



Publication: Arctic Science
• 15 January 2021 •
<https://doi.org/10.1139/as-2020-0034>

Cortisol levels in narwhal (*Monodon monoceros*) blubber from 2000 to 2019

Cortney A. Watt, James Simonee, Vincent L'Herault, Ruokun Zhou, Steven H. Ferguson, Marianne Marcoux and Sandra Black

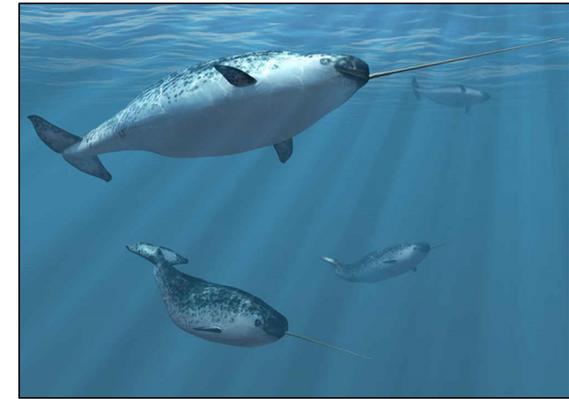
Il narvalo



- Dal norvegese *narhval* ovvero “balena cadavere”
 - I narvali insieme ai beluga sono cetacei appartenenti al sottordine degli Odontoceti e alla famiglia Monodontidae
 - Lunghezza media del corpo 4-5 m dente escluso (2.4-3 m); testa arrotondata con cranio asimmetrico, colorazione diversa in relazione all'età
 - Areale di distribuzione: 70°lat nord, raramente si allontanano dall'Artico ma d'estate si spostano verso baie e a volte risalgono i fiumi → pericolo di intrappolamento in baie ostruite dal ghiaccio
 - Vivono in piccoli gruppi (a volte anche 50 individui) ma che si possono associare tra loro
-



Abstract



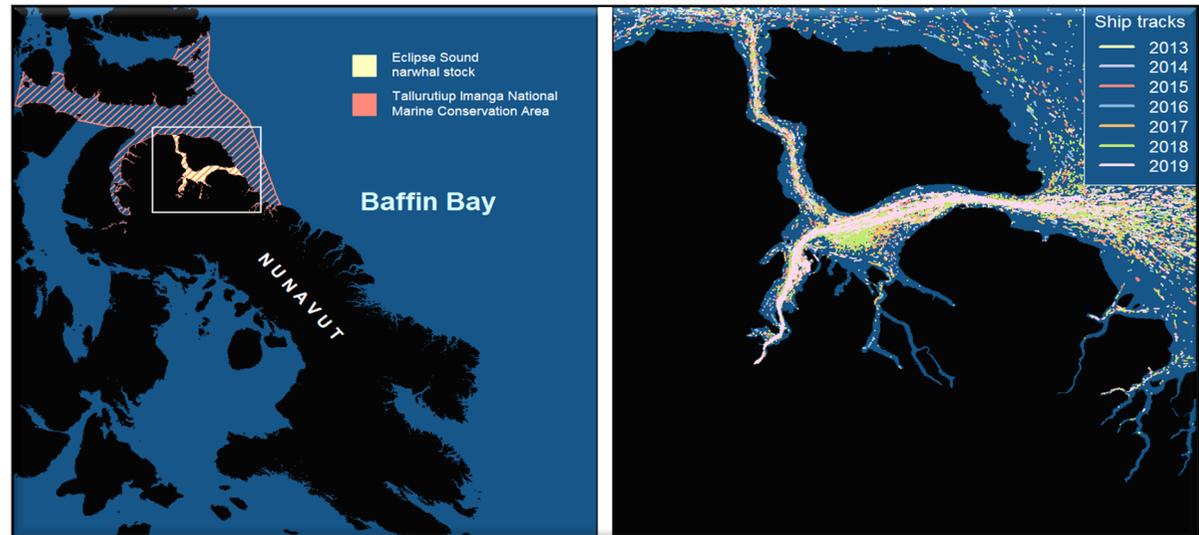
- I narvali trascorrono l'estate a largo dell'Isola di Baffin, area soggetta ad un recente aumento del traffico navale per la presenza di una miniera di minerali ferrosi (Baffinland Iron Mines Corporation); come questo disturbo possa impattare questa famiglia di cetacei è attualmente un'incognita.
 - Il cortisolo è un ormone di risposta ad uno stress e viene usato come indicatore di stress per i mammiferi marini.
 - Lo studio ha valutato il livello di cortisolo nel grasso dei narvali nell'arco di un ventennio, campionandolo
 - 2000-2006 prima del progetto del traffico navale (Mary River Project)
 - 2013-2019 durante il progetto del traffico navale
 - 2015 durante un evento di intrappolamento
-

Introduction

- Culturalmente e economicamente importanti per le comunità Inuit nella regione del Nunavut (pesca di sussistenza per la popolazione locale)
- **Global change:** $>CO_2$ antropogenica $\rightarrow >T^\circ \rightarrow$ $<$ estensione copertura ghiaccio+ allungamento stagione adatta per il traffico navale = aumentato traffico navale (a livelli senza precedenti)
- Il traffico navale altera movimento, comportamento e risposte di stress dei mammiferi marini (come nelle loro prede)
- Cortisolo come indicatore della risposta di stress, livello positivamente correlato con l'intensità dello stress



- Baffinland Iron Mines Corporation → Mary River Project inizia a produrre dal 2015
- Traffico navale per preparazione estrazione di minerali contenenti Fe inizia nel 2013
- Tallurutiup Imanga National Marine Conservation Area frequentata da narvali dell'Eclipse Sound stock ca. (12'000 individui)
- Per l'approvazione del progetto Baffinland istituisce MEWG → necessario stabilire la condizione di riferimento iniziale per determinare indicatori di avvertimento di stress e potenziali impatti negativi del traffico navale

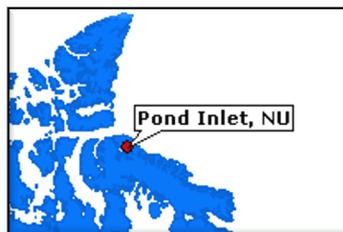


Distribution of the Eclipse Sound narwhal stock (left panel) and vessel locations for the area from 2013 to 2019 (right panel). The Tallurutiup Imanga National Marine Conservation Area is highlighted for reference (shapefile from the World Database on Protected Areas (IUCN and UNEP-WCMC 2017)). Maps were created using R (R Core Team 2020) with package “sp” (Pebesma and Bivand 2005; Bivand et al. 2013). Basemap data are from the United States Geological Survey (2020: CANADA_WVS_GEO_WGS84)

-
- Obiettivo studio: misurazione dei livelli di cortisolo dei narvali di Eclipse Sound e comparazione di questi nei tre “trattamenti”:
 - ✓ 2000-2006: pre-progetto (Mary River Project)
 - ✓ 2013-2019: durante il progetto
 - ✓ Dicembre 2015: evento naturale di intrappolamento



Methods: sample collection



- Campionamento di grasso da narvali cacciati dagli abitanti di Pond Inlet (insediamento Inuit) dal 2000 al 2019
- Campionamento di grasso da narvali intrappolati dal ghiaccio nell'Eclipse Sound nel 2015 durante una battuta locale → "sacssat"
- Grasso sottocutaneo usato per analisi → misura integrata che riflette lo stress anche nei beluga (Loseto et al. 2018)
- Campioni congelati a -20°C prima delle analisi, avvenute nello stesso laboratorio nell'arco temporale di 5 mesi.



Analysis

1. Trasferimento 200mg di grasso in 13x100mm culture test tube → addizionamento 5mL metanolo CH_3OH + 100 μL soluzione Cortisol-D4 IS (Certified Reference Material)
2. Campione mantenuto in agitazione per 24h e successiva concentrazione dell'estratto
3. Soluzione concentrata risultante viene risospesa in una soluzione di 2mL di CH_3OH al 5% prima dell'estrazione in fase solida per adsorbimento SPE

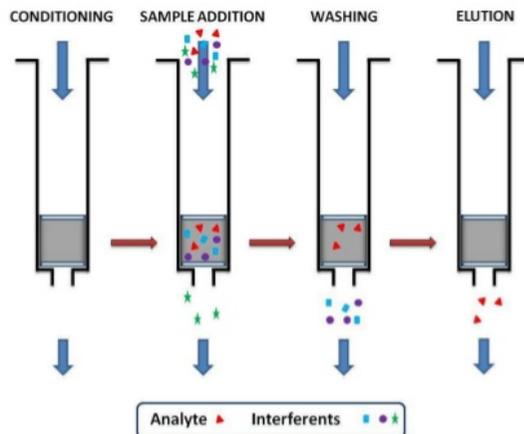
L'**estrazione in fase solida** (SPE, *solid-phase extraction*) rappresenta attualmente la tecnica di preparazione del campione più nota e utilizzata per le analisi chimiche in diversi settori (clinico, ambientale, farmaceutico e alimentare). Il processo di estrazione è basato sull'interazione degli analiti da estrarre, disciolti in una fase liquida (o talvolta gassosa), con una fase solida (adsorbente). Dopo un preliminare condizionamento dell'adsorbente, il processo di estrazione prevede generalmente una fase di caricamento del campione liquido (o passaggio del campione gassoso) e ritenzione degli analiti, seguita da una fase di eluizione con un opportuno solvente.



Solid Phase Extraction

EPA 3535 – SPE - Solid Phase Extraction

Estrazione in fase solida



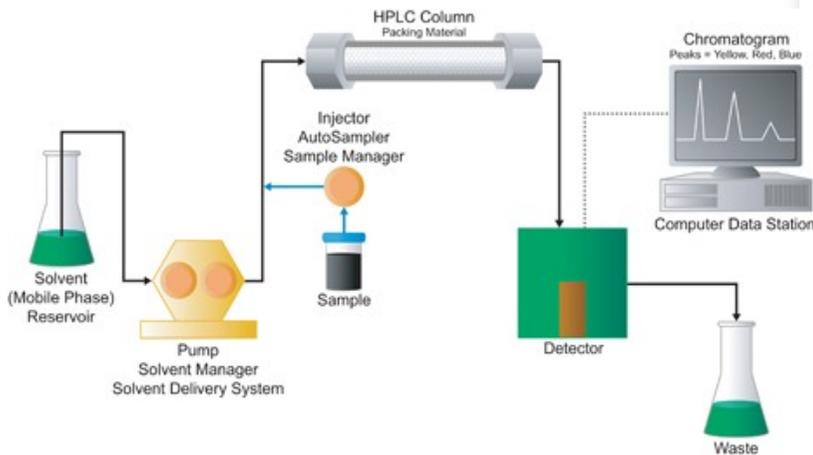
6

ThermoFisher
SCIENTIFIC



1. Ogni cartuccia SPE (Agilent Bond Elut-C18 OH) condizionata con 3mL 100% metanolo
 2. Caricamento del campione nella cartuccia a 1mL/min
 3. Lavaggio della cartuccia con 3mL soluzione acquosa di metanolo al 10% e flusso di 3mL di aria (1mL/min) per asciugare la cartuccia
 4. Fase di eluizione della cartuccia con 2mL di soluzione acquosa al 60% di metanolo
 5. Centrifuga a 14'000g per 10min
 6. Campione di 180µL di sopranatante per analisi
- LC-MS = cromatografia liquida e spettrometria di massa

HPCL High Performance Liquid Chromatography



- Cromatografia liquida ad alta prestazione tecnica cromatografica che permette di separare due o più composti presenti in un solvente sfruttando l'equilibrio di affinità tra una "fase stazionaria" posta all'interno della colonna cromatografica e una "fase mobile" che fluisce attraverso essa. Una sostanza più affine alla fase stazionaria rispetto alla fase mobile impiega un tempo maggiore a percorrere la colonna cromatografica (tempo di ritenzione), rispetto ad una sostanza con bassa affinità per la fase stazionaria ed alta per la fase mobile.
- Il campione da analizzare è iniettato all'inizio della colonna cromatografica dove è "spinto" attraverso la fase stazionaria dalla fase mobile applicando pressioni dell'ordine delle centinaia di atmosfere
- Alla fine della colonna è applicato un rilevatore (IR, UV-VIS, spettrometro di massa) e un calcolatore che permettono un'analisi in continuo dell'uscita della colonna e quindi di poter quantificare e/o identificare le sostanze iniettate tramite apposito cromatogramma.



Data analysis

- Trasformazione logaritmica dei livelli di cortisolo per migliorare la normalità dei dati
 - Anche dopo la log-transformation ci sono differenze enormi tra i campioni dei tre trattamenti:
 - I. 2000-2006 pre-Mary Project
 - II. 2013-2019 durante Mary Project
 - III. 2015 intrappolamento
-

Statistical Tests

- **Test di Kruskal-Wallis** è un metodo non parametrico per verificare l'uguaglianza delle mediane di diversi gruppi; cioè per verificare che tali gruppi provengano da una stessa popolazione (o da popolazioni con uguale mediana).
- **Test di Dunn** per determinare se ci fossero e dove delle differenze significative

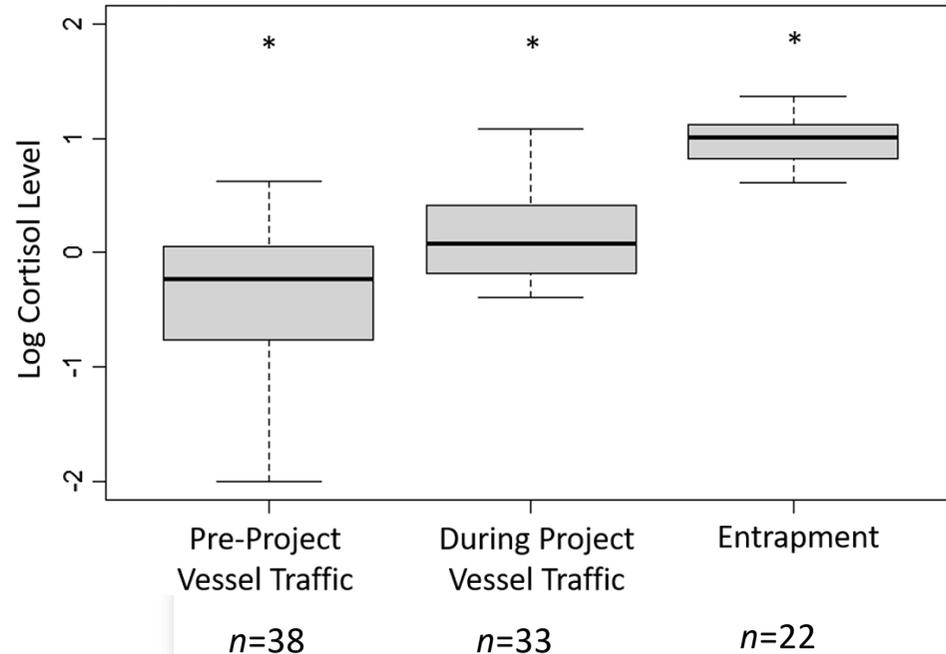
N.B. Età e lunghezza animale non sono stati inclusi nelle analisi (età sconosciuta e lunghezza non sempre registrata)

Results

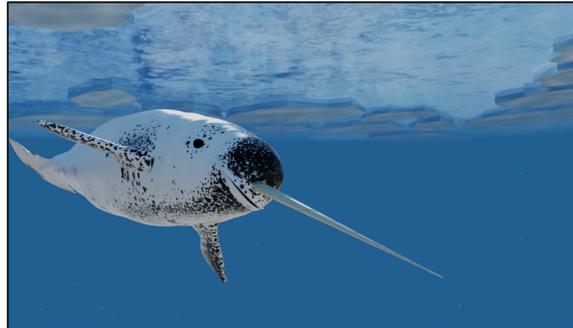
Livelli di cortisolo:

- I. 2000-2006 pre-Mary Project: variazione 0.01-4.21ng/g, **media 0.81ng/g** \pm 0.45
- II. 2013-2019 durante Mary Project: 0.4-12.2ng/g, **media 1.81ng/g** \pm 0.45
- III. 2015 intrappolamento: variazione 3.13-23.27ng/g, **media 10.52ng/g** \pm 0.59
→ campioni con livello di cortisolo significativamente molto alti

Boxplot of log-transformed cortisol level for three treatments, pre-project-related vessel traffic (2000–2006), during project-related vessel traffic (2013–2019), and an entrapment event (2015). Asterisks indicate significant differences among all three treatments.

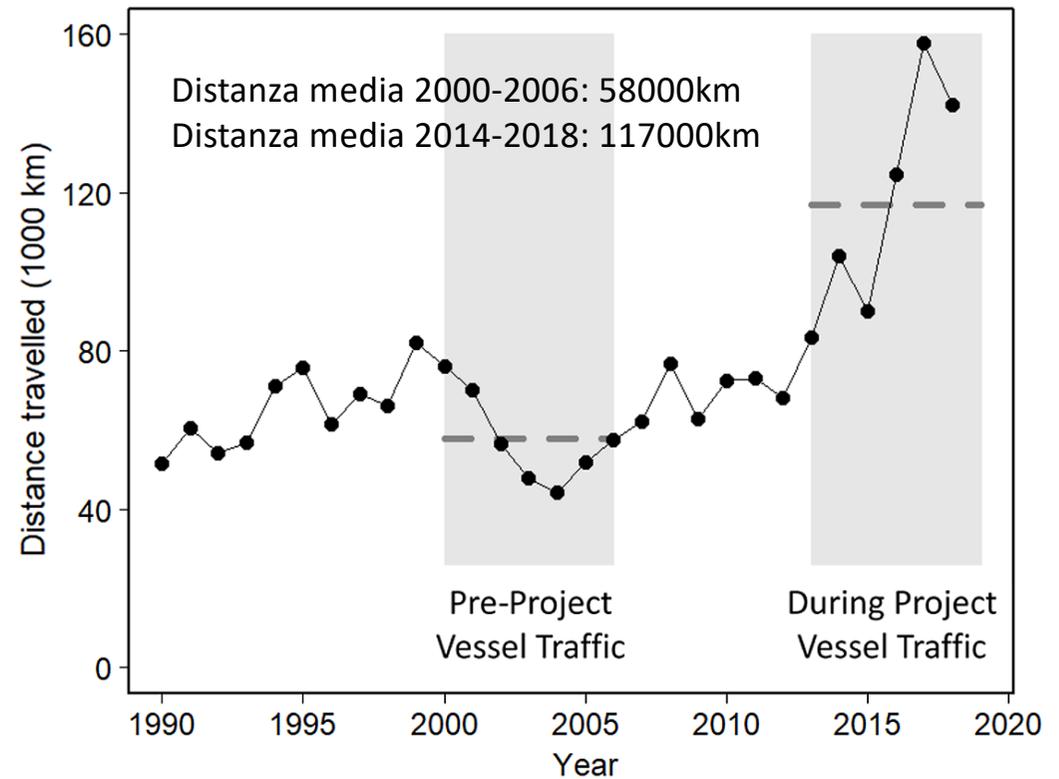


Discussion



- I livelli di cortisolo dei campioni dei narvali intrappolati sono molto più alti di quelli pre/post progetto, indica il forte stress sperimentato da questi durante l'evento di intrappolamento anche come risultato del limitato accesso alla superficie per respirare e quindi l'impossibilità di nutrirsi.
- Lo stress indotto dal traffico navale è meno forte di quello dovuto all'evento di intrappolamento ma agisce a lungo termine e dato che il traffico navale continuerà ad aumentare nel XXI sec. potrebbe portare a stress cronico e ridotto successo riproduttivo nei narvali della regione.
- Il fatto che le differenze nel livello di cortisolo TRA gli individui sono ridotte per il gruppo analizzato durante il Mary River Project (2013-2019) potrebbe indicare che lo stress indotto dal traffico navale nasconde delle differenze individuali nei livelli di cortisolo che potrebbero essere attribuite ad altri stress ambientali che questi individui hanno sperimentato prima del progetto.

- In corrispondenza del 2007 si è registrato un minimo nell'estensione della copertura di ghiaccio in Artico, quindi un'aumentata intensità di traffico marittimo indipendentemente dal Mary River Project
- Inoltre la distanza media percorsa dalle imbarcazioni nell'area protetta Tallurutiup Imanga National Marine Conservation Area nell'Antartico Canadese è raddoppiata se consideriamo i due periodi su cui si è concentrato lo studio



Total distance travelled by vessel transiting the Tallurutiup Imanga National Marine Conservation Area from 1990 to 2018. Data from Kochanowicz et al. (2020).

-
- Il traffico navale è considerato uno degli stress più importanti per i mammiferi marini che potrebbe ridurre le loro capacità trofiche, di comunicazione e navigazione, quindi eventualmente a una ridotta fitness
 - Il rumore marino propagandosi a frequenze simili a quelle fatte dai cetacei può interferire con la loro comunicazione e rompere le interazioni sociali; studi hanno dimostrato che i narvali tendono ad evitare gli icebreakers e che i beluga evitano zone ad elevato rumore marino in cui diminuiscono le loro vocalizzazioni → questo studio non ha considerato gli impatti a livello comportamentale, cosa auspicabile nel futuro



- Vecchi campioni di grasso (materiale degradato) hanno livelli di cortisolo ancora più bassi ma questo studio ha considerato quelli dopo il 2000 perché erano meglio conservati; quindi i livelli di cortisolo riscontrati nel periodo precedente al traffico navale (2000-2006) possono essere usati come metro di paragone per futuri monitoraggi
- I livelli di cortisolo variano tra gli individui e possono essere influenzati da molti fattori biologici (età, taglia, sesso, stato riproduttivo) → non presi in considerazione dallo studio



-
- Precedenti studi sul livello di cortisolo nei beluga hanno dimostrato che questi non vengono significativamente influenzati da fattori biologici
 - Altri studi sul cortisolo in beluga intrappolati era 1.76ng/g comparandolo con quello di 10.52ng/g dei narvali intrappolati si deduce quindi che quest'ultimi sono più sensibili
 - I livelli di cortisolo riscontrati in beluga in salute a ovest dell'Artico canadese sono simili a quelli dei narvali del presente studio nel periodo precedente al Mary River Project.



Future applications



Monitoraggio di: tassi riproduttivi dei narvali, condizioni di salute e abbondanze di popolazione fondamentale per capire gli impatti a lungo termine dovuti all'aumentato stress (cronico)

Aumentato stress per diverse cause:

Cambiamento delle condizioni del ghiaccio

Cambiamento nella catena trofica artica

Aumentata popolazione di orche nell'Artico canadese

Aumentato traffico marittimo

L'effetto cumulativo di questi cambiamenti potrebbe avere un impatto maggiore nelle popolazioni dei narvali.

