

Inaugural-Dissertation zur Erlangung der Doktorwürde der Tierärztlichen
Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München

**Methode der Speichelprobenentnahme und
Cortisolmessung im Speichel und im Blut bei
Großen Tümmlern (*Tursiops truncatus*)**

von Daniela Erika Rickert

aus Freiburg

München 2023

Aus dem Veterinärwissenschaftlichen Department der Tierärztlichen
Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München

Lehrstuhl für Tierschutz, Verhaltenskunde, Tierhygiene und Tierhaltung

Arbeit angefertigt unter der Leitung von
Univ.-Prof. Dr. Michael H. Erhard

Angefertigt im Tiergarten Nürnberg
Mentor: Dr. Lorenzo von Fersen

Gedruckt mit der Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität München

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Reinhard K. Straubinger, Ph.D.

Berichterstatter: Univ.-Prof. Dr. Michael H. Erhard

Korreferent/en: Univ.-Prof. Dr. Bernd Kaspers

Tag der Promotion: 11. Februar 2023

Meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis

I. EINLEITUNG	1
II. LITERATURÜBERSICHT	3
1 RECHTLICHE BESTIMMUNGEN.....	3
2 BEGRIFFSBESTIMMUNGEN	3
2.1 Artgerechte Tierhaltung.....	3
2.2 Wohlbefinden.....	4
3 STRESS.....	6
3.1 Allgemeines	6
3.2 Endokrine Stressantwort	9
3.3 Neuronale Stressantwort.....	10
3.4 Akuter Stress	10
3.5 Chronischer Stress	11
3.6 Cortisolsekretion bei Walen.....	12
4 STEROIDMESSUNGEN BEI MEERESSÄUGERN	14
5 SPEICHELUNTERSUCHUNGEN	16
6 BLUTUNTERSUCHUNGEN	17
7 ZIEL DER UNTERSUCHUNG	17
III. VERÖFFENTLICHUNG	19
IV. ERWEITERTE DISKUSSION	43
1 VERDÜNNUNGSREIHE	43
2 SPEICHEL CORTISOLWERTE DER GROßEN TÜMMLER IN NÜRNBERG IM VERGLEICH ZU ANDEREN HALTUNGEN	45
3 ABHÄNGIGKEIT DES BLUTCORTISOLLEVELS VON DER ART DER PROBENNAHME	47
4 SIMULTANE BLUT- UND SPEICHELPROBENNAHME.....	50
5 CORTISOL IM FUTTERFISCH	51

6	FUTTEREXPERIMENT I UND II	52
7	FAZIT.....	53
V.	ZUSAMMENFASSUNG	56
VI.	SUMMARY	58
VII.	ERWEITERTES LITERATURVERZEICHNIS	60
VIII.	PUBLIKATIONEN	75
1	ORIGINALARTIKEL	75
2	KONGRESSBEITRAG	75
IX.	DANKSAGUNG	76

Abkürzungsverzeichnis

ACTH	Adrenocorticotropes Hormon
BMEL	Bundesministerium für Ernährung und Landwirtschaft
CRH	Corticotropin Releasing Hormon
EAAM	European Association for Aquatic Mammals
EAZA	European Association of Zoos and Aquaria
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
HHN-Achse	Hypothalamus-Hypophysen- Nebennierenrinden-Achse
HPA axis	hypothalamic-pituitary-adrenal axis
LC-MS/MS	Liquid-Chromatographie- Massenspektrometrie/Massenspektrometrie
LoB	Leerwertgrenze (Limit of Blank)
LoD	Nachweisgrenze (Limit of Detection)
POMC	Proopiomelanocortin
RIA	Radioimmunoassay
SAM-Aktivierung	Sympathikus-Nebennierenmark-Aktivierung
TierSchG	Tierschutzgesetz
TierSchTrV	Tierschutztransportverordnung
U/min	Umdrehungen pro Minute
VO (EG) 1/2005	Verordnung 1/2005 zum Schutz der Tiere beim Transport
WHO	World Health Organization - Weltgesundheitsorganisation
ZNS	Zentrales Nervensystem

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1	Anzahl nüchtern genommener Speichelproben	46
Tabelle 2	Durchschnittliche Cortisolwerte für die beiden Experimente und die unterschiedlichen Individuen	46

I. Einleitung

Delfine gehören zu der biologisch nicht einheitlichen Gruppe der Meeressäuger. Diese beinhaltet drei Hauptgruppen: die Fleischfresser (*Carnivora*), die Wale (*Cetacea*) und die Seekühe (*Sirenia*).

Zu den Fleischfressern (*Carnivora*) gehören die Seeotter (*Enhydra ludris*) und Küstenotter (*Lontra felina*), die Robben (*Pinnipedia*), mit den Familien Ohrenrobber (*Otariidae*), Walrosse (*Odobenidae*) und Hundsrobber (*Phocidae*) und die Eisbären (*Ursus maritimus*).

Die Wale (*Cetacea*) werden in die Unterordnungen Bartenwale (*Mysticeti*) und Zahnwale (*Odontoceti*) geteilt, sie bilden die zweite Gruppe. Der Große Tümmler (*Tursiops truncatus*) gehört der Unterordnung der Zahnwale an.

Die dritte Gruppe sind die Seekühe (*Sirenia*) mit den Gabelschwanzseekühen (*Dugongidae*) und den Rundschwanzseekühen (*Trichechidae*) (REYNOLDS III et al., 1999).

Trotz der offensichtlichen phylogenetischen Unterschiede haben all diese Tiere dennoch Gemeinsamkeiten: Dazu gehören unter anderem ihre verhältnismäßig große Körpergröße, der stromlinienförmige Körper (im Vergleich zu den landlebenden Verwandten) und die Isolation durch Blubber (PABST et al., 1999).

Delfine, allen voran der Große Tümmler (*Tursiops truncatus*) werden seit ungefähr einhundert Jahren in menschlicher Obhut gehalten (BERTELSMANN, 1999). Die erste in menschlicher Obhut befindliche Gruppe von Delfinen wurde in Saint Augustine, Florida, in den späten 30iger Jahren des vorigen Jahrhunderts gehalten (NORRIS, 1991). Derzeit gibt es in Deutschland zwei Delfinarien. Diese sind in Duisburg und Nürnberg.

Da es sich bei Delfinen um intelligente und in der Haltung anspruchsvolle Tiere handelt ist eine engmaschige Kontrolle des Wohlbefindens der Tiere extrem wichtig. Ziel der vorliegenden Untersuchungen war es, durch die Untersuchung von Speichel auf ihren Cortisolgehalt eine Möglichkeit weiterzuentwickeln, Stress bei in menschlicher Obhut gehaltenen Tieren durch eine reproduzierbare wissenschaftliche Methode quantifizierbar zu machen. Dies kann beispielsweise neben Verhaltensbeobachtungen dabei helfen, Auswirkungen belastender Situationen bei Delfinen zu erkennen und daraus Schlussfolgerungen für den Umgang und die Haltung dieser Meeressäuger zu ziehen.

II. Literaturübersicht

1 Rechtliche Bestimmungen

Die Haltung von Tieren in Zoos wird in der Richtlinie 1999/22/EG näher beschrieben (RAT DER EUROPÄISCHEN UNION, 1999). Demnach müssen zoologische Einrichtungen Anforderungen an Forschung, Bildung und Artenschutz erfüllen. Sie benötigen dazu eine sogenannte Betriebserlaubnis. Diese ist in der deutschen Gesetzgebung im § 11 Tierschutzgesetz (TierSchG) (BMEL, 1972) festgelegt.

Die Verordnung (EG) 1/2005 (RAT DER EUROPÄISCHEN UNION, 2004) über den Schutz der Tiere beim Transport beinhaltet vor allem Bestimmungen über den Transport landwirtschaftlicher Nutztiere. Sie hat keine besonderen Vorschriften für Meeressäuger. Diese werden dafür aber in der nationalen Tierschutzgesetzgebung (TierSchTrV) (BMEL 2009) konkretisiert. Für den Transport von Meeressäugetieren gilt § 12 TierSchTrV, demnach Transporte von Meeressäugern von einer sachkundigen Person begleitet werden müssen.

2 Begriffsbestimmungen

2.1 Artgerechte Tierhaltung

Der § 2 TierSchG ist die „Grundvorschrift über die Tierhaltung“, sie gilt für alle Tiere, die sich in der Obhut des Menschen befinden (HIRT et al., 2016). Die Anforderungen an die Haltung von Tieren sind in verschiedenen Gutachten konkretisiert. Für die Haltung von Delfinen sind sie in den Mindestanforderungen zur Haltung von Säugetieren (BMEL, 2014) niedergelegt. Demnach sind Delfine in sozial stabilen Gruppen zu halten. Auch werden hier unter anderem Anforderungen

an die Luft- und Wasserqualität, die Pflege, den Transport und die Fütterung gestellt.

Die im § 2 TierSchG allgemein gehaltenen Anforderungen an eine artgerechte Tierhaltung, Ernährung und Pflege hat auch die European Association of Zoos and Aquaria (EAZA) (EAZA, 2020) noch weiter ausgeführt. Demnach sind Delfine, wie alle anderen Tiere im Zoo, täglich auf ihr Wohlbefinden und ihre Gesundheit zu überprüfen und falls nötig zu behandeln. Tiere dürfen nicht widernatürlich zur Belustigung des Publikums gereizt werden. Nur kompetente Trainer dürfen mit den Tieren umgehen. Andere Personen, die mit den Tieren umgehen, müssen unter deren Aufsicht stehen. Der Umgang mit den Tieren muss so vorsichtig sein, dass unnötiges Unbehagen, Stress oder akute physische Schäden vermieden werden.

2.2 Wohlbefinden

Der Begriff „Wohlbefinden“ taucht in der 1946 von der WHO geprägten Definition für Gesundheit auf. Demnach ist Gesundheit „Ein Zustand vollkommenen körperlichen, geistigen und sozialen Wohlbefindens und nicht allein das Fehlen von Krankheit und Gebrechen“ (WHO, 2005). Die Abwesenheit von Schmerzen, Leiden, sowie schweren Ängsten und ein ungestörter, artgemäßer sowie verhaltensgerechter Ablauf der Lebensvorgänge gelten dabei als Voraussetzung (HIRT et al., 2016). Als Indikatoren für Wohlbefinden gelten Gesundheit und Normalverhalten (SAMBRAUS und STEIGER, 1997). In der englischsprachigen Literatur wird der Begriff „animal welfare“ verwendet. Er wird häufig im Zusammenhang mit den „Fünf Freiheiten“ definiert, die vom Farm Animal Welfare Council, Vereinigtes Königreich bereits 1992 veröffentlicht wurden (BOTREAU et al., 2007). Diese Freiheiten bestehen aus der Freiheit von 1) Hunger und Durst, 2) Unbehagen, 3) Schmerz, Verletzung und Krankheit, 4) Angst und Leiden sowie 5) der Freiheit, natürliches

Verhalten auszuleben. Diese „Fünf Freiheiten“ stellen auch heute noch eine wichtige Grundlage dar, jedoch wurde der Anspruch an das Wohlbefinden weiterentwickelt. MELLOR (2016) entwickelte den Ansatz weiter hin zu einem „Leben, das es wert ist, gelebt zu werden“. Er stellt in seiner Arbeit dar, dass Mensch-Tier-Beziehungen Auswirkungen auf das Tierwohl haben können. Die Kenntnisse und Fähigkeiten der Tierpfleger, ihre Einstellungen und ihr Verhalten im Umgang mit den Tieren, und darüber hinaus auch ihre Bindung zu ihnen, können nicht nur zum Wohlergehen beitragen, sondern auch dazu führen, dass Tiere ein lebenswertes Leben haben. Mellor definiert dies als ein Leben, das den Tieren die Möglichkeiten eröffnet, verschiedenste positive Erfahrungen zu machen.

Bei Tieren in menschlicher Obhut werden seit einiger Zeit vermehrt Studien durchgeführt, um Aussagen über das Wohlbefinden der Tiere treffen zu können. Dies betrifft gehaltene Meeressäugetiere allgemein, wie BRANDO et al. (2018) in ihrem Übersichtsartikel darstellen, oder spezieller Wale und Delfine. So führten SERRES et al. (2020) Untersuchungen über verschiedene Arten des Schwimmverhaltens und dessen Zusammenhang mit Stress an den beiden Unterarten des Glattschweinswales, dem Jangtse-Glattschweinswal (*Neophocaena asiaeorientalis asiaeorientalis*) und dem Östlichen Glattschweinswal (*Neophocaena asiaeorientalis sunameri*) und dem Großen Tümmler (*Tursiops truncatus*) durch. LAUDERDALE et al. (2021) veröffentlichten eine Studie in welche Daten von 43 Zoos in sieben Ländern einfließen. Sie untersuchten Einfluss von Enrichment und Haltungsbedingungen auf Belugawale (*Delphinapterus leucas*), Indopazifische Große Tümmler (*Tursiops aduncus*), Große Tümmler (*Tursiops truncatus*) und Weißstreifendelfine (*Lagenorhynchus obliquidens*). Auch beim Schlankdelfin (*Stenella attenuata*) konnte der positive Einfluss von

Enrichment nachgewiesen werden (PEREZ et al., 2018), genauso wie beim Großen Tümmler (*Tursiops truncatus*) und beim Indogermanischen Großen Tümmler (*Tursiops aduncus*) (Lauderdale et al., 2021). DELFOUR et al. (2021) führten Verhaltensbeobachtungen an Großen Tümmlern (*Tursiops truncatus*) in elf verschiedenen europäischen Zoos durch. Auch andere in zoologischen Einrichtungen gehaltene Säugetiere wurden Verhaltensbeobachtungen unterzogen, um Rückschlüsse auf ihr Wohlbefinden zu ziehen. Dazu gehören beispielsweise Elefanten (*Loxodonta africana* und *Elephas maximus*) (YON et al., 2019), Braunbären (*Ursus arctos*) (SORIANO et al., 2019), Große Pandas (*Ailuropoda melanoleuca*) (OWEN et al., 2004) oder Vögel wie Entenvögel (ROSE und O'BRIEN, 2020) und Rosaflamingos (*Phoenicopterus roseus*) (REESE, 2020), und sogar Reptilien (WHITTAKER et al., 2021).

Zootiere können als Reaktion auf akuten und chronischen Stress und der Schwierigkeit darauf angemessen zu reagieren und diesen zu bewältigen (beispielsweise die Anwesenheit von Menschen, Lärm u. a.) Stereotypien entwickeln. Diese treten häufig mit organischen Erkrankungen auf, was die Gesundheit und das Wohlbefinden der Tiere beeinflusst (ROMANO et al., 2010).

3 Stress

3.1 Allgemeines

Nur wenige biomedizinische Begriffe sind so allgemein bekannt und in aller Munde wie das Wort Stress. Der Pionier der Stressforschung, Prof. Dr. Hans Selye schrieb in seinem populärwissenschaftlichen Werk „Stress beherrscht unser Leben“ (SELYE, 1984) wie sich der von ihm geprägte Begriff Stress, der aus dem Englischen kommt und

dessen ursprüngliche Bedeutung Zug oder Druck auf ein Material bedeutet, langsam in der Welt durchsetzte. „Welchen Wert wissenschaftliche Arbeit auch immer besitzen mag, so stelle ich jedenfalls befriedigt fest, praktisch jede Sprache der Welt durch mindestens einen Ausdruck bereichert zu haben.“

BROOM (1988) definiert Stress als einen Umwelteinfluss, der auf ein Individuum trifft und dessen Kontrollsystem überlastet und das dadurch seine Fitness verringert.

REEDER und KRAMER (2005) kommen zu der Auffassung, dass „obwohl die physiologischen und verhaltensbedingten Komponenten des Stresses bei einer Handvoll Labortiere (vor allem den Mäuseartigen und Primaten) gut studiert sind, unser Verständnis für Stress und seine Bedeutung für ein Tier in seiner natürlichen Umgebung bestenfalls rudimentär, und für die meisten der derzeit bekannten 5416 Arten von Säugetieren schlimmstenfalls komplett unbekannt ist.“

Moderne Stresstheorien definieren Stress als einen Verlust der Homöostase im Körper. Der auslösende Faktor wird Stressor genannt, dieser kann verschiedene Ursachen haben, beispielsweise physikalische, psychische oder beides. Physikalische Faktoren können endogen und exogen sein. Endogene Faktoren sind beispielsweise Hypoglykämie oder Anorexie (DU DOT et al., 2009). Exogene Faktoren sind beispielsweise Hitze, Kälte (HOUSER et al., 2011), Anstrengung, Verletzungen (REITER et al., 1981; LIDGARD et al., 2008) oder andere schädliche Stimuli, wie beispielsweise Whalewatching (BEJDER et al., 2006). Die gut erforschten physikalischen Stressoren lassen sich von Labortieren auf wildlebende Tiere übertragen. Dies trifft auch auf Faktoren zu, die Emotionen wie Furcht, Angst oder Frustration hervorrufen (REEDER und KRAMER, 2005).

Die auf einen Stressor folgende Reaktion des Körpers dient dazu, den Stressor zu neutralisieren und die Homöostase wiederherzustellen.

Grundsätzlich sind diese Stressreaktionen des Organismus daher physiologisch, denn es handelt sich dabei um notwendige Anpassungsreaktionen des Körpers. Diese müssen sich nicht zwangsläufig negativ auf das Wohlbefinden der Tiere auswirken (MOBERG und MENCH, 2000; SAPOLSKY, 2000).

Neben diesen physikalischen Stressoren gibt es wie erwähnt auch psychische. Dazu zählen soziale Stresssituationen wie beispielsweise neue Gruppenzusammensetzungen, Isolation sozialer Tiere und psychische Belastungen wie Angst. Bereits in den 60iger Jahren des vorherigen Jahrhunderts kam MASON (1968) zu der Erkenntnis, dass unvorhersehbare und neue oder unsichere Situationen als besonders starke Stressoren wirken und daher starke Stressreaktion hervorrufen können.

Stressreaktionen sind individuell unterschiedlich und hängen von verschiedensten Faktoren, beispielsweise dem Alter, dem Geschlecht oder dem Trächtigkeitsstadium ab (REEDER und KRAMER, 2005).

Es ist immer sinnvoll, akuten von chronischem Stress zu unterscheiden (BEERDA et al., 1997). Nach dem Auftreten von schwachen oder nur kurzzeitigen Stressreizen kann sich das Tier an diese Stressoren gewöhnen und mit einer geringeren Stressreaktion reagieren. Man spricht dabei auch von Habituation (THEWS und VAUPEL, 1997).

Aber auch das Gegenteil kann der Fall sein. Sind die Stressreize sehr intensiv oder langanhaltend kann es auch zu einer Sensibilisierung kommen (BELDA et al., 2015).

Die körperliche Reaktion auf die verschiedenen Stressoren beginnt im zentralen Nervensystem (ZNS). Im Hypothalamus werden die

ankommenden Nervenimpulse in hormonelle Signale umgewandelt. Man spricht von der sogenannten neuroendokrinen Kopplung (CARRASCO und VAN DE KAR, 2003).

3.2 Endokrine Stressantwort

Die endokrine Stressantwort beginnt in verschiedenen Kerngebieten des Hypothalamus, vor allem im Nucleus paraventricularis und läuft dann über die Hypophyse zur Nebennierenrinde. Zunächst werden die neurosekretorischen Zellen des Nucleus aktiviert und CRH (Corticotropin Releasing Hormon) wird vermehrt produziert und sezerniert. CRH bewirkt im Hypophysenvorderlappen die Freisetzung von ACTH (Adrenocorticotropes Hormon) aus Proopiomelanocortin (POMC).

Das ACTH wiederum bewirkt die Sezernierung von Glucocorticoiden aus der Nebennierenrinde (VOIGT, 2003). Daher wird die hormonelle Stressreaktion auch Hypothalamus-Hypophysen-Nebennierenrinden-Achse (HHN-Achse) oder HPA-Achse (hypothalamic-pituitary-adrenal axis) genannt. (MORMÈDE et al., 2007).

Die Nebennierenrinde ist beim Säugetier in drei Schichten gegliedert: Zona glomerulosa, Zona fasciculata und Zona reticularis. Glucocorticoide werden vor allem in der Zona fasciculata gebildet, Mineralocorticoide in der Zona glomerulosa und Androgene in der Zone reticularis (VOIGT, 2003; VINSON, 2016).

Je nach Wirkung werden die Corticoide in drei Gruppen unterschieden: Die Glucocorticoide wirken auf fast alle Stoffwechselfvorgänge, besonders auf den Glukosestoffwechsel, die Mineralocorticoide auf die Natriumausscheidung und Kaliumretention. Das wichtigste Mineralocorticoid ist das Aldosteron (HUBER, 2015).

Cortisol und Corticosteron als Glucocorticoide werden bei den einzelnen Tierarten in unterschiedlichem Verhältnis gebildet. Beim

Delfin überwiegt das Cortisol (ORTIZ und WORTHY, 2000), wie bei den meisten Säugetieren (COCKREM, 2013).

Nach der Sekretion werden die Corticoide zu über 90% an cortisolbindendes Globulin oder Albumin gebunden (VOIGT 2003).

3.3 Neuronale Stressantwort

Die neuronale Stressantwort geschieht über die Aktivierung des Nervus sympathicus, was eine Freisetzung von Noradrenalin aus den peripheren sympathischen Nerven und eine Freisetzung von Adrenalin und anderen Katecholaminen aus dem Nebennierenmark zu Folge hat. „Ein typischer Stimulus für das sympathische Nervensystem sind zum Beispiel Kampf- oder Fluchtsituationen. Die Aktivierung des Sympathicus führt zu einer Mobilisierung von Leistungsreserven, um das Tier an eine Belastungssituation anzupassen“ (DIENER, 2022). Dies führt zu einer Erhöhung der Herz- und Atemfrequenz, einer Erhöhung des Blutdrucks und einer gesteigerten Glykogenolyse zur schnellen Bereitstellung von Glucose. Die Aktivierung des Sympathikus geschieht wie bei der endokrinen Stressantwort über CRH aus dem paraventriculären Nucleus des Hypothalamus. Diese Stressantwort wird Sympathikus-Nebennierenmark-Aktivierung oder sympathico-adrenomedulläre Aktivierung (SAM-Aktivierung) genannt.

3.4 Akuter Stress

Akuter Stress entsteht beispielsweise durch die direkte Bedrohung durch einen Beutegreifer. Nach der SAM-Aktivierung steigt innerhalb kurzer Zeit der Corticoidspiegel. Durch einen negativen Feedback-Mechanismus, der von der Konzentration der Corticoide im Plasma ausgelöst wird, wird die weitere Sekretion der Hormone gehemmt.

3.5 Chronischer Stress

Chronischer Stress kann den oben erwähnten negativen Feedback-Mechanismus stören, was eine überschießende, ungehemmte Stressreaktion zur Folge hat (SAPOLSKY, 2000; SAPOLSKY et al., 2000; MIZOGUCHI et al., 2001).

Dass chronischer Stress tödlich sein kann, zeigen am eindrucksvollsten die Stuart-Breitfußbeutelmäuse (*Antechinus stuartii*) in Australien. Dort sterben die männlichen Tiere nach nicht einmal einem Lebensjahr an den Folgen der Kämpfe um die weiblichen Tiere. Der Tod der männlichen Tiere ist auf die zehnfache Erhöhung der Plasmacortisolwerte zurückzuführen, die unter anderem mit einem Zusammenbruch des Immunsystems einhergeht, sodass die Tiere beispielsweise an bakteriell bedingten Lebernekrosen, schwerwiegenden Parasitosen und anderen Infektionskrankheiten sterben. Auch zeigen sie die auf einen erhöhten Cortisolspiegel hinweisenden typischen Veränderungen im Magen-Darmtrakt, wie Magenblutungen und Zwölffingerdarmgeschwüre (BRADLEY et al., 1980; MCDONALD et al., 1981; BRADLEY, 1990; VON HOLST, 1998). Werden männliche Tiere vor der Zuchtsaison gefangen und in menschlicher Obhut gehalten, unterbleibt der Cortisolanstieg und die Tiere werden ebenso alt wie die weiblichen Breitfußbeutelmäuse (VON HOLST, 1998). DICKENS und ROMERO (2013) schlussfolgern, dass es trotz vieler Untersuchungen bisher nur wenige Antworten darauf gibt, wie Wildtiere endokrinologisch auf Stressoren reagieren, die chronischen Stress verursachen. Selbst in Tiermodellen für chronischen Stress, die seit langen Jahren erprobt sind werden immer wieder unterschiedliche Ergebnisse gemessen (PATCHEV und PATCHEV, 2006).

Die Bestimmung von Glucocorticoiden ist ein sowohl beim Menschen als auch bei Tieren weit verbreitetes Mittel zu Messung von Stress. (ROMANO et al., 2010)

Da die Glucocorticoide in allen Se- und Exkreten nachweisbar sind (MORMÈDE et al., 2007; AMARAL, 2010) haben sich bei freilebenden Wildtieren und Wildtieren in menschlicher Obhut die nicht invasiven Techniken vermehrt etabliert, da jegliche Form des Fangens und Fixierens der Tiere mit Stress und somit mit einer Erhöhung des Glucocorticoidspiegels einhergeht. Auch bei Haustieren werden vermehrt nicht invasive Techniken angewendet (COOK, 2012), da auch die Blutprobenentnahme mit einer Erhöhung des Glucocorticoidspiegels einhergehen kann (ERHARD, 2010).

Ein besonders geeignetes Sekret ist Speichel. Dieser konnte beispielsweise auch bei freilebenden Tieren wie Rhesusaffen (*Macaca mulatta*) (HIGHAM et al., 2010), Weißbüschelaffen (*Callithrix jacchus*) (CROSS et al., 2004) oder Tüpfelhyänen (*Crocuta crocuta*) (MONTGOMERY et al., 2022) untersucht werden.

Bei anderen Wildtieren haben sich vor allem Kot- und Urinuntersuchungen bewährt. (CREEL et al., 2002; CREEL, 2005; TOUMA und PALME, 2005; HOWELL-STEPHENS et al., 2012). Diese Untersuchungen beschränken sich nicht nur auf Säugetiere, auch Reptilien zeigen Stressreaktionen in Form eines erhöhten Glucocorticoidspiegels im Kot (KALLIOKOSKI et al., 2012). Liegt der Focus mehr auf länger zurückliegenden oder andauernden Stressreaktionsmessung, so werden kumulative keratinhaltige Matrices (BERKVENS, 2012) wie Haare (STALDER und KIRSCHBAUM, 2012), Federn (REESE et al., 2020) oder Exuvien von Reptilien (CARBAJAL et al., 2018) verwendet.

3.6 Cortisolsekretion bei Walen

Die Cortisolsekretion unterliegt sowohl bei Tieren als auch bei Menschen tages- bzw. jahreszeitlichen Schwankungen (PALAZZOLO und QUADRI, 1987; IRVINE und ALEXANDER, 1994; DE JONG et al.,

2000; VAN EEKELEN et al., 2003; SAGE et al., 2004; VERHAGEN et al., 2004; ASSENZA et al., 2009).

Bei tagaktiven Säugetieren steigt der Cortisolwert zu Beginn des Tages an, um ausreichend Energie beispielsweise zur Fortbewegung oder zur Futtersuche bereitzustellen. Bei nachtaktiven Tieren ist dies umgekehrt (REEDER und KRAMER, 2005; TOUMA und PALME, 2005). Auch beim Großen Tümmler sind die Blutwerte morgens höher als abends (SUZUKI et al., 2003; SCHMITT et al., 2010). Andere Studien scheinen jedoch einen anderen zirkadianen Rhythmus zu zeigen mit einem Höhepunkt mitten in der Nacht und einem Tiefpunkt am Abend (JUDD und RIDGWAY, 1977; SUZUKI et al., 2002). Diese beiden Studien wurden jedoch unter für das Tier stressigen Bedingungen durchgeführt, was die physiologische Cortisolsekretion verändert haben könnte. Tatsächlich wurden die Delfine ein bis zwei Tage außerhalb des Wassers in einem sogenannten Stretcher gehalten, wobei wiederholt Blutproben entnommen wurden.

Die jahreszeitlichen Schwankungen des Cortisolspiegels sind umstritten. Nach ORLOV et al. (1988) soll der Cortisol-Blutspiegel im Winter/Frühling höher sein als im Sommer/Herbst, während ST. AUBIN et al. (1996) keine signifikanten saisonalen Unterschiede feststellten. Auch FUNASAKA et al. (2011) stellten saisonale Unterschiede fest.

Untersuchungen an Buckelwalen (*Megaptera novaeangliae*) ergaben, dass die Cortisolwerte in der Speckschicht saisonal variierte, wobei Wale, die im Winter nach Norden zu den Aufzuchtgebieten ziehen, signifikant höhere Werte aufwiesen als Wale, die im Frühjahr nach Süden zu den Futterplätzen ziehen. Diese Unterschiede könnten jedoch auf den zusätzlichen Stress zurückzuführen sein, dem die Wale während der Geburt und Aufzucht ausgesetzt sind (MINGRAMM et al., 2020).

Das Alter scheint beim Großen Tümmler (*Tursiops truncatus*) keinen Einfluss auf die Cortisolwerte im Blut zu haben (ST. AUBIN et al., 1996).

4 Steroidmessungen bei Meeressäugern

Dass die HPA-Achse auch bei Meeressäugern funktioniert, wurde durch ACTH-Stimulationstest bei Ringelrobben (*Phoca hispida*) (ST. AUBIN und GERACI, 1986), beim Pazifischen Seehund (*Phoca vitulina richardii*) (GULLAND et al., 1999), beim Stellerschen Seelöwen (*Eumetopias jubatus*) (MASHBURN und ATKINSON, 2008) und bei Seehunden (*Phoca vitulina*) (KEOGH und ATKINSON, 2015) bewiesen. Auch die Reaktion der HPA-Achse auf akuten Stress ist bei gehaltenen Belugas (*Delphinapterus leucas*) belegt (ST. AUBIN und GERACI, 1990). Nicht nur Corticosteroide, auch andere Steroidhormone (Androgene, Gestagene) sind zunehmend in den Fokus von Forschungen über Meeressäuger gerückt. Dabei wurde auch immer mehr versucht, alternative Matrices zum Blut zu verwenden. Deren Nutzung dient der Bestimmung reproduktionsmedizinischer Fakten und auch dem Informationsgewinn, um beispielsweise Sozialverhalten wildlebender Tiere besser einschätzen zu können. Nicht zuletzt können die Ergebnisse solcher Forschung auch helfen das Management von Tieren in menschlicher Obhut zu optimieren.

Solche Untersuchungen wurden nicht nur bei Walen, sondern auch bei anderen Meeressäugern wie dem Nordamerikanischen Fischotter (*Lontra canadensis*) (ROTHSCHILD et al., 2008), dem Nördlichen Seeotter (*Enhydra lutris kenyoni*) (WASSER et al., 2000), dem Amazonas-Manati (*Trichechus inunguis*) (DE SOUZA AMARAL et al., 2009) und dem Stellerschen Seelöwen (*Eumetopias jubatus*) (L. PETRAUSKAS et al., 2006; L. R. PETRAUSKAS und ATKINSON, 2006; L. PETRAUSKAS et al., 2008) durchgeführt.

Bei den Walen wurden in bisherigen Untersuchungen hauptsächlich Geschlechtshormone analysiert. So bestimmte ATKINSON et al. (1999) Progesteron im Blut, Speichel und Tränenflüssigkeit von Kleinen Schwertwalen (*Pseudorca crassidens*). Geschlechtshormone wurden im Urin von Schwertwalen (*Orcinus orca*) (WALKER et al., 1988; ROBECK et al.; 1993, ROBECK et al., 2004) und beim Weißstreifendelfin (*Lagenorhynchus obliquidens*) (ROBECK et al., 2009) untersucht. Der Blubber wird immer häufiger als Matrix für Hormonuntersuchungen bei Zahnwalen, wie beispielsweise dem Gemeinen Delfin (*Delphinus delphis*) (KELLAR et al., 2006; KELLAR et al., 2009), dem Nördlichen Glattdelfin (*Lissodelphis borealis*), dem Weißstreifendelfin (*Lagenorhynchus obliquidens*) (KELLAR et al., 2006), und Bartenwalen, wie dem Atlantischen Nordkaper (*Eubalaena glacialis*) (GRAHAM et al., 2021), dem Buckelwal (*Megaptera novaeangliae*) (PALLIN et al., 2018) oder dem Blauwal (*Balaenoptera musculus*) (ATKINSON et al., 2020). Auch fanden bereits Hormonmessungen im Blas (HOGG et al., 2005; THOMPSON et al., 2014) und in der Haut (BECHSHOFT et al., 2020) von Großen Tümmlern statt.

Delfinkot ist aufgrund seiner eher schleimigen Konsistenz, die dazu führt, dass er sich schnell mit Wasser vermischt, nicht nach dem Kotabsatz zu gewinnen. Die einzige Möglichkeit ist über eine Katheterisierung des Rektums. Die Ampulla recti ist beim ausgewachsenen Großen Tümmler ca. 30 cm vom Anus entfernt. Um Kotproben gewinnen zu können muss die Tiere darauf trainiert werden, sich auf den Rücken zu legen und dort zu verharren. Obwohl diese Methode dadurch nicht einfach in der Durchführung ist, wurden schon mehrere Untersuchungen zum Cortisolgehalt im Delfinkot veröffentlicht (BIANCANI et al., 2017; CHAMPAGNE et al., 2018; HOUSER et al., 2021; MERCERA et al., 2021).

Bei Blutuntersuchungen wildlebender Großer Tümmler betrug nach Untersuchungen von ORTIZ und WORTHY (2000) die durchschnittliche Serumcortisolkonzentration 2,8 µg/dl, während die durchschnittliche Serumcorticosteronkonzentration lediglich 7,4 ng/ml betrug. GALLIGAN et al. (2018) konnten mittels LC-MS/MS auch feststellen, dass Cortisol das hauptsächlich im Blut vorhandene Steroidhormon darstellt.

5 Speicheluntersuchungen

Schon seit einiger Zeit wird die Speichelprobenentnahme als eine etablierte Methode verwendet um beispielsweise bei Haustieren schnell, oft und stressfrei Cortisolmessungen durchzuführen. Dass die gemessenen Werte mit dem Cortisolspiegel im Blut korrelieren können, ist schon seit vielen Jahren bekannt. Korrelationen wurden beispielsweise für Ziegen (GREENWOOD und SHUTT, 1992; SINGH et al., 2018), Schafe (FELL et al., 1985; ANDANSON, BOISSY et al., 2020) Schweine (PARROT und MISSON, 1989; SCHÖNREITER, 1996; BUSHONG et al., 2000), Pferde (KRONER, 2006; STRZELEC und KOWALIK, 2013) und Hunde (VINCENT und MICHELL, 1992; BEERDA et al., 1996) nachgewiesen. Dabei ist es bemerkenswert, dass sich hochsignifikante Zusammenhänge vor allem dann ergeben, wenn die Stressachse aktiviert ist. Bei den Basalwerten wurden bei Schweinen und Schafen keine Korrelationen festgestellt. ANDANSON (2020) fand heraus, dass eine starke Korrelation zwischen dem im Speichel und dem im Plasma gemessenen Cortisolgehalt bei Schafen nur vorliegt, wenn der Plasmacortisolgehalt über 55 nmol/l beträgt. Erklärt werden können diese Phänomene dadurch, dass nur das freie Cortisol aus dem Plasma in den Speichel übertreten kann (VINING et al., 1983).

Die Speicheluntersuchung kann aber fehlerbehaftet sein, so wies LEWIS (2006) darauf hin, dass Steroide aus Blut oder Plasma über

orale Abrasionen oder direkt aus Lebensmitteln in den Speichel gelangen können.

6 Blutuntersuchungen

Das Fangen der (wildlebenden) aquatischen Säuger führt gemeinsam mit der Prozedur der Blutentnahme zu einem ACTH-Anstieg (GULLAND et al., 1999; DESPORTES et al., 2007). Das wurde auch für Beluga (*Delphinapterus leucas*) (SCHMITT et al., 2010), Schlankdelfine (*Stenella attenuata*) (ST. AUBIN et al., 2013) und Große Tümmler (*Tursiops truncatus*) (THOMSON und GERACI, 1986) nachgewiesen. Einige weitere Studien über die Großen Tümmler (*Tursiops truncatus*) basieren nicht auf Speichel- sondern auf Blutuntersuchungen (SUZUKI et al., 1998; SUZUKI et al., 2002; SUZUKI et al., 2003). Jedoch sind sich häufig wiederholende Blutentnahmen beim Großen Tümmler mit einem erhöhten Infektionsrisiko und einer erhöhten Entzündungsgefahr verbunden (PEDERNERA-ROMANO et al., 2006).

Im Jahr 2006 wurde eine Untersuchung von PEDERNERA-ROMANO et al. veröffentlicht, nach der die Cortisolkonzentration im Speichel von Großen Tümmlern annäherungsweise 27% der Cortisolkonzentration im Blut beträgt. ROMANO et al. (2010) gehen nach einer Untersuchung vier Jahre später davon aus, dass ca. 10% der Blutglucocorticoidkonzentration im Speichel vorhanden sind.

7 Ziel der Untersuchung

Das Ziel der Untersuchung war eine kritische Auseinandersetzung mit der nichtinvasiven Methode der Stressmessung mittels Speichelcortisolmessung beim Großen Tümmler (*Tursiops truncatus*). Bisher gibt es kaum Untersuchungen zu diesem Thema; die wenigen, die es gibt sind zudem nicht miteinander vergleichbar. Daher erschien es wichtig, die Methodik der Speichelproben-

entnahme näher zu beleuchten, die Anwendungsgebiete und die Grenzen aufzuzeigen. Hierfür musste eine validierbare Methode entwickelt werden.

Während es bei landlebenden Säugetieren einfach ist, die Verdünnung des Speichels auszuschließen besteht bei den Meeressäugern immer die Gefahr, dass mehr oder weniger viel umgebendes Wasser im Schnabel der Tiere ist und die Speichelprobe verdünnt. Daher mussten wir zunächst eine geeignete Stelle zur Probennahme finden.

Außerdem galt es, weitere Einflussfaktoren auf den Speichelcortisolgehalt auszuschließen. Denn wie bereits ausgeführt schwanken viele biologische Parameter bei Tieren und ein tageszeitlicher Rhythmus ist eine weitverbreitete Eigenschaft bei Säugetieren (REFINETTI, 2006), daher war es bei allen unseren Untersuchungen wichtig, diese möglichst zur gleichen Tageszeit durchzuführen.

Ein weiterer wichtiger Einflussfaktor, der von uns aufgezeigt werden konnte, betraf den Einfluss von vor der Speichelprobenentnahme gegebenem Futterfisch auf den Speichelcortisolgehalt.

Weiter mussten wir bereits für die Untersuchung von menschlichem Speichel validierte Labormethoden auf ihre Anwendbarkeit für Delfinspeichel überprüfen und durch eigene Untersuchungen validieren.

Zudem wurden noch die Daten der Cortisolbestimmung im Blut über einen Zeitraum von 10 Jahren im Hinblick auf die Unterscheidungskriterien Art der Blutprobenentnahme (über Training oder auf der Hebebühne) und Gesundheitsstatus der Tiere ausgewertet, und es wurde versucht, eine Korrelation bezüglich des Speichelcortisolgehalts und des Blutcortisolgehalts festzustellen.

III. Veröffentlichung

Saliva and Blood Cortisol Measurement in Bottlenose Dolphins (*Tursiops truncatus*): Methodology, Application, and Limitations

Autoren: Daniela Rickert¹, Ralph Simon¹, Lorenzo von Fersen¹, Katrin Baumgartner¹, Thomas Bertsch², Clemens Kirschbaum³, Michael Erhard⁴

¹ Tiergarten Nürnberg Zoo, Am Tiergarten 30, D-90480 Nürnberg

² Institut für Klinische Chemie, Laboratoriumsmedizin und Transfusionsmedizin, Universitätsinstitut der Paracelsus Medizinischen Privatuniversität, Prof.-Ernst-Nathan-Str. 1, D-90419 Nürnberg

³ Institut für Allgemeine Psychologie, Biopsychologie und Methoden der Psychologie, Fachbereich Psychologie, Fakultät für Naturwissenschaften, Technische Universität Dresden, Zellescher Weg 19, D-01069 Dresden

⁴ Institut für Tierschutz, Ethologie und Tierhygiene, Veterinärwissenschaftliches Department, Tiermedizinische Fakultät, Ludwig-Maximilians-Universität, Veterinärstr. 13, D-80637 München

Jahr: 2022

Animals, Volume 12, Nr. 1

URL: <https://www.mdpi.com/2076-2615/12/1/22>

DOI: <https://doi.org/10.3390/ani12010022>

Zusammenfassung:

Eine zentrale Aufgabe von Zoos und Aquarien ist die regelmäßige und genaue Bewertung des Wohlergehens ihrer Tiere. In jüngster Zeit wurden wichtige Schritte unternommen, wie die Einführung von Instrumenten und von Entscheidungsbäumen zur Bewertung des Wohlergehens von Tieren. Um das Wohlergehen der Tiere zu bestimmen, ist es nicht nur wichtig, lebensgeschichtliche Daten wie

Langlebigkeit und Fortpflanzungserfolg zu sammeln, sondern auch, dass erfahrene Beobachter oder Pfleger regelmäßig Verhaltensbeobachtungen durchführen, um den emotionalen Zustand der Tiere zu beurteilen. Zur physiologischen Validierung von Tierschutzbeobachtungen wird in der Regel der Glucocorticoidspiegel bestimmt, da er ein gängiger Indikator für Stress ist. Während diese Werte bei vielen Tieren leicht über Kot- oder Haarproben bestimmt werden können, werden sie bei Walen und Delfinen in der Regel über Blutproben ermittelt. Da Blutproben nicht sehr häufig entnommen werden können und das Verfahren für die Tiere Stress bedeuten kann (wenn die Proben nicht nach einem medizinischen Training entnommen werden), sind andere Techniken, wie die Messung von Gesundheits-Biomarkern (insbesondere Cortisol, das im Speichel gemessen werden kann), in den Mittelpunkt der Stressforschung bei Walen gerückt. Es gibt jedoch zwei Probleme im Zusammenhang mit Speichelmessungen bei Walen: Der Speichel kann entweder mit Beckenwasser verdünnt oder durch Futterfische verunreinigt sein, da gefrorener Fisch in der Regel hohe Cortisolwerte enthält. In unserer Studie untersuchten wir, wie der Cortisolspiegel im Speichel mit dem Cortisolspiegel im Blut zusammenhängt und wie der Cortisolspiegel im Speichel durch Futterfisch beeinflusst werden kann. Wir untersuchten Speichel- und Blutproben von elf Großen Tümmlern (*Tursiops truncatus*), die in einer Außen- und Innenanlage in Deutschland gehalten wurden. Außerdem haben wir die Cortisolwerte verschiedener Futterfischarten untersucht. Unsere Daten zeigen, dass die Cortisolwerte im Speichel bei Stress und Erregung zwar erhöht sind, aber offenbar nicht mit den Cortisolwerten im Blut korrelieren. Wir zeigen auch, dass die Speichelcortisolwerte nach der Fütterung um das bis zu 100-fache erhöht sind. Unsere Ergebnisse legen nahe, dass Speichelcortisolmessungen bei Delfinen mit Vorsicht durchgeführt und berücksichtigt werden müssen, da sie leicht kontaminiert

werden können. Außerdem ist es wichtig, die richtige Labormethode zu verwenden, um Cortisol spezifisch nachzuweisen; in unserer Studie haben wir zuverlässige Tests mit LC-MS/MS durchgeführt.



Article

Saliva and Blood Cortisol Measurement in Bottlenose Dolphins (*Tursiops truncatus*): Methodology, Application, and Limitations

Daniela Rickert ^{1,2}, Ralph Simon ^{1,*} , Lorenzo von Fersen ¹ , Katrin Baumgartner ¹, Thomas Bertsch ³, Clemens Kirschbaum ⁴ and Michael Erhard ²

¹ Nuremberg Zoo, 90480 Nuremberg, Germany; daniela.rickert@amberg-mail.de (D.R.); lorenzo@vonfersen.org (L.v.F.); Katrin.Baumgartner@stadt.nuernberg.de (K.B.)

² Department of Veterinary Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Institute of Animal Welfare, Ethology and Animal Hygiene, Ludwig-Maximilians-University, 80637 Munich, Germany; M.Erhard@tierhyg.vetmed.uni-muenchen.de

³ Institute of Clinical Chemistry, Laboratory Medicine and Transfusion Medicine, Nuremberg General Hospital, Paracelsus Medical University, 90419 Nuremberg, Germany; thomas.bertsch@klinikum-nuernberg.de

⁴ Department of Psychology, Faculty of Science, Institute of General Psychology, Biopsychology and Methods of Psychology, Technische Universität Dresden, 01069 Dresden, Germany; clemens.kirschbaum@tu-dresden.de

* Correspondence: Ralph.Simon@stadt.nuernberg.de

Simple Summary: Animal welfare assessments in zoological facilities are becoming increasingly important. Two main assessment tools are behavioral observations and stress hormone measurements. At our facility (Nuremberg Zoo), cortisol levels are routinely determined every time blood samples are taken. We can show that the blood cortisol content of bottlenose dolphins depends on the way in which sampling is performed. Cortisol levels are significantly lower when blood samples are taken during voluntary medical training compared to when dolphins are sampled on a lifting platform, which results in higher cortisol levels. For a subset of the blood cortisol data, we simultaneously sampled saliva cortisol. However, we did not find any correlation between saliva cortisol and blood cortisol values. We also tested whether saliva samples are contaminated by fodder fish or diluted by pool water, finding that some fish and squid species exhibit high cortisol values. Consequently, dolphin saliva is highly contaminated directly after feeding, and increased values can be measured up to 4 min after feeding. We recommend being very careful when sampling saliva, and interpreting saliva cortisol values with caution.

Abstract: A central task of zoos and aquaria is the frequent and accurate assessment of their animals' welfare. Recently, important steps have been made, such as the introduction of animal welfare evaluation tools and welfare decision trees. To determine animal welfare, it is not only important to collect life history data, such as longevity and reproductive success, but also for experienced observers or caretakers to conduct behavioral observations on a regular basis to assess animals' emotional state. To physiologically validate welfare observations, glucocorticoid levels are usually assessed, as they are a common indicator of stress. While, for many animals, these levels can be easily determined via fecal or hair samples, for cetaceans, the levels are usually determined via blood samples. As blood samples cannot be taken very frequently and the process may cause stress to the animals (if the samples are not taken following medical training), other techniques, such as the measurement of health biomarkers (especially cortisol, which can be measured in saliva), have become the focus of cetacean stress research. However, there are two problems associated with saliva measurements in cetaceans: saliva might either be diluted with pool water or be contaminated by fodder fish, as frozen fish usually contains high levels of cortisol. In our study, we investigated how saliva cortisol levels are connected to blood cortisol levels and how saliva cortisol can be influenced by fodder fish. We examined saliva and blood samples in eleven bottlenose dolphins (*Tursiops truncatus*) kept in an outdoor and indoor facility in Germany. Furthermore, we assessed the cortisol levels of different kinds of fodder fish. Our data show that, although saliva cortisol values are elevated under stress and arousal, they seem not to be correlated with blood cortisol values. We also show that, after



Citation: Rickert, D.; Simon, R.; von Fersen, L.; Baumgartner, K.; Bertsch, T.; Kirschbaum, C.; Erhard, M. Saliva and Blood Cortisol Measurement in Bottlenose Dolphins (*Tursiops truncatus*): Methodology, Application, and Limitations. *Animals* **2022**, *12*, 22. <https://doi.org/10.3390/ani12010022>

Academic Editor:
Nadja Wielebnowski

Received: 17 November 2021

Accepted: 18 December 2021

Published: 23 December 2021

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

feeding, saliva cortisol values are increased up to 100-fold. Our results suggest that saliva cortisol measurements in dolphins have to be conducted and considered with care, as they can easily be contaminated. Moreover, it is important to use the right laboratory method in order to specifically detect cortisol; in our study, we conducted reliable tests, using LC-MS/MS.

Keywords: animal welfare; bottlenose dolphin; *Tursiops truncatus*; stress measurement; saliva cortisol; blood cortisol

1. Introduction

Animal welfare—in particular, cetacean welfare—is currently defined along different lines. One approach defines welfare as the balance of the positive and negative affective states [1]. Other approaches focus more on physical conditions, activity patterns, and physiological markers [2–5]. Currently, different welfare assessment protocols that try to standardize welfare assessments and approach animal welfare more holistically are used.

Since the 1990s, the ‘five freedoms’ have been used as a basis for evaluating animal welfare in livestock farms [6]. Mellor (2016) further developed this idea and pointed out that it is important to minimize the negative experiences of animals and, at the same time, provide opportunities for them to have positive experiences [7]. In order to verify this notion and obtain a more holistic view of the welfare of an animal, specific animal-related criteria must be developed. The so-called C-Well[®] protocol [8] is one of the first welfare assessment tools developed for bottlenose dolphins (*Tursiops truncatus*); however, it does not include behavioral observations made using a systematic approach. Another protocol is the American Humane [9,10], which is a conservation certification program that consists of the evaluation of the facility and management of animals by experts in the field. The European Association for Aquatic Mammals (EAAM) recently launched the Dolphin WET (Welfare Evaluation Tool) project. Another tool, the welfare decision tree [2], was introduced during the 1st Welfare Workshop from 3 to 5 May 2016 at Nuremberg Zoo. The assessment of the glucocorticoid levels of animals is also part of this decision tree.

Modern stress theory defines stress as a state in which homeostasis is lost [11]. Different stressors are known; they are usually divided into two different groups: physical, such as heat and cold, and psychological, such as fear and frustration. The physical response to various stressors begins in the central nervous system (CNS). In the hypothalamus, incoming nerve impulses are converted into hormonal signals. This is referred to as neuroendocrine coupling [12,13].

The endocrine stress response begins in the paraventricular nucleus of the hypothalamus and then runs via the pituitary gland to the adrenal cortex. Initially, the neurosecretory cells of the nucleus are activated and CRH (corticotropin-releasing hormone) is increasingly produced and secreted. CRH causes the release of ACTH (adrenocorticotropic hormone) in the anterior pituitary. ACTH, in turn, causes the secretion of glucocorticoids from the adrenal cortex. Therefore, the hormonal stress response is also called the hypothalamic–pituitary–adrenal (HPA) axis [14]. Various studies have shown that cortisol secretion in both animals and humans is subject to daily and seasonal fluctuations [15–21]. In mammals active during the day, the cortisol level rises throughout the morning and falls over the course of the day [22].

Glucocorticoids can be detected in blood; in different body fluids, such as saliva; in the skin; and even in the excreta [14,23] or blow [9]. As in some cases the sampling procedure itself can be a source of stress [24], it would be useful to be able to measure cortisol using less invasive matrices. The use of non-invasive techniques, such as saliva sampling, has become increasingly established, especially in wild animals and zoo animals [25]. Non-invasive techniques are also more frequently used in pets, as blood sampling itself can also lead to an increase in glucocorticoid levels [26]. In some cases, to circumvent stress, animals can be trained to voluntarily allow blood sampling, which then does not require

any restriction. Dolphins were among the first zoo animals in which this training was started and perfected. Today, blood sampling is an everyday part of the husbandry routines of these animals.

The primary glucocorticoid that has been identified and studied in dolphins is cortisol [27,28]. First studies on cortisol levels in bottlenose dolphins (*Tursiops truncatus*) mainly used blood tests [29–32] to measure cortisol. However, it was shown that too-frequent blood sampling in bottlenose dolphins (*Tursiops truncatus*) may not be feasible because of the risk of inflammation.

In other wild animals, feces and urine tests have proved particularly effective [33–38]. These investigations are not limited to mammals; reptiles also show stress reactions in the form of increased glucocorticoid levels in the feces [39]. Hair has also been found to be a suitable matrix in humans [40] and other mammals [41–43], and feathers have been used in birds [44] in cases where glucocorticoid levels over longer periods were of interest, as cortisol is incorporated throughout the growth phase of hair and feathers [45].

Fecal samples can also be obtained from bottlenose dolphins (*Tursiops truncatus*). This is usually achieved by the catheterization of the rectum [46–49]. In order to obtain fecal samples, animals must be trained to lie on their backs and remain there. Since the ampoule is not regularly filled with feces, this method is not only more time-consuming but requires additional training and is also difficult to conduct on a regular basis. Urine samples can also be collected through training [50].

A feasible method for frequent, non-invasive sampling in mammals is saliva collection.

The major salivary glands in almost all mammals are the parotid, sublingual, and submandibular glands. These glands, and hundreds of small salivary glands (labial, buccal, palatal, and lingual) secrete saliva with different compositions [51–53].

Saliva sampling has been used in different species as an established method for performing fast, frequent, and non-invasive cortisol measurements. The fact that the measured values correlate with the blood cortisol level has been proven for several different species such as goats, sheep, pigs, horses, and dogs [54,55]. Even in free-ranging animals, it is possible to collect saliva, as was shown for rhesus monkeys (*Macaca mulatta*) [25], for example.

Although it is relatively easy to obtain uncontaminated saliva from terrestrial mammals, for aquatic mammals this is much more challenging, because saliva samples can be diluted with pool water. Sampling must, therefore, take place under conditions that exclude or prevent contamination with pool water as far as possible. For this purpose, sites in the mouth that are usually not contaminated with water but still contain enough saliva to allow measurement should be aspirated. Whether pool water is present in the saliva samples obtained is almost impossible to determine. In saliva there are no enzymes, hormones, or salt concentrations, etc., which would always occur in the same form, as it is the case for blood.

Only a few studies have been carried out on the salivary or blood cortisol content of dolphins. These have been conducted with different objectives: A first study with dolphins showed that simultaneous measurements of saliva and blood cortisol showed that saliva cortisol concentrations represent 10% to 27% of the cortisol level in blood [56,57]. Ugaz et al. (2013) published a study on 23 bottlenose dolphins (*Tursiops truncatus*) kept in four different holding facilities. Saliva samples were collected once daily, in the morning, from fasting animals. The dolphins showed salivary cortisol levels between 0.0116 and 1.5109 nmol/L [58]. Furthermore, Monreal-Pawłowsky et al. used the salivary cortisol concentration as a possible welfare indicator [59].

In addition to the dilution problem mentioned above, there is the possibility of the contamination of samples with fodder fish. Dolphins in human care rarely use their teeth to loot-catch. Fish are usually given by keepers into the dolphin's opened mouth. Dolphins do not chew their food but swallow it whole. When swallowing, the tongue is pressed against the palate. Liquid from fodder fish can enter the mouth of the dolphin and contaminate the saliva sample. This could contaminate the saliva with cortisol from the fodder fish [60–62].

In summary, in contrast to terrestrial mammals, saliva sampling in aquatic mammals features particular challenges. Additionally, in our opinion, the correlation between blood cortisol content and salivary cortisol content is not clear.

The primary purpose of this study was to test whether salivary cortisol can be used as a measure to estimate HPA axis activity in dolphins. In the first phase, we tested whether salivary cortisol measurements correlate with time-matched blood cortisol levels.

For this study, we investigated the informative value of saliva cortisol samples under different dilution and contamination scenarios for bottlenose dolphins (*Tursiops truncatus*), and tested how saliva cortisol levels are correlated with blood cortisol levels. We investigated the following hypotheses: (1) saliva can be contaminated by fodder fish that contain high amounts of cortisol, (2) saliva can be diluted with pool water. To exclude contamination with cortisol from fish, we assessed the cortisol contamination of different types of fodder fish and conducted a feeding experiment with five bottlenose dolphins (*Tursiops truncatus*) to demonstrate how a fish meal can influence saliva cortisol values. Moreover, we tested if and how both levels are correlated using simultaneous blood and saliva cortisol measurements.

2. Materials and Methods

Animals: During the time in which our study was carried out, 11 bottlenose dolphins (*Tursiops truncatus*) were living at Nuremberg Zoo and data were collected from all of these animals. Table 1 provides an overview of the animals and their individual contributions to the datasets and experiments. The blood samples were all taken due to medical indication in the years 2010 to 2020. The simultaneous blood and saliva sampling was conducted in the years 2018 and 2019. Again, the blood samples were taken because of a medical reason. Almost all blood samples were taken early in the morning. The feeding experiments took place in July and August 2019 (experiment I) and February 2020 (experiment II) and were always started in the morning at 8 am, before the first meal. As we had a very tight sampling procedure, the feeding experiment could only be conducted with certain, well-cooperating individual dolphins.

Table 1. Overview of the study animals and the tests and experiments they participated in.

Name	Sex	Born	Birth Year	Blood Cortisol	Blood vs. Saliva Cortisol	Feeding Experiment I	Feeding Experiment II
Anke	female	wild	ca. 1983	×	×	×	-
Arnie	male	captive	2000	×	-	-	-
Jenny	female	wild	ca. 1987	×	×	×	-
Moby	male	wild	ca. 1960	×	×	-	-
Noah	male	captive	2000	×	-	-	-
Rocco	male	captive	2005	×	-	-	-
Nami	female	captive	2014	×	×	-	-
Dolly	female	captive	2007	×	-	×	×
Donna	female	captive	2007	×	-	×	×
Sunny	female	captive	1999	-	-	×	×
Joker	male	captive	1991	×	-	-	-

Housing: The dolphins were housed in an indoor and outdoor facility with three different indoor pools and five outdoor pools, which were connected to each other and had a total volume of salt water of more than 7 million liters. The depths varied from 7 m to 0.5 m. The indoor part featured a lifting platform in a so-called round-pool, which had a double floor. The upper, lattice-shaped floor could be raised automatically so that the animals could be lifted completely or partially out of the water.

The pools contained a closed life support system with ozone and a small amount of chlorine as a disinfectant. The animals were fed with different types of fish and cephalopods (herring (*Clupea*), mackerel (*Scomber scombrus*), capelin (*Mallotus villosus*), sardines (*Sardina*

pilchardus), sprat (*Sprattus*), and squid (*Loligo* spp.)). Training was based on positive reinforcement. All the animals were trained for different behaviors to facilitate/allow medical inspection, diagnostics, or treatment. A staff of eleven full-time employed qualified zookeepers took care of the animals.

The water temperature was usually between 17 °C and 20 °C, during summer it sometimes went higher but never above 25 °C. In winter the water temperature was always kept above 14 °C. Down to an outside air temperature of −4 °C, the animals had the possibility to freely choose between inside and outside pools. As soon as the air temperature permanently fell below −5 °C, the animals were kept indoors. To enlarge the heated indoor space during winter an air dome was placed over both upper pools (see Figure 1). The air temperature at the indoor facilities was kept higher than the water temperature and was at least 15 °C.

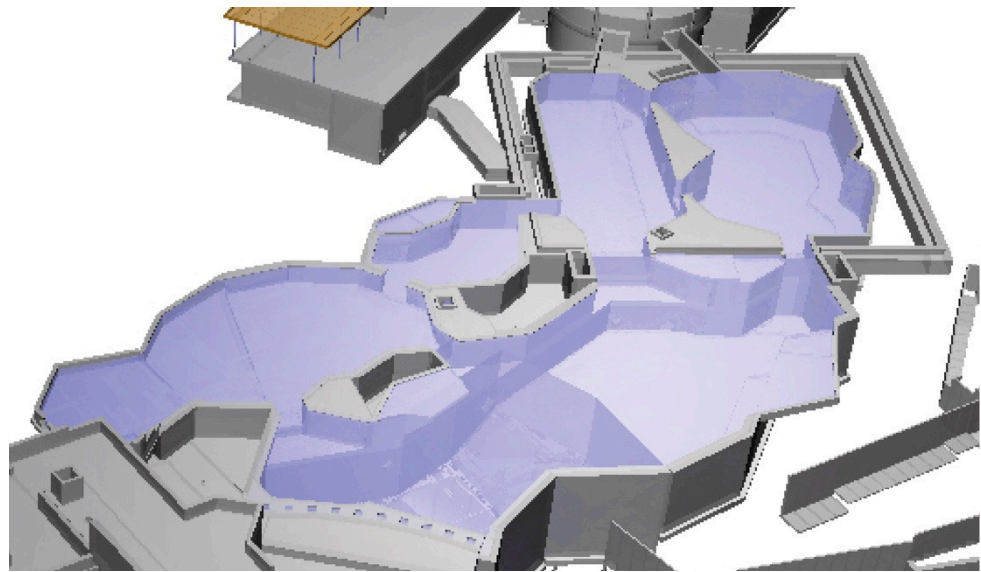


Figure 1. Scheme of the outdoor pools, called the lagoon, where the dolphins were housed.

Saliva sampling method: We established our saliva sampling protocol based on the following considerations. All sampling procedures were carried out while the animal remained in the pool. In this way, it could be ensured that repeated sampling procedures could be conducted with every animal at any place in the pool. At Nuremberg Zoo, the dolphins are trained to allow several medical behaviors, including saliva sampling. To take a saliva sample, the animals had to stretch their heads out of the water, open their beaks, and keep them open while the sample was taken until the reward whistle (secondary reinforcer) was blown.

Our second consideration was to find the best place to take saliva samples in the mouth of the dolphin. Salivary glands end in the whole mouth, but according to our experience watery accumulations, which could be saliva or pool water, often occur at the base of the tongue. Sampling on the palate was not possible because there was not enough saliva available. It turned out that the fluid obtained at the side of the tongue was more viscous than the fluids obtained elsewhere. Therefore, we assumed that the saliva in this region is the least diluted. For our method, it was important that the fluid obtained remained comparable and, therefore, we chose the side of the tongue as the best sampling area.

The specially designed Sarstedt “Cortisol-Salivette” (order number: 51.1534.500) was used for saliva sampling. This consists of a 4.2 cm-long roll of synthetic wadding that is inserted into a plastic container containing a small hole at the bottom and is located in a plastic tube. After taking the sample, the centrifugation of the Salivette device results in low-viscosity saliva at the bottom of the tube. The zookeepers who took the samples followed the instructions listed in the Appendix A. For sampling, the swab was moved

back and forth on the side of the tongue for 5 s (see Figure A1). After sampling, the samples were centrifuged for 5 min at 5000 rpm in the veterinary laboratory, and then the saliva remained in the tube was stored at -20°C or lower.

Laboratory methods used to analyze saliva: the swabs were tested for their cortisol content using the following methods: Liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry (LC-MS/MS): Cortisol levels were quantified by liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry, as described in detail elsewhere [63]. The intra- and interassay coefficients of variation are below 10% for this method. These samples were examined in the laboratory of the Chair of Biopsychology, Technical University Dresden.

Validation of the saliva cortisol measurement method: Since there are no validated tests for measuring salivary cortisol concentrations in dolphins, we had to find a way to validate the laboratory methods ourselves. For this, we used a series of diluted saliva samples from one bottlenose dolphin (*Tursiops truncatus*, Moby). In 2017, samples were collected, frozen, and pooled over some days in order to obtain a good quantity of saliva. The saliva was then defrosted, divided, and diluted with 0.9% NaCl solution to create a dilution series as follows: 100% saliva, 75% saliva/25% NaCl, 50% saliva/50% NaCl, 25% saliva/75% NaCl, 100% NaCl. The diluted samples were again divided into 60 cuvettes (12 cuvettes for each concentration level) and sent blinded to 4 different laboratories (Lab names were anonymized; we will use the following names: Lab B, Lab E, Lab D and Lab R). Each laboratory received three cuvettes of each concentration level. With this dilution series, we aimed to find out which laboratory methods were most suitable for measuring the correct cortisol content on a relative scale. The laboratories worked with different methods: Two laboratories worked with LC-MS/MS (Lab D and Lab R). Lab D additionally worked with a CLIA (Chemiluminescence Immunoassays (CLIA) from IBL international, now Tecan), a specially designed test for the detection of cortisol in human saliva. Lab E used the same CLIA kit from IBL and Lab B worked with an EIA (Enzyme Immunoassay (EIA) Cortisol EIA Detection kit, Neogen Europe, Ayr, UK), a test for the quantitative analysis of cortisol levels in biological fluid. We expected that all laboratories would give comparable results for samples with identical concentrations and that the readings would reflect the dilution series. We also expected that cortisol would not be measurable in the samples that did not contain saliva. This expectation was met only by laboratories working with the LC-MS/MS method (Lab D and Lab R). Lab B and Lab E were not able to detect anything and, therefore, could not provide any results. Lab D was able to display the dilution series correctly, both with the CLIA and the LC-MS/MS assay; however, for the CLIA the values varied greatly within the same dilution level (see Figure 2). Lab R, which worked with LC-MS/MS provided similar results as Lab D. Fitting a linear regression model showed that only 46.5% of the variation in cortisol levels could be explained by the proportion of saliva involved (LM, $F_{1,10} = 7.815$; $p = 0.0209$); see Figure 2. Fitting a linear regression model to the LC-MS/MS, however, showed that 92.3% or 96.1% of the variation in cortisol levels could be explained by the proportion of saliva involved (Lab R: LM, $F_{1,10} = 120.1$; $p < 0.001$; Lab D: LM, $F_{1,10} = 243.8$; $p < 0.001$; see Figure 2). We analyzed all subsequent samples with the LC-MS/MS method at the Lab D, the laboratory of CK in Dresden, Germany.

Blood collection procedure: Blood samples are taken regularly as part of routine medical practice. The frequency at which they are taken depends on the age and health status of the animals. When taking blood via training, the dolphin presents its fluke out of the water on demand. The animal remains under signal control until the blood collection procedure is finished. However, the animal can leave the situation at any time by swimming away. As mentioned before, the dolphins are trained to allow several medical behaviors. The animals are trained to be handled on a lifting platform on almost a daily basis. In cases where blood sampling must be carried out under restraint conditions, the dolphin will lie on a soft mattress and be restrained by their trainers, who position themselves on both sides of the dolphin.

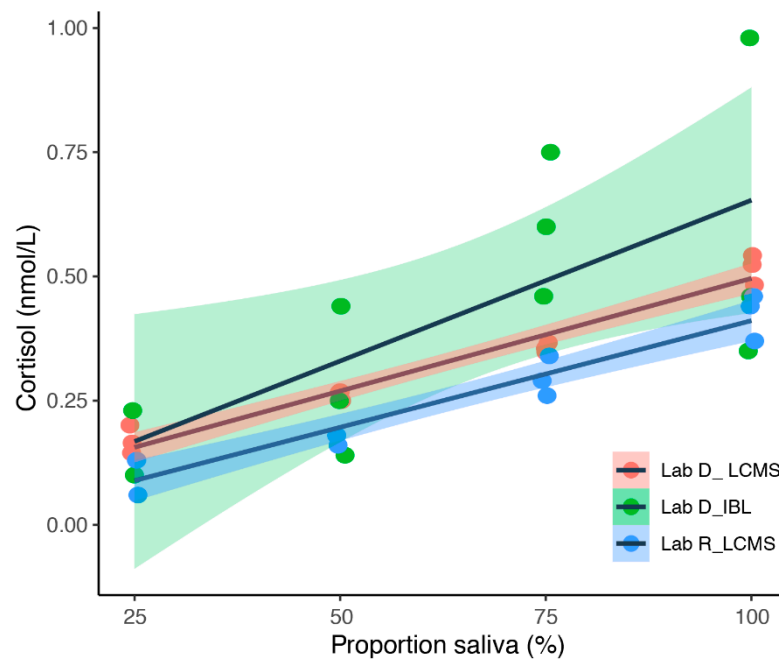


Figure 2. Dilution series for saliva cortisol analyzed at two laboratories (Lab R and Lab D). Saliva was collected over some days, accumulated, and then diluted with different proportions of 0.9% NaCl solution. Saliva samples were analyzed with two different methods LC-MS/MS (LC-MS) and immunoassays (IBL).

Laboratory methods for evaluating blood: The blood samples were all examined in the laboratory of the Institute of Clinical Chemistry, Laboratory Medicine and Transfusion Medicine—Nuremberg General Hospital. The cortisol value was also routinely determined, even if the reason for the examination was always different. Cortisol in heparinized plasma or serum was measured until the end of October 2015 using the ‘Elecsys Cortisol’ assay from Roche Diagnostics (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany). From November 2015, the ‘Elecsys Cortisol II’ assay from Roche Diagnostics was used for analysis. According to the manufacturer, the ‘Elecsys Cortisol II’ assay showed approx. 20% lower cortisol concentrations. Until September 2011, only whole numbers were used for statistics, as only whole numbers were displayed as results in the laboratory information system (LIS). Afterwards numbers with one decimal place were displayed in the LIS and used for statistics. The lowest value transferred from the laboratory instrument to the LIS was 0.1 µg/dL.

Comparison of cortisol in saliva and blood: In order to compare the correlation between blood and saliva cortisol, both parameters were assessed for four animals during different medical examinations (for example, X-rays). A single blood sampling procedure and multiple saliva sampling procedures were always used. The time at which the blood and saliva samples were taken was recorded precisely; see Figure 3.

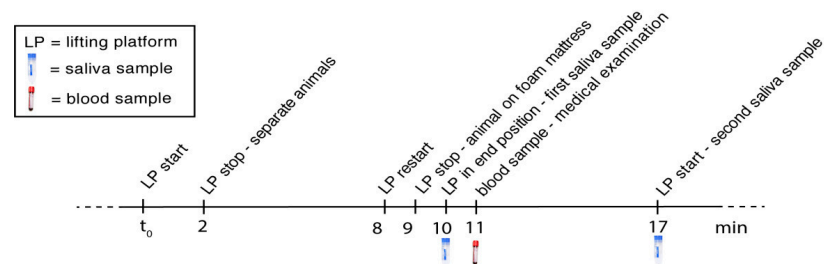


Figure 3. Exemplary sampling scheme for the simultaneous blood and saliva sampling.

Cortisol contamination by fodder fish: As previous studies have shown, the fishing method (rod or line) used can lead to a significant increase in cortisol in many fish species, for example, red snappers (*Pagrus auratus*) [64]. Therefore, we assumed that the fodder fish given to dolphins may also contain significant levels of cortisol. In order to verify this assumption, the cortisol content of the thawing water of various feed fish species and cephalopods was examined by LC-MS/MS (herring (*Clupea*), mackerel (*Scomber scombrus*), capelin (*Mallotus villosus*), sardines (*Sardina pilchardus*), and squid (*Loligo* spp.)). We thawed a complete palette of fish and squid, collected the thawing water, and stirred it. This prevented the formation of phases (fish mucus and water). We took samples by immersing a Salivette in the thawing water and then treated it as we would a saliva sample. We used different pack sizes for different fish species. We took one sample each from 20 kg of Atlantic herring, 15 kg of Baltic herring, 20 kg of mackerel, 5 kg of capelin, 8 kg of squid, and 8 kg of sprat.

Feeding experiment I: To measure the impact of fodder fish on saliva cortisol values, we took three samples before reinforcement and one sample directly after the dolphins swallowed the fish. Saliva samples were taken from three dolphins (Sunny, Donna, and Dolly) each morning between 8:00 and 8:15 a.m. according to the described sampling protocol. In total, 128 samples were taken. Only six samples could not be used for analysis, as they were either empty or had insufficient amounts of saliva. In order to exclude a possible dilution effect by water, the experimental setup was defined as follows: The animals were not fed before sampling. They were called individually to the border of the pool, after which they opened their mouth on command. The idea was to offer ice cubes or gelatin cubes to the animals so that the remaining water would be swallowed by ingesting the cubes. Only if the mouth was apparently free of water a saliva swab was taken. Then, the animal was sent away. About one minute later, it was called again and the second swab was taken under the described conditions. We continued to take a third swab in the same way. Only after the third sampling the fish was given as a reward. A fourth sample was taken after the reward to detect the possible influence of the fodder fish. To take the samples, the animals were divided into several groups at short notice so that one trainer could always take care of one animal. Otherwise, the daily routine was not modified.

Feeding experiment II: We were further interested in whether the values of cortisol in the thawing water of the fish correlated with the values in dolphin saliva. At the same time, we wanted to find out whether the salivary cortisol value quickly returned to normal after the fish were given. Therefore, the experimental set-up was modified as follows: The first two samples were taken without fish being given as a reward; after the second sample was taken, the dolphin got a reward of five capelin (*Mallotus villosus*) (ca. 150–200 g per fish); directly after this, the third sample was taken. Afterwards, three more samples were taken up to 6 min after feeding, for which the animals were sent away and recalled as before, again without receiving fish as a reward; they received ice cubes or gelatin as a reward instead (see Figure 4). In order to exclude the possible effect of the gelatin obtained from pork rind, the gelatin was also sampled daily. Five female dolphins (Anke, Dolly, Donna, Jenny, and Sunny) took part in this experiment. Two saliva samples were taken before feeding, one with feeding, and three more samples after feeding. We took a total of 180 saliva samples.

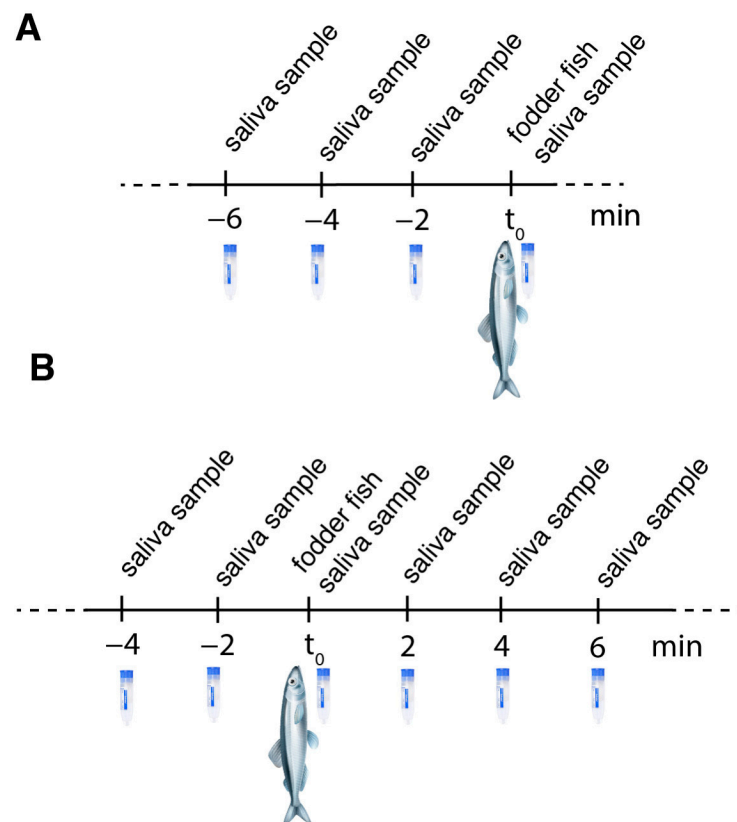


Figure 4. Fixed saliva sampling schemes used for (A) feeding experiment I and (B) feeding experiment II.

Statistics: Statistical analysis was conducted in Rstudio (Version 1.2.5042, Rstudio, Inc.) using the lme4 package by Bates et al. [65]. As the limit of detection for saliva cortisol was 0.02 nmol/L, we substituted measured values below the detection limit with 0.02 nmol/L. For the comparison of the blood cortisol levels between the treatments (training or restriction), we fitted a linear model with treatment, health status, and test assay as fixed effects and animal ID as a random factor ($\log(\text{cortisol}) \sim \text{treatm} \times \text{health} \times \text{assay} + (1 \mid \text{dolphin})$). For every parameter, we constructed a null model that excluded one fixed factor and included animal ID as a random intercept. We used ANOVAs to compare the null models to the models that included the respective fixed factor. To test the correlation between the blood and saliva cortisol values, we fitted a linear model. We also did this for the dilution series. To test the effect of feeding with fish (*Capelin, Mallotus villosus*) on the saliva cortisol values during the feeding experiments, we used restricted maximum likelihood to fit a linear mixed model with sample time as a fixed factor and animal as a random factor. We also constructed a null model that excluded the fixed factor and used ANOVAs to compare the null models to the models that included the fixed factor. We subsequently conducted Tukey's post hoc tests for the pairwise comparisons of samples. Data preparation and the calculation of basic statistical parameters (mean, standard deviation, median) were performed in Microsoft Excel. Graphs were generated using MATLAB_R2019a from Mathworks or in Rstudio using the ggplot package from Wickham [66].

3. Results

3.1. Blood Cortisol Values under Two Different Conditions

We collected blood samples during medical examinations under two different conditions: during a normal medical training procedure and on a lifting platform in a situation where dolphins were restrained. In 251 blood samples taken during training from

five females and five males, the blood cortisol values varied between 0.1 $\mu\text{g}/\text{dL}$ and 3.9 $\mu\text{g}/\text{dL}$, with an average of $0.75 \pm 0.65 \mu\text{g}/\text{dL}$. If the samples were taken during restriction ($n = 208$), the cortisol values varied from 0.2 $\mu\text{g}/\text{dL}$ up to 9 $\mu\text{g}/\text{dL}$, with an average of $2.71 \pm 1.99 \mu\text{g}/\text{dL}$.

We used different assays with slightly different standardizations and some blood samples were taken from animals that had health issues and had medication ($n = 116$). However, we never used any glucocorticoids as a medical treatment. If glucocorticoids are given, one has to be careful, as there is an attenuating effect of dexamethasone administration on cortisol release [67]. We fitted a linear mixed-effects model with treatment, assay, and health status as fixed factors and animal ID as a random factor and compared (ANOVA) it to a null model with only test assay and health status as fixed factors. We found that the treatment (restriction or training) had a significant effect and that all animals' blood cortisol levels were consistently higher when they were restricted than they were during training (LMM, $\chi^2(1) = 169.61$, $p < 0.0001$; see Figure 5 and Table A1). Meanwhile, health status was found to have no effect (LMM, $\chi^2(1) = 0.4092$, $p = 0.5224$; see Figure A2A). The assays also had a significant effect on the blood cortisol values, but this was lower than the training effect (LMM, $\chi^2(1) = 32.948$, $p < 0.0001$; see Figure A2B).

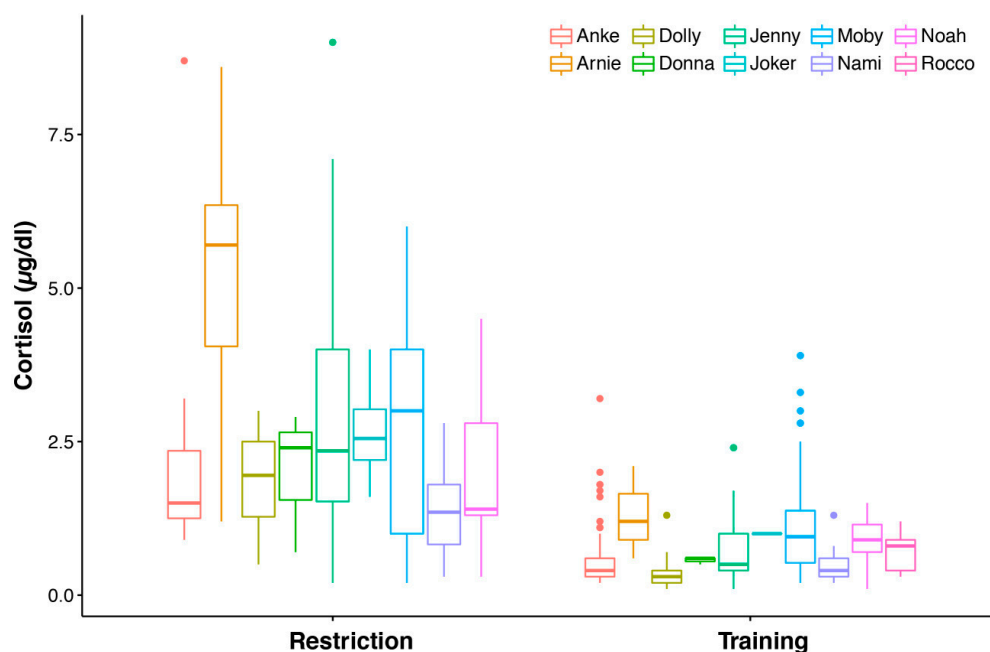


Figure 5. Blood cortisol values for five female and five male dolphins for the treatments restriction, and training.

3.2. Simultaneous Blood and Saliva Sampling

To find out how blood cortisol levels are reflected in the salivary cortisol, we tested saliva samples before and after we took a blood sample during times when the animals were restricted.

We calculated a linear regression to predict saliva cortisol values based on blood cortisol values during restriction; see Figure 6. We did not find significant regression equations for either the saliva values sampled before with an R^2 of 0.033 or for the values sampled after the blood values with an $R^2 = 0.022$ (before: $F_{1,11} = 0.3769$, $p = 0.5517$; after: $F_{1,12} = 0.2754$, $p = 0.6093$). We did, however, notice that the saliva samples taken after the blood samples had significantly increased values (before: $0.075 \pm 0.150 \text{ nmol}/\text{L}$; after: $0.382 \pm 0.564 \text{ nmol}/\text{L}$. Wilcoxon signed rank test with continuity correction: $V = 78$. p -value = 0.02524). We suspect that the increase in salivary cortisol levels is related to the stress caused by the restraint used during the blood sampling procedure.

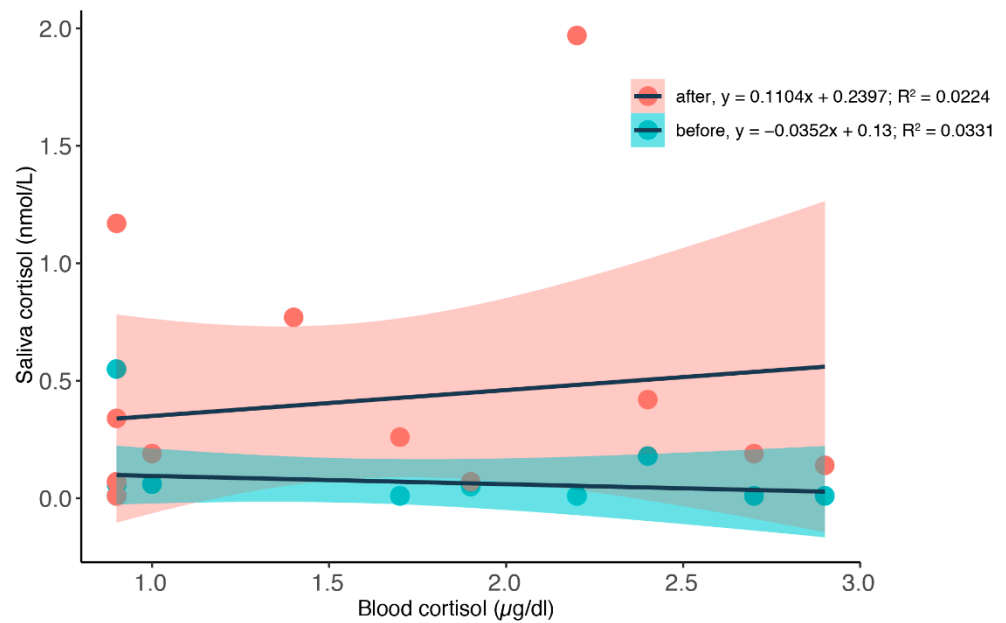


Figure 6. Correlation between blood cortisol values and saliva values during restriction. A linear curve was fitted (see Figures A3 and A4 for other curves). Saliva samples were taken before (green dots) and after (red dots) the blood samples; see Figure 3 for an exemplarily sampling scheme. Three dolphins were sampled (Jenny = 9 samples; Moby = 1 sample; Anke = 1 sample; Nami = 2 samples before, 3 samples after).

3.3. Cortisol Contamination of Fodder Fish

We examined thawing water of packs of frozen fodder fish and cephalopods after a night of them being stored at room temperature. We found the highest mean cortisol concentration values in capelin (*Mallotus villosus*) and squid (*Loligo. spp.*) (see Figure 7).

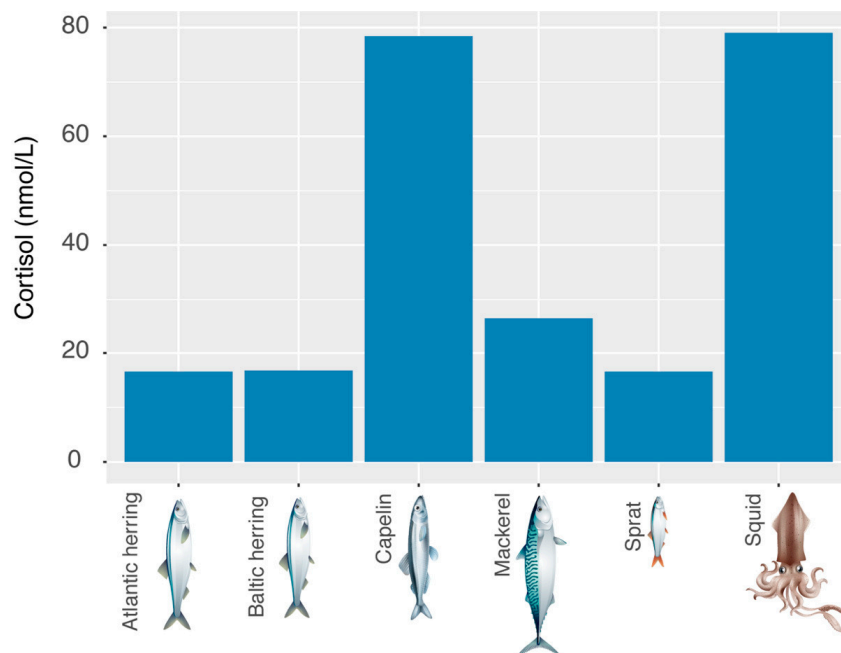


Figure 7. Cortisol values of different fodder fish and cephalopods. We measured samples taken from the thawing water of a 20 kg block of Atlantic herring, a 15 kg block of Baltic herring, a 5 kg block of capelin, a 20 kg block of mackerel, an 8 kg block of sprat and an 8 kg block of squid.

3.4. Feeding Experiment I

We found that the fodder fish had a significant effect on the salivary cortisol values (LMM, $\chi^2(3) = 54.411$, $p < 0.0001$). Indeed, the fodder fish sample differed significantly from all the samples taken before. Interestingly, sample 1 and 3 also differed significantly from each other (pairwise post hoc comparisons between all samples; see Table A2 in the Appendix A for all pairwise comparisons). For the results, see Figure 8.

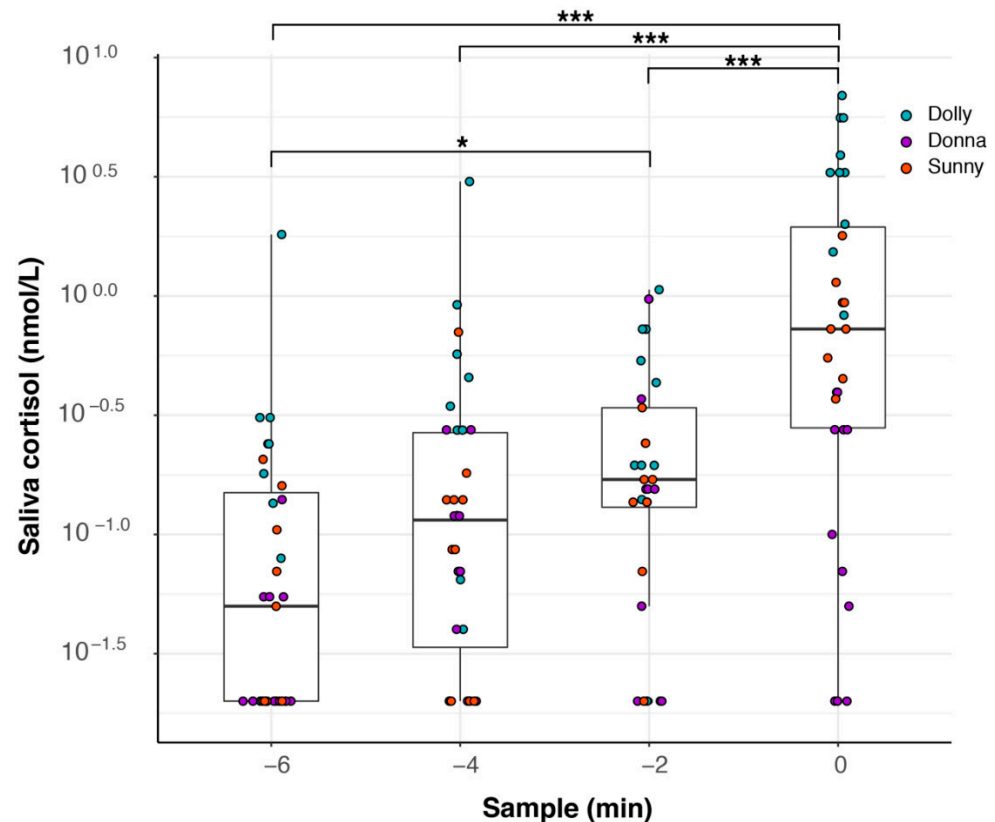


Figure 8. Saliva cortisol values during feeding experiment I. Saliva samples were taken every 2 min over a course of 6 min. At minute 0, dolphins were fed with fish (capelin, *Mallotus villosus*) and a saliva sample was taken directly afterwards. The experiment was conducted with 3 female dolphins and repeated 10–11 times (for Dolly and Donna, 11 times; for Sunny, 10 times). Some selected significance levels of Tukey’s pairwise post hoc comparisons are indicated as follows: * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$. For all results, see Table A2.

3.5. Feeding Experiment II

To measure how increased saliva values from fodder fish are diluted after feeding, we carried out a second feeding experiment where we also measured saliva values up to 6 min after feeding. We found a significant effect of feeding on salivary cortisol values (LMM, $\chi^2(5) = 189.63$, $p < 0.0001$), which was mainly caused by the fodder fish given at sample minute 0; see Figure 9. The salivary cortisol levels peaked at the time of feeding and decreased thereafter, returning to pre-feeding levels 6 min after feeding. Using pairwise post hoc comparisons between sample -2 and all following samples, we found significant differences for sample 0 ($p < 0.0001$), sample 2 ($p < 0.0001$), and sample 4 ($p = 0.0016$), but not for sample 6 ($p = 0.9412$); see Table A3 for all pairwise comparisons.

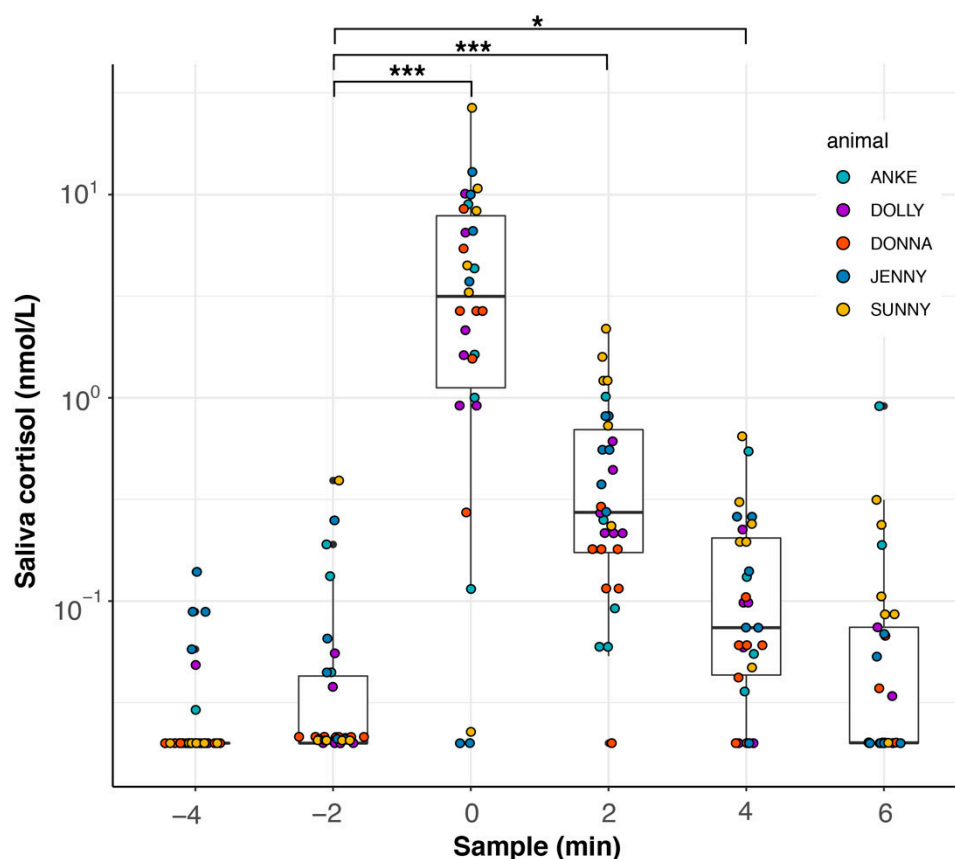


Figure 9. Saliva cortisol values during feeding experiment II. Saliva samples were taken every two minutes over a course of 10 min. At minute 0, dolphins were fed with fish (capelin, *Mallotus villosus*) and a saliva sample was taken directly afterwards. The experiment was conducted with 5 female dolphins and repeated 5–7 times (Anke, 5 times; Dolly, Jenny, and Sunny, 6 times; Donna, 7 times). Some selected significance levels of Tukey’s pairwise post hoc comparisons are indicated as follows: * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$. For all results, see Table A3.

4. Discussion

The analysis of blood samples for the quantification of various hormones is an established method, providing fast and accurate results. Disadvantages include the fact that blood sampling is always an invasive procedure and that the values measured can be influenced by the blood sampling method used (via training or restriction). Blood sample results are available quickly and their analysis is comparably inexpensive. Blood is a good matrix by which to obtain valid results quickly for routine sampling. However, it becomes difficult if the samples have to be taken more frequently (e.g., several times a week or several times a day at different times). Various factors can have an influence on the amount of cortisol in the blood (e.g., social stress [68], cold stress, daytime, and season [69]). It can clearly be shown that blood collection on the lifting platform leads to significantly higher values; hence, it can be assumed that even if the situation is familiar to the animals, it is likely to lead to higher stress levels. The predictability of the situation plays a role here. The dolphins know their routines exactly. In training, the animals can choose whether they want to participate or not. At any time, they are the masters of the situation, which they can end by simply swimming away.

The situation on the lifting platform (which is also familiar), however, is completely different. Here, the animals are restrained because they cannot swim away as soon as the lifting platform is above a certain water level. This leads to them experiencing significantly more stress, which leads to higher cortisol levels. Our measured blood values may show that the predictability of a situation and the possibility of avoiding it by one’s own actions

significantly influence the blood cortisol level. The different blood values obtained are mainly dependent on the type of blood sampling used (restriction/training) and also differ slightly between individuals; however, we found no dependency on the physiological condition of the animal (sick/healthy).

Salivary cortisol levels are used more and more to measure stress levels in zoo animals. While this appears to be a relatively straightforward approach for studying species such as non-human primates [70,71], dogs, cats, and others [72–74], the investigation of aquatic animals using saliva as a non-invasive biomarker matrix is more challenging. Different factors can lead to invalid results here, since saliva samples may be contaminated/diluted by pool water and/or fodder fish. The aim of our study was to investigate whether these factors are common downsides of salivary cortisol measurements. We demonstrated that the contamination of saliva with fodder fish had a significant effect on the cortisol levels measured. This influence persisted after the fish had been swallowed; in our measurements, this was still measurable up to about 4 min after the feed was given. Therefore, salivary samples should never be taken while animals are fed or shortly after a feeding reward.

Why are the saliva cortisol levels not correlated to the blood cortisol levels? One reason for the missing correlation could be that saliva is formed and secreted in different glands, this means that the saliva composition is variable. After a study by Vincent and Michell, it was shown that in dogs exposed to acute stress, the salivary cortisol value increases almost parallel to the blood cortisol value. An increase was observed 10 min after the onset of stress [54]. So why couldn't we find parallel increase in dolphins? One reason for the different cortisol values found in blood and saliva could be that there is always the possibility of dilution by pool water even when taking samples on a lifting platform or the comparatively short time interval between blood and saliva sampling. Additionally, the measurement of very small amounts of cortisol is associated with some difficulties. This is shown by the fact that two laboratories could not measure any valid values. Another reason could be that the saliva samples were measured by LC-MS/MS, while the blood samples were measured by CLIA: CLIA is an immunological method that is based on concurrent binding of the hormone to the antibody. Because steroid hormones are chemically/structurally similar, antibodies cannot distinguish between steroids with absolute specificity. According to the manufacture instructions, Roche cortisol II for Cobas, the estimated cross-reactivity for corticosterone is 6.58% and the one for 11-Deoxycortisol is 4.9%. In addition to that, antibodies cannot distinguish between free and protein-bound hormone fractions. Cortisol levels in serum measured by CLIA reflect total cortisol, both free and bound. The majority of the blood-cortisol circulates bound to corticosteroid-binding globulin (CBG) and albumin. Normally, less than 5% of circulating cortisol is free (unbound). In saliva, the cortisol is mostly unbound. The LC/MS-MS measures cortisol with an extremely good specificity with almost zero cross-reactivity with other substances. This could also be an explanation for the poor correlation we observed.

Our data show that the exclusive use of cortisol, especially if only quantified on one occasion, is a poor indicator for the general well-being of bottlenose dolphins (*Tursiops truncatus*). It also has to be considered that absolute values of a single sample are not indicators for the condition of an animal. Any sampling must take into account whether the type of sampling used may have an influence on the result. Additionally, the condition of the animal should also be included in the evaluation. This means that the determination of cortisol values alone is not sufficient. In order to be able to make statements about the well-being of animals, one still needs additional information (for example, the health status of an animal) and, perhaps, also behavioral observations, as qualitative and quantitative analyses of behavior were shown to be important welfare indicators in bottlenose dolphins under professional care [75].

We also showed that fish as a reward had an enormous influence on the cortisol content of dolphin saliva. This is because when the dolphins swallow fish, they press it against their hard palate with their tongue and move it towards the gullet, which causes the fish to

be “squeezed out”. The body fluids of the fish mix with the saliva and thereby increase the salivary cortisol content. This increase is still measurable 4 min after the reward is given.

Although our data show that the use of saliva cortisol values seem to be rather unreliable because there is no correlation with the blood values, as well as the fact that there can be an influence by dilution with pool water and contamination with fodder fish, we also find indications of significantly increased values due to stress or arousal. In blood versus saliva measurements, we found increased values for the second measurement, where the animals had already been under restriction for some time. In the third sample of feeding experiment I, which was taken before feeding, the cortisol levels were significantly increased. This could possibly point towards a state of arousal or anticipation of food. Therefore, the use of saliva cortisol values might still allow us to obtain information about the animals’ welfare and emotional state. However, samples have to be taken with care, and it has to be considered that their variation is large. Further studies must find suitable sampling schemes for reliable saliva cortisol measurements in aquatic mammals.

5. Conclusions

Blood cortisol measurements can be used to measure acute stress. This is clearly demonstrated by the measurements of blood cortisol levels taken on the lifting platform. The non-invasive sampling of saliva is another option for cortisol measurement, but it is more prone to error. This is because, unlike blood samples, saliva samples from aquatic mammals are likely to be contaminated; therefore, care must be taken that the sample is as clean as possible (i.e., without the influence of dilution by surrounding pool water).

Other parameters (especially behavioral observations) also have to be used when assessing animals’ well-being. Basing decisions exclusively on cortisol levels could, as our data show, lead to false results. On the other hand, it is also possible to find important signals in the salivary cortisol levels. Therefore, we think that further research on salivary cortisol in marine mammals is needed.

Author Contributions: Conceptualization, D.R., R.S., L.v.F., K.B. and M.E.; methodology, D.R., R.S., L.v.F. and K.B.; validation, T.B., C.K.; formal analysis, D.R. and R.S.; investigation, D.R.; lab resources, T.B., C.K.; data curation, R.S.; writing—original draft preparation, D.R.; writing—review and editing, D.R., R.S., L.v.F. and K.B.; visualization, R.S.; statistics, R.S.; supervision, M.E. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research received no external funding.

Institutional Review Board Statement: As the authority responsible for the approval of animal experiments, the government of Lower Franconia informed us that regular saliva sampling in the context of medical training does not fall under notification or approval requirements. Blood samples were taken exclusively within the framework of routine examinations or on an ad hoc basis in the presence of a disease.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: The data presented in this study are available on request from the corresponding authors. The data are not publicly available because they are owned by the owner of the animals and are only available with permission.

Acknowledgments: We would like to thank the animal caretakers Armin Fritz, Christiane Thiere, and the whole team who supported us by conducting training and sampling. Special thanks to the veterinary technicians Simone Pürkel, Gabi Foth, Tina Locker, and Manuela Enzelberger for their help in editing the samples and collecting the data. We would like to thank Christian Langhammer for the data management. We would like to thank Wei Gao, for the help with the LC-MS/MS.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

Appendix A

Instructions for zookeepers:

Zookeepers who took the samples followed these instructions/this protocol:

- Do not feed the dolphin before sampling.
- Wear gloves.
- Remove the cotton swab from the plastic tube.
- Collect saliva from the side of the tongue for 5 s.
- Put the swab back into the tube.
- Record the date, time of the collection, and name of the animal on the plastic tube.
- If more than one saliva sample is taken, reward the animal with ice cubes or gelatin (only if necessary). If available, take notes on the documentation sheet.
- Send tubes to the veterinarians.



Figure A1. Saliva sampling, Image of the saliva sampling procedure.

Table A1. Statistical results of the linear mixed-effect models (LMMs) fit by REML. The results show the effect of the treatment, test assay, and health status on the blood cortisol levels. Formula: $\log(\text{Cortisol}) \sim \text{treatm} + \text{assay} + \text{health} + (1 \mid \text{dolphinID})$. Significance levels are indicated * $p < 0.05$ and *** $p < 0.001$.

LMM-Model	Observation Periods	Estimate	Std. Error	Df	T-Value	p-Value
<i>Blood cortisol</i> REML AIC: 1008.779	Intercept	0.38350	0.14475	16.75493	2.649	0.017 *
	Treatment training	-1.08618	0.07620	464.74523	-14.253	$<2 \times 10^{-16}$ ***
	Elecsys Cortisol III	0.45200	0.07766	461.23621	5.820	1.1×10^{-8} ***
	Health status sick	0.04378	0.06810	463.24528	0.643	0.521

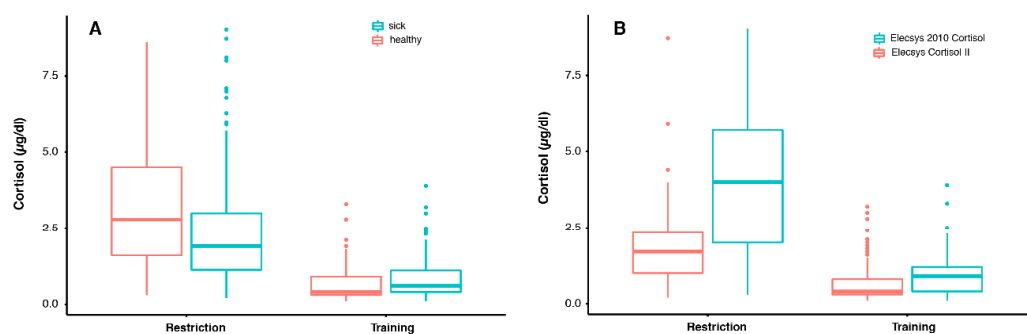


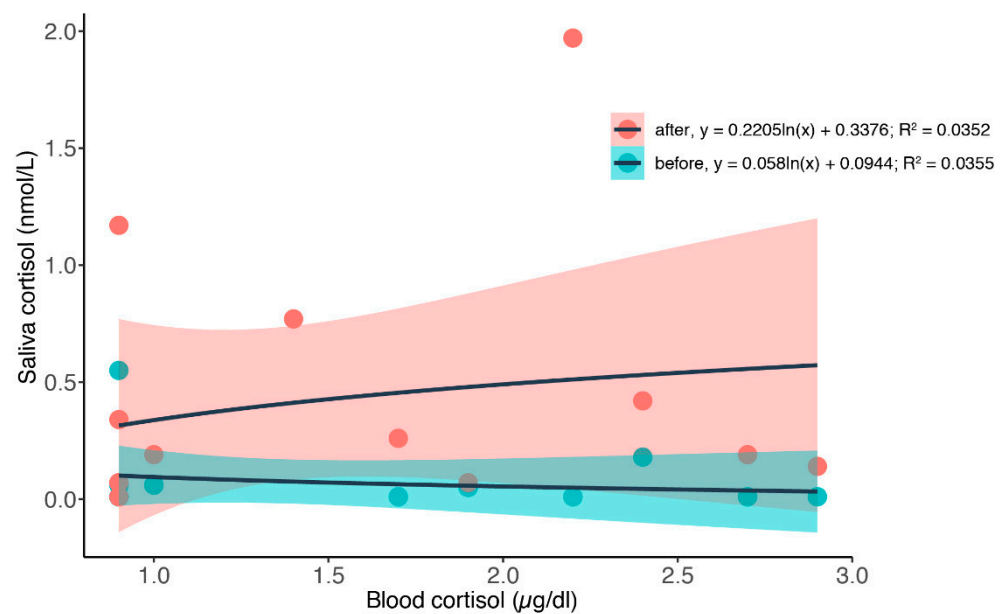
Figure A2. Blood cortisol values for five female and five male dolphins who underwent two different treatments: restriction and training. (A) Healthy animals versus animals experiencing medical treatment (referred to as sick). (B) The two different test assays, which had different sensitivities.

Table A2. Tukey's pairwise post hoc comparisons for feeding experiment I; see Figure 8.

Contrast	Estimate	SE	df	T Ratio	p-Value
−6 effect vs. −4 effect	−0.595	0.287	122	−2.074	0.1675
−6 effect vs. −2 effect	−0.937	0.294	122	−3.185	0.0098
−6 effect vs. 0 effect	−2.305	0.291	122	−7.911	<0.0001
−4 effect vs. −2 effect	−0.342	0.292	122	−1.173	0.6451
−4 effect vs. 0 effect	−1.71	0.289	122	−5.916	<0.0001
−2 effect vs. 0 effect	−1.368	0.297	122	−4.614	0.0001

Table A3. Tukey's pairwise post hoc comparisons for feeding experiment II; see Figure 9.

Contrast	Estimate	SE	df	T Ratio	p-Value
−4 effect vs. −2 effect	−0.242	0.289	179	−0.838	0.9601
−4 effect vs. 0 effect	−4.339	0.289	179	−15.012	<0.0001
−4 effect vs. 2 effect	−2.492	0.289	179	−8.623	<0.0001
−4 effect vs. 4 effect	−1.19	0.289	179	−4.119	0.0008
−4 effect vs. 6 effect	−0.51	0.292	179	−1.749	0.5012
−2 effect vs. 0 effect	−4.097	0.289	179	−14.174	<0.0001
−2 effect vs. 2 effect	−2.25	0.289	179	−7.785	<0.0001
−2 effect vs. 4 effect	−0.948	0.289	179	−3.281	0.0155
−2 effect vs. 6 effect	−0.268	0.292	179	−0.919	0.9412
0 effect vs. 2 effect	1.847	0.289	179	6.389	<0.0001
0 effect vs. 4 effect	3.148	0.289	179	10.894	<0.0001
0 effect vs. 6 effect	3.829	0.292	179	13.131	<0.0001
2 effect vs. 4 effect	1.302	0.289	179	4.504	0.0002
2 effect vs. 6 effect	1.982	0.292	179	6.798	<0.0001
4 effect vs. 6 effect	0.68	0.292	179	2.333	0.1863

**Figure A3.** Correlation between blood cortisol values and saliva values during restriction. A logarithmic curve was fitted. Saliva samples were taken before (green dots) and after (red dots) the blood samples; see Figure 3 for an exemplarily sampling scheme. Three dolphins were sampled (Jenny = 9 samples; Moby = 1 sample; Anke = 1 sample; Nami = 2 samples before, 3 samples after).

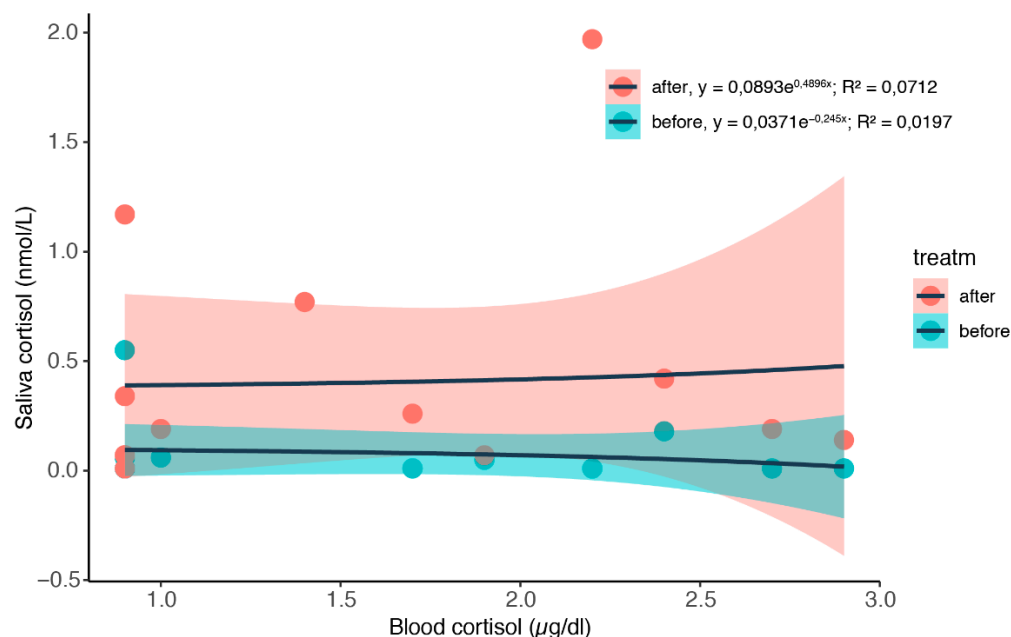


Figure A4. Correlation between blood cortisol values and saliva values during restriction. An exponential curve was fitted. Saliva samples were taken before (green dots) and after (red dots) the blood samples; see Figure 3 for an exemplarily sampling scheme. Three dolphins were sampled (Jenny = 9 samples; Moby = 1 sample; Anke = 1 sample; Nami = 2 samples before, 3 samples after).

References

- Clegg, I.; Van Elk, C.; Delfour, F. Applying welfare science to bottlenose dolphins (*Tursiops truncatus*). *Anim. Welf.* **2017**, *26*, 165–176. [CrossRef]
- Von Fersen, L.; Encke, D.; Hüttner, T.; Baumgartner, K. Establishment and implementation of an animal welfare decision tree to evaluate the welfare of zoo animals. *Aquat. Mamm.* **2018**, *44*, 211–220. [CrossRef]
- Rees, P.A. *Studying Captive Animals: A Workbook of Methods in Behaviour, Welfare and Ecology*; John Wiley & Sons: Hoboken, NJ, USA, 2015.
- Romano, M.C.; Zulema Rodas, A.; Valdez, R.A.; Elizabeth Hernandez, S.; Galindo, F.; Canales, D.; Maria Brousset, D. Stress in wildlife species: Noninvasive monitoring of glucocorticoids. *Neuroimmunomodulation* **2010**, *17*, 209–212. [CrossRef]
- Berger, A. Activity patterns, chronobiology and the assessment of stress and welfare in zoo and wild animals. *Int. Zoo Yearb.* **2011**, *45*, 80–90. [CrossRef]
- Webster, J. Assessment of animal welfare: The five freedoms. In *Animal Welfare: A Cool Eye Towards Eden*; Blackwell Science: Oxford, UK, 1994; pp. 10–14.
- Mellor, D.J. Updating animal welfare thinking: Moving beyond the “five freedoms” towards “a life worth living”. *Animals* **2016**, *6*, 21. [CrossRef]
- Clegg, I.L.K.; Borger-Turner, J.L.; Eskelinen, H.C. C-well: The development of a welfare assessment index for captive bottlenose dolphins (*Tursiops truncatus*). *Anim. Welf.* **2015**, *24*, 267–282. [CrossRef]
- Thompson, L.A.; Spoon, T.R.; Goertz, C.E.; Hobbs, R.C.; Romano, T.A. Blow collection as a non-invasive method for measuring cortisol in the beluga (*Delphinapterus leucas*). *PLoS ONE* **2014**, *9*, e114062.
- American Humane. American Humane Association: Humane Conservation Program. Available online: <http://humaneconservation.org/app/uploads/2016/05/Certification-Standards-Details-Humane-Conservation.pdf> (accessed on 17 December 2021).
- Reeder, D.M.; Kramer, K.M. Stress in free-ranging mammals: Integrating physiology, ecology and natural history. *J. Mammal.* **2005**, *86*, 225–235. [CrossRef]
- Carrasco, G.A.; Van de Kar, L.D. Neuroendocrine pharmacology of stress. *Eur. J. Pharmacol.* **2003**, *463*, 235–272. [CrossRef]
- Voigt, K. *Endokrines System*, 4th ed.; Georg Thieme Verlag: Stuttgart, Germany, 2003.
- Mormède, P.; Andanson, S.; Aupein, B.; Beerda, B.; Guemene, D.; Malmkvist, J.; Manteca, X.; Manteuffel, G.; Prunet, P.; van Reenen, C.G.; et al. Exploration of the hypothalamic-pituitary-adrenal function as a tool to evaluate animal welfare. *Physiol. Behav.* **2007**, *92*, 317–339. [CrossRef]
- Palazzolo, D.L.; Quadri, S.K. The effects of aging on the circadian rhythm of serum cortisol in the dog. *Exp. Gerontol.* **1987**, *22*, 379–387. [CrossRef]
- Irvine, C.H.G.; Alexander, S.L. Factors affecting the circadian rhythm in plasma cortisol concentrations in the horse. *Domest. Anim. Endocrinol.* **1994**, *11*, 227–238. [CrossRef]

17. De Jong, I.C.; Prelle, I.T.; van de Burgwal, J.A.; Lambooj, E.; Korte, S.M.; Blokhuis, H.J.; Koolhaas, J.M. Effects of environmental enrichment on behavioral responses to novelty, learning, and memory, and the circadian rhythm in cortisol in growing pigs. *Physiol. Amp. Behav.* **2000**, *68*, 571–578. [[CrossRef](#)]
18. Van Eekelen, A.P.J.; Kerhof, G.A.; Amsterdam, J.G.C. Circadian variation in cortisol reactivity to an acute stressor. *Chronobiol. Int. J. Biol. Med. Rhythm. Res.* **2003**, *20*, 863. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
19. Sage, D.; Ganem, J.; Guillaumond, F.; Laforge-Anglade, G.; François-Bellan, A.; Bosler, O.; Becquet, D. Influence of the corticosterone rhythm on photic entrainment of locomotor activity in rats. *J. Biol. Rhythm.* **2004**, *19*, 144–156. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
20. Verhagen, L.A.W.; Pévet, P.; Saboureaux, M.; Sicard, B.; Nesme, B.; Claustrat, B.; Buijs, R.M.; Kalsbeek, A. Temporal organization of the 24-h corticosterone rhythm in the diurnal murid rodent *arvicanthus ansorgei thomas 1910*. *Brain Res.* **2004**, *995*, 197–204. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
21. Assenza, A.; Fazio, F.; Marceno, G.; Piccione, G.; Caola, G. Daily rhythms of serum and salivary parameters in goats. *Aust. Vet. J.* **2009**, *87*, 397–401. [[CrossRef](#)]
22. Refinetti, R. *Circadian Physiology*, 2nd ed.; Taylor & Francis: Boca Raton, FL, USA, 2006; pp. 105–216.
23. Amaral, R.S. Use of alternative matrices to monitor steroid hormones in aquatic mammals: A review. *Aquat. Mamm.* **2010**, *36*, 162–171. [[CrossRef](#)]
24. Säkkinen, H.; Tornbeg, J.; Goddard, P.J.; Eloranta, E.; Ropstad, E.; Saarela, S. The effect of blood sampling method on indicators of physiological stress in reindeer (*Rangifer tarandus tarandus*). *Domest. Anim. Endocrinol.* **2004**, *26*, 87–98. [[CrossRef](#)]
25. Higham, J.P.; Vitale, A.B.; Rivera, A.M.; Ayala, J.E.; Maestripieri, D. Measuring salivary analytes from free-ranging monkeys. *Physiol. Amp. Behav.* **2010**, *101*, 601–607. [[CrossRef](#)]
26. Erhard, M. Physiologie und Tierschutz. In *Physiologie der Haustiere*; von Engelhardt, W., Ed.; Enke: Stuttgart, Germany, 2010; p. 712.
27. Romano, T.A.; Keogh, M.J.; Kelly, C.; Feng, P.; Berk, L.; Schlundt, C.E.; Carder, D.A.; Finneran, J.J. Anthropogenic sound and marine mammal health: Measures of the nervous and immune systems before and after intense sound exposure. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* **2004**, *61*, 1124–1134. [[CrossRef](#)]
28. Galligan, T.M.; Schwacke, L.H.; Houser, D.S.; Wells, R.S.; Rowles, T.; Boggs, A.S.P. Characterization of circulating steroid hormone profiles in the bottlenose dolphin (*Tursiops truncatus*) by liquid chromatography-tandem mass spectrometry (lc-ms/ms). *Gen. Comp. Endocrinol.* **2018**, *263*, 80–91. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
29. Suzuki, M.; Tobayama, T.; Katsumata, E.; Uchida, S.; Ueda, K.; Yoshioka, M.; Aida, K. Secretory patterns of cortisol in indo-pacific bottlenose dolphins and killer whales. *Fish. Sci.* **2002**, *68*, 451–452. [[CrossRef](#)]
30. Suzuki, M.; Tobayama, T.; Katsumata, E.; Yoshioka, M.; Aida, K. Serum cortisol levels in captive killer whale and bottlenose dolphin. *Fish. Sci.* **1998**, *64*, 643–647. [[CrossRef](#)]
31. Suzuki, M.; Uchida, S.; Ueda, K.; Tobayama, T.; Katsumata, E.; Yoshioka, M.; Aida, K. Diurnal and annual changes in serum cortisol concentrations in indo-pacific bottlenose dolphins *Tursiops aduncus* and killer whales *orcinus orca*. *Gen. Comp. Endocrinol.* **2003**, *132*, 427–433. [[CrossRef](#)]
32. Bertelsmann, H. *Haltungsbedingungen, Soziale Beziehungen und Streß Bei Großen Tümmlern (Tursiops truncatus) in Delphinarien*. Ph.D. Thesis, Universität Bayreuth, Bayreuth, Germany, 1999.
33. Creel, S.; Fox, J.E.; Hardy, A.; Sands, J.; Garrott, B.; Peterson, R.O. Snowmobile activity and glucocorticoid stress responses in wolves and elk actividad de vehículos para nieve y respuestas de stress glucocorticoide en lobos y alces. *Conserv. Biol.* **2002**, *16*, 809–814. [[CrossRef](#)]
34. Creel, S. Dominance, aggression and glucocorticoid levels in social carnivores. *J. Mammal.* **2005**, *96*, 255–264. [[CrossRef](#)]
35. Palme, R.; Rettenbacher, S.; Touma, C.; El-Bahr, S.M.; Mostl, E. Stress hormones in mammals and birds—comparative aspects regarding metabolism, excretion, and noninvasive measurement in fecal samples. In *Trends in Comparative Endocrinology and Neurobiology*; Vaudry, H., Roubos, E., Schoofs, L., Fiik, G., Larhammar, D., Eds.; New York Acad Sciences: New York, NY, USA, 2005; Volume 1040, pp. 162–171.
36. Howell-Stephens, J.A.; Brown, J.S.; Bernier, D.; Mulkerin, D.; Santymire, R.M. Characterizing adrenocortical activity in zoo-housed southern three-banded armadillos (*Tolypeutes matacus*). *Gen. Comp. Endocrinol.* **2012**, *178*, 64–74. [[CrossRef](#)]
37. Touma, C.; Palme, R. Measuring fecal glucocorticoid metabolites in mammals and birds: The importance of validation. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **2005**, *1046*, 54–74. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
38. Hein, A.; Palme, R.; Baumgartner, K.; von Fersen, L.; Woelfing, B.; Greenwood, A.D.; Bechshoft, T.; Siebert, U. Faecal glucocorticoid metabolites as a measure of adrenocortical activity in polar bears (*Ursus maritimus*). *Conserv. Physiol.* **2020**, *8*, coaa012. [[CrossRef](#)]
39. Kalliokoski, O.; Timm, J.A.; Ibsen, I.B.; Hau, J.; Frederiksen, A.M.B.; Bertelsen, M.F. Fecal glucocorticoid response to environmental stressors in green iguanas (*Iguana iguana*). *Gen. Comp. Endocrinol.* **2012**, *177*, 93–97. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
40. Stalder, T.; Kirschbaum, C. Analysis of cortisol in hair—state of the art and future directions. *Brain Behav. Immun.* **2012**, *26*, 1019–1029. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
41. Cattet, M.; Macbeth, B.J.; Janz, D.M.; Zedrosser, A.; Swenson, J.E.; Dumond, M.; Stenhouse, G.B. Quantifying long-term stress in brown bears with the hair cortisol concentration: A biomarker that may be confounded by rapid changes in response to capture and handling. *Conserv. Physiol.* **2014**, *2*, cou026. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
42. Mastromonaco, G.F.; Gunn, K.; McCurdy-Adams, H.; Edwards, D.B.; Schulte-Hostedde, A.I. Validation and use of hair cortisol as a measure of chronic stress in eastern chipmunks (*Tamias striatus*). *Conserv. Physiol.* **2014**, *2*, cou005. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

43. Rakotoniaina, J.H.; Kappeler, P.M.; Kaesler, E.; Hämäläinen, A.M.; Kirschbaum, C.; Kraus, C. Hair cortisol concentrations correlate negatively with survival in a wild primate population. *BMC Ecol.* **2017**, *17*, 1–13. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
44. Reese, L.; Baumgartner, K.; von Fersen, L.; Merle, R.; Ladwig-Wiegand, M.; Will, H.; Haase, G.; Tallo-Parra, O.; Carbajal, A.; Lopez-Bejar, M. Feather corticosterone measurements of greater flamingos living under different forms of flight restraint. *Animals* **2020**, *10*, 605. [[CrossRef](#)]
45. Jenni-Eiermann, S.; Helfenstein, F.; Vallat, A.; Glauser, G.; Jenni, L. Corticosterone: Effects on feather quality and deposition into feathers. *Methods Ecol. Evol.* **2015**, *6*, 237–246. [[CrossRef](#)]
46. Biancani, B.; Da Dalt, L.; Lacave, G.; Romagnoli, S.; Gabai, G. Measuring fecal progesterones as a tool to monitor reproductive activity in captive female bottlenose dolphins (*Tursiops truncatus*). *Theriogenology* **2009**, *72*, 1282–1292. [[CrossRef](#)]
47. Mercera, K. Le Dosage du Cortisol Fécal: Faisabilité, Intérêts et Limites Dans L'étude du Bien-être du Grand Dauphin (*Tursiops truncatus*). Ph.D. Thesis, École nationale vétérinaire d'Alfort, Alfort, Sweden, 2019.
48. Biancani, B.; Dalt, L.D.; Gallina, G.; Capolongo, F.; Gabai, G. Fecal cortisol radioimmunoassay to monitor adrenal gland activity in the bottlenose dolphin (*Tursiops truncatus*) under human care. *Mar. Mammal Sci.* **2017**, *33*, 1014–1034. [[CrossRef](#)]
49. Miller, L.J.; Lauderdale, L.K.; Walsh, M.T.; Bryant, J.L.; Mitchell, K.A.; Granger, D.A.; Mellen, J.D. Reference intervals and values for fecal cortisol, aldosterone, and the ratio of cortisol to dehydroepiandrosterone metabolites in four species of cetaceans. *PLoS ONE* **2021**, *16*, e0250331.
50. Muraco, H.; Cheng, A.; Ravidá, N.; Arn, D.; Hudson, J.; Durrant, B. A new approach to detection of luteinizing hormone in a bottlenose dolphin (*Tursiops truncatus*). *Aquat. Mamm.* **2009**, *35*, 386. [[CrossRef](#)]
51. Lettrichová, M.I. Saliva as Diagnostic Fluid: Its Applicability to Noninvasive Evaluation of Oxidative Stress Status and Ovulation Detection. Ph.D. Thesis, Comenius University, Bratislava, Slovakia, 2015.
52. Humphrey, S.P.; Williamson, R.T. A review of saliva: Normal composition, flow, and function. *J. Prosthet. Dent.* **2001**, *85*, 162–169. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
53. Veerman, E.; Van den Keybus, P.; Vissink, A.; Amerongen, A.N. Human glandular salivas: Their separate collection and analysis. *Eur. J. Oral Sci.* **1996**, *104*, 346–352. [[CrossRef](#)]
54. Vincent, I.C.; Michell, A.R. Comparison of cortisol concentrations in saliva and plasma of dogs. *Res. Vet. Sci.* **1992**, *53*, 342–345. [[CrossRef](#)]
55. Beerda, B.; Schilder, M.; Janssen, N.; Mol, J.A. The use of saliva cortisol, urinary cortisol, and catecholamine measurements for a noninvasive assessment of stress responses in dogs. *Horm. Behav.* **1996**, *30*, 272–279. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
56. Pedernera-Romano, C.; Valdez, R.A.; Singh, S.; Chiappa, X.; Romano, M.C.; Galindo, F. Salivary cortisol in captive dolphins (*Tursiops truncatus*): A non-invasive technique. *Anim. Welf.* **2006**, *15*, 359–362.
57. Cook, N.J. Review: Minimally invasive sampling media and the measurement of corticosteroids as biomarkers of stress in animals. *Can. J. Anim. Sci.* **2012**, *92*, 227–259. [[CrossRef](#)]
58. Ugaz, C.; Valdez, R.A.; Romano, M.C.; Galindo, F. Behavior and salivary cortisol of captive dolphins (*Tursiops truncatus*) kept in open and closed facilities. *J. Vet. Behav. Clin. Appl. Res.* **2013**, *8*, 285–290. [[CrossRef](#)]
59. Monreal-Pawlowsky, T.; Carbajal, A.; Tallo-Parra, O.; Sabés-Alsina, M.; Monclús, L.; Almunia, J.; Fernández-Bellon, H.; Lopez-Bejar, M. Daily salivary cortisol levels in response to stress factors in captive common bottlenose dolphins (*Tursiops truncatus*): A potential welfare indicator. *Vet. Rec.* **2017**, *180*, 593. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
60. Bonga, S.E.W. The stress response in fish. *Physiol. Rev.* **1997**, *77*, 591–625. [[CrossRef](#)]
61. Campbell, M.D.; Patino, R.; Tolan, J.; Strauss, R.; Diamond, S.L. Sublethal effects of catch-and-release fishing: Measuring capture stress, fish impairment, and predation risk using a condition index. *ICES J. Mar. Sci.* **2009**, *67*, 513–521. [[CrossRef](#)]
62. Sadoul, B.; Geffroy, B. Measuring cortisol, the major stress hormone in fishes. *J. Fish Biol.* **2019**, *94*, 540–555. [[CrossRef](#)]
63. Gao, W.; Stalder, T.; Kirschbaum, C. Quantitative analysis of estradiol and six other steroid hormones in human saliva using a high throughput liquid chromatography–tandem mass spectrometry assay. *Talanta* **2015**, *143*, 353–358. [[CrossRef](#)]
64. Pankhurst, N.; Sharples, D. Effects of capture and confinement on plasma cortisol concentrations in the snapper, *Pagrus auratus*. *Mar. Freshw. Res.* **1992**, *43*, 345–355. [[CrossRef](#)]
65. Bates, D.; Mächler, M.; Bolker, B.; Walker, S. Fitting linear mixed-effects models using lme4. *arXiv* **2014**, arXiv:1406.5823.
66. Wickham, H. *Ggplot2: Elegant Graphics for Data Analysis*; Springer: Berlin/Heidelberg, Germany, 2016.
67. Reidarson, T.H.; McBain, J.F. Hematologic, biochemical, and endocrine effects of dexamethasone on bottlenose dolphins (*Tursiops truncatus*). *J. Zoo Wildl. Med.* **1999**, *30*, 310–312.
68. Waples, K.A.; Gales, N.J. Evaluating and minimising social stress in the care of captive bottlenose dolphins (*Tursiops aduncus*). *Zoo Biol.* **2002**, *21*, 5–26. [[CrossRef](#)]
69. Judd, H.L.; Ridgway, S. Twenty-four hour patterns of circulating androgens and cortisol in male dolphins. In *Breeding Dolphin: Present Status, Suggestion for the Future*; National Technical Information Service: Springfield, VA, USA, 1977; pp. 269–277.
70. Pfefferle, D.; Plümer, S.; Burchardt, L.; Treue, S.; Gail, A. Assessment of stress responses in rhesus macaques (*Macaca mulatta*) to daily routine procedures in system neuroscience based on salivary cortisol concentrations. *PLoS ONE* **2018**, *13*, e0190190. [[CrossRef](#)]
71. Behringer, V.; Borchers, C.; Deschner, T.; Möstl, E.; Selzer, D.; Hohmann, G. Measurements of salivary alpha amylase and salivary cortisol in hominoid primates reveal within-species consistency and between-species differences. *PLoS ONE* **2013**, *8*, e60773. [[CrossRef](#)]

72. Da Silva, B.P.; Knackfuss, F.B.; Labarthe, N.; Mendes-de-Almeida, F. Effect of a synthetic analogue of the feline facial pheromone on salivary cortisol levels in the domestic cat. *Pesqui. Vet. Bras.* **2017**, *37*, 287–290.
73. Menargues, A.; Urios, V.; Mauri, M. Welfare assessment of captive asian elephants (*Elephas maximus*) and indian rhinoceros (*Rhinoceros unicornis*) using salivary cortisol measurement. *Anim. Welf.* **2008**, *17*, 305–312.
74. Peeters, M.; Sulon, J.; Beckers, J.F.; Ledoux, D.; Vandenheede, M. Comparison between blood serum and salivary cortisol concentrations in horses using an adrenocorticotrophic hormone challenge. *Equine Vet. J.* **2011**, *43*, 487–493. [[CrossRef](#)]
75. Huettner, T.; Dollhaeupl, S.; Simon, R.; Baumgartner, K.; von Fersen, L. Activity budget comparisons using long-term observations of a group of bottlenose dolphins (*Tursiops truncatus*) under human care: Implications for animal welfare. *Animals* **2021**, *11*, 2107. [[CrossRef](#)]

IV. Erweiterte Diskussion

1 Verdünnungsreihe

Für Speichelcortisoluntersuchungen des Menschen werden verschiedene kommerziell erhältliche Tests angeboten. Sie sind für humanen Speichel validiert. Einen solchen validierten Test zur Speichelcortisolbestimmung gibt es für kein Tier, so auch nicht für den Großen Tümmler (*Tursiops truncatus*). Daher war es zunächst wichtig die bisher von verschiedenen Autoren genutzten Tests zu validieren. Dafür verwendeten wir eine Verdünnungsreihe: Über einen längeren Zeitraum wurden von Moby Speichelproben gesammelt und gepoolt. Anschließend wurde ein Teil des gesammelten Speichels mit 0,9 %iger Natrium-Chlorid-Lösung (0,9 % NaCl) verdünnt, um Proben zu erhalten die zu 75 % aus Speichel und 25 % aus 0,9 %iger NaCl-Lösung bestehen. Die nächste Verdünnungsstufe enthielt je 50 % Speichel und 0,9 %ige NaCl-Lösung, die darauffolgende bestand aus 25 % Speichel und 75 % 0,9 %iger NaCl-Lösung. Diese verdünnten Proben wurden in zwölf Küvetten aufgeteilt und gemeinsam mit zwölf Küvetten mit unverdünntem Speichel und zwölf Küvetten mit 0,9 %iger NaCl-Lösung so verblindet, dass vier Labore von jeder Konzentration je drei Küvetten erhielt. Zwei der vier Labore, zu denen wir unsere Proben sendeten nutzten den selben Assay. Der Test mit hoher Sensibilität von TECAN wird wie folgt beschrieben: „Kompetitiver Enzymimmunoassay (ELISA). Die unbekannte Menge an Antigen in der Probe und eine bekannte Menge an enzymmarkiertem Antigen (E-Ag) konkurrieren um die Bindungsstellen des an die Wells der Mikrotiterstreifen gebundenen Antikörpers. Nach der Inkubation wird nicht gebundenes E-Ag durch Waschen entfernt. Die Intensität der gebildeten Farbe nach der Substratreaktion ist umgekehrt proportional zur Antigen-Konzentration in den Proben. Die

Ergebnisse der Proben können direkt anhand der Standardkurve bestimmt werden. Die Leerwertgrenze (LoB) für menschlichen Speichel beträgt 0,003 µg/dL, die Quantifizierungsgrenze (LoD) ist 0,005 µg/dL (TECAN). Der Umrechnungsfaktor von µg/dL in nmol/L ist 27,6. Das bedeutet, dass die LoB bei 0,828 nmol/l und die LoD bei 1,38 nmol/l liegt.“

Die Leerwertgrenze (Limit of Blank, LoB) und Nachweisgrenze (Limit of Detection, LoD) sind neben der Bestimmungsgrenze (Limit of Quantitation, LoQ) Begriffe, die zur Beschreibung der kleinsten Konzentration, die mit einem analytischen Verfahren zuverlässig gemessen werden kann dienen. Leerwertgrenze bedeutet hierbei die höchste scheinbare Analytenkonzentration in einer Leerprobe. Mit dem Begriff Nachweisgrenze wird die niedrigste Analytenkonzentration, die zuverlässig von der Leerwertgrenze unterschieden werden kann und bei der ein Nachweis möglich ist, bezeichnet (ARMBRUSTER und PRY, 2008).

Die gepoolte, unverdünnte Speichelprobe von Moby wies nur einen sehr geringen Cortisolgehalt auf, die drei Ergebnisse der LC-MS/MS Messung im Labor in Dresden, welche 100% Speichel enthielt, betrugen 0,48 nmol/L, 0,52 nmol/L und 0,54 nmol/L. Sie lagen damit deutlich unterhalb der von der Firma TECAN für menschlichen Speichel angegebenen Messgrenze. Damit ist es umso erstaunlicher, dass das Labor in Dresden überhaupt Ergebnisse liefern konnte und diese auch die Verdünnungsreihe weitestgehend widerspiegeln konnten.

Dadurch konnten wir zeigen, wie wichtig es ist, vor den eigentlichen Untersuchungen zunächst die Assays zu validieren um reproduzierbare, korrekte Ergebnisse zu erhalten.

2 Speichelcortisolwerte der Großen Tümmler in Nürnberg im Vergleich zu anderen Haltungen

Es gibt bislang nur wenige Untersuchungen von Speichelproben bei Delfinen in menschlicher Obhut. MONREAL-PAWLOWSKI et al. (2017) veröffentlichten eine Short Communication, in welcher der Speichelcortisolgehalt mit dem RIA getestet wurde, welcher auch von Labor B verwendet wurde. Die von ihm ebenfalls morgens um 8:00 Uhr gemessenen Werte lagen bei $0,13 \pm 0,07$ ng/ml, am Tag der Bauarbeiten um 8:00 Uhr $0,10 \pm 0,08$ ng/ml. Umgerechnet in nmol/l waren die gemessenen Werte demnach $0,3588 \pm 0,1932$ nmol/l bzw. $0,2760 \pm 0,2208$ nmol/l. PEDERNERA-ROMANO et al. (2006) nahmen von vier Delfinen morgens zwischen 9:00 und 9:30 Uhr Speichelproben, die ebenfalls mit einem RIA untersucht wurden, hier lagen die Werte zwischen $1,59 \pm 0,62$ nmol/l und $2,14 \pm 0,87$ nmol/l. Wenn man im Vergleich dazu die Nüchternwerte, d.h. die erste und zweite Speichelprobe aus dem Feeding Experiment I und II nimmt ergibt sich für die Speichelproben aus Nürnberg folgender Durchschnittswert: $0,18 \pm 0,16$ nmol/l.

Die Durchschnittswerte für das Feeding Experiment I weichen stark von dem des Feeding Experiments II ab, siehe hierzu Tabelle 1 und Tabelle 2:

Tabelle 1: Anzahl nüchtern genommene Speichelproben

Individuum	Feeding experiment I: Anzahl der Proben	Feeding experiment II: Anzahl der Proben	Feeding experiment I + II: Anzahl der Proben
ANKE	0	6	6
JENNY	0	8	8
DOLLY	18	3	21
DONNA	11	1	12
SUNNY	12	2	14
Anzahl valider Proben	41	20	61
Gesamtzahl der Proben	64	60	124
Anzahl der ungültigen Proben	23	40	63

Tabelle 2: Durchschnittliche Cortisolwerte für die beiden Experimente und die unterschiedlichen Individuen. Anke und Jenny nahmen nicht am Feeding Experiment I teil.

Individuum		Feeding experiment I: Durchschnittswerte Cortisol nmol/L	Feeding experiment II: Durchschnittswerte Cortisol nmol/L	Feeding experiment I + II: Durchschnittswerte Cortisol nmol/L
ANKE			0,072	0,072
JENNY			0,094	0,094
DOLLY		0,521	0,047	0,454
DONNA		0,115	0,023	0,108
SUNNY		0,173	0,207	0,177
	average	0,270	0,089	0,181
	SD	0,220	0,071	0,157
	median	0,173	0,072	0,108

Die auffälligen Unterschiede der Werte des Feeding Experiment I gegenüber dem Feeding Experiments II beruhen hauptsächlich auf zwei Speichelproben von Dolly, welche an einem Tag eine sehr starke Abweichung nach oben zeigten. Bei der ersten Probe dieses

Tages wurde bei ihrer Speichelprobe ein Cortisolgehalt von 1,81 nmol/l gemessen, bei der zweiten Probe wurde sogar ein Wert von 3,02 nmol/l. Trotz dieser beiden Ausreißerwerte ist der Durchschnittswert deutlich unter den Werten, die MONREAL-PAWLOWSKI et al. (2017) und PEDERNERA-ROMANO et al. (2006) gemessen haben.

Unterschiede in der Haltung, d.h. den Gesamtumständen bestehend aus Versorgung und Beschäftigung mit den Tieren, Größe, Anzahl und Ausstattung der Becken, Sozialstruktur etc. könnten der Grund sein, dass die gemessenen Werte erheblich niedriger sind als die, die in anderen Einrichtungen gemessen wurden. Dass die genannten Unterschiede Einfluss auf die Cortisolsekretion haben, wurde schon mehrfach nachgewiesen (ARMSTRONG und SANTYMIRE, 2013; REESE, 2020).

3 Abhängigkeit des Blutcortisollevels von der Art der Probennahme

Die gemessenen Blutcortisolwerte wiesen signifikante Unterschiede auf, je nachdem ob sie während eines medizinischen Trainings oder auf einer Hebebühne genommen wurden. Die Hebebühne ist in einem runden Becken im überdachten Teil des Delphinariums installiert. Es besitzt einen doppelten, perforierten Boden, welcher nach oben gefahren werden kann. Das bedeutet, dass die Tiere ab einem gewissen Wasserstand nicht mehr wegschwimmen können und man dadurch die Möglichkeit hat sie zu fixieren. Das Hebebühnentraining ist Teil der Trainingsroutine. Dabei kommt es zu unterschiedlichen Trainingssettings, die die Tiere gewohnt sind. Sie werden einzeln aber auch in Gruppen mit der Hebebühne hochgefahren, auch ist der unter ihnen verbleibende Wasserspiegel nicht immer gleich, mal sind die Trainer dann mit im Wasser, mal nicht. Die Tiere können, sobald sie sich im Rundbecken befinden,

abgeschiebert werden, d.h. von ihren Artgenossen getrennt werden. Dies könnte ein Gefühl des Ausgeliefertseins erzeugen. Dem muss beim Training aktiv entgegengewirkt werden. Dies geschieht, wie bei jedem anderen Training auch, mit positiver Verstärkung. Würde dieser Grundsatz nicht beachtet werden, könnten sich die Tiere verweigern und dann nicht mehr ins Rundbecken schwimmen.

Trotzdem und obwohl die Tiere alle freiwillig ins Rundbecken schwimmen und dort auch am Hebebühnentraining teilnehmen, führt die Blutentnahme zu einer signifikanten Cortisolwerterhöhung. Auch beim Training der Blutentnahme werden die Tiere auch festgehalten, es gibt hier, bis auf den Einstich, keinen Unterschied zur realen Situation der Blutentnahme. Auch Tiere, die keine Anzeichen von Stress bei der Blutentnahme auf der Hebebühne zeigen, weisen deutlich höhere Cortisolwerte aus, als wenn die Proben über Training genommen werden. Aus den vorliegenden Daten ging leider nicht hervor, ob und bei welchen Tieren bzw. in welchen Situationen weitere Zwangsmaßnahmen (Festhalten durch mehrere Personen; üblicherweise sitzt ein Pfleger am Kopf, mindestens einer an einer Seite des Tieres, ein weiterer fixiert die Fluke) notwendig waren. Auch wenn das Anheben der Tiere mit der Hebebühne wahrscheinlich noch zu keinem messbaren Stress bei den Tieren führt, tut dies die Blutentnahme unter diesen Bedingungen schon. Wir vermuten, dass das daran liegt, dass die Delfine zum einen sehr wohl unterscheiden können, ob es sich um eine Trainingssituation oder um eine tatsächliche medizinische Behandlung handelt, zum anderen haben die Tiere auf der Hebebühne eben nicht mehr die Möglichkeit wegzuschwimmen. Diese Möglichkeit haben sie bei der Blutentnahme im wassergefüllten Becken immer, sie bleiben somit Herr der Situation und entscheiden sich freiwillig für die Mitarbeit.

Bei einer weiteren statistischen Auswertung wurde berechnet, ob es möglich ist, anhand der vorliegenden Daten festzustellen, dass Tiere,

die unter Medikation standen, höhere Cortisolwerte aufwiesen, als Tiere, die nicht unter Medikation standen. Die zugrundeliegende Idee war, dass nicht nur die diversesten Umwelteinflüsse Stress verursachen und somit einen Einfluss auf den Blutcortisolspiegel haben, sondern auch pathologische Zustände. Dies wurde beispielsweise für postoperative Zustände nachgewiesen (YODER und WOLF, 2005; ATWOOD et al., 2020). BOONPRASERT et al. (2021) konnten bei einer Untersuchung an asiatischen Elefanten (*Elephas maximus*) zeigen, dass der Speichelcortisolwert in den nicht vom Elephant Endotheliotropic Herpesvirus (EEHV) betroffenen Gruppen niedriger war als in den Gruppen, in welchen bei den Individuen später das EEHV nachgewiesen wurde. Bei Weißfußmäusen (*Peromyscus leucopus*) konnten BROWN und FULLER (2006) zeigen, dass der Kot von Tieren, die mit Darmparasiten oder Dasselfliegenlarven befallen waren, höhere Cortisolwerte aufwies.

Daher hatten wir die Hypothese, dass kranke bzw. medikamentierte Tiere einen höheren Blutcortisolspiegel aufwiesen als gesunde, nicht medikamentierte Tiere, die wir aber nicht bestätigen konnten.

Entweder ist der durch die Art der Blutentnahme induzierte Stress, selbst bei den über das medical training genommenen Proben, höher als der durch eine eventuell behandlungsbedürftige Krankheit entstehende Stress, oder die zugrundeliegende Krankheit bzw. die Medikation beeinflusst den Cortisolwert nicht. Wir teilten die Proben nur in die Kategorien „in Behandlung“ bzw. „krank“ und „gesund“, eine weitere detailliertere Aufarbeitung der auf den Krankenblättern vermerkten Daten wurde nicht vorgenommen. Eine mögliche Ursache dafür, dass es keinen Zusammenhang zwischen dem Gesundheitszustand und dem gemessenen Cortisolwert gibt, könnte sich auch dadurch ergeben haben, dass die medikamentöse Behandlung nicht genauer betrachtet wurde. So fallen beispielsweise auch Tiere in diese Kategorie, die keine offensichtlichen

Krankheitsanzeichen, wie beispielsweise Inappetenz, Vomitus oder reduziertes Allgemeinbefinden zeigen. Als Beispiel können hier Individuen genannt werden, die über einen langen Zeitraum ein Antimykotikum erhalten haben. Da die zugrundeliegende Erkrankung ohne sichtbaren Einfluss auf das Wohlbefinden der Tiere ist, erscheint es möglich, dass beispielsweise eine subklinische Mykose durch unsere Art der Analyse keinen messbaren Einfluss auf den Blutcortisolwert hat. Eine weitere Erklärung kann sein, dass die Delfine während der kompletten Behandlungszeit als „sick“ gekennzeichnet wurden. Das heißt im Endeffekt, wenn die verordneten Medikamente bereits Wirkung zeigen, und die Tiere daher nicht mehr krank sind, werden sie trotzdem noch über die gesamte Dauer der Behandlung als „sick“ geführt.

4 Simultane Blut- und Speichelprobennahme

Im Gegensatz zu anderen Autoren (PEDERNERA-ROMANO et al., 2006; ROMANO et al., 2010) konnten wir keine Korrelation zwischen Blut- und Speichelcortisolwerten finden. Zum einen hatten wir zum Bewerten dieses Zusammenhangs nur wenige Messpunkte bei dem sowohl Speichel als auch Blutproben genommen wurden (n=20). Auch wenn die einzelnen Speichelprobenentnahmen nur wenig Zeit in Anspruch nehmen, wurden auf der Hebebühne insgesamt nur wenige Speichelproben genommen, da immer versucht wurde, die Zeit, die die Tiere unter restriktiven Bedingungen auf der Hebebühne verbringen mussten, so gering wie möglich zu halten. Auch war es schwierig, bei den Versuchen mehrere Speichelproben in geringem zeitlichem Abstand zu ziehen, immer eine ausreichende Menge an Speichel zu erhalten. Dadurch konnten viele Proben nicht ausgewertet werden. Wir konnten jedoch einen signifikanten Unterschied des Cortisolgehalts zwischen den Speichelproben, die vor der Blutprobe und denen die nach der Blutprobe gezogen wurden, feststellen. Dies zeigt uns, dass der Zeitraum zwischen dem

Start der Hebebühne und der ersten Speichelprobe zu kurz ist, um bereits einen im Speichel messbaren Anstieg des Cortisols zu bewirken. Durch verschiedene Studien konnte gezeigt werden, dass es etwa 10 Minuten dauert, bis die erhöhte Blutcortisolkonzentration auch im Speichel nachgewiesen werden kann (HERNANDEZ et al., 2014; RIEK et al., 2019). Dies war hier auch der Fall.

5 Cortisol im Futterfisch

Bereits im Jahr 1977 wurde bekannt, dass die Stressreaktion von Knochenfischen viele Ähnlichkeiten mit der von Landwirbeltieren aufweist. Dies betrifft trotz der anatomischen und physiologischen Unterschiede sowohl die wichtigsten Botenstoffe als auch deren Funktion (WENDELAAR BONGA, 1997). Cortisolmessungen bei Makrelen (*Scomber scombrus*) unter verschiedenen Haltungsbedingungen wiesen umso stärker erhöhte Werte auf je dichter die Tiere gehalten werden. Hier ist zu berücksichtigen, dass die vom Hersteller angegebene Obergrenze 800 ng/ml für die Analyse des Blutes angegeben wird (ANDERS et al., 2021). Dies entspricht 2206 nmol/l. Diese Werte wurden teilweise erreicht bzw. in unbekannter Höhe überschritten. Auch bei Heringen (*Clupea harengus*) wurden signifikante Steigerungen des Cortisolwerts bei Erhöhung der Besatzdichte festgestellt (TENNINGEN et al., 2012). Direkte Untersuchungen zum Einfluss des Fangs der im Tiergarten Nürnberg verfütterten Meeresfische auf den Cortisolspiegel bzw. eine Verlaufsuntersuchung bis hin zu ihrem Erstickungstod sind nicht bekannt. Jedoch zeigen beispielsweise Sardinen, die mit sogenannten Ringwaden gefischt werden, auch im Verlauf des Fanges deutlich steigende Cortisolwerte (MARÇALO et al., 2006). Es ist jedoch davon auszugehen, dass der Tod durch Ersticken mit maximalem Stress verbunden ist. Dies zeigen unsere im Auftauwasser gemessenen Werte zumindest beim Capelin (*Mallotus*

villosus) und den Kalmaren (*Loligo* spp.). Die stark unterschiedlichen Messwerte zwischen den einzelnen Fischarten lassen sich durch die unterschiedlichen Packungsgrößen und Art des Gefrierprozesses erklären. Einige Produzenten frieren den Fisch mit einer Wasserglasur ein, das bedeutet, dass ein nicht unerheblicher Anteil des Auftauwassers nicht aus dem Fisch direkt kommt, sondern aus dem zum Schutz des Gefriergutes eingesetzten Wassers besteht.

6 Futterexperiment I und II

Unsere Experimente zeigen deutlich, wie wichtig eine sorgfältige Planung und Durchführung der Speichelprobenentnahme bei piscivoren Tieren ist. Dass Glucocorticoide nicht nur bei Fischen durch Stress ansteigen, ist durch Untersuchungen von Schlachttieren wie Kaninchen (SKŁADANOWSKA-BARYZA et al., 2018), Hähnchen (GOU et al., 2021), Rindern (CAPRA et al., 2019), Lämmern (HEMSWORTH et al., 2019) und Schweinen (BREINEKOVÁ et al., 2007) hinlänglich bekannt. Dies könnte je nach Art der Fütterung bzw. der Probennahme bei Cortisoluntersuchungen carnivorere Tiere von Bedeutung sein.

Obwohl es schon viele Untersuchungen zum Einfluss von Stress auf den Cortisolgehalt im Speichel (BEERDA et al., 1996) und im Kot (MORATO et al., 2004; YOUNG et al., 2004; NARAYAN et al., 2013; MOLNAR et al., 2015; VAN DER WEYDE et al., 2016) carnivorere Tiere gibt, finden sich in der Literatur bisher noch keine Untersuchungen zum Einfluss des Cortisolgehalts des Futters/der Futtertiere auf den Cortisolgehalt im Speichel bzw. im Kot.

In einigen Untersuchungen wird explizit erwähnt, dass der Speichelcortisolwert bei nüchternen Tieren (MEUNIER et al., 2021) bzw. Tieren, die nicht in den 10 Minuten vor der Probennahme gefressen bzw. Muttermilch getrunken haben (MONTGOMERY et al., 2022) untersucht wurde, aus anderen Untersuchungen geht nicht hervor, wann die Tiere gefüttert wurden bzw. wie lange der Abstand

zwischen Fütterung und Speichelprobenentnahme war (KOYAMA et al., 2003).

Unsere Ergebnisse zeigen, dass die im Speichel gemessene Cortisolmenge bei den im direkten Anschluss an die Fütterung bzw. Futterbelohnung genommenen Proben stark ansteigt. Auch konnten wir zeigen, dass die Zeit, die zwischen der Fütterung und der Speichelprobenentnahme vergeht, einen großen Einfluss auf die im Speichel der Tiere gemessene Cortisolmenge hat. Eine Probennahme, die in engem zeitlichem Zusammenhang mit der Fütterung bzw. Futterbelohnung steht führt zu fälschlicherweise erhöhten Messwerten.

Weiterhin konnten wir zeigen, dass der Cortisolwert im Speichel bei mehrmaliger Speichelprobenentnahme, ohne dass diese mit einer Futtergabe belohnt wird, zu einer Cortisolerhöhung führt. Wir vermuten, dass hier das Appetenzverhalten zu einer vermehrten Cortisolausschüttung führt.

7 Fazit

Unsere Untersuchungen zeigen, dass eine alleinige Messung von Speichelcortisolwerten bei Großen Tümmlern (*Tursiops truncatus*) keine geeignete Methode darstellt, um Stress bzw. im Umkehrschluss Wohlbefinden zu messen. Zum einen ist eine korrekte Messung nur mit der aufwendigen und teuren LC-MS/MS Methode möglich, zum anderen sind die bei den Delfinen im Tiergarten Nürnberg gemessenen Werte so niedrig, dass kleinste Fehler in der Probennahme (beispielsweise durch vorherige Fütterung) signifikante Unterschiede machen. Auch konnten wir zeigen, dass eine einzelne Messung wenig Aussagekraft hat, da die Varianz oft recht groß ist. Deshalb sollte man regelmäßig Messungen machen bzw. mehrere Messungen in einem engen Zeitraum vornehmen und die so gewonnenen Proben poolen.

Um das Wohlbefinden der Tiere vergleichbar zu machen, sind Verhaltensbeobachtungen ergänzt durch Cortisolbestimmungen bei den Großen Tümmlern sicherlich sinnvoller als alleinige Cortisoluntersuchungen.

Dabei muss man natürlich bedenken, dass das Verhalten und das Wohlbefinden der Tiere vielen Einflüssen unterworfen ist, die die Vergleichbarkeit einschränken können. Ein bereits untersuchter Umwelteinfluss auf das Verhalten von Walen sind beispielsweise menschliche Aktionen und Lärm (RICHARDSON und WÜRSIG, 1997). FAIR und BECKER (2000) sehen im Lärm eine mögliche Ursache von Stress bei Meeressäugern. Bei anderen Umwelteinflüssen konnte gezeigt werden, dass diese einen messbaren Einfluss auf den Blutcortisolwert haben. Einer dieser Einflüsse ist Kälte. Bei Temperaturen unter 5,5 °C steigen bei Großen Tümmlern die Cortisolwerte signifikant an (HOUSER et al., 2011). Ein anderer könnte auch Training und die Anwesenheit von Besuchern sein. MATSUSHIRO et al. (2021) zeigten, dass diese beiden Einflüsse den Blutcortisolspiegel bei Großen Tümmlern ansteigen lassen.

Neben diesen exogenen Faktoren, die das Verhalten der Tiere beeinflussen können, spielen auch individuelle Faktoren, wie beispielsweise das Alter eines Tieres eine Rolle. So zeigen alte Tiere weniger Spielverhalten (HUETTNER et al., 2021).

Um verschiedene Delfinhaltungen vergleichbar zu machen ist es notwendig, eine Kombination aus Verhaltensbeobachtungen und Cortisolmessungen durchzuführen. Hierbei müssen zusätzlich individuelle Faktoren, wie beispielsweise der Gesundheitszustand, das Alter und die soziale Stellung der Tiere und Standortfaktoren, wie die Gruppengröße und die Gruppenzusammensetzung, aber auch die Anzahl Delfine pro Tierpfleger/Tiertrainer, das Engagement und der Ausbildungsstand der Trainer, die Trainingszeiten und die Trainingsdauer, das angebotene Enrichment (Qualität, Quantität, Häufigkeit des Wechsels), die Wassermenge pro Individuum, eine

eventuelle Vergesellschaftung mit anderen Tierarten etc. verglichen werden. Nur so könnten Delfinarien untereinander vergleichbar sein. Allgemeine Ansätze hierzu liefern VON FERSEN et al. (2018), spezielle Ansätze für Delfinarien haben schon mehrere Autoren beschrieben (CLEGG et al., 2015; CLEGG et al., 2017; MILLER et al., 2021).

V. Zusammenfassung

Methode der Speichelprobenentnahme und Cortisolmessung im Speichel und im Blut bei Großen Tümmlern (*Tursiops truncatus*)

Das Wohlbefinden von in menschlicher Obhut gehaltenen Tieren ist Gegenstand vieler wissenschaftlicher Untersuchungen. Diese finden unabhängig davon statt, ob es sich um Nutz-, Heim- oder Zootiere handelt. Neben Verhaltensstudien spielen auch Cortisolmessungen eine wichtige Rolle. Auch wenn die Cortisoluntersuchung in verschiedenen Matrices mittlerweile weit verbreitet ist, gibt es noch ungeklärte methodische Fragen. So wurde beispielsweise in der wissenschaftlichen Literatur die Fragestellung nach der Validierung der Speichelprobenentnahme und -untersuchung beim Großen Tümmler (*Tursiops truncatus*) bisher noch nicht bearbeitet, auch wenn auf dieses Problem zumindest bei der Frage der Cortisolmessung im Kot schon vor vielen Jahren hingewiesen wurde (TOUMA und PALME, 2005). Es wurde versucht, diese Lücke durch die vorliegende Arbeit zu schließen. Durch unsere Versuchsreihe konnten wir zeigen, dass die Liquid-Chromatographie-Massenspektrometrie/Massenspektrometrie-Methode (LC-MS/MS) reproduzierbare, valide Ergebnisse liefert.

Auch die Frage, ob der Cortisolgehalt der verfütterten Fische einen Einfluss auf die gemessenen Cortisolwerte im Speichel hat, konnte beantwortet werden. Werden Speichelproben kurz nach der Fütterung analysiert, so zeigt sich, dass ist der Einfluss sehr hoch ist, die gemessenen Cortisolwerte steigen signifikant an. Sie fallen jedoch bereits nach etwa 6 Minuten wieder auf das ursprüngliche Niveau zurück.

Während bei landlebenden Tieren eine Verdünnung des Speichels durch Wasser, Futter o.ä. nahezu ausgeschlossen werden kann, konnten wir dies bei den Delfinen nicht ausschließen. Es gelang uns

nicht einen biochemischen Parameter ausfindig zu machen, der immer in der gleichen Konzentration im Speichel aber nicht im umgebenden Salzwasser vorkommt und dadurch als Referenz dienen könnte.

Auch wurde die Frage beantwortet, inwieweit die Technik der Blutprobenentnahme (über Training oder auf der Hebebühne) einen Einfluss auf den Cortisolwert hat. Dieser Einfluss ist bedeutend und zeigt, wie wichtig das medizinische Training für ein möglichst stressfreies Handling der Tiere ist.

Auch wenn durch die Literatur bekannt ist, dass neben den Umwelteinflüssen auch der Gesundheitszustand der Tiere einen Einfluss auf die Cortisolkonzentration hat, konnten wir dies nicht bestätigen.

Im direkten Vergleich mit den Cortisolwerten, die in anderen Einrichtungen bei der gleichen Tierart gemessen wurden, lagen die Werte der Tiere im Tiergarten Nürnberg wesentlich niedriger.

VI. Summary

Method of saliva sampling and cortisol measurement in saliva and blood in bottlenose dolphins (*Tursiops truncatus*)

The well-being of animals kept under human care is the subject of many scientific studies. These take place regardless of whether they are farm, pet or zoo animals. Besides behavioural studies, cortisol measurements also play an important role. Even though cortisol testing in various matrices is now widely used, there are still methodological issues, which are not solved. An example is the validation of saliva sampling and examination in bottlenose dolphins (*Tursiops truncatus*) which has not yet been addressed in the scientific literature. This problem however, has been addressed for the issue of cortisol measurement in faeces (TOUMA and PALME, 2005). The present study aims at closing this gap. Thanks to our series of experiments, we were able to demonstrate that the liquid chromatography-mass spectrometry/mass spectrometry-method (LC-MS/MS) provides reproducible and valid results.

We were able to answer the question if the cortisol level of the fish fed to dolphins has an impact on the measured Cortisol levels in dolphins' saliva. If saliva samples are analysed shortly after feeding the fish, the impact of the fed fish is high as the cortisol levels rise significantly. They, however, return to their physiological level after approx. 6 minutes.

While dilution of saliva by water, food, etc. can be virtually ruled out in terrestrial animals, we could not rule this out in dolphins. We were unable to find a biochemical parameter that could be detected reliably in a constant concentration in saliva but not in the surrounding salt water and could thus serve as a reference.

We also tried to answer the question to what extent the technique of blood sampling (via training or on the lifting platform) has an

influence on the cortisol value. This influence is significant and shows how important medical training is for the stress free handling of the animals.

Even though it is known from the literature that, in addition to environmental influences, the health status of the animals also has an influence on the cortisol concentration, we were not able to confirm this.

However, the cortisol levels determined in the zoo Nuremberg were considerably lower than those measured in other facilities.

VII. Erweitertes Literaturverzeichnis

- AMARAL, R. S. (2010): Use of Alternative Matrices to Monitor Steroid Hormones in Aquatic Mammals: A Review. *Aquatic Mammals* 36, 2, 162-171.
- ANDANSON, S., BOISSY, A., VEISSIER, I. (2020): Conditions for assessing cortisol in sheep: the total form in blood v. the free form in saliva. *Animal* 14, 9, 1916-1922.
- ANDERS, N., ROTH, B., BREEN, M. (2021): Physiological response and survival of Atlantic mackerel exposed to simulated purse seine crowding and release. *Conserv Physiol* 9, 1, coab076.
- ARMBRUSTER, D. A., PRY, T. (2008): Limit of blank, limit of detection and limit of quantitation. *The Clinical biochemist. Reviews* 29 Suppl 1, Suppl 1, S49-S52.
- ARMSTRONG, D. M., SANTYMIRE, R. M. (2013): Hormonal and Behavioral Variation in Pied Tamarins Housed in Different Management Conditions. *Zoo Biology* 32, 3, 299-306.
- ASSENZA, A., FAZIO, F., MARCENO, G., PICCIONE, G., CAOLA, G. (2009): Daily rhythms of serum and salivary parameters in goats. *Australian Veterinary Journal* 87, 10, 397-401.
- ATKINSON, S., COMBELLES, C., VINCENT, D., NACHTIGALL, P., PAWLOSKI, J., BREESE, M. (1999): Monitoring of Progesterone in Captive Female False Killer Whales, *Pseudorca crassidens*. *General and Comparative Endocrinology* 115, 3, 323-332.
- ATKINSON, S., GENDRON, D., BRANCH, T. A., MASHBURN, K. L., MELICA, V., ENRIQUEZ-PAREDES, L. E., BROWNELL JR., R. L. (2020): Pregnancy rate and biomarker validations from the blubber of eastern North Pacific blue whales. *Marine Mammal Science* 36, 1, 6-28.
- ATWOOD, R. E., GOLDEN, D. M., KABA, S. A., BRADLEY, M. J. (2020): Characterization of the cortisol response to traumatic hemorrhage and intra-abdominal contamination models in *Cynomolgus* Macaques. *Mol Cell Endocrinol* 518, 111036.
- BECHSHOFT, T., WRIGHT, A. J., STYRISHAVE, B., HOUSER, D. (2020): Measuring and validating concentrations of steroid hormones in the skin of bottlenose dolphins (*Tursiops truncatus*). *Conservation Physiology* 8, 1, coaa032.
- BEERDA, B., SCHILDER, M., JANSSEN, N., 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, 3, 272-279.
- BEERDA, B., SCHILDER, M., VAN HOOFF, J., DE VRIES, H. W. (1997): Manifestations of chronic and acute stress in dogs. *Applied Animal Behaviour Science* 52, 3-4, 307-319.
- BEJDER, L., SAMUELS, A., WHITEHEAD, H., GALES, N., MANN, J., CONNOR, R., HEITHAUS, M., WATSON-CAPPS, J., FLAHERTY, C., KRÜTZEN, M. (2006): Decline in Relative Abundance of

- Bottlenose Dolphins Exposed to Long-Term Disturbance. *Conservation Biology* 20, 6, 1791-1798.
- BELDA, X., FUENTES, S., DAVIU, N., NADAL, R., ARMARIO, A. (2015): Stress-induced sensitization: the hypothalamic-pituitary-adrenal axis and beyond. *Stress* 18, 3, 269-279.
- BERKVENS, C. N. (2012). *Keratin glucocorticoid analysis by enzyme immunoassay in mammals, birds and reptiles*. Thesis, University of Guelph, Guelph.
- BERTELSMANN, H. (1999). *Haltungsbedingungen, soziale Beziehungen und Streß bei großen Tümmlern (Tursiops truncatus) in Delphinarien*. Diss. med. vet., Universität Bayreuth, Bayreuth.
- BIANCANI, B., DALT, L. D., GALLINA, G., CAPOLONGO, F., GABAI, G. (2017): Fecal cortisol radioimmunoassay to monitor adrenal gland activity in the bottlenose dolphin (*Tursiops truncatus*) under human care. *Marine Mammal Science* 33, 4, 1014-1034.
- BMEL. (1972). Tierschutzgesetz in der Fassung der Bekanntmachung vom 18. Mai 2006 (BGBl. I S. 1206, 1313), das zuletzt durch Artikel 105 des Gesetzes vom 10. August 2021 (BGBl. I S. 3436) geändert worden ist. Retrieved 20.03.2022, 2022, from <https://www.gesetze-im-internet.de/tierschg/BJNR012770972.html>
- BMEL. (2009). Tierschutztransportverordnung vom 11. Februar 2009 (BGBl. I S. 375), die zuletzt durch Artikel 2 der Verordnung vom 25. November 2021 (BGBl. I S. 4970) geändert worden ist. Retrieved 20.03.2022, 2022, from https://www.gesetze-im-internet.de/tierschtrv_2009/BJNR037500009.html
- BMEL. (2014). Mindestanforderungen an die Haltung von Säugetieren. Retrieved 20.02.2022, 2022, from https://www.bmel.de/SharedDocs/Downloads/DE/_Tiere/Tierschutz/HaltungSaeugetiere.pdf;jsessionid=36D1B21BD027657202A2D542D32CF838.live851?__blob=publicationFile&v=7
- BOONPRASERT, K., YUN, Y., KOSARUK, W., TOWIBOON, P., TANKAEW, P., PUNYAPORNWITHAYA, V., JANYAMATHAKUL, T., MUANGHONG, P., BROWN, J. L., THITARAM, C., SOMGIRD, C. (2021): A Longitudinal Study of Hematology and Stress Biomarker Profiles in Young Asian Elephants (*Elephas maximus*) in Relation to Elephant Endotheliotropic Herpesvirus (EEHV) in Thailand. *Animals* 11, 9, 2530.
- BOTREAU, R., VEISSIER, I., BUTTERWORTH, A., BRACKE, M. B., KEELING, L. J. (2007): Definition of criteria for overall assessment of animal welfare. *ANIMAL WELFARE-POTTERS BAR THEN WHEATHAMPSTEAD-* 16, 2, 225.
- BRADLEY, A. J. (1990): Failure of glucocorticoid feedback during breeding in the male red-tailed phascogale *Phascogale calura* (Marsupialia: Dasyuridae). *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 37, 1, 155-163.

- BRADLEY, A. J., MCDONALD, I. R., LEE, A. K. (1980): Stress and mortality in a small marsupial (*Antechinus stuartii*, Macleay). *General and Comparative Endocrinology* 40, 2, 188-200.
- BRANDO, S., BROOM, D. M., ACASUSO-RIVERO, C., CLARK, F. (2018): Optimal marine mammal welfare under human care: Current efforts and future directions. *Behavioural Processes* 156, 16-36.
- BREINEKOVÁ, K., SVOBODA, M., SMUTNÁ, M., VORLOVÁ, L. (2007): Markers of acute stress in pigs. *Physiol Res* 56, 3, 323-329.
- BROOM, D. M. (1988): The scientific assessment of animal welfare. *Applied Animal Behaviour Science* 20, 1-2, 5-19.
- BROWN, T. T., FULLER, C. A. (2006): Stress and parasitism of white-footed mice (*Peromyscus leucopus*) in dry and floodplain environments. *Canadian Journal of Zoology* 84, 1833+.
- BUSHONG, D. M., FRIEND, T. H., KNABE, D. A. (2000): Salivary and plasma cortisol response to adrenocorticotropin administration in pigs. *Lab Anim* 34, 2, 171-181.
- CAPRA, P., LEPORATI, M., NEBBIA, C., GATTO, S., ATTUCCI, A., BARBARINO, G., VINCENTI, M. (2019): Effects of truck transportation and slaughtering on the occurrence of prednisolone and its metabolites in cow urine, liver, and adrenal glands. *BMC Vet Res* 15, 1, 336.
- CARBAJAL, A., TALLO-PARRA, O., MONCLÚS, L., ARESTÉ, M., FERNÁNDEZ-BELLON, H., ALMAGRO, V., LOPEZ-BEJAR, M. (2018): Corticosterone measurement in Komodo dragon shed skin. *Herpetological Journal* 28, 3.
- CARRASCO, G. A., VAN DE KAR, L. D. (2003): Neuroendocrine pharmacology of stress. *European Journal of Pharmacology* 463, 1-3, 235-272.
- CHAMPAGNE, C. D., KELLAR, N. M., TREGO, M. L., DELEHANTY, B., BOONSTRA, R., WASSER, S. K., BOOTH, R. K., CROCKER, D. E., HOUSER, D. S. (2018): Comprehensive endocrine response to acute stress in the bottlenose dolphin from serum, blubber, and feces. *General and Comparative Endocrinology* 266, 178-193.
- CLEGG, I., VAN ELK, C., DELFOUR, F. (2017): Applying welfare science to bottlenose dolphins (*Tursiops truncatus*). *Animal Welfare* 26, 2, 165-176.
- CLEGG, I. L., BORGER-TURNER, J. L., ESKELINEN, H. C. (2015): C-Well: The development of a welfare assessment index for captive bottlenose dolphins (*Tursiops truncatus*). *Animal Welfare* 24, 3, 267-282.
- COCKREM, J. F. (2013): Individual variation in glucocorticoid stress responses in animals. *General and Comparative Endocrinology* 181, 45-58.
- COOK, N. J. (2012): Review: Minimally invasive sampling media and the measurement of corticosteroids as biomarkers of stress in animals. *Canadian Journal of Animal Science* 92, 3, 227-259.

- CREEL, S. (2005): Dominance, aggression and glucocorticoid levels in social carnivores. *Journal of Mammalogy* 96, 2, 255-264.
- CREEL, S., FOX, J. E., HARDY, A., SANDS, J., GARROTT, B., PETERSON, R. O. (2002): Snowmobile Activity and Glucocorticoid Stress Responses in Wolves and Elk Actividad de Vehículos para Nieve y Respuestas de Stress Glucocorticoide en Lobos y Alces. *Conservation Biology* 16, 3, 809-814.
- CROSS, N., PINES, M. K., ROGERS, L. J. (2004): Saliva sampling to assess cortisol levels in unrestrained common marmosets and the effect of behavioral stress. *Am J Primatol* 62, 2, 107-114.
- DE JONG, I. C., PRELLE, I. T., VAN DE BURG WAL, 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, 4, 571-578.
- DE SOUZA AMARAL, R., ROSAS, F. C. W., VIAU, P., D'AFFONSÊCA NETO, J. A., DA SILVA, V. M. F., DE OLIVEIRA, C. A. (2009): Noninvasive Monitoring of Androgens in Male Amazonian Manatee (*Trichechus inunguis*): Biologic Validation. *Journal of Zoo and Wildlife Medicine* 40, 3, 458-465.
- DELFOUR, F., VAICEKAUSKAITE, R., GARCÍA-PÁRRAGA, D., PILENGA, C., SERRES, A., BRASSEUR, I., PASCAUD, A., PERLADO-CAMPOS, E., SÁNCHEZ-CONTRERAS, G. J., BAUMGARTNER, K., MONREAL-PAWLOWSKY, T. (2021): Behavioural Diversity Study in Bottlenose Dolphin (*Tursiops truncatus*) Groups and Its Implications for Welfare Assessments. *Animals* 11, 6, 1715.
- DESPORTES, G., BUHOLZER, L., ANDERSON-HANSEN, K., BLANCHET, M., ACQUARONE, M., SHEPHARD, G., BRANDO, S., VOSSSEN, 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, 3, 286-292.
- DICKENS, M. J., ROMERO, L. M. (2013): A consensus endocrine profile for chronically stressed wild animals does not exist. *General and Comparative Endocrinology* 191, 177-189.
- DIENER, M. (2022): Endokrinologie und Reproduktion. In G. Breves, M. Diener & G. Gäbel (Hrsg.): *Physiologie der Haustiere*. Georg Thieme Verlag KG.
- DU DOT, T. J., ROSEN, D. A. S., TRITES, A. W. (2009): Energy Reallocation during and after Periods of Nutritional Stress in Steller Sea Lions: Low-Quality Diet Reduces Capacity for Physiological Adjustments. *Physiological & Biochemical Zoology* 82, 5, 516-530.
- EAZA. (2020). Standards for the Accommodation and Care of Animals in Zoos and Aquaria. Retrieved 20.03.2022, 2022, from <https://www.eaza.net/assets/Uploads/Standards-and->

policies/2020-10-EAZA-Standards-for-Accommodation-and-Care.pdf

- ERHARD, M. (2010): Physiologie und Tierschutz. In W. von Engelhardt (Hrsg.), Physiologie der Haustiere (686). Stuttgart. Enke.
- FAIR, P. A., BECKER, P. R. (2000): Review of stress in marine mammals. *Journal of Aquatic Ecosystem Stress and Recovery (Formerly Journal of Aquatic Ecosystem Health)* 7, 4, 335-354.
- FELL, L. R., SHUTT, D. A., BENTLEY, C. J. (1985): Development of a salivary cortisol method for detecting changes in plasma "free" cortisol arising from acute stress in sheep. *Australian Veterinary Journal* 62, 12, 403-406.
- FUNASAKA, N., YOSHIOKA, M., SUZUKI, M., UEDA, K., MIYAHARA, H., UCHIDA, S. (2011): Seasonal Difference of Diurnal Variations in Serum Melatonin, Cortisol, Testosterone, and Rectal Temperature in Indo-Pacific Bottlenose Dolphins (*Tursiops aduncus*). *Aquatic Mammals* 37, 4, 433-442.
- GALLIGAN, T. M., SCHWACKE, L. H., HOUSER, D. S., WELLS, R. S., ROWLES, T., BOGGS, A. S. P. (2018): Characterization of circulating steroid hormone profiles in the bottlenose dolphin (*Tursiops truncatus*) by liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS). *Gen Comp Endocrinol* 263, 80-91.
- GOU, Z., ABOUELEZZ, K. F. M., FAN, Q., LI, L., LIN, X., WANG, Y., CUI, X., YE, J., MASOUD, M. A., JIANG, S., MA, X. (2021): Physiological effects of transport duration on stress biomarkers and meat quality of medium-growing Yellow broiler chickens. *Animal* 15, 2, 100079.
- GRAHAM, K. M., BURGESS, E. A., ROLLAND, R. M. (2021): Stress and reproductive events detected in North Atlantic right whale blubber using a simplified hormone extraction protocol. *Conserv Physiol* 9, 1, coaa133.
- GREENWOOD, P. L., SHUTT, D. A. (1992): Salivary and plasma cortisol as an index of stress in goats. *Aust Vet J* 69, 7, 161-163.
- GULLAND, F. M. D., HAULENA, M., LOWENSTINE, L. J., MUNRO, C., GRAHAM, P. A., BAUMAN, J., HARVEY, J. (1999): Adrenal Function in Wild and Rehabilitated Pacific Harbour Seals (*Phoca vitulina richardii*) and in Seals with Phocine Herpesvirus-associated Adrenal Nerosis. *Marine Mammal Science* 15, 3, 810-827.
- HEMSWORTH, P. H., RICE, M., BORG, S., EDWARDS, L. E., PONNAMPALAM, E. N., COLEMAN, G. J. (2019): Relationships between handling, behaviour and stress in lambs at abattoirs. *Animal* 13, 6, 1287-1296.
- 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 Vet Scand* 56, 1, 61.
- HIGHAM, J. P., VITALE, A. B., RIVERA, A. M., AYALA, J. E., MAESTRIPIERI, D. (2010): Measuring salivary analytes from free-ranging monkeys. *Physiology & Behavior* 101, 5, 601-607.
- HIRT, A., MAISACK, C., MORITZ, J. (2016): *Tierschutzgesetz*. Verlag Franz Vahlen.
- HOGG, C. J., VICKERS, E. R., ROGERS, T. L. (2005): Determination of testosterone in saliva and blow of bottlenose dolphins (*Tursiops truncatus*) using liquid chromatography–mass spectrometry. *Journal of Chromatography B* 814, 2, 339-346.
- HOUSER, D. S., CHAMPAGNE, C. D., WASSER, S. K., BOOTH, R. K., ROMANO, T., CROCKER, D. E. (2021): Influence of season, age, sex, and time of day on the endocrine profile of the common bottlenose dolphin (*Tursiops truncatus*). *General and Comparative Endocrinology* 313, 113889.
- HOUSER, D. S., YEATES, L. C., CROCKER, D. E. (2011): Cold Stress induces an Adrenocortical Response in Bottlenose Dolphin (*Tursiops truncatus*). *Journal of Zoo and Wildlife Medicine* 42, 4, 565-571.
- HOWELL-STEPHENS, J. A., BROWN, J. S., BERNIER, D., MULKERIN, D., SANTYMIRE, R. M. (2012): Characterizing adrenocortical activity in zoo-housed southern three-banded armadillos (*Tolypeutes matacus*). *General and Comparative Endocrinology* 178, 1, 64-74.
- HUBER, K. (2015): *Physiologie der Haustiere*. Georg Thieme Verlag.
- HUETTNER, T., DOLLHAEUPL, S., SIMON, R., BAUMGARTNER, K., VON FERSEN, L. (2021): Activity Budget Comparisons Using Long-Term Observations of a Group of Bottlenose Dolphins (*Tursiops truncatus*) under Human Care: Implications for Animal Welfare. *Animals* 11, 7, 2107.
- IRVINE, C. H. G., ALEXANDER, S. L. (1994): Factors affecting the circadian rhythm in plasma cortisol concentrations in the horse. *Domestic Animal Endocrinology* 11, 2, 227-238.
- JUDD, H. L., RIDGWAY, S. (1977): Twenty-four hour patterns of circulating androgens and cortisol in male dolphins. *Breeding Dolphin: Present status, Suggestion for the future*, Natl. Tech. Info. Serv, 269-277.
- KALLIOKOSKI, O., TIMM, J. A., IBSEN, I. B., HAU, J., FREDERIKSEN, A. M. B., BERTELSEN, M. F. (2012): Fecal glucocorticoid response to environmental stressors in green iguanas (*Iguana iguana*). *General and Comparative Endocrinology* 177, 1, 93-97.
- KELLAR, N. M., TREGO, M. L., MARKS, C. I., CHIVERS, S. J., DANIL, K., ARCHER, F. I. (2009): Blubber testosterone: A potential marker of male reproductive status in short-beaked common dolphins. *Marine Mammal Science* 25, 3, 507-522.

- KELLAR, N. M., TREGO, M. L., MARKS, C. I., DIZON, A. E. (2006): Determining Pregnancy from Blubber in three Species of Delphinids. *Marine Mammal Science* 22, 1, 1-16.
- KEOGH, M. J., ATKINSON, S. (2015): Endocrine and immunological responses to adrenocorticotrophic hormone (ACTH) administration in juvenile harbor seals (*Phoca vitulina*) during winter and summer. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology* 188, 22-31.
- KOYAMA, T., OMATA, Y., SAITO, A. (2003): Changes in salivary cortisol concentrations during a 24-hour period in dogs. *Horm Metab Res* 35, 6, 355-357.
- KRONER, K. (2006). *Blut- und Speichelparameter beim Kaltblutpferd in Ruhe und bei Zugarbeit*. Diss. med. vet., LMU München, München.
- LAUDERDALE, L. K., MELLEN, J. D., WALSH, M. T., GRANGER, D. A., MILLER, L. J. (2021): Towards understanding the welfare of cetaceans in accredited zoos and aquariums. *PLoS One* 16, 8, e0255506.
- LAUDERDALE, L. K., WALSH, M. T., MELLEN, J. D., GRANGER, D. A., MILLER, L. J. (2021): Environmental enrichment, training, and habitat characteristics of common bottlenose dolphins (*Tursiops truncatus*) and Indo-Pacific bottlenose dolphins (*Tursiops aduncus*). *PLoS One* 16, 8, e0253688.
- LEWIS, J. G. (2006): Steroid analysis in saliva: an overview. *Clin Biochem Rev* 27, 3, 139-146.
- LIDGARD, D. C., BONESS, D. J., BOWEN, W. D., MCMILLAN, J. I. (2008): The implications of stress on male mating behavior and success in a sexually dimorphic polygynous mammal, the grey seal. *Hormones and Behavior* 53, 1, 241-248.
- MARÇALO, A., MATEUS, L., CORREIA, J. H. D., SERRA, P., FRYER, R., STRATOUDAKIS, Y. (2006): Sardine (*Sardina pilchardus*) stress reactions to purse seine fishing. *Marine Biology* 149, 6, 1509-1518.
- MASHBURN, K. L., ATKINSON, S. (2008): Variability in leptin and adrenal response in juvenile Steller sea lions (*Eumetopias jubatus*) to adrenocorticotrophic hormone (ACTH) in different seasons. *General and Comparative Endocrinology* 155, 2, 352-358.
- MASON, J. W. (1968): "Over-all" Hormonal Balance as a Key to Endocrine Organization. *Psychosomatic Medicine* 30, 5, 791-808.
- MATSUSHIRO, M., KURONO, H., YAMAMOTO, K., KOORIYAMA, T. (2021): Cortisol changes in bottlenose dolphins in the dolphin interactive program. *Japanese Journal of Veterinary Research* 69, 2, 99-108.
- MCDONALD, I. R., LEE, A. K., BRADLEY, A. J., THAN, K. A. (1981): Endocrine changes in dasyurid marsupials with differing

- mortality patterns. *General and Comparative Endocrinology* 44, 3, 292-301.
- MELLOR, D. (2016): A Life Worth Living with Dr David Mellor. Interview by Luna Allison, Canadian Federation for Animal Welfare.
- MERCERA, K., PILOT-STORCK, F., MERCERA, B., GILBERT, C., DELFOUR, F. (2021): Exploration of Fecal Glucocorticoid Metabolites in the Bottlenose Dolphin (*Tursiops truncatus*) Under Human Care by Enzyme Immunoassay. *Aquatic Mammals* 47, 3, 227-238.
- MEUNIER, S., GROESSL, M., REUSCH, C., BORETTI, F., SIEBER-RUCKSTUHL, N. (2021): Salivary cortisol in healthy dogs: a randomized cross-over study to evaluate different saliva stimulation methods and their effects on saliva volume and cortisol concentration. *BMC Vet Res* 17, 1, 194.
- MILLER, L. J., LAUDERDALE, L. K., MELLEÑ, J. D., WALSH, M. T., GRANGER, D. A. (2021): Relationships between animal management and habitat characteristics with two potential indicators of welfare for bottlenose dolphins under professional care. *PLOS ONE* 16, 8, e0252861.
- MINGRAMM, F. M. J., KEELEY, T., WHITWORTH, D. J., DUNLOP, R. A. (2020): Blubber cortisol levels in humpback whales (*Megaptera novaeangliae*): A measure of physiological stress without effects from sampling. *General and Comparative Endocrinology* 291, 113436.
- MIZOGUCHI, K., YUZURIHARA, M., ISHIGE, A., SASAKI, H., CHUI, D., TABIRA, T. (2001): Chronic stress differentially regulates glucocorticoid negative feedback response in rats. *Psychoneuroendocrinology* 26, 5, 443-459.
- MOBERG, G. P., MENCH, J. A. (2000): The biology of animal stress: basic principles and implications for animal welfare. CABI.
- MOLNAR, B., FATTEBERT, J., PALME, R., CIUCCI, P., BETSCHART, B., SMITH, D. W., DIEHL, P. A. (2015): Environmental and Intrinsic Correlates of Stress in Free-Ranging Wolves. *PLoS One* 10, 9, e0137378.
- MONREAL-PAWLOWSKY, T., CARBAJAL, A., TALLO-PARRA, O., SABÉS-ALSINA, M., MONCLÚS, L., ALMUNIA, J., FERNÁNDEZ-BELLON, H., LOPEZ-BEJAR, M. (2017): Daily salivary cortisol levels in response to stress factors in captive common bottlenose dolphins (*Tursiops truncatus*): a potential welfare indicator. *Veterinary Record* 180, 24, 593-593.
- MONTGOMERY, T. M., GREENBERG, J. R., GUNSON, J. L., JOHN, K., LAUBACH, Z. M., NONNAMAKER, E., PERSON, E. S., ROGERS, H., RONIS, E. M., SMALE, L., STEINFELD, K. R., STRONG, R., HOLEKAMP, K. E., BEEHNER, J. C. (2022): Measuring salivary cortisol in wild carnivores. *Horm Behav* 137, 105082.
- MORATO, R. G., BUENO, M. G., MALMHEISTER, P., VERRESCHI, I. T., BARNABE, R. C. (2004): Changes in the fecal

- concentrations of cortisol and androgen metabolites in captive male jaguars (*Panthera onca*) in response to stress. *Braz J Med Biol Res* 37, 12, 1903-1907.
- MORMÈDE, P., ANDANSON, S., AUPERIN, B., BEERDA, B., GUÉMENE, D., MALMKVIST, J., MANTECA, X., MANTEUFFEL, G., PRUNET, P., VAN REENEN, C. G., RICHARD, S., VEISSIER, I. (2007): Exploration of the hypothalamic-pituitary-adrenal function as a tool to evaluate animal welfare. *Physiology & Behavior* 92, 3, 317-339.
- NARAYAN, E. J., PARNELL, T., CLARK, G., MARTIN-VEGUE, P., MUCCI, A., HERO, J. M. (2013): Faecal cortisol metabolites in Bengal (*Panthera tigris tigris*) and Sumatran tigers (*Panthera tigris sumatrae*). *Gen Comp Endocrinol* 194, 318-325.
- NORRIS, K. S. (1991): *Dolphins Societies Discoveries and Puzzles*. California. University of California Press.
- ORLOV, M. M., MUKHLYA, A. M., LUKOKOV, N. A. (1988): Hormonal Indices in the Bottlenose Dolphin (*Tursiops truncatus*) Under Normal Conditions and During Experimental Stress. *Zhurnal Evolyutsionnoi Biokhimii i Fiziologii* 24, 4, 557-563.
- ORTIZ, R. M., WORTHY, G. A. J. (2000): Effects of capture on adrenal steroid and vasopressin concentrations in free-ranging bottlenose dolphins (*Tursiops truncatus*). *Comparative Biochemistry and Physiology a-Molecular and Integrative Physiology* 125, 3, 317-324.
- OWEN, M. A., SWAISGOOD, R. R., CZEKALA, N. M., STEINMAN, K., LINDBURG, D. G. (2004): Monitoring stress in captive giant pandas (*Ailuropoda melanoleuca*): behavioral and hormonal responses to ambient noise. *Zoo Biology* 23, 2, 147-164.
- PABST, D. A., ROMMEL, S. A., MCLELLAN, W. A. (1999): *The functional morphology of marine mammals* (1 ed.). Washington. Smithsonian Institute.
- PALAZZOLO, D. L., QUADRI, S. K. (1987): The effects of aging on the circadian rhythm of serum cortisol in the dog. *Experimental Gerontology* 22, 6, 379-387.
- PALLIN, L., ROBBINS, J., KELLAR, N., BÉRUBÉ, M., FRIEDLAENDER, A. (2018): Validation of a blubber-based endocrine pregnancy test for humpback whales. *Conservation Physiology* 6, 1.
- 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, 6, 501-505.
- PATCHEV, V. K., PATCHEV, A. V. (2006): Experimental models of stress. *Dialogues Clin Neurosci* 8, 4, 417-432.
- PEDERNERA-ROMANO, C., VALDEZ, R. A., SINGH, S., CHIAPPA, X., ROMANO, M. C., GALINDO, F. (2006): Salivary cortisol in captive dolphins (*Tursiops truncatus*): a non-invasive technique. *Animal Welfare* 15, 4, 359-362.

- PEREZ, B. C., MEHRKAM, L. R., FOLTZ, A. R., DOREY, N. R. (2018): Effects of Enrichment Presentation and Other Factors on Behavioral Welfare of Pantropical Spotted Dolphin (*Stenella attenuata*). *J Appl Anim Welf Sci* 21, 2, 130-140.
- PETRAUSKAS, L., ATKINSON, S., GULLAND, F., MELLISH, J., HORNING, M. (2008): Monitoring glucocorticoid response to rehabilitation and research procedures in California and Steller Sea Lions. *Journal of Experimental Zoology Part A: Ecological Genetics and Physiology* 309A, 2, 73-82.
- PETRAUSKAS, L., TUOMI, P., ATKINSON, S. (2006): Noninvasive Monitoring of Stress Hormone Levels in a Female Steller Sea Lion (*Eumetopias jubatus*) Pup Undergoing Rehabilitation *Journal of Zoo and Wildlife Medicine* 37, 1, 75-78.
- PETRAUSKAS, L. R., ATKINSON, S. K. (2006): Variation of Fecal Corticosterone Concentrations in Captive Steller Sea Lions (*Eumetopias jubatus*) in Relation to Season and Behavior. *Aquatic Mammals* 32, 2, 168-174.
- RAT DER EUROPÄISCHEN UNION. (1999). RICHTLINIE 1999/22/EG DES RATES vom 29. März 1999 über die Haltung von Wildtieren in Zoos. from <https://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:1999:094:0024:0026:DE:PDF>
- RAT DER EUROPÄISCHEN UNION. (2004). VERORDNUNG (EG) Nr. 1/2005 DES RATES vom 22. Dezember 2004 über den Schutz von Tieren beim Transport und damit zusammenhängenden Vorgängen sowie zur Änderung der Richtlinien 64/432/EWG und 93/119/EG und der Verordnung (EG) Nr. 1255/97. Retrieved 20.03.2022, from <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/DE/TXT/PDF/?uri=CELEX:32005R0001&from=DE>
- REEDER, D. M., KRAMER, K. M. (2005): Stress in Free-ranging Mammals: Integrating Physiology, Ecology and Natural History. *Journal of Mammalogy* 86, 2, 225-235.
- REESE, L. (2020): *Zum Flugunfähigmachen von Zoovögeln unter besonderer Berücksichtigung des Tierwohlaspekts am Beispiel des Rosaflamingos*. Diss. med. vet, FU Berlin, Berlin.
- REESE, L., BAUMGARTNER, K., VON FERSEN, L., MERLE, R., LADWIG-WIEGARD, M., WILL, H., HAASE, G., TALLO-PARRA, O., CARBAJAL, A., LOPEZ-BEJAR, M. (2020): Feather Corticosterone Measurements of Greater Flamingos Living under Different Forms of Flight Restraint. *Animals* 10, 4, 605.
- REFINETTI, R. (2006): *Circadian Physiology* (2 ed.). Boca Raton. Taylor & Francis.
- REITER, J., PANKEN, K. J., LE BOEUF, B. J. (1981): Female competition and reproductive success in northern elephant seals. *Animal Behaviour* 29, 3, 670-687.
- REYNOLDS III, J. E., ODELL, D. K., ROMMEL, S. A. (1999): *arine Mammals of the World*. Smithsonian Institution.

- RICHARDSON, W. J., WÜRSIG, B. (1997): Influences of man-made noise and other human actions on cetacean behaviour. *Marine and Freshwater Behaviour and Physiology* 29, 1-4, 183-209.
- RIEK, A., SCHRADER, L., ZERBE, F., PETOW, S. (2019): Comparison of cortisol concentrations in plasma and saliva in dairy cattle following ACTH stimulation. *Journal of Dairy Research* 86, 4, 406-409.
- ROBECK, T. R., SCHNEYER, A. L., MCBAIN, J. F., DALTON, L. M., WALSH, M. T., CZEKALA, N. M., KRAEMER, D. C. (1993): Analysis of urinary immunoreactive steroid metabolites and gonadotropins for characterization of the estrous cycle, breeding period, and seasonal estrous activity of captive killer whales (*Orcinus orca*). *Zoo Biology* 12, 2, 173-187.
- ROBECK, T. R., STEINMAN, K. J., GEARHART, S., REIDARSON, T. R., MCBAIN, J. F., MONFORT, S. L. (2004): Reproductive Physiology and Development of Artificial Insemination Technology in Killer Whales (*Orcinus orca*). *Biology of Reproduction* 71, 2, 650-660.
- ROBECK, T. R., STEINMAN, K. J., GREENWELL, M., RAMIREZ, K., VAN BONN, W., YOSHIOKA, M., KATSUMATA, E., DALTON, L., OSBORN, S., O'BRIEN, J. K. (2009): Seasonality, estrous cycle characterization, estrus synchronization, semen cryopreservation, and artificial insemination in the Pacific white-sided dolphin (*Lagenorhynchus obliquidens*). *Reproduction* 138, 2, 391-405.
- ROMANO, M. C., ZULEMA RODAS, A., VALDEZ, R. A., ELIZABETH HERNANDEZ, S., GALINDO, F., CANALES, D., MARIA BROUSSET, D. (2010): Stress in Wildlife Species: Noninvasive Monitoring of Glucocorticoids. *Neuroimmunomodulation* 17, 3, 209-212.
- ROSE, P., O'BRIEN, M. (2020): Welfare Assessment for Captive Anseriformes: A Guide for Practitioners and Animal Keepers. *Animals (Basel)* 10, 7.
- ROTHSCHILD, D. M., SERFASS, T. L., SEDDON, W. L., HEGDE, L., FRITZ, R. S. (2008): Using Fecal Glucocorticoids to Assess Stress Levels in Captive River Otters. *Journal of Wildlife Management* 72, 1, 138-142.
- SAGE, D., GANEM, J., GUILLAUMOND, F., LAFORGE-ANGLADE, G., FRANÇOIS-BELLAN, A., BOSLER, O., BECQUET, D. (2004): Influence of the Corticosterone Rhythm on Photic Entrainment of Locomotor Activity in Rats. *Journal of Biological Rhythms* 19, 2, 144-156.
- SAMBRAUS, H. H., STEIGER, A. (1997): *Das Buch vom Tierschutz*. Enke.
- SAPOLSKY, R. M. (2000): Stress Hormones: Good and Bad. *Neurobiology of Disease* 7, 5, 540-542.
- 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, 1, 55-89.
- SCHMITT, T. L., ST. AUBIN, D. J., SCHAEFER, A. M., DUNN, J. L. (2010): Baseline, diurnal variations, and stress-induced changes of stress hormones in three captive beluga whales, *Delphinapterus leucas*. *Marine Mammal Science* 26, 3, 635-647.
- SCHÖNREITER, S. (1996). *Bestimmung der Kortisolkonzentration im Speichel als tierschutzrelevante Alternative zur Messung des Kortisolspiegels aus dem Blut von Saugferkeln*. Diss. med. vet, LMU München, München.
- SELYE, H. (1984): *Stress beherrscht unser Leben*. Frankfurt. Fischer Taschenbuch Verlag.
- SERRES, A., HAO, Y., WANG, D. (2020): Swimming features in captive odontocetes: Indicative of animals' emotional state? *Behav Processes* 170, 103998.
- SINGH, S., NATESAN, R., SHARMA, N., SINGH, M., RAHAL, A. (2018): Lipopolysaccharide exposure modifies salivary and circulating level of cortisol in goats. *Small Ruminant Research* 162, 30-33.
- SKŁADANOWSKA-BARYZA, J., LUDWICZAK, A., PRUSZYŃSKA-OSZMAŁEK, E., KOŁODZIEJSKI, P., BYKOWSKA, M., STANISZ, M. (2018): The effect of transport on the quality of rabbit meat. *Anim Sci J* 89, 4, 713-721.
- SORIANO, A. I., VINYOLES, D., MATÉ, C. (2019): Patterns of animal-enrichment interaction in captive brown bears. *Zoo Biol* 38, 3, 239-247.
- ST. AUBIN, D., GERACI, J. (1990): Adrenal Responsiveness to Stimulation by Adrenocorticotrophic Hormone (ACTH) in Captive Beluga Whales, *Delphinapterus leucas*. *Can Bull Fish Aquat Sci* 224, 149-157.
- ST. AUBIN, D. J., FORNEY, K. A., CHIVERS, S. J., SCOTT, M. D., DANIL, K., ROMANO, T. A., WELLS, R. S., GULLAND, F. M. D. (2013): Hematological, serum, and plasma chemical constituents in pantropical spotted dolphins (*Stenella attenuata*) following chase, encirclement, and tagging. *Marine Mammal Science* 29, 1, 14-35.
- ST. AUBIN, D. J., GERACI, J. R. (1986): Adrenocortical Function in Pinniped Hyponatremia. *Marine Mammal Science* 2, 4, 243-250.
- ST. AUBIN, D. J., RIDGWAY, S. H., WELLS, R. S., RHINEHART, H. (1996): Dolphin thyroid and adrenal hormones: Circulating levels in wild and semidomesticated *Tursiops truncatus*, and influence of sex, age, and season. *Marine Mammal Science* 12, 1, 1-13.
- STALDER, T., KIRSCHBAUM, C. (2012): Analysis of cortisol in hair – State of the art and future directions. *Brain, Behavior, and Immunity* 26, 7, 1019-1029.

- STRZELEC, K., KOWALIK, S. (2013): Salivary cortisol concentration in exercised thoroughbred horses. *Journal of Equine Veterinary Science* 33, 12, 1106-1109.
- SUZUKI, M., TOBAYAMA, T., KATSUMATA, E., UCHIDA, S., UEDA, K., YOSHIOKA, M., AIDA, K. (2002): Secretory patterns of cortisol in Indo-Pacific bottlenose dolphins and killer whales. *Fisheries Science* 68, 451-452.
- SUZUKI, M., TOBAYAMA, T., KATSUMATA, E., YOSHIOKA, M., AIDA, K. (1998): Serum cortisol levels in captive killer whale and bottlenose dolphin. *Fisheries Science* 64, 4, 643-647.
- 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, 3, 427-433.
- TECAN, I. I. G. Cortisol Saliva ELISA. Retrieved 15.05.2022, 2022, from https://www.ibl-international.com/media/mageworx/downloads/attachment/file/r/e/re52611_ifu_eu_de_cortisol_saliva_elisa_2020-04_sym9.pdf
- TENNINGEN, M., VOLD, A., OLSEN, R. E. (2012): The response of herring to high crowding densities in purse-seines: survival and stress reaction. *ICES Journal of Marine Science* 69, 8, 1523-1531.
- THEWS, G., VAUPEL, P. (1997): Nebennierenrindenhormone *Vegetative Physiologie* (424-426). Springer.
- THOMPSON, L. A., SPOON, T. R., GOERTZ, C. E., HOBBS, R. C., ROMANO, T. A. (2014): Blow collection as a non-invasive method for measuring cortisol in the beluga (*Delphinapterus leucas*). *PLoS One* 9, 12, e114062.
- THOMSON, C. A., GERACI, J. R. (1986): Cortisol, Aldosterone and Leukocytes in the Stress Response of Bottlenosed Dolphins, *Tursiops truncatus*. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 43, 5, 1010-1016.
- TOUMA, C., PALME, R. (2005): Measuring fecal glucocorticoid metabolites in mammals and birds: The importance of validation. In U. Bauchinger, W. Goymann & S. JenniEiermann (Hrsg.): *Bird Hormones and Bird Migrations: Analyzing Hormones in Droppings and Egg Yolks and Assessing Adaptations in Long-Distance Migration* (Vol. 1046, 54-74). New York. New York Acad Sciences.
- VAN DER WEYDE, L. K., MARTIN, G. B., PARIS, M. C. (2016): Monitoring stress in captive and free-ranging African wild dogs (*Lycaon pictus*) using faecal glucocorticoid metabolites. *Gen Comp Endocrinol* 226, 50-55.
- VAN EEKELLEN, A. P. J., KERHOF, G. A., AMSTERDAM, J. G. C. (2003): Circadian Variation in Cortisol Reactivity to an Acute Stressor.

- Chronobiology International: The Journal of Biological & Medical Rhythm Research 20, 5, 863.
- VERHAGEN, L. A. W., PÉVET, P., SABOUREAU, M., SICARD, B., NESME, B., CLAUSTRAT, B., BUIJS, R. M., KALSBECK, A. (2004): Temporal organization of the 24-h corticosterone rhythm in the diurnal murid rodent *Arvicanthis ansorgei* Thomas 1910. *Brain Research* 995, 2, 197-204.
- VINCENT, I. C., MICHELL, A. R. (1992): Comparison of cortisol concentrations in saliva and plasma of dogs. *Research in Veterinary Science* 53, 3, 342-345.
- VINSON, G. P. (2016): Functional Zonation of the Adult Mammalian Adrenal Cortex. *Frontiers in Neuroscience* 10.
- VOIGT, K. (2003): *Endokrines System* (4. ed.). Stuttgart. Georg Thieme Verlag.
- VON FERSEN, L., ENCKE, D., HÜTTNER, T., BAUMGARTNER, K. (2018): Establishment and implementation of an animal welfare decision tree to evaluate the welfare of zoo animals. *Aquatic Mammals* 44, 2, 211-220.
- VON HOLST, D. (1998): The concept of stress and its relevance for animal behavior. In A. P. Moller, M. Milinski & P. J. B. Slater (Hrsg.): *Stress and Behavior* (Vol. 27, 1-131). San Diego. Elsevier Academic Press Inc.
- WALKER, L., CORNELL, L., DAHL, K., CZEKALA, N., DARGEN, C., JOSEPH, B., HSUEH, A., LASLEY, B. (1988): Urinary concentrations of ovarian steroid hormone metabolites and bioactive follicle-stimulating hormone in killer whales (*Orcinus orchus*) during ovarian cycles and pregnancy. *Biology of Reproduction* 39, 5, 1013-1020.
- WASSER, S., HUNT, K., BROWN, J., COOPER, K., CROCKETT, C., BECHERT, U., MILLSPAUGH, J., LARSON, S., MONFORT, S. (2000): A Generalized Fecal Glucocorticoid Assay for Use in a Diverse Array of Nondomestic Mammalian and Avian Species. *General and Comparative Endocrinology* 120, 3, 260-275.
- WENDELAAR BONGA, S. E. (1997): The stress response in fish. *Physiol Rev* 77, 3, 591-625.
- WHITTAKER, A. L., GOLDBERGER-DEWAR, B., TRIGGS, J. L., SHERWEN, S. L., MCLELLAND, D. J. (2021): Identification of Animal-Based Welfare Indicators in Captive Reptiles: A Delphi Consultation Survey. *Animals (Basel)* 11, 7.
- WHO. (2005). Preamble to the Constitution of the World Health Organization as adopted by the International Health Conference, 19-22 June 1946, and entered into force on 7 April 1948. *Bulletin of the World Health Organization* Retrieved 20.03.2022, from http://www.who.int/bulletin/bulletin_board/83/ustun11051/en/
- YODER, B., WOLF, J. S., JR. (2005): Canine model of surgical stress response comparing standard laparoscopic, microlaparoscopic,

- and hand-assisted laparoscopic nephrectomy. *Urology* 65, 3, 600-603.
- YON, L., WILLIAMS, E., HARVEY, N. D., ASHER, L. (2019): Development of a behavioural welfare assessment tool for routine use with captive elephants. *PLoS One* 14, 2, e0210783.
- YOUNG, K. M., WALKER, S. L., LANTHIER, C., WADDELL, W. T., MONFORT, S. L., BROWN, J. L. (2004): Noninvasive monitoring of adrenocortical activity in carnivores by fecal glucocorticoid analyses. *General and Comparative Endocrinology* 137, 2, 148-165.

VIII. Publikationen

1 Originalartikel

Daniela Rickert, Ralph Simon, Lorenzo von Fersen, Katrin Baumgartner, Thomas Bertsch, Clemens Kirschbaum und Michael Erhard. 2021. „Saliva and Blood Cortisol Measurement in Bottlenose Dolphins (*Tursiops truncatus*): Methodology, Application, and Limitations“. *Animals* 12(1):22

2 Kongressbeitrag

Vortrag bei der EAAM 2022: Daniela Rickert, Ralph Simon, Lorenzo von Fersen, Katrin Baumgartner, Thomas Bertsch, Clemens Kirschbaum und Michael Erhard. 2021. „Saliva and Blood Cortisol Measurement in Bottlenose Dolphins (*Tursiops truncatus*): Methodology, Application, and Limitations“

IX. Danksagung

Mein ganz besonderer Dank gilt allen Mitarbeiter:innen der Lagune des Tiergarten Nürnberg unter Leitung von Armin Fritz und Christiane Thiere und den Tiermedizinischen Fachangestellten Simone Pürkel, Manuela Enzelberger, Gabi Foth und Tina Locker im Tiergarten Nürnberg. Ohne euch alle wäre das dieser Dissertation zugrundeliegende Projekt nicht möglich gewesen! Ihr habt mich immer unterstützt, wenn ich mal wieder mit neuen Ideen kam, wann und wie Speichelproben genommen werden sollen, habt die Proben genommen und bearbeitet, unzählige Listen ausgefüllt und ihr habt mit eurer Expertise die Arbeit bereichert und mich auf viele Fallstricke aufmerksam gemacht. Danke dafür!

Meinem Mentor Dr. Lorenzo von Fersen, der von Anfang an an dieses Projekt glaubte und es mit hohem persönlichem Einsatz vorantrieb, auch wenn wir zu Beginn viele Rückschläge verkraften mussten, gilt mein besonderer Dank! Er nahm sich immer Zeit für mich! Danke, lieber Lorenzo!

Auch Dr. Katrin Baumgartner gilt mein ganz besonderer Dank. Sie war Ideengeberin und Mentorin, Mahnerin und Antreiberin und einfach eine gute Freundin! Danke, liebe Katrin!

Ganz besonders will ich allen Co-Autoren danken:

Allen voran Dr. Ralph Simon, der es nicht nur geschafft hat, komplizierte Berechnungen anzustellen und mir die Ergebnisse so zu erklären, dass auch ich sie verstand, der lange Zahlenkolonnen in anschauliche Diagramme verwandeln konnte und der mit seiner präzisen Art an der dieser Arbeit zugrundeliegenden Veröffentlichung bis zur letzten Sekunde mitfeilte und diese Dissertation akribisch Korrektur las. Lieber Ralph, herzlichen Dank! Du warst eine

unglaubliche Hilfe! Andere Doktoranden können sich glücklich schätzen, wenn sie Dich als Betreuer haben.

Prof. Dr. Kirschbaum, der uns in Dresden in vielen persönlichen Gesprächen hilfreich zur Seite stand und der in seinem Institut die Proben kostenlos untersuchte! Danke an das komplette Laborteam, das immer hilfsbereit und aufgeschlossen war und mich in die Geheimnisse der Speichelcortisolbestimmung einweihte.

Prof. Dr. Thomas Bertsch, der die Blutproben in seinem Krankenhauslabor untersuchen ließ und uns mit seiner Detailkenntnis noch weitere Aspekte bedenken ließ. Auch seinem Team gilt mein herzlicher Dank!

Prof. Dr. Dr. Michael Erhard für die Übernahme dieser externen Arbeit an seinem Lehrstuhl, für seine unaussprechlich große Geduld mit mir, seine schnellen Antworten und seine kostbaren Ratschläge.

Ein großer Dank gilt meinen Eltern, die es mit ermöglicht haben, meinen seit Kindesbeinen vorhandenen Berufswunsch ausüben zu können. Sie haben es unter großen persönlichen Opfern geschafft, dass ich studieren konnte, und waren mir immer eine emotionale Stütze. Leider können sie beide nicht mehr Zeuge davon werden, dass die Erste in der Familie promoviert. Es wäre ihnen eine unfassbar große Freude gewesen!

Für viele gute Ratschläge und die Unterstützung will ich meinem Team im Veterinäramt danken. Stellvertretend für alle sei Dr. Tim Böhmer genannt, der meine Computerdefizite ausglich und besser war als jedes Rechtschreibprogramm. Danke Tim!

Meiner guten Freundin Dr. Rebecca Holmes danke ich dafür, dass sie die englische Zusammenfassung Korrektur gelesen hat. Liebe Beccy, herzlichen Dank!

Zu guter Letzt möchte ich meinem Mann Klaus einen ganz speziellen Dank aussprechen. Dafür, dass Du immer für mich da bist und mir den Rückhalt gibst, damit ich meine Pläne verwirklichen kann. Ohne Dich hätte ich es nicht geschafft!