance between individuals over repeated measurements (Bell et al., 2009), that is the animals differ consistently in this behavior. As explained by Nakagawa and Schielzeth (2010), there are two definitions of repeatability: Agreement repeatability refers to the absolute agreement between measurements. Consistency repeatability, in contrast, reflects the reproducibility of relative measurements, that is the means and variances are allowed to vary between measurements. Hence, consistency is a “looser” definition of repeatability (Nakagawa and Schielzeth, 2010), as the stability of the rank-order of the animals over time is sufficient to demonstrate repeatability of the behavior. The estimation of consistency repeatability allows to control the effects of environmental variation between measurements that are not of interest (Nakagawa and Schielzeth, 2010). For example, the use of a different

NOV in each trial in order to ensure novelty may result in different, object-specific NOV responses. This plasticity of individual behavior may explain low agreement repeatability (Wuerz and Krüger, 2015) but may not affect consistency if the relative differences between animals are maintained (Bell et al., 2009). Estimating consistency repeatability, therefore, may be more appropriate if the environmental conditions during the NOV vary between measurements or if learning processes (e.g., habituation) across repeated trials may occur (Martin and Réale, 2008).

Repeatability of the behavior is a prerequisite both for the reliability of the NOV (and any behavioral test) and for the definition of the NOV response as a personality trait (Carter et al., 2013). Mostly, the terms neophilia/neophobia, boldness/shyness or exploratory tendency were used to name the scales along which the animals were arranged according to their NOV responses (Andersson et al., 2014; Blaszczyk, 2017; Greenberg and Mettke-Hofmann, 2001; Myers and Young, 2018). Some studies, however, were not able to demonstrate behavioral repeatability in the NOV and, thus, to define a respective personality trait (e.g., chimpanzee, *Pan troglodytes*: Massen et al., 2013; zebra finch, *Taeniopygia guttata*: Wuerz and Krüger, 2015). Repeatability of the NOV response, therefore, cannot be assumed but needs to be determined.

1.2 Practical considerations: The Novel Object Test as a management tool

Personality assessments can assist in tailoring management situations to meet the needs and thus ensure the welfare of each individual animal (Hall et al., 2018; Highfill, 2008; Watters and Powell, 2012). In this respect, the NOV can be used to assess the individual enrichment need. As assumed by Horback et al. (2013), bold elephants may have high enrichment needs and shy elephants low enrichment needs. The magnitude of the NOV response, therefore, may reflect both the conceptual personality trait “boldness” and the applied trait “enrichment need”. In addition, there is evidence that animals which are bold towards NOVs better perform in learning tasks (cavy, *Cavia aperea*: Guenther et al., 2014) and positive reinforcement training (rhesus macaque, *Macaca mulatta*: Coleman et al., 2005). The NOV, therefore, may potentially also reveal differences between animals in the need for cognitive enrichment.

The NOV is a promising tool to assess these applied aspects of personality in zoo animals: First, compared to keeper ratings, it is a more objective, standardized and quick measure of personality (Carlstead et al., 1999b; Powell and Svoke, 2008), as the knowledge of keepers about their animals is dependent on the time they worked with them (King et al., 2005) and may take years to build up. Second, the NOV is a feasible behavioral test because it can be

easily integrated in existing enrichment programs (Franks et al., 2013; Powell and Svoke, 2008).

1.3 Objectives

NOV results can only be correctly interpreted in terms of individual differences in personality and enrichment needs if the repeatability of these results is proven. The present study, therefore, examined the repeatability as well as the intra- and inter-individual variation of the NOV response in ten African elephants housed in three different zoos. The aim was to find out whether the NOV reliably detects behavioral differences between the animals studied. If yes, the NOV could be used to assess individual enrichment needs as a basis to improve the individual welfare of African elephants under human care.

2. Material and methods

2.1 Animals and management

We tested the behavior of ten adult African elephants (*Loxodonta africana*) towards different novel objects in 2016 and 2017. They were housed in the following German zoos: Opel-Zoo Kronberg, Grüner Zoo Wuppertal and Thüringer Zoopark Erfurt. Table 1 summarizes the information on the animals. The study in each zoo took place in the same season in both years (Kronberg: spring, Wuppertal summer, Erfurt: fall/winter). Elephant housing in all zoos included a spacious naturalistic outdoor enclosure, an indoor free stall and several boxes to separate individual animals. The enclosures were furnished with natural substrates, scratching surfaces, sand pits and mud wallows. The use of enrichment objects, mostly for feeding, differed between zoos and was more frequent in Erfurt than in Kronberg and Wuppertal. Depending on the weather conditions, the elephants were maintained outdoors. Females and their offspring formed stable social groups. Bulls were temporarily housed with the females. In April 2017, a new cow was transferred to Erfurt and was integrated in the group by the beginning of the study in that year. All elephants received positive reinforcement training regularly.

Table 1: Information on animals (sorted by zoo).

Zoo	Animal-ID	Age class [†]	Sex [‡]
Kronberg (K)	AR	3	F
	ZI	3	F
	TA	1	M
Wuppertal (W)	SA	2	F
	SW	2	F
	TI	1	F
	TU	2	M
Erfurt (E)	SF	3	F
	CH	1	F
	KB	1	M

[†] 1=5-14.9 years (young adult), 2=20-34.9 years (adult), 3=35-49.9 years (old adult) (Lee and Moss, 2014), [‡]F=Female, M=Male.

2.2 Experimental set-up

The NOV took place in enclosure areas familiar to the animals, which consisted of the test arena (free stall in Kronberg and Erfurt, bull enclosure in Wuppertal) and a retreat (starting box in Kronberg and Erfurt, kraal [bull TU] or section of the cow enclosure [cows] in Wuppertal). Figure S1 shows the respective enclosure areas where the NOV took place.

The NOV lasted 10 min and proceeded as follows: Initially, the animal was separated from the group and moved in the retreat, a procedure to which the animals were used as part of daily routines. Then, food and feces were removed from the test arena and the NOV was placed in the test arena. The NOV began as soon as the animal looked in the direction of the object while the door to the test arena opened. The animal entered the test arena voluntarily and was allowed to return to the retreat. The time of day when the NOV took place was determined by the daily zoo-specific management routine and, therefore, differed between zoos but was constant within zoos (Kronberg: 18:00 h, Wuppertal: 14:00 h, Erfurt: 13:00 h).

With the exception of the cows in Wuppertal, the animals went through NOV alone. The cows in Wuppertal were tested along with their offspring in order to prevent confounding social stress due to separation. Each animal was tested once per day and only one animal was tested per day. Only SA and TI (mother and daughter) were tested simultaneously and offered two equal NOVs four to five meters apart. While another animal was being tested, the other animals examined in the study were kept in enclosure areas where they could not observe the

NOV. For logistical reasons, the remaining elephants had to remain in the enclosures adjacent to the retreat during the NOV, which allowed interactions through barriers between these animals and the animal currently being tested (Figure S1).

We tested each animal nine times in total with three trials in 2016 (trial 1-3) and six trials in 2017 (trial 6-9). The animals were consecutively exposed to one NOV trial per week in a stable order. In each trial a different NOV was presented and each NOV was used only once. NOVs were of different colors, materials and sizes (ball, traffic cone, barrel, white tarpaulin, air mattress, etc.) and not used in regular management before. We aimed to present the same NOVs in the same order to all animals. In three trials, however, we had to use a different NOV in one zoo, either because the animals had contact to the same type of object shortly before the study started in this zoo or the NOV was not robust enough. In two trials, the door to the retreat was accidentally closed after the animal had entered the test arena.

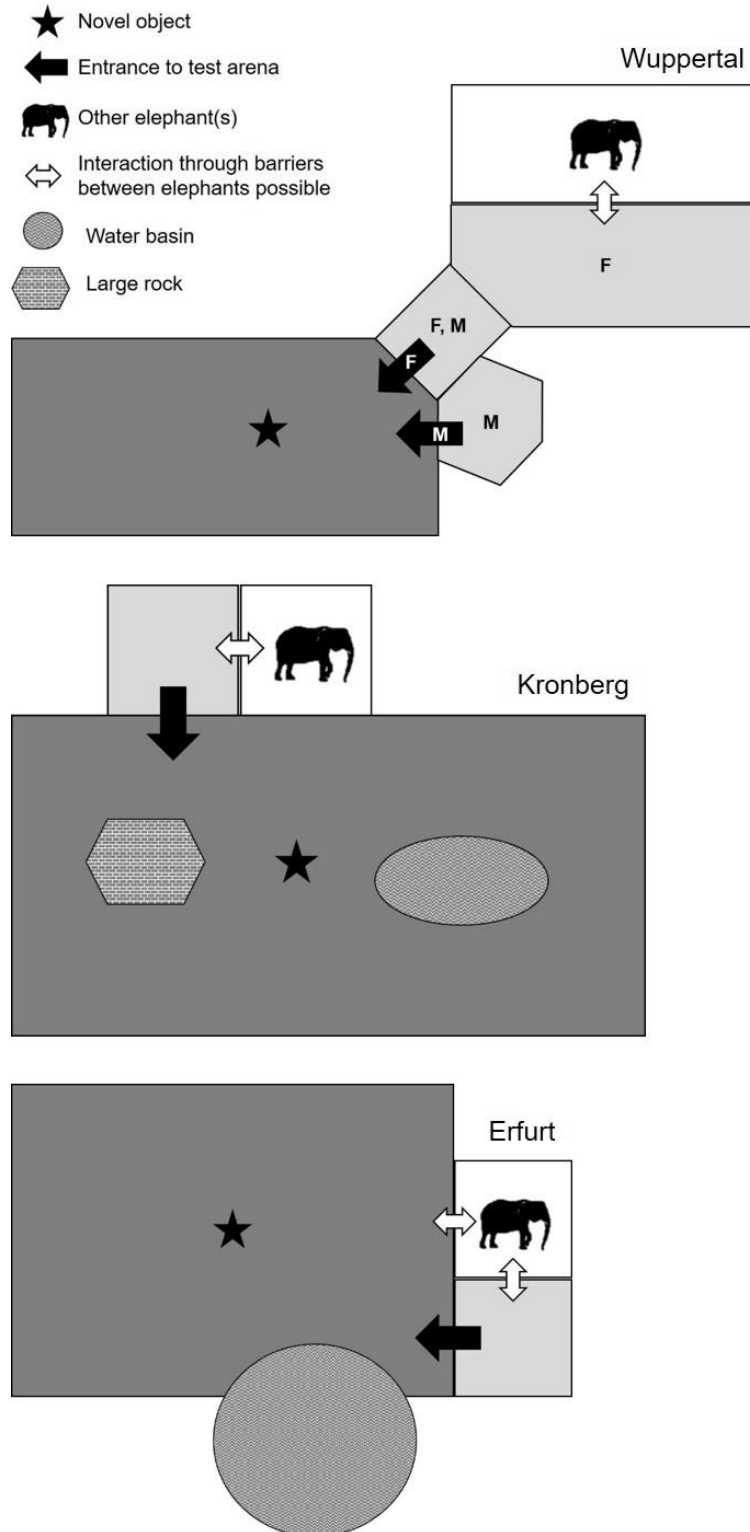


Figure S1: Schematic diagram of the respective enclosure areas in the three zoos where the Novel Object Test (NOV) took place. Test arena (dark grey), retreat (light grey) and areas holding other elephants (white) are indicated. Furthermore, the position of the novel object (NOV), the entrance from the retreat into the test arena, the position of large enclosure furniture (rock, water basin), the position of other elephants during the NOV and possible locations of social interactions between elephants and the animal tested are depicted (see figure legend for explanations of the respective symbols). The areas of the retreat and the entrance from the retreat into the test arena differed between the male TU (M) and the cows (F) in Wuppertal.

2.3 Data collection

We recorded the behavior of each animal in each NOV trial with three cameras (two GoPro Hero 4 Silver and one Sony Handycam HDR-CX405), which covered the area of the test arena and the retreat. For each animal and NOV trial, we measured the NOV response as the latency and duration of the behavior High-Interest-Activity (McComb et al., 2006) from video recordings using the open-source software BORIS (Behavioral Observation Research Interactive Software, version 4.1.4, Friard and Gamba, 2016). High-Interest-Activity (HIA) was recorded when the animal touched (did not move the NOV), manipulated (moved the NOV) or played with the NOV (manipulated the NOV vigorously and intensely, Lee and Moss, 2014).

We corrected for different observation times between trials and animals by calculating the duration of HIA in relation to the duration this behavior could have been observed in the respective animal and trial:

$$\text{Relative duration} = \text{Duration of HIA} / (\text{NOT duration} - \text{OUT duration}).$$

The NOV duration was always 600 sec. During OUT the behavior of the animal could not be determined. If an animal kicked or threw the NOV out of the test arena beyond its reach, the NOV was not put back. Instead the time the animal did not have access to the NOV was added to the OUT duration.

2.4 Data analysis

R (version 3.6.0, R Core Team, 2019) was used for data analysis. We applied non-parametric statistics because of the non-normality of the data (visually assessed by histograms and Q-Q-plots). Significance level was $p < 0.05$. In addition, the tendency for significance is indicated when $p < 0.1$.

2.4.1 Intra- and inter-individual variation in the NOV response

We applied the Friedman test and the Nemenyi post hoc test for dependent samples (R package PMCMR, version 4.3, Pohlert, 2014) in order to analyze which animals differed significantly from each other in their latency and relative duration. We describe the intra-individual variation between trials 1-9 by means of the interquartile range depicted in box plots. Additionally, we visually assess the intra-individual variation using line plots showing the behavioral change across trials and study periods. In the case of the intra-individual variation between study periods, we used the median calculated from the individual trial values of the respective study period.

2.4.2 Consistency and repeatability

We estimated consistency repeatability using Spearman rank correlations with Bonferroni-Holm correction in order to determine whether the rank order of the animals in the latency and relative duration was stable across time (Logan, 2016). We assessed pairwise consistency between trials and consistency of the average level between study periods. The Spearman correlation coefficient r_s was used as a measure of the effect size, that is the strength of consistency (weak: $r_s=0.1$, moderate: $r_s=0.3$, strong: $r_s=0.5$, Cohen, 1992).

The rank-order consistency between study periods is visualized in line plots. For this purpose, we sorted the animals by the average latency respectively relative duration in each study period and assigned each animal the respective rank according to its position in the order (i.e., rank 1 corresponds to the lowest latency and highest relative duration, respectively, and rank 10 to the highest latency and lowest relative duration, respectively).

In addition, we estimated agreement repeatability of the binary NOV response in order to determine whether the animals repeatedly showed HIA within a specific time frame or not. 90 sec was used as the cut-off between showing HIA, i.e., a NOV response, and not showing a NOV response. The reason for this approach is that not earlier than 90 sec after onset of the NOV an animal removed the NOV from the test arena. We used the function `rptBinary` with logit-link of the R package `rptR` (version 0.9.22; Stoffel et al., 2017). Confidence intervals were calculated based on 1000 iterations of parametric bootstrapping. Significance of repeatability was determined by likelihood ratio tests and permutation tests (1000 permutations). We considered repeatability to be low when <0.3 and high when >0.5 (Baugh et al., 2014).

3. Results

3.1 Inter-individual variation in the NOV response

As illustrated in Figure 1, the animals differed significantly in the magnitude of the NOV response (Friedman test: HIA latency: $X^2=62.28$, $p<0.001$, $n=9$; HIA relative duration: $X^2=66.21$, $p<0.001$, $n=9$). The results of the Nemenyi *post hoc* tests are presented in Table S1 and Table S2. The results of these pairwise tests indicated the existence of two extreme groups: CH, KB and TU displayed significantly greater NOV responses (lower latencies and higher relative durations) than ZI, SA and TI (except for the marginally significant difference in HIA latency between TI and TU). The difference between animals within these groups was not significant. SF did not differ significantly from all other animals in both the latency and relative

duration. Except for a marginally lower HIA latency compared to ZI, the NOV response of SW did not differ significantly from the behavior of all other animals. The relative duration of AR was significantly lower than the relative duration of CH and did not differ from the NOV responses of all other animals. The NOV response of TA tended to be lower than those of CH and KB and did not differ from the NOV responses of all other animals.

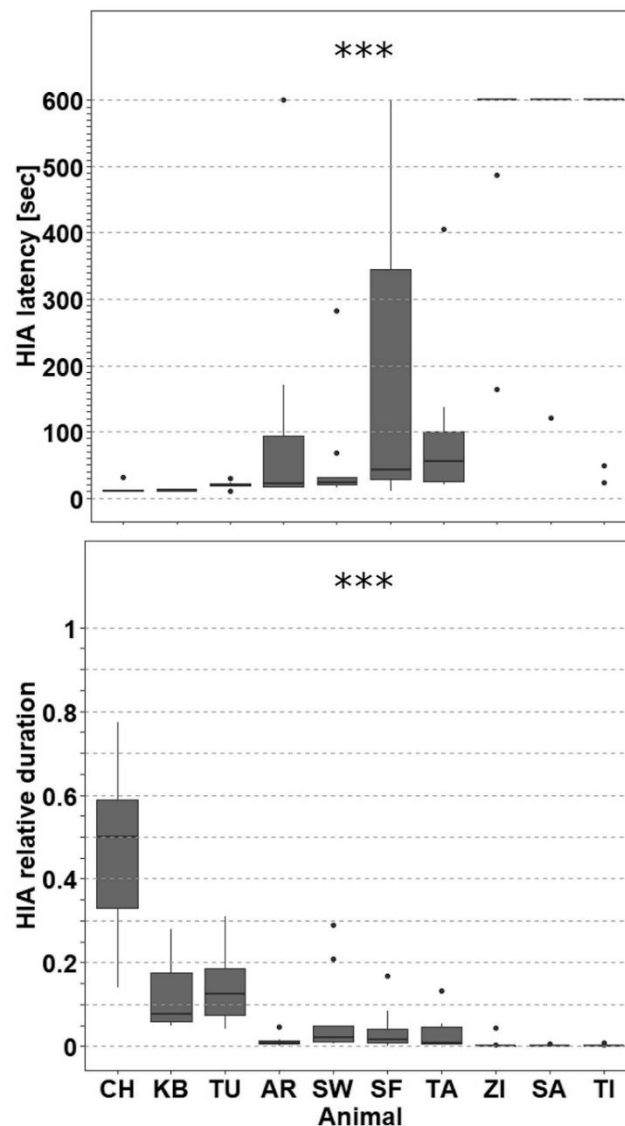


Figure 1: Difference between animals in the latency and relative duration of High-Interest-Activity (HIA). The boxes illustrate the 25% and 75% quartiles, bars indicate medians, dots indicate outliers. Stars indicate significance of the Friedman test: $p < 0.001$ ***. Results of the pairwise Nemenyi post hoc tests are presented in Table S1 and Table S2. The animals are sorted from left to right in ascending order according to the median of HIA latency.

Table S1: P-values of the pairwise Nemenyi post hoc tests for differences between animals in the latency of High-Interest-Activity (HIA).

HIA latency									
	Animal								
	CH	KB	TU	AR	SW	SF	TA	ZI	SA
Animal	KB	1	-	-	-	-	-	-	-
	TU	0.901	0.901	-	-	-	-	-	-
	AR	0.341	0.341	0.997	-	-	-	-	-
	SW	0.582	0.582	1	1	-	-	-	-
	SF	0.135	0.135	0.949	1	0.999	-	-	-
	TA	<i>0.090</i>	<i>0.090</i>	0.901	1	0.995	1	-	-
	ZI	<0.001	<0.001	0.017	0.214	<i>0.090</i>	0.471	0.582	-
	SA	<0.001	<0.001	0.019	0.232	0.100	0.498	0.610	1
	TI	<0.001	<0.001	<i>0.073</i>	0.498	0.273	0.789	0.869	1

Note: Bold: $p < 0.05$, italic: $p < 0.1$. The animals are sorted from left to right and top to bottom in ascending order according to the median of HIA latency.

Table S2: P-values of the pairwise Nemenyi post hoc tests for differences between animals in the relative duration of High-Interest-Activity (HIA).

HIA relative duration									
	Animal								
	CH	KB	TU	AR	SW	SF	TA	ZI	SA
Animal	KB	0.927	-	-	-	-	-	-	-
	TU	0.992	1	-	-	-	-	-	-
	AR	0.005	0.295	0.123	-	-	-	-	-
	SW	0.232	0.977	0.869	0.957	-	-	-	-
	SF	0.111	0.901	0.691	0.994	1	-	-	-
	TA	<i>0.058</i>	0.789	0.526	0.999	1	1	-	-
	ZI	<0.001	0.005	0.001	0.939	0.196	0.366	0.526	-
	SA	<0.001	0.003	<0.001	0.901	0.149	0.295	0.444	1
	TI	<0.001	0.003	<0.001	0.885	0.135	0.273	0.417	1

Note: Bold: $p < 0.05$, italic: $p < 0.1$. The animals are sorted from left to right in ascending order according to the median of HIA latency.

3.2 Intra-individual variation in the NOV response

Figure 1 and Figure 2 show that most animals exhibited relatively low intra-individual variation in HIA latency and relative duration both between trials and on the average level between study periods. The latencies of CH, KB, TU and SW were at the same low level in all or most of the nine trials (Figure 3). The latencies of ZI, SA and TI were also relatively stable, as their latencies were similarly high in seven or eight of the nine trials (Figure 3). The intra-

individual variation across trials, therefore, tended to be low in the animals showing extreme, that is highest (CH, KB and TU) respectively lowest (ZI, SA and TI) average values (Figure 1).

Relatively high intra-individual variation across trials was found in the relative durations of CH, KB and TU and in the latencies and the relative durations of the animals showing intermediate average values of these behavioral measures (intermediate animals, e.g., SF and TA) (Figure 1).

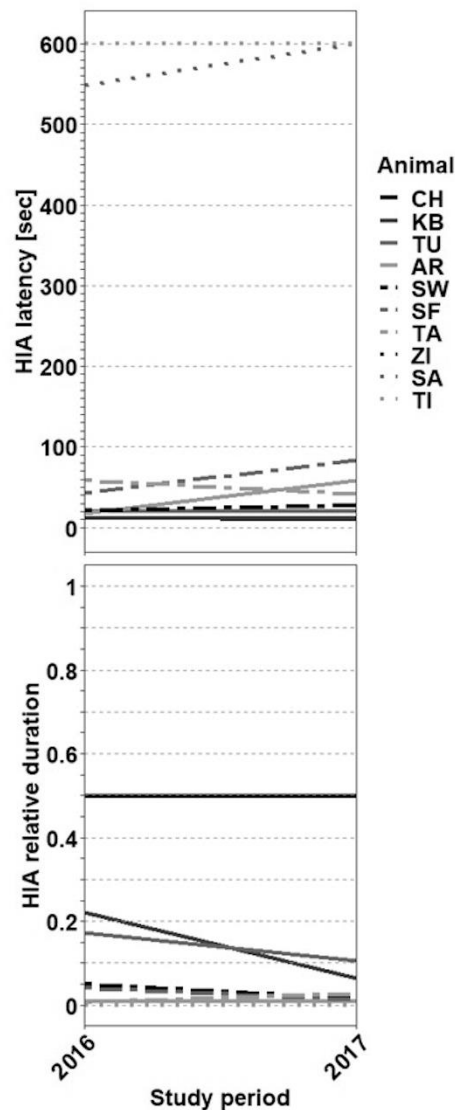


Figure 2: Average (median) latency and relative duration of High-Interest-Activity (HIA) in the two study periods (2016, 2017). The animals are sorted from top to bottom in ascending order according to the median of HIA latency.

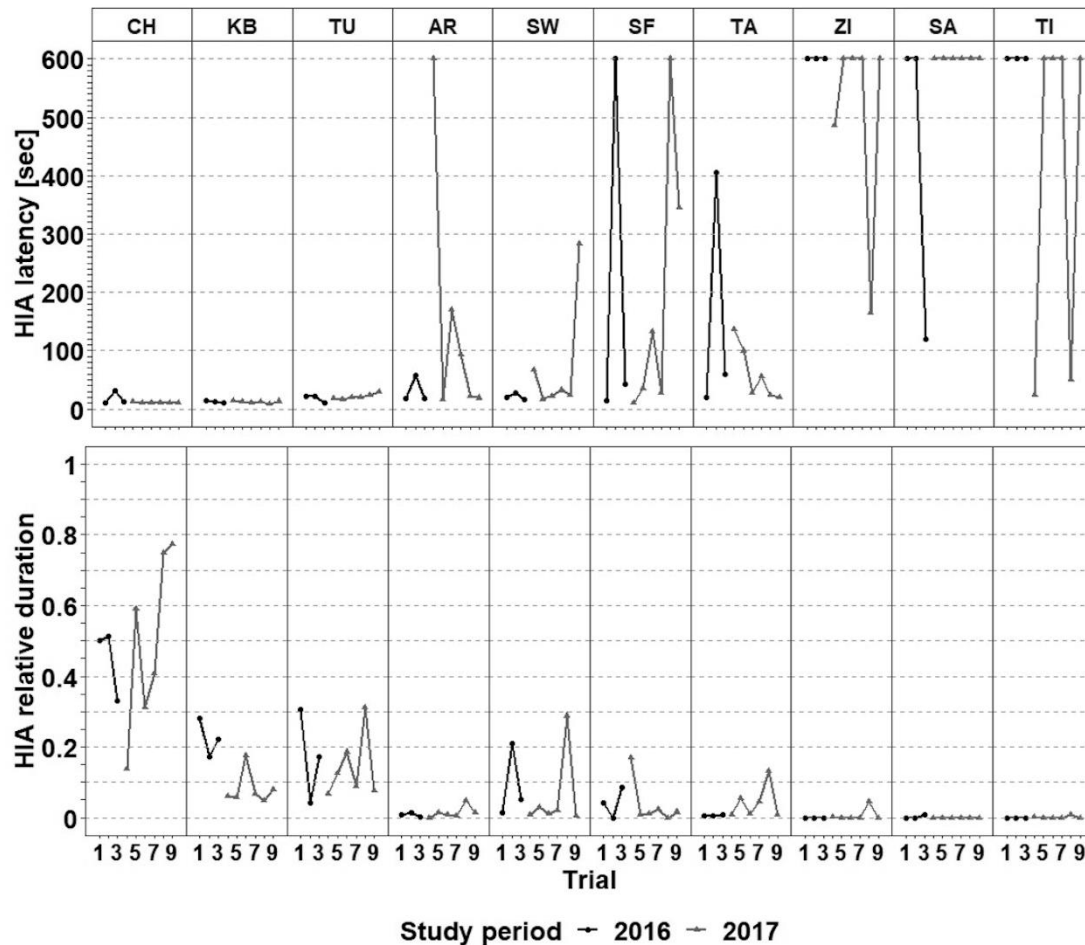


Figure 3: Latency and relative duration of High-Interest-Activity (HIA) of each animal in each trial and study period. Study period of trials is indicated by color (black: 2016, grey: 2017). The animals are sorted from left to right in ascending order according to the median of HIA latency.

3.3 Consistency and agreement repeatability of the NOV response

As illustrated in Figure 4, the rank order of the animals in the HIA latency and relative duration was consistent between 2016 and 2017 based on high and significantly positive Spearman correlations of average levels between study periods (HIA latency: $r_s=0.88$, $p<0.001$, $n=10$; HIA relative duration: $r_s=0.91$, $p<0.001$, $n=10$). The rank order of animals in the NOV response was also consistent between trials. The Spearman correlation coefficients were mostly above 0.5, that is the consistency was predominantly high (Table S3 and Table S4). Spearman correlations coefficients lower than 0.5 between two trials always involved trial 4.

The binary NOV response was significantly repeatable ($R=0.71$, $CI=0.23-0.97$, $p<0.001$ [LRT], $p=0.001$ [permutation]).

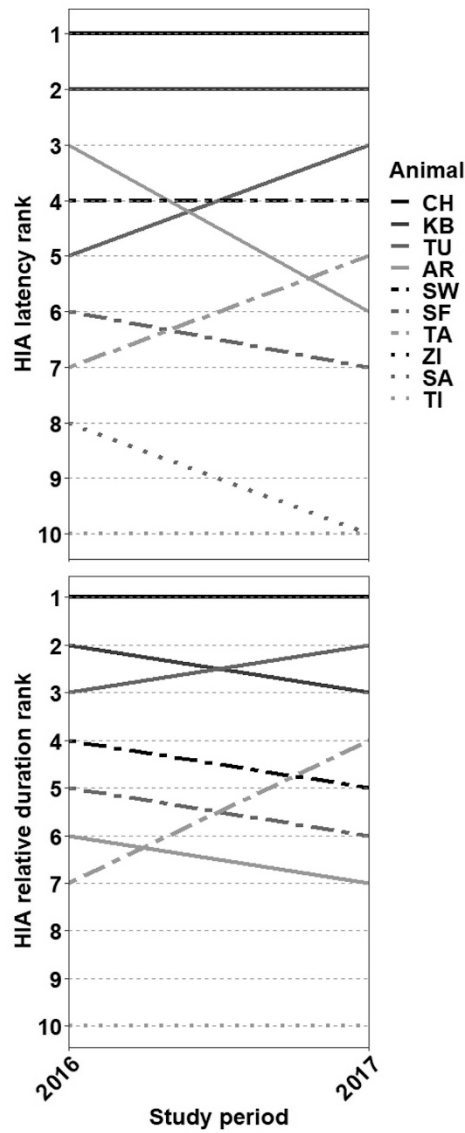


Figure 4: Rank order of animals in the average (median) latency and relative duration of High-Interest-Activity (HIA) in the two study periods (2016, 2017). The animals are sorted from top to bottom in ascending order according to the median of HIA latency. Rank 1-10=increasing latency, decreasing relative duration.

Table S3: Spearman's rank correlation matrix for the latency of High-Interest-Activity (HIA) recorded in trial 1 to 9 (n=10).

HIA latency									
Trial									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Trial	1	1	-	-	-	-	-	-	-
2	0.55	1	-	-	-	-	-	-	-
3	0.73	0.93**	1	-	-	-	-	-	-
4	0.60	0.30	0.49	1	-	-	-	-	-
5	0.88*	<i>0.81</i>	0.90*	0.46	1	-	-	-	-
6	0.78	0.85*	0.90*	0.63	0.86*	1	-	-	-
7	0.84	0.75	0.89*	0.77	0.86*	0.96***	1	-	-
8	0.66	0.86*	0.77	0.22	0.86*	0.75	0.64	1	-
9	0.84	0.75	0.79	0.34	0.93**	<i>0.84</i>	0.79	0.87*	1

Note: Two-sided Spearman's rank correlation, $p < 0.05$ *, $p < 0.01$ **, $p < 0.001$ ***, correlation coefficients ≥ 0.5 are highlighted in grey. Bold: $p < 0.05$, italic: $p < 0.1$.

Table S4: Spearman's rank correlation matrix for the relative duration of High-Interest-Activity (HIA) recorded in trial 1 to 9 (n=10).

HIA relative duration									
Trial									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Trial	1	1	-	-	-	-	-	-	-
2	0.77	1	-	-	-	-	-	-	-
3	0.90**	0.69	1	-	-	-	-	-	-
4	<i>0.81</i>	0.42	0.77	1	-	-	-	-	-
5	0.89*	0.87*	0.79	0.63	1	-	-	-	-
6	0.99***	0.76	0.92**	0.86*	0.91**	1	-	-	-
7	0.93**	0.74	0.86*	0.78	0.96***	0.96***	1	-	-
8	0.68	0.88*	0.52	0.42	0.88*	0.70	0.76	1	-
9	0.95***	0.70	0.86*	0.73	0.88*	0.94**	0.93**	0.59	1

Note: Two-sided Spearman's rank correlation, $p < 0.05$ *, $p < 0.01$ **, $p < 0.001$ ***, correlation coefficients ≥ 0.5 are highlighted in grey. Bold: $p < 0.05$, italic: $p < 0.1$.

4. Discussion

The present study found intra- and inter-individual variation in the HIA latency and relative duration in the NOV (NOV response) in ten African elephants. The intra-individual variation was relatively low in most animals in both behavioral measures of the NOV response. The inter-individual variation of the NOV response was characterized by the emergence of two extreme groups differing significantly in the HIA latency and relative duration. Furthermore,

we demonstrated rank-order consistency of the NOV response across time and detected agreement repeatability of the binary NOV response in our study group.

4.1 Inter-individual variation in the NOV response

The African elephants studied differed significantly in the NOV response. The consistency and repeatability of the NOV response confirms the stability of these inter-individual differences over time. This finding is essential for the definition of a personality trait (Sih et al., 2004). Studies in many other species found that the animals differed consistently in the behavior in the NOV and, therefore, defined a personality trait which they called neophobia, boldness or exploratory tendency (e.g., domestic rabbits: Andersson et al., 2014; fallow deer, *Dama dama*: Bergvall et al., 2011; vervet monkey: Blaszczyk, 2017; swift fox, *Vulpes velox*: Bremner-Harrison et al., 2004). In addition, personality studies confirmed that African elephants possess similar personality traits, which were labeled curiosity (Horback et al., 2013; Yasui et al., 2013) respectively playfulness (Lee and Moss, 2012). We assume, therefore, that the inter-individual differences in the NOV response found here in African elephants are also related to this trait. For simplicity, we will use “boldness” to specify the stable behavioral differences in the NOV response between the animals of the present study. When citing studies, we will mention the respective term used by the authors.

In the group of African elephants studied here, CH, KB and TU were extreme animals ranging at the bold end of the bold-shy-scale. Based on the assumption of Horback et al. (2013), these animals probably need a higher level of enrichment. SA, TI and ZI, in contrast, are rather shy animals that potentially only need a lower enrichment level. SW, SF, AR and TA are intermediate animals, that is they range between bold and shy. Their enrichment need cannot be specified but potentially depends on other environmental (housing) conditions to a higher degree than in the extreme animals.

Differences in management and housing (Baker and Pullen, 2013; Carlstead et al., 1999a) may have promoted these consistent differences between bold and shy animals in the present study. Especially the level of enrichment with objects may have influenced the individual experiences with (novel) objects and, therefore, the individual NOV responses observed (Christensen et al., 2008; Mettke-Hofmann et al., 2006). Based on the more frequent use of enrichment objects, the animals in Erfurt were potentially more experienced with NOVs than the animals housed in the other two zoos. As two of the three bold animals were housed in Erfurt (CH and KB), the results of the present study indicate that the experienced animals were bolder, that is showed lower HIA latencies and higher durations. Studies in different species of

birds partly support this relationship between the experience with objects and the NOV response (Heinrich et al., 1995; Jones and Waddington, 1992; Meehan and Mench, 2002). In other studies, however, experienced animals showed higher approach latencies (garden warbler, *Sylvia borin*: Mettke-Hofmann et al., 2006; domestic pig: Pearce and Paterson, 1993) respectively lower HIA durations (domestic pig: Bracke and Spoolder, 2008; Pearce and Paterson, 1993; Amazon parrot, *Amazona amazonica*: Meehan and Mench, 2002) than inexperienced animals. The authors explained these unexpected findings with object generalization based on neutral experiences (Mettke-Hofmann et al., 2006) respectively reduced motivation to interact with objects (e.g., Meehan and Mench, 2002). The bold animals in the present study may have generalized across objects based on positive experiences (i.e., they knew objects as food containers and/or “toys”) and, therefore, considered NOVs as beneficial. This would explain both the low HIA latencies, that is low neophobia (Meehan and Mench, 2002), and high durations, that is high motivation to engage in object manipulation in general, a behavior already described before in African elephants (Greco et al., 2013; Lee and Moss, 2014). The shy animals, in contrast, may have been more neophobic in the face of NOVs based on limited (positive) experiences with objects.

The animals in the present study did not group according to their zoos. Therefore, other factors besides differences or similarities in housing and management have to be taken into account when attempting to explain different degrees of NOV responses respectively boldness in animals housed in the same and in different zoos. First, older elephants were shown to be less curious and playful than younger elephants (Lee and Moss, 2012). This could additionally explain the low to intermediate boldness of the older adults AR, ZI and SF. Second, elephants are highly social animals (Archie et al., 2006; Evans and Harris, 2008). Therefore, we cannot totally exclude that the social context during the test also influenced the NOV response. It is possible, for example, that SA and TI (mother and daughter) behaved in a similarly shy manner because they went through the test together. However, the comparison of these two animals on the trial level shows that lower latencies did not occur in the same trials, that is they did not join forces to approach NOVs, as it was shown in ravens for siblings (*Corvus corax*, Stöwe et al., 2006). In addition, the presence of a calf may have influenced the NOV responses of the respective mother (SA, SW) and sister (TI). For example, it is conceivable that cows in this new situation maintained proximity to their calves (Lee, 1987). In addition, we observed that the bull calf of SW interacted with the NOV thereby virtually occupying the NOV. These findings of potential social effects on the NOV responses could be seen as an incentive for future studies to compare NOV responses of the same elephants in different social contexts.

4.2 Intra-individual variation in the NOV response

The present study found that extreme animals behaved more stable across trials than the intermediate animals. Stamps and Groothuis (2010) discussed two potential causes for this finding. First, extreme individuals might seek out situations which promote their behavioral tendency. This would lower intra-individual variation in these animals compared to intermediate animals, which respond more flexibly to environmental changes. Second, behavioral tests with limited durations are subjected to ceiling or floor effects. For example, animals showing maximal latencies cannot further increase their latencies, while intermediate animals can change their behavior in both directions. Experimental protocols allowing animals to both increase and decrease their behavior can control for these methodological effects. In the present study, selecting the NOVs appropriately would have been difficult because of the lack of knowledge how elephants in general respond to different object properties.

In addition, it is conceivable that the potential inter-individual differences in experience with (novel) objects did not only determine the difference between bold and shy animals, as described above, but also the degree of intra-individual variation. Mettke-Hofmann et al. (2006) assumed that experienced animals showed higher HIA latencies because they were unconcerned about NOVs, that is they considered NOVs neither as dangerous nor as beneficial. Analogous to this assumption, limited experience with objects could have led to constantly low NOV responses in the shy animals in the present study, while positive experiences may have favored constantly high NOV responses in the bold animals.

The high intra-individual variation found in the intermediate animals and in the relative duration of bold animals can have several causes. Besides previous experience with specific NOVs, the properties of the NOV, for example, color (Christensen et al., 2008) and complexity (Mettke-Hofmann et al., 2006), may have influenced the response. In addition, rodents (Heyser and Chemero, 2012) and birds (Mettke-Hofmann et al., 2002) interacted longer with NOVs which allowed species-typical behaviors than with NOVs which did not allow these behaviors. In the present study, we used NOVs with different properties in order to avoid habituation, which may have occurred when using similar types of objects (Christensen et al., 2008; Wuerz and Krüger, 2015). Furthermore, all NOVs used in the present study allowed similar and elephant-typical manipulation behaviors including kicking, striking, stepping on it, piercing with the tusk, throwing and biting. Therefore, the NOV properties may have influenced with what behaviors and how long the bold elephants dealt with the NOV but not how quickly they approached the NOV. In the intermediate animals, however, neophobia (i.e., the latencies)

rather than motivation to manipulate NOVs (i.e., the relative durations) may have been influenced by NOV properties.

Besides the NOV properties, environmental variation between trials may have resulted in intra-individual variation in the NOV response, as the animal may have been “distracted” from the NOV differently depending on the stimuli available in the test arena in the different trials (Bracke and Spoolder, 2008). These stimuli included substrate, water, feces and food rests. Horses, for example, had less contact with the NOV when food was available (Bulens et al., 2015). To control for such “distraction” the test arena was cleaned from food and feces before each NOV trial. Other confounding environmental conditions, however, were difficult to control for, like the behavior of the other elephants separated next to the retreat or the frequency of keepers passing.

Moreover, different experiences immediately before NOV trials may have resulted in intra-individual variation. A study in pigs showed that animals experiencing enrichment shortly before the NOV interacted less with the NOV (Bracke and Spoolder, 2008). Furthermore, social experiences prior to the NOV could also influence the NOV response, as shown in rainbow trout (*Onchorhynchus mykiss*, Frost et al., 2007).

4.3 Consistency and agreement repeatability of the NOV response

The NOV response of the African elephants studied was repeatable. Many studies also demonstrated repeatability of the NOV response (domestic rabbits: Andersson et al., 2014; chacma baboon: Carter et al., 2012; barnacle goose: Kurvers et al., 2010; mouse lemur: Verdolin and Harper, 2013). Low repeatability of the NOV response was explained by high intra-individual variation (Massen et al., 2013; Wuerz and Krüger, 2015) and low validity of the NOV to measure neophobia in the respective species (Logan, 2016). In the present study, the NOV response of most animals showed relatively low intra-individual variation compared to high inter-individual variation, which may explain the high repeatability of both measures of the NOV response (Bell et al., 2009). Furthermore, in order to demonstrate the validity of the NOV as a test of the enrichment need in the African elephant, the enrichment level before a NOV trial could be experimentally controlled. In general, lower enrichment levels should be associated with greater NOV responses (Bracke and Spoolder, 2008; Schulze Westerath et al., 2009). In addition, animals with higher enrichment needs (i.e., bold animals) should generally show a higher NOV response than animals with lower enrichment needs, regardless of the enrichment level before the NOV.

Different rank orders of the animals explained the low consistency between some trials and trial 4. Such rank swaps occur when animals change their behavior in different ways, which results in relatively low consistency (Bell et al., 2009). AR and SF, for example, changed their ranks between trial 2 and trial 4. The latency of AR was maximal in trial 4, which may be related to the door accidentally being closed in this trial. AR, therefore, had a much higher rank in this trial than in the other trials, as the other animals did not increase their latencies to the same degree (including CH, the animal in which the door had also been closed). This finding of low consistency in the present study highlights the importance to determine repeatability (Logan, 2016; Wuerz and Krüger, 2015).

The binary NOV response showed high agreement repeatability. This result reflects the bimodal distribution of the HIA latencies measured in the present study: Most animals showed this behavior repeatedly within 90 sec, while the remaining animals displayed considerably higher latencies (ZI, SA and TI). Therefore, our results suggest that implementing NOV within the routine of elephant management could be further simplified by shortening the test duration and recording only the HIA latency of each animal.

5. Conclusion

The present study demonstrated consistent behavioral differences in response to a novel object in the African elephants studied. This finding suggests that the NOV response may reflect a personality trait comparable to boldness in other species. In addition, the evidence of the consistency of this behavior found in the present study suggests that the NOV could be a reliable indicator of the individual enrichment needs of African elephants. Bold animals may need a more varied enrichment program to maintain stimulation, while shy animals may require a less variable schedule (Horback et al., 2013). It is conceivable that the individual previous experience may determine whether an elephant behaves boldly or shyly in the face of a NOV. Future studies could replicate the present study in other elephant groups and additionally record enrichment levels in order to entangle the relationship between individual experience, boldness and the enrichment need.

Acknowledgments

We thank Opel-Zoo Kronberg (Dr. Thomas Kauffels, Dr. Martin Becker and Jörg Beckmann), Grüner Zoo Wuppertal (Dr. Arne Lawrenz) and Thüringer Zoopark Erfurt (Dr. Dr.

Sabine Merz and Tina Risch) for supporting the present study. We are also grateful to the keepers for cooperation in conducting the many novel object tests. In addition, special thanks to Dr. Ann-Kathrin-Oerke and Dr. Michael Heistermann for valuable advice regarding the experimental set-up. Finally, we also thank Prof. Dr. Johannes Hartig (Leibniz-Institute for Research and Information on Education, Frankfurt am Main) for support in data analysis.

Funding

This work was supported by the Opel-Zoo Foundation Professorship Zoo Biology, which is financed by the von Opel Hessische Zoostiftung.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

References

- Andersson, A., Laikre, L., & Bergvall, U. A. (2014). Two shades of boldness: Novel object and anti-predator behavior reflect different personality dimensions in domestic rabbits. *Journal of Ethology*, *32*, 123–136. <https://doi.org/10.1007/s10164-014-0401-9>.
- Archie, E. A., Morrison, T. A., Foley, C. A. H., Moss, C. J., & Alberts, S. C. (2006). Dominance rank relationships among wild female African elephants, *Loxodonta africana*. *Animal Behaviour*, *71*, 117–127. <https://doi.org/10.1016/j.anbehav.2005.03.023>.
- Baker, K., & Pullen, P. K. (2013). The impact of housing and husbandry on the personality of cheetah (*Acinonyx jubatus*). *Journal of Zoo and Aquarium Research*, *1*, 35–40. <https://doi.org/10.19227/jzar.v1i1.11>.
- Baugh, A. T., van Oers, K., Dingemanse, N. J., & Hau, M. (2014). Baseline and stress-induced glucocorticoid concentrations are not repeatable but covary within individual great tits (*Parus major*). *General and Comparative Endocrinology*, *208*, 154–163. <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2014.08.014>.
- Bell, A. M., Hankison, S. J., & Laskowski, K. L. (2009). The repeatability of behaviour: A meta-analysis. *Animal Behaviour*, *77*, 771–783. <https://doi.org/10.1016/j.anbehav.2008.12.022>.
- Bergvall, U. A., Schäpers, A., Kjellander, P., & Weiss, A. (2011). Personality and foraging decisions in fallow deer, *Dama dama*. *Animal Behaviour*, *81*, 101–112. <https://doi.org/10.1016/j.anbehav.2010.09.018>.
- Blaszczyk, M. B. (2017). Boldness towards novel objects predicts predator inspection in wild vervet monkeys. *Animal Behaviour*, *123*, 91–100. <https://doi.org/10.1016/j.anbehav.2016.10.017>.
- Bracke, M. B. M., & Spoolder, H. A. M. (2008). Novel object test can detect marginal differences in environmental enrichment in pigs. *Applied Animal Behaviour Science*, *109*, 39–48. <https://doi.org/10.1016/j.applanim.2007.01.014>.
- Bremner-Harrison, S., Prodohl, P. A., & Elwood, R. W. (2004). Behavioural trait assessment as a release criterion: Boldness predicts early death in a reintroduction programme of captive-bred swift fox (*Vulpes velox*). *Animal Conservation*, *7*, 313–320. <https://doi.org/10.1017/S1367943004001490>.

- Bulens, A., Sterken, H., van Beirendonck, S., van Thielen, J., & Driessen, B. (2015). The use of different objects during a novel object test in stabled horses. *Journal of Veterinary Behavior, 10*, 54–58. <https://doi.org/10.1016/j.jveb.2014.09.002>.
- Carlstead, K., Fraser, J., Bennett, C., & Kleiman, D. G. (1999a). Black rhinoceros (*Diceros bicornis*) in U.S. zoos: II. behavior, breeding success, and mortality in relation to housing facilities. *Zoo Biology, 18*, 35–52. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1098-2361\(1999\)18:1%3C35::AID-ZOO5%3E3.0.CO;2-L](https://doi.org/10.1002/(SICI)1098-2361(1999)18:1%3C35::AID-ZOO5%3E3.0.CO;2-L).
- Carlstead, K., Mellen, J., & Kleiman, D. G. (1999b). Black rhinoceros (*Diceros bicornis*) in U.S. zoos: I. individual behavior profiles and their relationship to breeding success. *Zoo Biology, 18*, 17–34. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1098-2361\(1999\)18:1<17::AID-ZOO4>3.3.CO;2-B](https://doi.org/10.1002/(SICI)1098-2361(1999)18:1<17::AID-ZOO4>3.3.CO;2-B).
- Carter, A. J., Feeney, W. E., Marshall, H. H., Cowlshaw, G., & Heinsohn, R. (2013). Animal personality: What are behavioural ecologists measuring? *Biological Reviews of the Cambridge Philosophical Society, 88*, 465–475. <https://doi.org/10.1111/brv.12007>.
- Carter, A. J., Marshall, H. H., Heinsohn, R., & Cowlshaw, G. (2012). How not to measure boldness: Novel object and antipredator responses are not the same in wild baboons. *Animal Behaviour, 84*, 603–609. <https://doi.org/10.1016/j.anbehav.2012.06.015>.
- Christensen, J. W., Zharkikh, T., & Ladewig, J. (2008). Do horses generalise between objects during habituation? *Applied Animal Behaviour Science, 114*, 509–520. <https://doi.org/10.1016/j.applanim.2008.03.007>.
- Cohen, J. (1992). A power primer. *Psychological Bulletin, 112*, 155–159. <https://doi.org/10.1037/0033-2909.112.1.155>.
- Coleman, K., Tully, L. A., & McMillan, J. L. (2005). Temperament correlates with training success in adult rhesus macaques. *American Journal of Primatology, 65*, 63–71. <https://doi.org/10.1002/ajp.20097>.
- Evans, K. E., & Harris, S. (2008). Adolescence in male African elephants, *Loxodonta africana*, and the importance of sociality. *Animal Behaviour, 76*, 779–787. <https://doi.org/10.1016/j.anbehav.2008.03.019>.
- Franks, B., Reiss, D., Cole, P., Friedrich, V., Thompson, N., & Higgins, E. T. (2013). Predicting how individuals approach enrichment: Regulatory focus in cotton-top tamarins (*Sanguinus oedipus*). *Zoo Biology, 32*, 427–435. <https://doi.org/10.1002/zoo.21075>.

- Friard, O., & Gamba, M. (2016). BORIS: A free, versatile open-source event-logging software for video/audio coding and live observations. *Methods in Ecology and Evolution*, 7, 1325–1330. <https://doi.org/10.1111/2041-210X.12584>.
- Frost, A. J., Winrow-Giffen, A., Ashley, P. J., & Sneddon, L. U. (2007). Plasticity in animal personality traits: Does prior experience alter the degree of boldness? *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 274, 333–339. <https://doi.org/10.1098/rspb.2006.3751>.
- Greco, B. J., Brown, T. K., Andrews, J. R. M., Swaisgood, R. R., & Caine, N. G. (2013). Social learning in captive African elephants (*Loxodonta africana africana*). *Animal Cognition*, 16, 459–469. <https://doi.org/10.1007/s10071-012-0586-7>.
- Greenberg, R., & Mettke-Hofmann, C. (2001). Ecological aspects of neophobia and neophilia in birds. *Current Ornithology*, 16, 119–178. https://doi.org/10.1007/978-1-4615-1211-0_3.
- Guenther, A., Brust, V., Dersen, M., & Trillmich, F. (2014). Learning and personality types are related in caviies (*Cavia aperea*). *Journal of Comparative Psychology*, 128, 74–81. <https://doi.org/10.1037/a0033678>.
- Hall, B. A., Melfi, V., Burns, A., McGill, D. M., & Doyle, R. E. (2018). Curious creatures: A multi-taxa investigation of responses to novelty in a zoo environment. *PeerJ*, 6, e4454. <https://doi.org/10.7717/peerj.4454>.
- Heinrich, B., Marzluff, J., & Adams, W. (1995). Fear and food recognition in naive common ravens. *The Auk*, 112, 499–503. <https://doi.org/10.2307/4088740>.
- Heyser, C. J., & Chemero, A. (2012). Novel object exploration in mice: Not all objects are created equal. *Behavioural Processes*, 89, 232–238. <https://doi.org/10.1016/j.beproc.2011.12.004>.
- Highfill, L. E. (2008). The use of personality assessments in designing environmental enrichment for Garnett’s bushbabies (*Otolemur garnettii*) (Dissertation). The University of Southern Mississippi, Hattiesburg. Accessed 2 February 2020, retrieved from <https://aquila.usm.edu/dissertations/1143>.
- Horback, K. M., Miller, L. J., & Kuczaj, S. A. (2013). Personality assessment in African elephants (*Loxodonta africana*): Comparing the temporal stability of ethological coding versus trait rating. *Applied Animal Behaviour Science*, 149, 55–62. <https://doi.org/10.1016/j.applanim.2013.09.009>.

- Jones, B. R., & Waddington, D. (1992). Modification of fear in domestic chicks, *Gallus gallus domesticus*, via regular handling and early environmental enrichment. *Animal Behaviour*, *43*, 1021–1033. [https://doi.org/10.1016/S0003-3472\(06\)80015-1](https://doi.org/10.1016/S0003-3472(06)80015-1).
- King, J. E., Weiss, A., & Farmer, K. H. (2005). A chimpanzee (*Pan troglodytes*) analogue of cross-national generalization of personality structure: Zoological parks and an African sanctuary. *Journal of Personality*, *73*, 389–410. <https://doi.org/10.1111/j.1467-6494.2005.00313.x>.
- Kurvers, R. H. J. M., Prins, H. H. T., van Wieren, S. E., van Oers, K., Nolet, B. A., & Ydenberg, R. C. (2010). The effect of personality on social foraging: Shy barnacle geese scrounge more. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, *277*, 601–608. <https://doi.org/10.1098/rspb.2009.1474>.
- Lee, P. C. (1987). Allomothering among African elephants. *Animal Behaviour*, *35*, 278–291. [https://doi.org/10.1016/S0003-3472\(87\)80234-8](https://doi.org/10.1016/S0003-3472(87)80234-8).
- Lee, P. C., & Moss, C. J. (2014). African elephant play, competence and social complexity. *Animal Behavior and Cognition*, *1*, 144–156. <https://doi.org/10.12966/abc.05.05.2014>.
- Lee, P. C., & Moss, C. J. (2012). Wild female African elephants (*Loxodonta africana*) exhibit personality traits of leadership and social integration. *Journal of Comparative Psychology*, *126*, 224–232. <https://doi.org/10.1037/a0026566>.
- Logan, C. J. (2016). Behavioral flexibility in an invasive bird is independent of other behaviors. *PeerJ*, *4*, e2215. <https://doi.org/10.7717/peerj.2215>.
- Martin, J. G.A., & Réale, D. (2008). Temperament, risk assessment and habituation to novelty in eastern chipmunks, *Tamias striatus*. *Animal Behaviour*, *75*, 309–318. <https://doi.org/10.1016/j.anbehav.2007.05.026>.
- Massen, J. J. M., Antonides, A., Arnold, A.-M. K., Bionda, T., & Koski, S. E. (2013). A behavioral view on chimpanzee personality: Exploration tendency, persistence, boldness, and tool-orientation measured with group experiments. *American Journal of Primatology*, *75*, 947–958. <https://doi.org/10.1002/ajp.22159>.
- McComb, K., Baker, L., & Moss, C. (2006). African elephants show high levels of interest in the skulls and ivory of their own species. *Biology Letters*, *2*, 26–28. <https://doi.org/10.1098/rsbl.2005.0400>.
- Meehan, C. L., & Mench, J. A. (2002). Environmental enrichment affects the fear and exploratory responses to novelty of young Amazon parrots. *Applied Animal Behaviour Science*, *79*, 75–88. [https://doi.org/10.1016/S0168-1591\(02\)00118-1](https://doi.org/10.1016/S0168-1591(02)00118-1).

- Mettke-Hofmann, C., Rowe, K. C., Hayden, T. J., & Canoine, V. (2006). Effects of experience and object complexity on exploration in garden warblers (*Sylvia borin*). *Journal of Zoology*, 268, 405–413. <https://doi.org/10.1111/j.1469-7998.2005.00037.x>.
- Mettke-Hofmann, C., Winkler, H., & Leisler, B. (2002). The significance of ecological factors for exploration and neophobia in parrots. *Ethology*, 108, 249–272. <https://doi.org/10.1046/j.1439-0310.2002.00773.x>.
- Myers, P. J., & Young, J. K. (2018). Consistent individual behavior: Evidence of personality in black bears. *Journal of Ethology*, 36, 117–124. <https://doi.org/10.1007/s10164-018-0541-4>.
- Nakagawa, S., & Schielzeth, H. (2010). Repeatability for Gaussian and non-Gaussian data: A practical guide for biologists. *Biological Reviews of the Cambridge Philosophical Society*, 85, 935–956. <https://doi.org/10.1111/j.1469-185X.2010.00141.x>.
- Pearce, G. P., & Paterson, A. M. (1993). The effect of space restriction and provision of toys during rearing on the behaviour, productivity and physiology of male pigs. *Applied Animal Behaviour Science*, 36, 11–28. [https://doi.org/10.1016/0168-1591\(93\)90095-7](https://doi.org/10.1016/0168-1591(93)90095-7).
- Pohlert, T. (2014). The pairwise multiple comparison of mean ranks package (PMCMR). Accessed 2 February 2020, retrieved from <https://CRAN.R-project.org/package=PMCMR>.
- Powell, D. M., & Svoke, J. T. (2008). Novel environmental enrichment may provide a tool for rapid assessment of animal personality: A case study with giant pandas (*Ailuropoda melanoleuca*). *Journal of Applied Animal Welfare Science : JAAWS*, 11, 301–318. <https://doi.org/10.1080/10888700802329673>.
- R Core Team (2019). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing. Accessed 2 February 2020, retrieved from <https://www.R-project.org/>.
- Schulze Westerath, H., Laister, S., Winckler, C., & Knierim, U. (2009). Exploration as an indicator of good welfare in beef bulls: An attempt to develop a test for on-farm assessment. *Applied Animal Behaviour Science*, 116, 126–133. <https://doi.org/10.1016/j.applanim.2008.08.012>.
- Sih, A., Bell, A. M., Johnson, J. C., & Ziemba, R. E. (2004). Behavioral syndromes: An integrative overview. *The Quarterly Review of Biology*, 79, 241–277. <https://doi.org/10.1086/422893>.

- Stamps, J., & Groothuis, T. G. G. (2010). The development of animal personality: Relevance, concepts and perspectives. *Biological Reviews of the Cambridge Philosophical Society*, *85*, 301–325. <https://doi.org/10.1111/j.1469-185X.2009.00103.x>.
- Stoffel, M. A., Nakagawa, S., & Schielzeth, H. (2017). rptR: Repeatability estimation and variance decomposition by generalized linear mixed-effects models. *Methods in Ecology and Evolution*, *8*, 1639–1644. <https://doi.org/10.1111/2041-210X.12797>.
- Stöwe, M., Bugnyar, T., Heinrich, B., & Kotrschal, K. (2006). Effects of group size on approach to novel objects in ravens (*Corvus corax*). *Ethology*, *112*, 1079–1088. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0310.2006.01273.x>.
- Van Reenen, C. G., O'Connell, N. E., van der Werf, J. T. N., Korte, S. M., Hopster, H., Jones, R. B., & Blockhuis, H. J. (2005). Responses of calves to acute stress: Individual consistency and relations between behavioral and physiological measures. *Physiology & Behavior*, *85*, 557–570. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2005.06.015>.
- Verdolin, J. L., & Harper, J. (2013). Are shy individuals less behaviorally variable? Insights from a captive population of mouse lemurs. *Primates; Journal of Primatology*, *54*, 309–314. <https://doi.org/10.1007/s10329-013-0360-8>.
- Visser, E. K., van Reenen, C. G., Hopster, H., Schilder, M. B. H., Knaap, J. H., Barneveld, A., & Blockhuis, H. J. (2001). Quantifying aspects of young horses' temperament: Consistency of behavioural variables. *Applied Animal Behaviour Science*, *74*, 241–258. [https://doi.org/10.1016/S0168-1591\(01\)00177-0](https://doi.org/10.1016/S0168-1591(01)00177-0).
- Watters, J. V., & Powell, D. M. (2012). Measuring animal personality for use in population management in zoos: Suggested methods and rationale. *Zoo Biology*, *31*, 1–12. <https://doi.org/10.1002/zoo.20379>.
- Wuerz, Y., & Krüger, O. (2015). Personality over ontogeny in zebra finches: Long-term repeatable traits but unstable behavioural syndromes. *Frontiers in Zoology*, *12*, S9. <https://doi.org/10.1186/1742-9994-12-S1-S9>.
- Yasui, S., Konno, A., Tanaka, M., Idani, G. 'i., Ludwig, A., Lieckfeldt, D., & Inoue-Murayama, M. (2013). Personality assessment and its association with genetic factors in captive Asian and African elephants. *Zoo Biology*, *32*, 70–78. <https://doi.org/10.1002/zoo.21045>.