

Focus

Efectos subletales de la exposición al vertido tóxico de Aznalcóllar en aves de larga vida

Raquel Baos^{1*} & Fernando Hiraldo¹

Sublethal effects of the exposure to the Aznalcóllar toxic spill in long-lived birds

In 1998, the rupture of the tailings dam at the Aznalcóllar pyrite mine (Sevilla, Southwestern Spain) caused a toxic spill in the surroundings of the Doñana National Park. Here, we review the potential impact of this mining spill on birds using the White Stork *Ciconia ciconia* and the Black Kite *Milvus migrans* as sentinel species. We employed a biomarker approach to study the relationships between blood levels of Pb, Cd, Zn, Cu and As (the most abundant metals in the spill), and molecular, biochemical, cellular, and physiological aspects of vital importance – including the immune system, DNA damage, the adrenocortical stress response, and bone development and metabolism – to organism functioning. We found that, although often below threshold toxicity values, levels of some metals (e.g. Cu) could be related to an impaired cellular immune response (PHA-skin-test) and to DNA damage (comet assay) both in White Stork and Black Kite nestlings. The adrenocortical stress response in White Stork nestlings was positively related to low Pb levels. This association was stronger in individuals that had suffered additional stress from other environmental factors. The morphological deformities detected in White Stork nestlings after the spill were related to disrupted bone metabolism (P levels, Ca:P, bone alkaline phosphatase), especially in younger birds. Moreover, female storks developmentally exposed to the spill experienced an altered age-dependent pattern of breeding performance in comparison with their non-developmentally exposed counterparts (hatched before the spill), showing an unusually high productivity in their early reproductive life and premature breeding senescence. We propose that sublethal effects compromising White Storks' health during the nestling period might play an important role in shaping this pattern of reproduction (terminal investment hypothesis). In summary, the biomarker approach used in the short- and medium-terms can serve as an early-warning signal of long-term contaminant effects in wild birds. This review shows that the exposure to pollutants in early life, even at low levels, may affect individual fitness (reproduction) and is evidence of the need for long-term monitoring and evaluation when attempting to correctly assess the impact of pollutants on wildlife populations. We conclude that the Aznalcóllar mine spill is the most likely cause of the effects detected in storks and kites. However, we cannot completely rule out the idea that these effects may be the result of the combined exposure to spill-related metals and other contaminants associated with the industrial and agricultural activities practiced in the surroundings of the Doñana National Park.

Key words: White Stork, *Ciconia ciconia*, Black Kite, *Milvus migrans*, Aznalcóllar mine spill, metal pollution.

¹ Departamento de Biología de la Conservación, Estación Biológica de Doñana (CSIC), Avda. Américo Vespucio 26, 41092, Sevilla, Spain.

* Corresponding author: rbsenda@yahoo.es

Received: 21.09.18; Accepted: 30.10.18 / Edited by O. Gordo.

Los accidentes medioambientales se han convertido en una triste realidad que a menudo ocupa la primera página de los periódicos y es cabecera de las noticias de radio y televisión. Explosiones o escapes químicos como los de Seveso (Italia, 1976), o Bhopal (India, 1984), radioactivos como el de Chernobyl (Ucrania, 1986) o Fukushima (Japón, 2011), vertidos mineros como el de Aznalcóllar (España, 1998) o el de Baia Mare (Rumanía, 2000), o los más frecuentes vertidos de crudo como los del petrolero Exxon Valdez (Alaska, EEUU, 1989), del Prestige (España, 2002) o de la plataforma petrolífera Deepwater Horizon-BP (Golfo de México, EEUU, 2010), son una de las consecuencias de la mala gestión de riesgos que caracteriza a la sociedad industrial y tecnológica en la que vivimos. El ser humano se halla detrás de la gran mayoría de estos desastres, que suelen recibir precisamente este nombre (desastres) por el impacto obvio e inmediato que ocasionan allí donde se producen. Así, es frecuente ver imágenes de paisajes devastados, de voluntarios y técnicos limpiando zonas cubiertas de petróleo o lodos tóxicos y leer noticias donde se detalla el número o cantidad de animales muertos o las dimensiones de la superficie afectada, por lo general, muy elevados. Sin embargo, después de algunas semanas, meses o, en el mejor de los casos, años, los medios de comunicación y con ellos la administración competente suelen olvidarse de esos accidentes/desastres y de los efectos directos o indirectos que, más allá del llamativo impacto inicial (p.ej. grandes mortandades de peces y aves), pueden tener a medio-largo plazo sobre la fauna en particular y el ecosistema en general, y que muchas veces son más importantes para la dinámica de las poblaciones y ecosistemas afectados que los efectos a corto plazo (Peterson *et al.* 2003, Guterman 2009).

Contaminación por metales pesados y metaloides

Los metales constituyen una gran familia de elementos caracterizados por una química compleja. Algunos de ellos, los llamados “esenciales” [p.ej. cinc (Zn), cobre (Cu), hierro (Fe)], son necesarios para el normal funcionamiento de los seres vivos y forman parte de aminoácidos, ácidos nucleicos y otros componentes estructurales del organismo. Todos los metales esenciales

poseen un rango de variabilidad (“ventana de esencialidad”) dentro del cual sus concentraciones han de mantenerse constantes para que el organismo crezca y se reproduzca normalmente. Para algunos de ellos ese rango es muy reducido [p.ej. selenio (Se)], de forma que fuera de esos márgenes, y superada la capacidad homeostática del organismo, esos mismos metales esenciales pueden dar lugar a efectos adversos. Otros metales como el cadmio (Cd), el mercurio (Hg), el plomo (Pb) o el metaloide arsénico (As) se consideran no esenciales porque no desempeñan función alguna conocida en los organismos vivos. Además de ser tóxicos por encima de ciertos niveles o umbrales de toxicidad, los metales no esenciales como el Hg o el Cd, pueden también afectar negativamente a los organismos induciendo deficiencias de elementos esenciales al competir con ellos por los sitios activos en importantes biomoléculas (Goyer 1997, Walker *et al.* 2001). En este sentido es importante señalar que, en su mayor parte, los metales no se hallan en el medio aisladamente, sino que coexisten en mezclas con otros metales/metaloides y/o sustancias de naturaleza orgánica con los que pueden interactuar dando lugar a efectos distintos a los que ocasionarían de manera individual o aislada (ATSDR 2004). Los efectos de los metales en las mezclas pueden ser aditivos, sinérgicos, antagónicos, o incluso potenciadores. Estas interacciones también pueden aparecer entre elementos esenciales y, en cualquier caso, dificultan el estudio de los efectos observados.

A diferencia de otros contaminantes que no existen en el medio de forma natural sino que han sido creados por el hombre con un determinado fin (p.ej. los pesticidas organoclorados), o que resultan de la degradación de estos otros como *by-products* o productos secundarios, los metales son elementos naturales, liberados al medio tras la alteración de sus ciclos (bio)geoquímicos, por causa tanto de la actividad humana como de procesos naturales (p.ej. las erupciones volcánicas o la erosión del suelo). La actividad minera (extracción y procesamiento de minerales), la combustión de carbón y petróleo, la incineración de residuos, y el uso agrícola de los fangos procedentes de las plantas de tratamiento de aguas residuales constituyen importantes fuentes de contaminación por metales, a las que hay que añadir el uso agrícola de determinados fertilizantes y pesticidas con una base metálica

(p.ej. arsenato de plomo), o en el caso de determinados metales como el Pb, usos específicos como la actividad cinegética con munición de este metal (Pattee & Pain 2003). Debido a que, en general, la vida media de los metales en el ecosistema es larga, los metales son clasificados como contaminantes persistentes. Además, el hecho de que su uso esté muy extendido en la fabricación de una gran cantidad de productos hace que la contaminación por metales se considere ubicua (Walker *et al.* 2001).

La principal ruta de exposición de la fauna a la contaminación por metales/metaloideos (de aquí en adelante metales), sobre todo en el medio terrestre, es la dieta que, en determinados casos, y normalmente vinculado a los hábitos tróficos o formas de alimentarse, puede ir acompañada de la ingestión accidental de suelo/sedimento y/o agua contaminada. En menor medida los metales se incorporan al organismo por inhalación. El grado de exposición depende de factores tales como la bioaccesibilidad y la biodisponibilidad (Fairbrother *et al.* 2007). A diferencia de otro tipo de contaminantes, los metales se bioacumulan pero no se biomagnifican a través de la cadena trófica, excepto ciertos compuestos organometálicos como el metil-mercurio, que puede biomagnificarse varios órdenes de magnitud dentro del medio acuático.

Una vez en el interior del organismo, la vida media de los metales varía en función del elemento y de la especie/taxón afectada. Por ejemplo, en mamíferos, la vida media del Cd es de entre 20 y 30 años mientras que la del As o el cromo (Cr) es sólo de algunas horas o días. Su toxicidad depende no sólo de la dosis y del tiempo de exposición, como ocurre en el caso de otros contaminantes, sino también de la forma (especie) química en que se encuentre y de su biodisponibilidad, además de la susceptibilidad/sensibilidad del individuo (o especie/taxón) expuesto, relacionada esta con una serie de factores (*host-factors*) tales como el tamaño, la edad, el sexo, el estado nutricional, la fase del ciclo vital o estatus (p.ej. reproductor o no reproductor) y sus características genéticas (p.ej. polimorfismos) (Burger *et al.* 2003, Peakall & Burger 2003). Así, se han detectado efectos adversos en individuos en desarrollo (p.ej. pollos) expuestos a niveles que resultan inocuos para los adultos de la misma especie y/o población (Gochfeld 1997, Burger *et al.* 2003, Scanes & McNabb 2003).

Efectos subletales

Los metales se han asociado tradicionalmente con una gran variedad de efectos adversos para la salud [EPA's Integrated Risk Information System (IRIS), Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR), World Health Organization's International Programme for Chemical Safety (WHO/IPCS)]. Algunos son conocidos mutagénicos, carcinogénicos, e incluso teratogénicos (Rojas *et al.* 1999), pero sus efectos también pueden ser neurológicos, cardiovasculares, hematológicos, gastrointestinales, musculoesqueléticos, inmunológicos, etc. (Berglund *et al.* 2000, Florea & Buesselberg 2006, Fairbrother *et al.* 2007). Esta diversidad en cuanto a toxicidad que, además, puede ser multi-orgánica (i.e. afectar a varios órganos o sistemas simultáneamente), es probablemente un reflejo de la variedad de mecanismos a través de los cuales los metales pueden ejercer estos efectos.

La bibliografía sobre los efectos adversos de los metales en la fauna silvestre es extensa, sobre todo para algunos elementos como el Pb o el Hg (p.ej. Scheuhammer 1987, Pattee & Pain 2003). Estos efectos abarcan desde la muerte del animal (efectos letales), generalmente asociada a una intoxicación aguda, hasta sutiles cambios bioquímicos, celulares, fisiológicos e incluso de comportamiento (efectos subletales). Los efectos subletales son mucho más frecuentes en la naturaleza y también más preocupantes por su repercusión en la viabilidad de las poblaciones silvestres (Scheuhammer 1987, Banks & Stark 1998), aunque faltan estudios detallados a este respecto. Suelen derivar de la exposición prolongada a niveles de contaminantes que se sitúan por debajo del umbral de toxicidad (niveles subletales). Aunque normalmente no conllevan la muerte del animal, sí son capaces de alterar su fisiología (y/o comportamiento), afectando a la salud del individuo y con ello a su eficacia biológica o *fitness* (i.e. reproducción y supervivencia).

Especial atención han recibido los efectos subletales que los contaminantes ejercen sobre la reproducción, tanto a corto como a medio y largo plazo (Fry 1995, Hose & Guillette 1995, Grasman *et al.* 1998, Spahn & Sherry 1999, Bustnes *et al.* 2003, 2007, Helberg *et al.* 2005, Evers *et al.* 2008). Sin embargo, son los efectos a largo plazo los que plantean mayores incógnitas, sobre

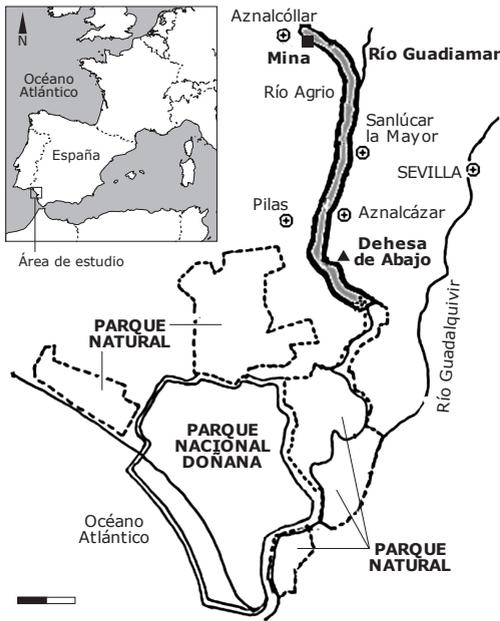


Figura 1. Mapa detallado del área de estudio. El área afectada por el vertido de la mina de Aznalcóllar en 1998 aparece señalada en gris.
Detailed map of the study area. The area affected by the Aznalcóllar mine spill in 1998 is shown in grey.

todo cuando la exposición a los contaminantes tiene lugar durante la fase de desarrollo, ya que pueden provocar efectos latentes no detectables hasta que los individuos afectados alcanzan la madurez reproductora (Colborn & Clement 1992, di Giulio & Tillit 1999, Fernie *et al.* 2001, 2003, Iwaniuk *et al.* 2006, Dickerson & Gore 2007, Quinn *et al.* 2008). Entender cómo afectan estos efectos subletales a la salud/dinámica de las poblaciones es de suma importancia para valorar el impacto de los contaminantes sobre el medio, y poder utilizarlos como señal de alerta temprana.

Biomarcadores

Una herramienta de uso extendido en el estudio de los efectos subletales son los llamados biomarcadores (Fox 1993, Fossi & Leonzio 1994). Se puede definir biomarcador como cualquier cambio o respuesta a nivel bioquímico, celular, fisiológico o de comportamiento susceptible de ser medido en un organismo vivo (respuesta biológica) que evidencie la exposición y/o efecto

tóxico de uno o más contaminantes (McCarthy & Shugart 1990, Fossi & Leonzio 1994, Peakall 1994). Estas respuestas pueden producirse a diferentes niveles de organización biológica o complejidad estructural, desde el genético o molecular, hasta el nivel de organismo. No obstante, hay autores que consideran también algunas respuestas a nivel de población, comunidad, e incluso de ecosistema como biomarcadores (p.ej. riqueza y diversidad de especies) (Peakall & Walker 1994, Clements 2000) (Figura 2).

A nivel de individuo, y junto con el análisis de residuos en tejidos biológicos, los biomarcadores proporcionan un sistema de evaluación integrado sobre la biodisponibilidad, bioacumulación y efectos de los contaminantes en la fauna silvestre (Depledge 1994, Fossi & Leonzio 1994, Peakall & Walker 1994). Además, la rapidez con que se producen algunas de estas respuestas (p.ej. las que tienen lugar a nivel bioquímico o molecular) permite utilizarlas como una señal de alerta temprana que puede anticipar efectos a largo plazo sobre la reproducción y la supervivencia (Peakall & Walker 1994, Vasseur & Cossu-Leguille 2006). Estos efectos son difíciles de evaluar en ausencia de seguimientos de campo prolongados que resultan muy costosos desde un punto de vista logístico y económico. Sin embargo, su impacto potencial sobre la eficacia biológica de los individuos puede tener consecuencias a nivel poblacional, e incluso a nivel de comunidad o ecosistema, de ahí la importancia del uso de los biomarcadores como señal de alerta temprana (Fox 1993, Depledge *et al.* 1995).

Otra de las ventajas del empleo de biomarcadores para evaluar el impacto de los contaminantes sobre los seres vivos es que muchos de ellos permiten utilizar técnicas de muestreo no destructivas (sangre, huevos, plumas, etc.) (Fossi & Leonzio 1994, Melancon 2003). Este aspecto resulta de especial interés cuando se trabaja con especies catalogadas como raras o amenazadas (Fossi *et al.* 1999), o en espacios protegidos o de interés desde el punto de vista de la conservación. Además de las consideraciones éticas, las técnicas no destructivas permiten obtener muestras del mismo individuo a lo largo del tiempo (medidas repetidas), y por tanto estudiar con precisión el efecto del tóxico a medio-largo plazo utilizando al animal como su propio control.

El uso de biomarcadores plantea, sin embargo, algunos inconvenientes, sobre todo cuando el

estudio se lleva a cabo fuera del laboratorio (Fossi 1994, Segner 2007). En condiciones naturales, el individuo se halla expuesto a multitud de factores de estrés o perturbaciones ambientales que pueden modificar su respuesta frente a la exposición al tóxico. Las condiciones meteorológicas, la disponibilidad de alimento, la presencia de predadores o competidores y varios factores bióticos relacionados con el propio individuo (*host factors*: tamaño, edad, sexo, condición física o estado reproductor; entre otros) pueden influir en la respuesta (Handy *et al.* 2003, Burger *et al.* 2007, Segner 2007). A efectos prácticos, estas limitaciones pueden ser evitadas o atenuadas utilizando un diseño experimental adecuado

que tenga en cuenta estos y otros factores en el análisis e interpretación de los resultados (Depledge 2009).

Por lo general, una adecuada evaluación de la exposición y efectos de los contaminantes ambientales requiere de la utilización de un conjunto o batería de biomarcadores, cuyas respuestas constituyen evidencias en las que apoyar dicha evaluación o valoración (Rowe *et al.* 2001, Hagger *et al.* 2006). La selección de los biomarcadores a estudiar y las pruebas diagnósticas (tests) empleadas dependerá en gran medida de la naturaleza del problema a tratar y de posibles condicionamientos locales (p.ej. limitaciones de tipo logístico, características del hábitat, etc.). El objetivo último de esta aproximación basada en el peso de las evidencias (en inglés, *weight of evidence approach*), o conjunto de biomarcadores, es demostrar o proporcionar evidencias claras de que los organismos objeto de estudio han estado expuestos a una o varias sustancias tóxicas y/o que esa exposición está relacionada con el deterioro de su salud, pudiendo afectar a su crecimiento, éxito reproductor y supervivencia, parámetros cruciales desde un punto de vista ecológico.

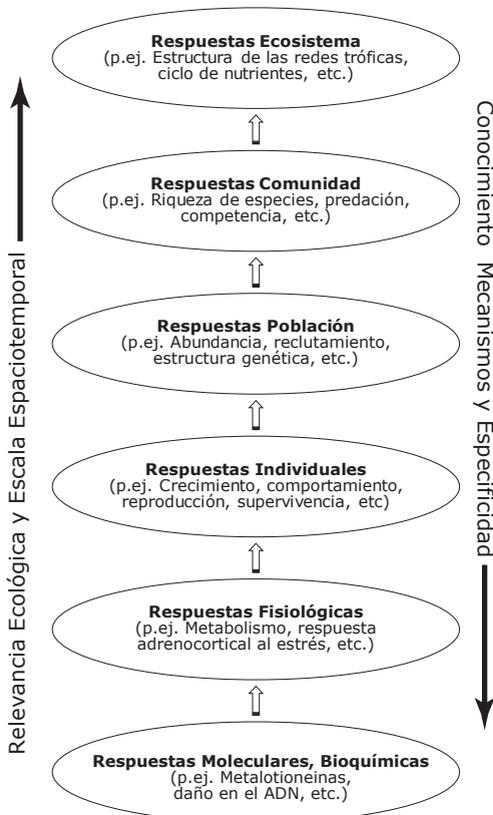


Figura 2. Relación entre la relevancia ecológica, la escala espaciotemporal, el conocimiento de los mecanismos y la especificidad a través de los niveles de organización biológica. Modificado a partir de Clements (2000).

Relationship between ecological relevance, the spatiotemporal scale, mechanistic understanding, and specificity across levels of biological organization. Modified from Clements (2000).

Las aves como bioindicadores ambientales

La necesidad de identificar especies y poblaciones susceptibles de ser utilizadas como bioindicadores ambientales o "centinelas" surge ante la imposibilidad de llevar a cabo un amplio estudio de biomarcadores sobre todos y cada uno de los componentes de un ecosistema. La función de estas especies/poblaciones es la de alertar de los posibles riesgos que la exposición a los contaminantes podría suponer tanto para la salud humana como para la del resto de seres vivos del ecosistema (LeBlanc 1995, Stahl 1997, Sheffield *et al.* 1998, Fox 2001) (a pesar de las limitaciones relacionadas con la extrapolación de efectos entre especies, entre localidades, etc., ver Frame & Dickerson 2006). Para que una especie pueda ser considerada como centinela es necesario que cumpla una serie de requisitos relacionados, entre otros, con su sensibilidad al tóxico, distribución geográfica, estatus migratorio, nivel trófico o grado de amenaza (este último relacionado con el tipo de muestreo que requiera

el biomarcador objeto de estudio: destructivo o no, invasivo o no, etc.) (Becker 2003). Estos requisitos varían según la naturaleza del problema a tratar y del área de estudio, pero son muchas las especies de aves que los reúnen con facilidad (para más detalles, ver Baos & Blas 2008 y referencias allí citadas) y por ello han sido utilizadas como indicadores de la salud de los ecosistemas o bioindicadores (Furness 1993, Kushlan 1993).

El uso de las aves como especies centinelas no es reciente. Por ejemplo, los canarios *Serinus canaria* fueron utilizados durante siglos en las minas de carbón para detectar las fugas de gases procedentes de las excavaciones (Burrell & Seibert 1916, Schwabe 1984). Durante los años sesenta y setenta del pasado siglo, las aves recibieron especial atención como centinelas de los efectos ocasionados por contaminantes persistentes como los compuestos organoclorados (DDTs, PCBs, etc.), tras descubrirse que la exposición a este tipo de sustancias provocaba el adelgazamiento de la cáscara de los huevos (Hickey & Anderson 1968, Ratcliffe 1970), y que este efecto era una de las principales causas de los grandes declives de población que sufrieron rapaces como el pigargo americano *Haliaeetus leucocephalus* o el halcón peregrino *Falco peregrinus* en EEUU, Canadá o Reino Unido, así como varias especies de gaviotas, cormoranes, charranes o pelícanos en la zona de los Grandes Lagos de Norteamérica (Grasman *et al.* 1998). Desde entonces, una gran variedad de especies de aves han sido utilizadas como centinelas o bioindicadores de contaminación ambiental (p.ej. Romijn *et al.* 1995, McCarty 2002, Mallory *et al.* 2010, Verreault *et al.* 2010). Además, en comparación con otros vertebrados, las aves son organismos conspicuos, relativamente fáciles de observar. Su biología, comportamiento y ecología están bastante bien descritos, lo que potencia su utilidad como bioindicadores reduciendo el riesgo de interpretaciones erróneas.

El caso del vertido tóxico de Aznalcóllar

El vertido de la mina de pirita de Aznalcóllar (Sevilla), propiedad de la empresa sueco-canadiense Boliden-Apirsa S.L., se produjo en la madrugada del 25 de abril de 1998, cuando en el muro de la balsa de residuos tóxicos procedentes de la

flotación de este mineral de hierro se abrió una brecha de 50 m de altura y 14 m de profundidad. Tras la rotura del muro, seis millones de metros cúbicos de lodos y aguas ácidas con una alta concentración de metales pesados provocaron una excepcional riada, desbordando los ríos Agrio y Guadiamar a lo largo de 63 km de cauce y afectando una superficie de 4.634 ha (Grimalt *et al.* 1999). La riada alcanzó más de 3 m de altura en algunos puntos, llegando casi hasta el límite del Parque Nacional de Doñana (Figura 1). La magnitud del vertido y el hecho de que se produjera en una zona tan importante para la conservación del patrimonio natural como el entorno de este Parque Nacional lo convirtieron en el desastre medioambiental más importante ocurrido en España hasta esa fecha y uno de los más graves acaecidos en Europa (Pain *et al.* 1998, Grimalt & Macpherson 1999, del Valls & Blasco 2005).

La composición química del vertido era mayoritariamente de metales pesados, con la presencia de casi un tercio de los elementos químicos conocidos. Las cantidades estimadas en los lodos tóxicos para algunos de los elementos vertidos fueron del orden de las 16,000 toneladas de Zn y Pb, 10,000 toneladas de As, 4,000 toneladas de Cu, 1,000 toneladas de antimonio (Sb), 120 toneladas de cobalto (Co), 100 toneladas de talio (Tl) y bismuto (Bi), 50 toneladas de Cd y plata (Ag), 30 toneladas de Hg, y 20 toneladas de Se y otros metales. Entre un 5 y un 15% de estos elementos se infiltraron en el suelo, y los procesos de oxidación aumentaron su movilidad y biodisponibilidad para las cadenas tróficas (Grimalt *et al.* 1999). Aunque las tareas de limpieza se iniciaron sólo ocho días después de que ocurriera el vertido, dándose finalmente por concluidas en el año 2000, los estudios llevados a cabo en los meses siguientes al accidente mostraron que los metales habían entrado en las cadenas tróficas de Doñana (Grimalt & Macpherson 1999), llegando a sus eslabones más altos representados por algunas especies de aves como la cigüeña blanca *Ciconia ciconia* o el milano negro *Milvus migrans* (Benito *et al.* 1999, Hernández *et al.* 1999). Por ello, y por la importancia de la conservación de la avifauna en Doñana, se consideró pertinente la elección de las aves como modelo de estudio. En concreto, fueron las dos especies anteriormente mencionadas, milano negro y cigüeña blanca, las que se escogieron como bioindicadores

ambientales de los efectos del vertido tóxico de Aznalcóllar, ya que, además de haberse comprobado en ellas la acumulación de importantes cantidades de metales inmediatamente después del vertido (Benito *et al.* 1999, Hernández *et al.* 1999), cumplían una serie de requisitos. Por un lado, ambas son especies de vida larga, lo que permite examinar los efectos subletales de los contaminantes a corto, medio y largo plazo. En segundo lugar, las dos especies se sitúan en los eslabones más altos de las cadenas tróficas de las marismas del Guadalquivir, alimentándose de fauna vertebrada e invertebrada, tanto acuática como terrestre. Tercero, aunque se trata de especies migradoras, nacen y se desarrollan durante los primeros estadios de su vida en Doñana, por lo que es muy probable que la exposición a metales y los posibles efectos relacionados con ella durante su permanencia en el nido tengan su origen en el vertido (Meharg *et al.* 2002). Esto permite, además, evaluar los posibles efectos a largo plazo de la exposición temprana (durante la ontogenia) a contaminantes. Por último, en el caso de la cigüeña blanca, el núcleo reproductor de la Dehesa de Abajo (DdA) (Puebla del Río, Sevilla) está situado a pocos kilómetros de la zona directamente afectada por el vertido, y había sido objeto de un seguimiento científico pormenorizado desde su formación a comienzos de los años ochenta. Este hecho permite llevar a cabo comparaciones longitudinales, y con ello entender las posibles repercusiones de la contaminación ocasionada por el vertido a medio y largo plazo.

En este artículo, se hace una revisión de los estudios llevados a cabo para evaluar los efectos del vertido tóxico de la mina de Aznalcóllar en las aves de Doñana y su entorno, tanto a corto, como a medio y largo plazo. En dichos estudios investigamos la exposición (determinación de residuos en sangre) y potenciales efectos biológicos ocasionados por cinco metales, dos de ellos esenciales, Cu y Zn, y tres no esenciales, Pb, Cd y As en la cigüeña blanca y el milano negro (especies centinelas), centrándonos en sus pollos por representar estos, dentro del ciclo vital de las aves, el estadio más vulnerable a los efectos de los contaminantes (Gochfeld 1997, Peakall & Burger 2003, Scanes & McNabb 2003). Estos cinco metales, además de ser los más abundantes en el vertido (Grimalt *et al.* 1999), son los que se detectaron mayoritariamente en las cadenas

tróficas de Doñana en los estudios de exposición a corto plazo realizados dentro del programa de seguimiento de seres vivos establecido a los pocos días del accidente (Grimalt & Macpherson 1999). Para evaluar el estado de salud general de las aves y los posibles efectos de los metales a corto y medio plazo se emplearon una serie de biomarcadores a nivel molecular, celular, bioquímico y fisiológico. El daño en el ADN (ensayo del cometa), la respuesta inmune celular (CMI-PHA *skin test*), la respuesta adrenocortical al estrés (niveles de corticosterona plasmática), los niveles de hormonas tiroideas (T3 y T4), y varias medidas relacionadas con el metabolismo óseo [niveles plasmáticos de calcio (Ca), fósforo (P) y de la enzima fosfatasa alcalina ósea o BALP por sus siglas en inglés, *Bone Alkaline Phosphatase*] constituyen la batería de biomarcadores utilizados para tal fin.

Por último, se evalúan también los posibles efectos a largo plazo de la exposición al vertido durante el desarrollo sobre la reproducción de la cigüeña blanca; el marcaje de los pollos de cigüeña en el núcleo reproductor de la DdA permitió un seguimiento detallado en el tiempo. Así, el estudio continuado del éxito reproductor después del accidente minero, unido al hecho de que se estuviera realizando un seguimiento de esta población antes de la catástrofe, ofreció la oportunidad de examinar a largo plazo, y en condiciones naturales, los efectos de la exposición a contaminantes durante el desarrollo sobre la eficacia biológica de los individuos afectados.

Niveles de metales y biomarcadores

Los niveles de metales en sangre de cigüeñas y milanos entre 1998 y 2003 (período de estudio para el análisis de residuos) se encontraron en la mayoría de los casos por debajo de los umbrales de toxicidad citados en la literatura como susceptibles de causar efectos subletales (Franson 1996). Comparando esos niveles con los de individuos de las mismas u otras especies muestreadas en zonas afectadas por este tipo de contaminación, los pollos muestreados en Doñana mostraron concentraciones por lo general más bajas (Baos *et al.* 2006a, 2006b, 2006c y referencias allí citadas). Además, para aquellos metales para los que se pudo estudiar su

evolución en el tiempo (ver Baos *et al.* 2006a), la tendencia general fue a la disminución en sus niveles desde que ocurriera el vertido, con alguna excepción, como el caso del Cd en el milano negro (Baos *et al.* 2006b).

Daño en el ADN

Los biomarcadores a nivel molecular constituyen una de las primeras respuestas del organismo frente a la exposición a contaminantes (Delpedre *et al.* 1995). Entre ellos, el daño en el ADN destaca por su creciente relevancia en el estudio del estrés ambiental, tanto en el medio acuático como en el terrestre (Anderson *et al.* 1994, Mitchelmore & Chipman 1998, Shugart 2000, Bonisoli-Alquati *et al.* 2010). La genotoxicidad de los contaminantes ambientales, entre los que se incluyen algunos metales (Kakkar & Jaffery 2005, García-Lestón *et al.* 2010), incluye efectos mutagénicos, carcinogénicos y teratogénicos que pueden tener consecuencias a medio-largo plazo sobre la eficacia biológica de los individuos (Anderson & Wild 1994, Ellegren *et al.* 1997), de ahí su importancia para la dinámica de las poblaciones y su interés para la biología de la conservación.

En nuestro caso, la técnica empleada para estimar el daño genotóxico fue el denominado ensayo del cometa (Pastor *et al.* 2001). Esta técnica se ha demostrado extremadamente sensible y útil en el área de la ecotoxicología genética y el seguimiento medioambiental (Cotelle & Féraud 1999). Su versión alcalina, introducida por Singh *et al.* (1988), permite la evaluación de distintos tipos de daño en el ADN de células individuales. Además, muestra claras relaciones dosis-respuesta incluso a concentraciones relativamente bajas de sustancias consideradas como genotóxicas (Mitchelmore & Chipman 1998).

Estudios previos llevados a cabo en aves de Doñana tras el vertido tóxico de Aznalcóllar habían detectado niveles elevados de daño genotóxico en comparación con los de con-específicos muestreados en zonas de referencia (Pastor *et al.* 2001), habiéndose además incrementado con el paso del tiempo (Pastor *et al.* 2004). Aunque el origen de este daño podría ser diverso, la naturaleza genotóxica, mutagénica e incluso carcinogénica de algunos de los metales vertidos en el accidente minero, apuntaba a estos contaminantes como la causa más pro-

bable. Para testar esta hipótesis, medimos las concentraciones en sangre de Pb, Zn, As, Cu y Cd en pollos de cigüeña blanca y milano negro muestreados en la DdA y el Espacio Natural Doñana, respectivamente, a lo largo de 4 años (1999–2002), y estudiamos su posible relación con el daño en el ADN previamente estimado en ambas especies mediante el ensayo del cometa (ver detalles en Baos *et al.* 2006b).

Se observaron variaciones en las respuestas entre especies y entre años dentro de especies (Baos *et al.* 2006b). Algunos elementos no mostraron ningún tipo de relación con el daño en el ADN (p.ej. Pb), mientras que para otros elementos, como el As (cigüeñas), el Cu y el Cd (milanos) se encontraron efectos significativos en algunos de los años de estudio, pero no en otros (Baos *et al.* 2006b). La condición física de los pollos (milanos) modificó el efecto genotóxico de algunos metales, como el Cd, siendo los individuos más débiles los que acusaron en mayor medida el daño en el ADN asociado a este metal.

Estos resultados sugieren que los pollos de ambas especies se vieron afectados en parte por los metales estudiados, pero estos, por sí solos, no explicarían completamente el daño observado en el ADN. De hecho, mientras los niveles de metales disminuyeron con el tiempo (Baos *et al.* 2006b), el daño en el ADN aumentó (Pastor *et al.* 2004). La presencia de otros contaminantes (pesticidas organoclorados, PCBs, etc.) y/o agentes genotóxicos en el medio (p.ej. microcistinas producidas por el crecimiento masivo o *blooms* de cianobacterias), junto con la existencia de otros factores ambientales o ecológicos variables entre años o períodos reproductores (p.ej. disponibilidad de alimento, factores densodependientes, etc.) podrían haber afectado o modulado la posible relación, impidiendo identificar inequívocamente la exposición al vertido como origen del daño observado (Baos *et al.* 2006b).

Respuesta inmune celular

El sistema inmune es una pieza clave en el estudio de los efectos de los contaminantes sobre los organismos vivos y de su posible impacto sobre niveles superiores de organización biológica (Melancon 2003, Eeva *et al.* 2005, Letcher *et al.* 2010). Numerosos trabajos publicados en las últimas décadas destacan el papel de distintos

parámetros inmunológicos como biomarcadores o indicadores del estado de salud de los individuos, así como su sensibilidad frente a la exposición a tóxicos en comparación con otras medidas o indicadores de salud (Grasman 2002, Galloway & Handy 2003, Fairbrother *et al.* 2004). Algunos de los efectos adversos de los contaminantes sobre el sistema inmune aparecen a concentraciones mucho más bajas de las necesarias para apreciar signos manifiestos de toxicidad en el organismo (Wong *et al.* 1992), y pueden persistir tiempo después de que otras respuestas hayan desaparecido. Por ello, las pruebas de función inmune constituyen indicadores sensibles, de alerta temprana y a largo plazo de efectos subletales sobre la salud de los individuos y las poblaciones. Una de las más utilizadas (*in vivo*) por su sencillez y facilidad de aplicación en campo, es el denominado test de la fitohemaglutinina (*PHA skin test*). Este test estima la respuesta inmune celular mediada por linfocitos T tras la inoculación de un agente mitógeno de origen vegetal (fitohemaglutinina) (Smits *et al.* 1999). En nuestro caso, la respuesta inmune celular y su posible relación con el vertido se estudió en pollos de cigüeña blanca a lo largo de cuatro años de muestreo (1999, 2001–2003) y de milano negro en 1999 (Baos *et al.* 2006a). De los metales analizados, sólo el Cu mostró un efecto negativo en la respuesta inmune celular en ambas especies, aunque la relación sólo resultó significativa para las cigüeñas en 2002. Como elemento esencial, el Cu se halla presente en todos los organismos vivos, desempeñando un papel fundamental en muchas funciones fisiológicas, incluyendo la función inmune (Beisel 1982), pero también puede ser tóxico (Mason 1979). En mamíferos, el exceso de este elemento afecta al sistema inmune (Pocino *et al.* 1991), sin embargo, efectos similares no se habían detectado hasta la fecha en aves.

No encontramos evidencias de que la exposición al Pb, Zn, As, y Cd tuviera efecto alguno sobre la respuesta inmune celular de los pollos de ambas especies (Baos *et al.* 2006a). En Baos *et al.* (2006a) se discute ampliamente cuáles podrían ser los motivos para la ausencia de tales efectos, entre los que se incluye la posible naturaleza dosis-dependiente y/o tiempo-dependiente de esta respuesta (Redig *et al.* 1991, Fair & Myers 2002), o la interacción entre los contaminantes presentes en el vertido (metales u otros) y otro

tipo de contaminantes relacionados con la actividad agrícola de la zona (p.ej. pesticidas).

La consistencia en las respuestas (p.ej. a lo largo del tiempo) es un aspecto/criterio importante para aproximarse al origen o causa última de un determinado efecto (Fox 1991). Sin embargo, en el campo no es frecuente que el estudio de la relación entre el efecto o respuesta biológica (biomarcador) y la exposición a los contaminantes (a nivel individual o poblacional) supuestamente relacionados con ella se prolongue en el tiempo más allá de un año o estación reproductora. Tanto en el caso de la respuesta inmune como en el del daño en el ADN, la repetición en el tiempo de los estudios realizados permitió valorar en profundidad el posible papel del vertido como origen de estos efectos. Los resultados de ambos biomarcadores apoyarían el hecho de que las conclusiones basadas en un solo año de estudio, aunque valiosas de cara a establecer una alerta temprana y, en consecuencia, promover investigaciones más detalladas en la misma línea, deben también ser acogidas con cautela (Gordo & Avilés 2017), sobre todo en lo que se refiere a la toma de decisiones encaminadas a la gestión del medio y de las poblaciones que lo habitan.

Metabolismo óseo

Otro claro ejemplo de la importancia de realizar estudios a lo largo de varios años lo encontramos en el caso del que quizá sea el más conspicuo de los efectos detectados en las aves de Doñana tras el vertido tóxico de Aznalcóllar: las deformaciones en pollos de cigüeña blanca, y las investigaciones sobre el metabolismo óseo realizadas a raíz de su aparición (Smits *et al.* 2005, 2007, Baos 2016).

Los primeros pollos de cigüeña blanca con deformaciones en picos y patas (Figura 3) aparecieron durante los años inmediatamente posteriores al accidente minero (a partir de 1999) en el núcleo reproductor de la DdA, localizado a pocos kilómetros de la zona afectada por la riada tóxica. Rápidamente se pusieron en marcha varios estudios para determinar el origen de estas deformaciones y su posible relación con la exposición a los metales vertidos. Es necesario destacar que el seguimiento estandarizado de los parámetros reproductivos de las cigüeñas en la DdA se venía realizando desde que aparecie-

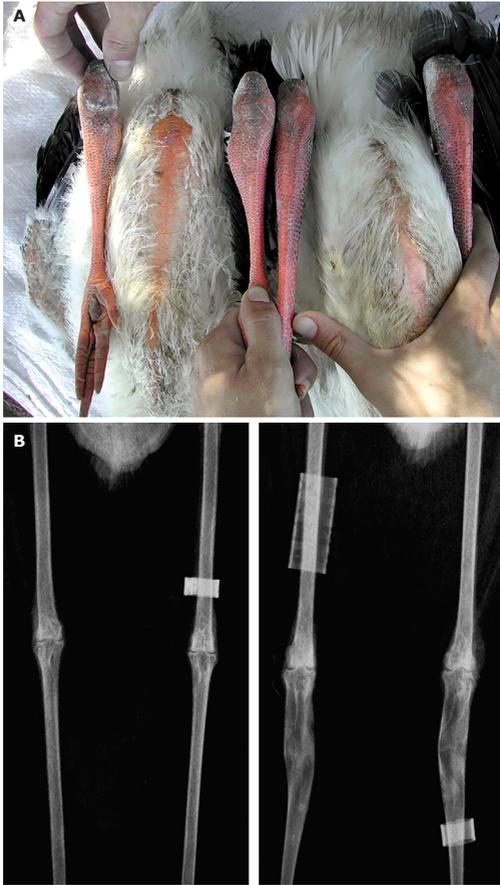


Figura 3. (A) Comparación de tarsometatarsos de pollos de cigüeña normales (derecha) y deformes (izquierda). (B) Radiografías de una cigüeña con patas normales procedente de una zona alejada (izquierda) comparada con una cigüeña de la Dehesa de Abajo (derecha) con tarsometatarsos típicamente deformados. Modificado a partir de Smits *et al.* (2007).

(A) Comparison of tarsometatarsi of nestling storks: normal (right) and deformed (left). (B) X-rays of a stork with normal legs from a distant area (left) compared with a fledgling stork from Dehesa de Abajo (right) with typically deformed tarsometatarsi. Modified from Smits *et al.* (2007).

ron los primeros nidos a principios de los años ochenta, y que nunca antes se habían detectado este tipo de deformaciones o anomalías en el crecimiento de los pollos (Baos 2016).

Las deformaciones o malformaciones morfológicas han sido descritas con anterioridad en aves expuestas a contaminantes ambientales (Hoffman *et al.* 1988, Gilbertson *et al.* 1991, Bowerman 1994). Aunque los mecanismos a través de los cuales se producen estas deforma-

ciones suelen ser bastante complejos, ciertos parámetros bioquímicos como la enzima fosfatasa alcalina, cuya isoforma ósea está directamente asociada con el crecimiento del hueso (Tilgar *et al.* 2004), o los niveles relativos (proporción o razón, *ratio*) de dos minerales: Ca y P, desempeñan un papel destacado en el metabolismo óseo (Fowler 1986). Un desequilibrio en los niveles de cualquiera de estos parámetros, que a su vez interaccionan con vitaminas y hormonas (p.ej. vitamina D o la hormona paratiroidea), puede dar lugar a anomalías esqueléticas, especialmente en individuos en desarrollo.

En una investigación previa con juveniles de esta especie procedentes de la DdA que presentaban deformaciones en sus picos y extremidades inferiores, Smits *et al.* (2005) encontraron que el conjunto de metales (incluyendo Pb, Zn, Sr, Sn, As, Cu, Cr, V, Ti y Al) contenidos en hueso estaba relacionado en cierto grado con los cambios histopatológicos detectados en el tarsometatarso (TMT) de las cigüeñas, el hueso más afectado por estas deformaciones (Figura 3). Además de las diferencias observadas al microscopio (ver Smits *et al.* 2005), estos individuos presentaban una mayor asimetría en sus patas, y los niveles plasmáticos de la enzima fosfatasa alcalina ósea (BALP) eran más bajos que los de las cigüeñas de la misma edad que no presentaban deformaciones. La relación entre las deformaciones y la contaminación por metales resultó compleja, y aunque no fue posible establecer una relación directa con ningún elemento en particular, parecía claro que la carga contaminante estaba afectando en cierto grado al desarrollo óseo de estas aves (Smits *et al.* 2005). No obstante, en este mismo trabajo también se apuntaba la existencia de otros factores desconocidos que estarían exacerbando los costes fisiológicos de la exposición al vertido, y la necesidad de profundizar en su estudio para intentar determinar la causa última de estas deformaciones y los potenciales mecanismos implicados.

Con este objetivo, Smits *et al.* (2007) investigaron a lo largo de varios años (2001–2003) posibles anomalías fisiológicas que pudieran explicar el anormal desarrollo esquelético de estas cigüeñas. En este nuevo trabajo, esta vez con individuos muestreados en nido (pollos), sólo se consideraron las cigüeñas con deformaciones en las patas (siendo nuevamente el TMT el hueso consistentemente más afectado). Para poder

establecer desviaciones respecto a los niveles normales de los parámetros bioquímicos objeto de estudio (Ca, P, Ca:P, BALP) se seleccionó como referencia el núcleo reproductor de esta especie asentado en Matasgordas, dentro del Parque Nacional de Doñana y lejos de la zona afectada por el vertido (Smits *et al.* 2007).

A lo largo de los dos primeros años de estudio (2001–2002), se observó cómo los pollos con patas deformes presentaron niveles de P en plasma más bajos y tasas Ca:P más elevadas que los pollos no deformes (ver Figura 4 para el año 2001). En 2003, con un mayor número de individuos muestreados, sobre todo de edades inferiores a las de los estudiados en años anteriores, se hizo evidente que los pollos de la DdA, independientemente de que presentaran o no deformaciones, tenían los niveles de P alterados, y que la edad jugaba un papel importante en esa alteración (Smits *et al.* 2007). Así, mientras en los pollos de la DdA los niveles de P disminuían con la edad, en los pollos de Matasgordas (referencia) este mineral se incrementaba ligeramente (Figura 5). Y lo que es más importante, mientras que los pollos de Matasgordas mostraban unos niveles de

P sin variaciones significativas y estrechamente regulados a lo largo del período de estancia en el nido (coeficiente de variación, CV = 19%), el coeficiente de variación para este elemento en la zona afectada alcanzaba el 60%, con niveles que superaban hasta cinco veces los de la zona de referencia, Matasgordas (Smits *et al.* 2007, Figura 5). Es decir, las cigüeñas de la DdA eran incapaces de controlar los niveles de P y las tasas Ca:P dentro de los estrechos límites necesarios para un normal desarrollo óseo. Por otro lado, este rango tan amplio en los niveles de P plasmático indicaba que una dieta deficitaria en este mineral no era la explicación más plausible para el desequilibrio encontrado.

En cuanto a la BALP, en condiciones normales lo esperable es que los niveles de esta enzima se incrementen a lo largo del proceso de crecimiento y remodelación ósea del esqueleto que tiene lugar durante el período de estancia en el nido (Tilgar *et al.* 2004). En las cigüeñas de la DdA, los niveles de BALP variaron con la edad y con la presencia de deformaciones: en los pollos de menor edad, los niveles de esta enzima fueron inferiores en aves deformes, mientras que en los

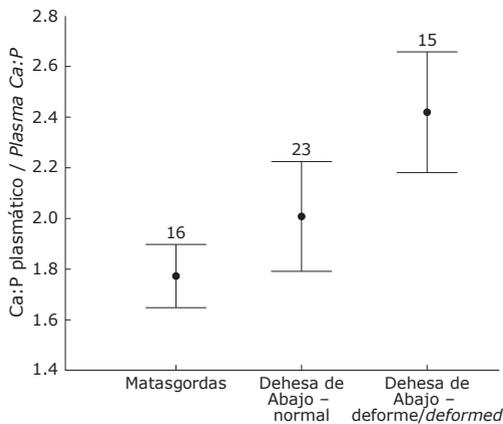


Figura 4. Comparación de las tasas Ca:P plasmático en 2001 entre pollos de cigüeña no deformes de Matasgordas y pollos tanto no deformes como deformes procedentes del núcleo reproductor de la Dehesa de Abajo afectado por el vertido. Se indica el tamaño de muestra en cada caso. Modificado a partir de Smits *et al.* (2007).

*Comparison of plasma Ca:P ratios in 2001 in normal nestling storks from the reference population in Matasgordas, and both normal and deformed nestlings from the Dehesa de Abajo population affected by the spill. The sample size is shown. Modified from Smits *et al.* (2007).*

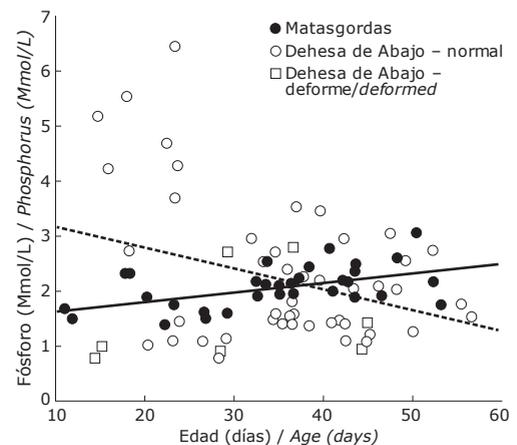


Figura 5. En 2003, las grandes diferencias en los niveles de fósforo plasmático entre los pollos de cigüeña de Matasgordas y de la Dehesa de Abajo son especialmente evidentes en las aves menores de 30 días de edad. Los pollos deformes tienen más probabilidades de tener niveles muy bajos de fósforo. Modificado a partir de Smits *et al.* (2007).

*In 2003, the very different plasma phosphorus levels in stork nestlings from Matasgordas and Dehesa de Abajo are especially evident in birds under 30 days old. Deformed nestlings are more likely to have very low phosphorus levels. Modified from Smits *et al.* (2007).*

pollos de mayor edad (próximos a volar del nido), los niveles de BALP fueron más elevados en los individuos con deformaciones (Figura 6). Estas diferencias podrían estar relacionadas con el proceso de mineralización y remodelación ósea, más retrasado en el caso de los pollos deformes (Smits *et al.* 2007).

Debido a la complejidad subyacente a la homeostasis de Ca y P, dependiente del correcto funcionamiento e interacción entre diversos tejidos y órganos (intestino, hígado, riñón, glándula tiroidea y paratiroidea, hueso, etc.), es posible que cualquier alteración producida en ellos tuviera efectos adversos en el metabolismo óseo. Serían necesarios estudios específicos para poder determinar el papel de estos órganos en las anomalías detectadas. Por otro lado, aunque el problema de las deformaciones en las patas parece quedar resuelto para cuando estas aves abandonan el nido (Smits *et al.* 2007), se desconoce el impacto que estos problemas fisiológicos y esqueléticos podrían tener sobre su capacidad reproductiva y su supervivencia, especialmente durante la etapa juvenil, caracterizada por unas tasas de supervivencia normalmente bajas (Ringsby *et al.* 1998, Naef-Daenzer *et al.* 2001).

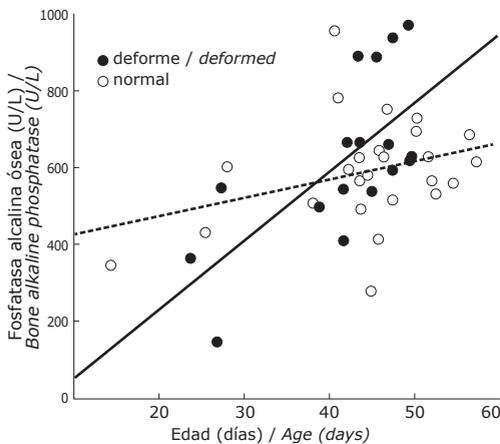


Figura 6. En 2002, considerando sólo las cigüeñas procedentes de la Dehesa de Abajo, los niveles de la fosfatasa alcalina ósea (U/L) difieren entre los pollos con patas deformes y no deformes; esta diferencia se ve afectada por la edad de las aves. Modificado a partir de Smits *et al.* (2007).

*In 2002, considering only the storks from Dehesa de Abajo, bone alkaline phosphatase (U/L) levels are different in nestlings with deformed and normal legs; this difference is affected by the age of the birds. Modified from Smits *et al.* (2007).*

El vertido minero es el problema toxicológico más obvio relacionado tanto temporal como espacialmente con las deformaciones observadas en las cigüeñas de la DdA. Sin embargo, parece claro, en función de los resultados aquí expuestos y de trabajos anteriores (Smits *et al.* 2005), que la relación entre este desastre ecológico y los problemas esqueléticos de los pollos de cigüeña es compleja, y que existen otros factores ambientales que podrían desempeñar un papel importante en la etiología de estas deformaciones. Las cigüeñas se alimentan en vertederos (Tortosa & Caballero 2002), y en el caso de la DdA también es probable que, en su búsqueda de alimento, se hallen expuestas a niveles moderadamente elevados de agroquímicos debido al uso de estos productos en los cultivos de arroz próximos al núcleo reproductor (< 3 km). Es posible que la exposición a una mezcla compleja de metales (vertido), añadida a una exposición crónica a niveles bajos de pesticidas, estimule diversos mecanismos de biotransformación y detoxificación que contribuirían a alterar los procesos de regulación del fósforo (Smits *et al.* 2007).

Sistema endocrino

Al igual que en el caso del sistema inmune, la respuesta endocrina frente a la exposición a contaminantes suele ser rápida, sensible a niveles bajos, y anticipar problemas de salud más significativos (Kendall *et al.* 1998). Aunque la mayor parte de los estudios sobre disrupción o modulación endocrina en fauna silvestre se han centrado en aspectos relacionados con la reproducción (eje endocrino Hipotálamo-Pituitaria-Gónadas, HPG), los contaminantes ambientales pueden afectar, y de hecho hacerlo más frecuentemente, a otros ejes no relacionados directamente con los esteroides gonadales (ver p.ej. Guillette 2006, Baos & Blas 2008 y referencias allí citadas). El eje endocrino Hipotálamo-Pituitaria-Glándulas adrenales (HPA) regula e integra muchos de los cambios fisiológicos que se producen en respuesta al estrés ambiental (Wingfield & Kitaysky 2002). La exposición a una perturbación (química o de otra naturaleza) da lugar a la secreción de glucocorticoides desde las glándulas adrenales (principalmente corticosterona en el caso de las aves) que pueden alterar la fisiología del organismo, afectando al

metabolismo intermediario, al crecimiento, o a la función inmune (Sapolsky *et al.* 2000, Kitaysky *et al.* 2003).

Otro de los ejes endocrinos que puede verse afectado por la exposición a sustancias tóxicas es el eje Hipotálamo-Pituitaria-Glándula tiroidea (HPT). Las hormonas tiroideas [Tiroxina (T4) y Triyodotironina (T3)] desempeñan un papel muy importante en el metabolismo, con profundos efectos en el desarrollo de los organismos (tanto en la fase de diferenciación como en la de crecimiento) (McNabb 2000). De hecho, las alteraciones tanto de la función adrenal como de la tiroidea pueden tener graves consecuencias para los individuos en desarrollo, como por ejemplo, reducción del crecimiento, merma de las capacidades cognitivas o alteración de la función inmune (Vos *et al.* 2000, Schantz & Widholm 2001, Smits *et al.* 2002). A largo plazo estos efectos pueden impactar negativamente en el éxito reproductor y supervivencia de los organismos y, por tanto, en su eficacia biológica (McArthur *et al.* 1983, Blas *et al.* 2007).

Para este biomarcador, el estudio se llevó a cabo en pollos de cigüeña blanca nacidos en el área afectada por el vertido tóxico de Aznalcóllar (DdA) en el año 2000, comparándolos con los de una zona de referencia (Aldea del Cano, Cáceres) elegida por sus similares características al núcleo reproductor objeto de estudio pero situada a unos 230 km al norte de la DdA y, por tanto, no afectada por este episodio de contaminación (Baos *et al.* 2006c). Se utilizó un protocolo estandarizado de captura-manejo-restricción para determinar tanto los niveles basales de corticosterona plasmática (tras la captura) como la respuesta inducida al estrés (niveles máximos de esta hormona tras 45 minutos de aplicación del protocolo). También se midieron los niveles circulantes de T3 y T4, y se estudiaron las posibles relaciones entre estos parámetros y las concentraciones de Pb, Cu, Zn, Cd y As en sangre (ver detalles en Baos *et al.* 2006c).

No se encontraron efectos significativos de los metales en los niveles de corticosterona basal (Baos *et al.* 2006c), en cambio, la respuesta inducida al estrés estuvo positivamente relacionada con la concentración de Pb (Figura 7), tanto en la DdA como en la zona de referencia. Esta relación fue mucho más intensa para los pollos únicos que para los pollos de nidadas múltiples (Baos *et al.* 2006c, Figura 7), lo que

sugiere un mayor impacto de este metal en los individuos que habían experimentado adicionalmente otro tipo de estrés ambiental; se pudo comprobar que los pollos únicos procedían de nidos con reducción de pollada, probablemente como consecuencia de unas condiciones ambientales adversas, falta de cuidado parental, etc. Los metales no afectaron a los niveles de T3 y T4, aunque se encontraron diferencias significativas entre las dos zonas estudiadas (Baos *et al.* 2006c).

En trabajos previos llevados a cabo con paseriformes, tanto en campo como en laboratorio, no se había encontrado relación entre la exposición al Pb y la respuesta al estrés (Eeva *et al.* 2003, 2005, Snoeijs *et al.* 2005). No obstante, el parámetro analizado en esos estudios fue la corticosterona basal, para la que tampoco nosotros encontramos efecto alguno. Nuestros resultados indican que la utilización de un protocolo estandarizado de captura-manejo-restricción puede ser una aproximación más acertada para evaluar la respuesta al estrés que

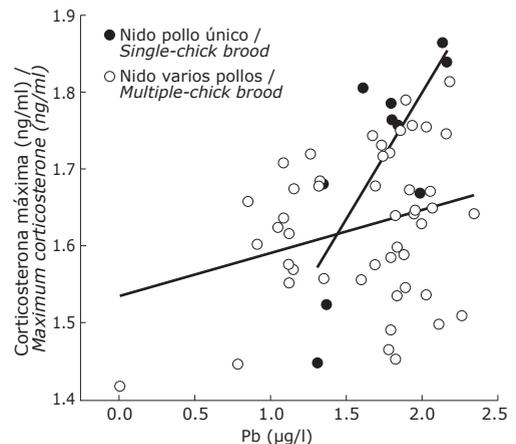


Figura 7. Relación entre los niveles de Pb en sangre y la respuesta inducida al estrés (i.e. concentración máxima de corticosterona) en pollos de cigüeña blanca en nidos con pollos únicos (n=10) y en nidadas múltiples (n=48) después de 45 minutos de manejo y restricción (procedentes de ambas zonas: Dehesa de Abajo y Cáceres). Modificado a partir de Baos *et al.* (2006c).

*Relationships between Pb levels in blood and the stress-induced response (i.e. maximum corticosterone concentration) in white stork nestlings from single chick broods (n=10) and multiple-chick broods (n=48) after 45 minutes of handling and restraint (from both areas: Dehesa de Abajo and Cáceres). Modified from Baos *et al.* (2006c).*

los niveles de corticosterona plasmática medidos de manera puntual y aislada tras la captura de los individuos (i.e. corticosterona basal); ésta es en sí misma una medida estática que no proporciona información acerca de la naturaleza dinámica del sistema (Norris 2000, Hinson & Raven 2006).

En mamíferos, estudios experimentales han mostrado que la exposición al Pb, tanto en la etapa adulta como durante el desarrollo, eleva los niveles de corticosterona basal (Der *et al.* 1977, Vyskocil *et al.* 1990, Cory-Slechta *et al.* 2004). Sin embargo, no se han encontrado efectos similares en relación a la respuesta inducida al estrés. Por ello, no podemos descartar que otros factores potencialmente correlacionados con el Pb (p.ej. la exposición a pesticidas) hayan contribuido en cierta medida al resultado encontrado en las cigüeñas. Serían necesarios estudios experimentales para poder establecer una relación causa-efecto.

En un estudio con ratas de laboratorio, Cory-Slechta *et al.* (2004) mostraron evidencias de la interacción entre la exposición al Pb y otros factores de estrés. Además, el hecho de que tanto el estrés como el Pb actúen sobre los sistemas dopaminérgicos mesocorticolímbicos del cerebro (Cory-Slechta *et al.* 1997, Barrot *et al.* 2000) proporciona una base biológica para dicha interacción. En este sentido, aunque deben ser interpretados con precaución debido al pequeño tamaño muestral, nuestros resultados apoyarían el argumento de que los contaminantes que actúan junto con otros factores de estrés ambiental podrían tener un mayor impacto en los individuos o en sus poblaciones que el que desencadenarían tanto los contaminantes como esos otros estresores ambientales de manera aislada (Baos *et al.* 2006c).

Aunque se cree que los aumentos puntuales/temporales en los niveles de corticosterona resultan beneficiosos para el individuo, ya que le permiten reorientar su comportamiento y fisiología hacia la búsqueda de alimento y supervivencia (potenciando la asimilación de energía durante el período de estrés), la activación crónica o de manera repetida de la respuesta al estrés puede tener efectos deletéreos, dando lugar a la interrupción del crecimiento, alteraciones en la reproducción e inmunosupresión (Wingfield & Kitaysky 2002). También la función cognitiva puede verse afectada por una elevación prolon-

gada de glucocorticosteroides (Kitaysky *et al.* 2003). Por todo ello, un HPA comprometido en su función por la exposición al Pb, aislada o conjuntamente con otros factores de estrés ambientales, podría tener importantes consecuencias en términos de alteraciones comportamentales y procesos metabólicos/fisiológicos necesarios para la supervivencia. De hecho, estudios posteriores encontraron una menor probabilidad de reclutamiento y supervivencia entre los pollos de cigüeña blanca con una mayor respuesta inducida al estrés (Blas *et al.* 2007). La medición de esta respuesta destaca, por tanto, como un biomarcador útil de la exposición y potenciales efectos adversos de los metales en la fauna silvestre.

Efectos de la exposición al vertido durante el desarrollo en la reproducción de la cigüeña blanca

La susceptibilidad de los organismos en desarrollo a diversos factores de estrés ambiental o la inducción temprana de los llamados efectos latentes son hechos ampliamente aceptados en la literatura científica (Bateson *et al.* 2004, Hotchkiss 2008), en la que también aumenta el reconocimiento de la importancia que tienen las condiciones vividas durante el desarrollo (p.ej. déficit de nutrientes) en la eficacia biológica de los individuos (Lindström 1999, Metcalfe & Monaghan 2001). Asimismo, estudios llevados a cabo en laboratorio sugieren que ciertas etapas del ciclo vital de los vertebrados, como el desarrollo, son especialmente vulnerables a la exposición y efectos de los contaminantes (Damstra *et al.* 2002, Gore 2008, Ottinger *et al.* 2008, Quinn *et al.* 2008). Aunque estos estudios (en condiciones controladas) son esenciales para poder establecer posibles relaciones causa-efecto, normalmente no reflejan la realidad ambiental de la exposición a mezclas complejas de productos químicos. Además, la diversidad de estrategias vitales y de estresores ambientales a los que los individuos tienen que enfrentarse en la naturaleza introduce la posibilidad de respuestas específicas a los contaminantes en condiciones de campo que podrían no ser evidentes en los experimentos controlados en laboratorio con especies modelo

(Sih *et al.* 2004, Rowe 2008). Se desconocen, por tanto, las consecuencias que podría tener la exposición a contaminantes durante esta etapa del ciclo vital sobre la eficacia biológica de los vertebrados en condiciones ambientales, especialmente en especies de larga vida, cuya complejidad estructural y funcional, además de sus largos tiempos de generación, contribuyen a que en ellas permanezcan bastante inexploradas. El vertido tóxico de Aznalcóllar y el seguimiento a largo plazo del núcleo reproductor de cigüeña blanca en la DdA, antes y después de que se produjera el accidente minero, proporcionaron un marco de trabajo para investigar en esta dirección. Así, nuestro objetivo al llevar a cabo este estudio fue, por un lado, evaluar el impacto a largo plazo de este desastre ambiental en la población de cigüeñas asentada en la DdA y, por otro, proporcionar lo que sería la primera evidencia en aves silvestres de larga vida de que la exposición a niveles bajos de contaminantes durante el desarrollo tiene efectos a largo plazo sobre la eficacia biológica de los individuos.

Para ello comparamos los cambios asociados a la edad en el éxito reproductor (tamaño de puesta y número de pollos que vuelan del nido) entre individuos que habían estado expuestos al vertido durante su desarrollo (nacidos en la DdA a partir de 1998) e individuos nacidos antes del accidente minero y, por tanto, no expuestos al vertido durante esta etapa de su ciclo vital. El seguimiento a largo plazo de este núcleo reproductor (control de nidos y anillamiento de los pollos) permitió conocer la identidad y determinar la edad de la mayor parte de los individuos reproductores en la DdA durante los siete años en los que se llevó a cabo el estudio (1999–2005), analizándose por separado machos y hembras (Baos *et al.* 2012). A diferencia de las aproximaciones clásicas, en las que se comparan los parámetros reproductores de individuos o poblaciones antes y después de un vertido o perturbación ambiental, en este estudio sólo consideramos el período posterior al accidente minero. De esta forma, todos los individuos se estarían reproduciendo bajo las mismas condiciones ambientales (ver detalles en Baos *et al.* 2012). Aun así, aspectos como la disponibilidad de alimento, meteorología (Jovani & Tella 2004), etc., podrían variar entre años (después del vertido) y afectar a la respuesta, por lo que también se consideró el año de reproducción, junto con la

identidad del individuo y el año de nacimiento como efectos aleatorios (Baos *et al.* 2012).

En aves de larga vida, es habitual que la productividad se incremente con la edad durante las primeras etapas del período reproductor (Forslund & Pärt 1995). En las cigüeñas, este patrón se observó en las hembras nacidas antes del vertido (no expuestas durante el desarrollo) (Figura 8). Sin embargo, las hembras nacidas después del vertido y, por tanto, expuestas a éste durante su desarrollo, mostraron un prematuro descenso en su éxito reproductor (número de pollos que vuelan del nido) con la edad (senescencia reproductiva), tras haber iniciado su etapa reproductiva con una mayor productividad que las hembras nacidas antes del vertido (Figura 8). No se encontró este mismo efecto en el caso de los machos (Baos *et al.* 2012).

Aunque algunos trabajos llevados a cabo después de que se produjeran vertidos de crudo habían encontrado efectos a corto plazo sobre la supervivencia y reproducción en vertebrados silvestres (Wikelski *et al.* 2002, Peterson *et al.* 2003, Velando *et al.* 2005, Zuberogoitia *et al.* 2006), ningún otro estudio previo había vinculado la

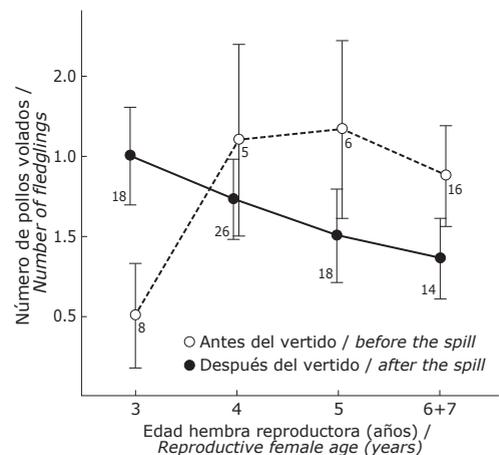


Figura 8. Número de pollos promedio que vuelan del nido en hembras de cigüeña nacidas antes (no expuestas durante el desarrollo) y después (expuestas durante el desarrollo) del vertido minero en función de la edad. Las barras representan el error estándar. Los números corresponden a los intentos reproductores. Modificado a partir de Baos *et al.* (2012). *Average number of fledglings raised by female storks hatched before (non-developmentally exposed) and after (developmentally exposed) the mine spill as a function of age. Bars represent the standard error. Numbers correspond to individual breeding attempts. Modified from Baos et al. (2012).*

exposición a un vertido durante las primeras etapas del desarrollo con efectos a largo plazo sobre la reproducción en aves. El seguimiento de individuos y poblaciones en el tiempo es imprescindible para poder detectar los impactos a largo plazo de accidentes o desastres ambientales, pero estos estudios son escasos, especialmente cuando la investigación requiere información previa a esos desastres, que no suele existir. En este caso, la combinación tanto de esa información previa, como del seguimiento individualizado posterior, permitió detectar que las hembras de cigüeña expuestas al vertido durante su desarrollo mostraban un patrón alterado de la reproducción dependiente de la edad en comparación con sus conespecíficas nacidas antes del vertido, con una productividad inusualmente elevada durante sus primeros episodios de reproducción seguida de una aparentemente prematura senescencia reproductiva.

La teoría evolutiva proporciona una posible explicación a este patrón al predecir que los individuos podrían incrementar su inversión reproductiva cuando el valor reproductivo residual es bajo (hipótesis de la inversión terminal; Clutton-Brock 1984, Hanssen 2006, Velando *et al.* 2006). En el caso de las cigüeñas, como se ha señalado anteriormente, los pollos expuestos al vertido de Aznalcóllar en la DdA sufrían diversos efectos subletales relacionados con la respuesta inmune (Baos *et al.* 2006a), la respuesta adrenocortical al estrés (Baos *et al.* 2006c), alteraciones en el metabolismo óseo (Smits *et al.* 2005, 2007), y daños en el ADN (Pastor *et al.* 2001, 2004, Baos *et al.* 2006b). Estos efectos subletales, que comprometen la salud de los individuos, podrían actuar como señales fisiológicas, alertando al organismo de una menor supervivencia y reproducción futuras, lo que disminuiría el valor reproductivo residual y, en consecuencia, llevaría a las cigüeñas a invertir comparativamente más recursos en su reproducción temprana. Esto explicaría tanto la elevada productividad inicial de las hembras expuestas al vertido durante su desarrollo como su prematura senescencia reproductiva, debido a la combinación de, por un lado, los efectos adversos de los contaminantes y, por otro, la mayor inversión en la reproducción temprana en detrimento de la reproducción futura (Harshman & Zera 2007, Reed *et al.* 2008), evidenciando con ello que la exposición a contaminantes ambien-

tales durante el desarrollo podría afectar a los compromisos (*trade-offs*) establecidos entre los distintos caracteres que definen las estrategias vitales seleccionadas por individuos/especies para maximizar su eficacia biológica de manera análoga a cómo lo hacen otros factores de estrés ambiental.

Aunque la naturaleza observacional de este estudio no nos permite identificar las bases biológicas que podrían estar detrás de este patrón alterado de la reproducción dependiente de la edad, estudios previos apuntan a varios mecanismos no excluyentes por los que los efectos subletales derivados de la exposición al vertido podrían afectar a la *fitness* reproductiva de las hembras de cigüeña y a su tasa de senescencia (ver detalles en Baos *et al.* 2012). Entre ellos se encuentra el estrés oxidativo causado por las denominadas especies reactivas de oxígeno (*Reactive Oxygen Species*, ROS), que según la teoría evolutiva desempeña un papel determinante en el proceso de senescencia (Monaghan *et al.* 2008). En estudios llevados a cabo con otras especies de aves se ha podido establecer una relación entre una mayor resistencia al estrés oxidativo y: i) un mayor número de eventos reproductivos, y ii) una senescencia retardada (Kim *et al.* 2009). Además, en algunos de ellos, al igual que en nuestro caso, se han registrado variaciones en este tipo de respuestas en función del sexo, siendo las hembras las que se muestran más afectadas (Bize *et al.* 2008). De hecho, son varios los estudios que han encontrado diferencias entre sexos en respuesta a distintos factores de estrés durante las primeras etapas de la vida, siendo las hembras las que parecen mostrarse más sensibles ante unas condiciones adversas durante el desarrollo que se traducen en efectos fenotípicos a más largo plazo (Spencer *et al.* 2010 y referencias allí citadas). Por otro lado, parece claro que las hembras son más vulnerables al daño ocasionado en las funciones neuronales por el Pb y otros factores de estrés (White *et al.* 2007). Dado el papel fundamental que desempeña el sistema endocrino en el control del neurodesarrollo, la fisiología y el comportamiento (Norris & Carr 2006, Wingfield & Mukai 2009), la disrupción endocrina podría también constituirse como un posible mecanismo subyacente a los efectos aquí descritos. De hecho, la senescencia reproductiva prematura se ha demostrado experimentalmente en hembras de roedores expuestas durante el

desarrollo a disruptores endocrinos (Dickerson & Gore 2007).

Este estudio se añade a la cada vez más numerosa literatura que sugiere que los vertidos tóxicos pueden afectar a la vida silvestre durante mucho más tiempo del que se creía hasta ahora (ver p.ej. Peterson *et al.* 2003) a través, por ejemplo, de los denominados efectos latentes (Depledge 1994), es decir, de efectos que no se observan inmediatamente después de la exposición, sino tiempo después, siendo por tanto más difícil establecer una relación causal entre ellos (Gordo & Avilés 2017). En este contexto, la exposición transitoria a un contaminante, especialmente en etapas del desarrollo cruciales para determinadas funciones cognitivas, reproductoras, etc., puede comprometer la salud y/o eficacia biológica de los individuos a largo plazo (p.ej. alterando la capacidad de los organismos para adaptarse o responder ante futuros retos ambientales), independientemente de que a corto-medio plazo no haya signos evidentes de esa merma en la capacidad funcional de los individuos (Colborn & Clement 1992, di Giulio & Tillit 1999, Iwaniuk *et al.* 2006). Por otro lado, el hecho de que sea necesario dejar transcurrir el tiempo para poder estudiar y detectar los posibles efectos (latentes) de esa exposición sobre la eficacia biológica de los individuos también puede, paradójicamente, afectar negativamente a la detección de esos efectos, ya que cuanto mayor sea ese tiempo, mayor es también la probabilidad de que dichos efectos se diluyan o queden enmascarados por el “ruido” ambiental (variabilidad natural de fondo, mortalidad selectiva, etc.), siendo por ello más difícil su detección (Peterson *et al.* 2003, Wiens *et al.* 2004). Esto, sumado a las dificultades logísticas y de financiación que conllevan este tipo de investigaciones (Gordo & Avilés 2017) ha supuesto un importante obstáculo para la evaluación a largo plazo de los posibles impactos causados por la contaminación ambiental sobre la eficacia biológica de los individuos y la dinámica de sus poblaciones, especialmente en condiciones naturales. Precisamente por esta razón, el uso de biomarcadores a corto y medio plazo se ha convertido en una herramienta alternativa útil para evaluar o valorar la salud de la vida silvestre en relación con la exposición a contaminantes, especialmente como señal de alerta temprana de potenciales efectos a más largo plazo (Depledge 1994).

Consideraciones finales y conclusiones

Aunque el interés o preocupación última por los cambios inducidos por estrés ambiental (contaminantes u otros) se centre en los niveles más altos de organización biológica (población/comunidad/ecosistema), estos niveles son demasiado complejos en su estructura y función para resultar útiles en el desarrollo de herramientas de alerta temprana que permitan evaluar los efectos de los contaminantes en los organismos vivos. La alternativa radica, por tanto, en la detección de las denominadas “señales de alerta” en los niveles inferiores de organización biológica; señales, ecológicamente relevantes, que más tarde puedan ser relacionadas con efectos a niveles más elevados (Moore *et al.* 2004). Estas señales (moleculares, bioquímicas, fisiológicas) proporcionan biomarcadores de alerta temprana y, según los casos, pronóstico de un menor rendimiento (p.ej. reducción de la eficacia biológica), o cuando menos de una determinada patología o merma en la salud de los individuos de manera análoga a como lo hacen los tests clínicos en medicina y veterinaria. No obstante, son muy pocos los biomarcadores para los que la relación entre su respuesta y la eficacia biológica de los individuos se ha determinado inequívocamente (Ellegren *et al.* 1997, Matthiessen & Gibbs 1998, Cheek 2006). La literatura contiene numerosos ejemplos en los que las respuestas de los biomarcadores (bioquímicas, fisiológicas, etc.) se detectan a niveles de exposición para los cuales la disminución de crecimiento, supervivencia, y reproducción son evidentes (McCarthy & Shugart 1990, Hugget *et al.* 2002). En esos casos, los biomarcadores proporcionan poco valor añadido como alerta temprana del impacto de la exposición a contaminantes sobre la eficacia biológica de los individuos, así como de los potenciales efectos subsiguientes sobre poblaciones y ecosistemas. No obstante, siguen constituyendo una información muy valiosa, ya que en numerosas ocasiones resulta más fácil tomar una muestra para evaluar la respuesta de un determinado biomarcador que realizar un seguimiento pormenorizado de la reproducción y supervivencia del individuo o de la población.

En esta revisión se ha mostrado que las respuestas de los biomarcadores estudiados se relacionan, en mayor o menor medida, con

niveles bajos de metales, es decir, con niveles a los que probablemente no se detectarían efectos a corto plazo sobre la reproducción y/o supervivencia pero que, sin embargo, se demuestran posteriormente, a más largo plazo, relacionados con la reproducción (alterada) de los individuos expuestos al vertido durante el desarrollo. Por tanto, en este caso particular, sí podríamos afirmar que los biomarcadores utilizados actuaron como señal de alerta temprana de posteriores efectos sobre la *fitness* o eficacia biológica de los individuos expuestos al vertido de Aznalcóllar, o al menos de aquellos que lo estuvieron en las etapas más tempranas de su desarrollo. Se podría concluir así que la obtención de respuestas a corto-medio plazo mediante el uso de biomarcadores sirve para avalar la necesidad de llevar a cabo, o en su caso continuar, un seguimiento y estudio a largo plazo de esas mismas respuestas y de sus posibles consecuencias sobre la reproducción y supervivencia de los individuos y, por tanto, de su potencial impacto sobre la dinámica de las poblaciones afectadas.

Los resultados aquí mostrados, junto con los de cada vez más investigadores en el campo de la ecotoxicología, pueden contribuir a que se produzcan cambios en el modo en que se entiende la toxicidad y los potenciales efectos de los contaminantes sobre la salud de individuos y poblaciones. Un producto químico no tiene que ser necesariamente letal para considerarse perjudicial o dañino para la salud; puede serlo por medio de efectos más sutiles dentro del organismo, por ejemplo, alterando el sistema hormonal o las defensas (sistema inmune) frente a parásitos o enfermedades y/o provocando efectos a más largo plazo sobre la reproducción. Gracias a los estudios realizados a lo largo de las últimas décadas sobre los efectos de los llamados disruptores endocrinos (p.ej. pesticidas organoclorados, PCBs, algunos metales, etc.), ahora sabemos que pequeños cambios, a veces sutiles, combinados entre sí y/o bajo condiciones diferentes y/o en generaciones posteriores, pueden reducir o limitar la capacidad de los organismos para adaptarse a nuevas situaciones o factores de estrés ambiental (Depledge 1994, Damstra *et al.* 2002, Goodhead & Tyler 2009). En este mismo sentido, cabe la posibilidad de que un determinado efecto sólo se haga evidente en presencia de un factor de estrés adicional (Norris 2000). La resiliencia de las poblaciones silvestres frente a la exposición

crónica a una determinada fuente de estrés (p.ej. la exposición a contaminantes u otras perturbaciones antropogénicas o ambientales) puede reducirse o desaparecer con la exposición a un nuevo factor de estrés dando lugar a efectos inesperados (Woodward *et al.* 2011). Este podría ser el caso del vertido de Aznalcóllar, sobre todo en relación con el más conspicuo de los efectos detectados: las deformaciones en los pollos de cigüeña blanca. El hecho de que estas deformaciones se detectaran sólo después del accidente minero, y que los resultados encontrados en relación con el metabolismo óseo mostraran que, independientemente de que las deformaciones fueran o no evidentes, todos los pollos muestreados en la DdA presentaban alteraciones de los parámetros bioquímicos estudiados (Baos 2016), hace pensar que el problema, siendo complejo en cuanto a sus causas, e involucrando a varios factores (Smits *et al.* 2005), tiene en el vertido un probable detonante o catalizador de esos efectos tras superarse la resiliencia de los individuos afectados (Gangoso *et al.* 2009). La información de la que se dispone es insuficiente para demostrar de forma inequívoca esta hipótesis, pero las evidencias acumuladas apuntan en esa dirección (Baos 2016).

Aunque los niveles de metales encontrados en cigüeñas y milanos se hallaron, en la mayoría de los casos, por debajo de los umbrales de toxicidad citados en la literatura como susceptibles de causar efectos subletales, la mezcla de todos ellos en el vertido, junto a contaminantes de distinta naturaleza como pesticidas organoclorados, PCBs, dioxinas y derivados, aminas aromáticas, etc., también presentes en el medio (Alzaga *et al.* 1999, Jiménez *et al.* 2000, Gómara *et al.* 2008, Muñoz-Arnanz *et al.* 2011a, 2011b), podría haber jugado un papel importante en los resultados obtenidos para los distintos biomarcadores. El vertido de la mina de Aznalcóllar constituye el origen más probable de las alteraciones detectadas en cigüeñas y milanos. No obstante, no podemos descartar que estas anomalías pudieran resultar de la exposición conjunta a los tóxicos del vertido minero y otros contaminantes vinculados a la actividad industrial y agrícola en los alrededores del Espacio Natural Doñana. La naturaleza observacional de las investigaciones realizadas junto con la ausencia de estudios experimentales diseñados al efecto en condiciones controladas (laboratorio) que apoyen los resultados obtenidos

en campo, impiden que se puedan establecer inequívocamente relaciones causales, así como determinar los mecanismos próximos asociados a tales efectos (p.ej. Rauschenberger *et al.* 2007). Aun así, las implicaciones que pueden derivarse de estos resultados son importantes, fundamentalmente porque la exposición a niveles bajos de una mezcla de metales (y/u otros contaminantes) reproduce el ambiente en el que se mueve la mayor parte de la fauna silvestre, por lo que los efectos detectados y sus consecuencias a largo plazo podrían estar mucho más generalizados de lo imaginable *a priori*. Esto podría llevar a plantearnos si muchas de las respuestas fisiológicas y ecológicas que observamos en la naturaleza no están contaminadas, en el más amplio sentido de la palabra, por los efectos de este tipo de exposiciones que, como se ha visto, son difíciles de detectar mediante estudios a corto o medio plazo, que, por otra parte, son los que habitualmente se vienen realizando (Gordo & Avilés 2017).

Los seguimientos a largo plazo de individuos y/o poblaciones expuestas a niveles relativamente bajos de contaminantes son indispensables para estudiar sus posibles efectos sobre la eficacia biológica de esos individuos y, por extensión, sobre la dinámica de sus poblaciones. No obstante, a pesar del seguimiento y del trabajo realizado, tras años de investigación y con la información disponible hasta el momento, no podemos afirmar con rotundidad que se hayan producido cambios en la abundancia, estructura y/o función de las poblaciones de aves de Doñana debido a la exposición al vertido. Los datos sobre abundancia de las especies que invernan o se reproducen en el Espacio Natural Doñana no parecen haber sufrido cambios (Rendón *et al.* 2008, Ramo *et al.* 2013), y ello pese a que la presencia de algunas de estas especies (incluso en gran número, como p.ej. gansos *Anser anser*, calamones *Porphyrio porphyrio* o fochas *Fulica atra*) en las zonas directamente cubiertas o afectadas por los lodos y aguas tóxicas conlleva un elevado riesgo de exposición y potenciales efectos (Baos *et al.* 2003). No obstante, tampoco se puede descartar que se haya producido un incremento de las tasas de mortalidad ligado a los efectos del vertido, y que ese incremento no haya sido detectado mediante los censos periódicos de poblaciones (Román & Vilà 2014) al no basarse estos en individuos marcados. De hecho, la zona afectada podría haberse mantenido atractiva para la fauna y comportarse

temporalmente como un sumidero (Delibes *et al.* 2009). Tal y como se señala en Baos *et al.* (2012), hay efectos que pueden permanecer ocultos y conducir incluso a conclusiones erróneas desde el punto de vista de la conservación, si no se realizan estudios a nivel individual y a largo plazo. Además, las estrategias demográficas de algunas especies han podido contribuir a contrarrestar esos posibles efectos, y quizá, enmascararlos. Por ejemplo, la mortalidad causada por los contaminantes puede ser compensada en mayor o menor medida mediante una reducción en las pérdidas naturales dependientes de la densidad (Newton 1998). En el caso del milano negro, la probabilidad de supervivencia fue analizada en relación con el vertido (comparación antes-después), encontrándose un descenso de este parámetro tras el accidente minero, especialmente acusado en el año 2001, último de la serie analizada (Baos *et al.* 2003). De no estar sujeta a seguimiento científico con marcaje y seguimiento individual, este efecto hubiese pasado desapercibido al no repercutir en cambios apreciables en el tamaño de la población reproductora.

Por último, y partiendo de la cautela que requiere realizar este tipo de afirmaciones, atendiendo, por un lado al papel de centinelas o bioindicadores ambientales que otorgamos al principio de esta revisión a las dos especies de aves objeto de estudio y, por otro, a los resultados obtenidos en relación con los efectos aquí investigados, es razonable pensar que otras especies con estrategias vitales próximas a las de cigüeñas y milanos podrían haber experimentado efectos similares. No obstante, dada la variabilidad interespecífica en cuanto a sensibilidad o susceptibilidad a determinados contaminantes, y la escasez de información experimental sobre sus posibles efectos, sobre todo en los niveles más elevados de organización biológica, es difícil valorar cuáles podrían ser los efectos a largo plazo que la exposición a contaminantes en general, y al vertido de Aznalcóllar en particular, podría llegar a tener en la fauna silvestre de Doñana. Aun así, los resultados de Baos *et al.* (2012) alertan de un potencial efecto en la dinámica poblacional de la cigüeña blanca, difícil de constatar en una especie como ésta debido a los propios mecanismos *buffer* o amortiguadores que puede ejercer, por ejemplo, la incorporación de individuos procedentes de otros núcleos reproductores (Barbraud *et al.* 1999). El mismo efecto en otras

especies cuyo número de individuos sea más reducido (p.ej. milano real *Milvus milvus*) o que sufran limitaciones en cuanto a la incorporación de individuos foráneos (p.ej. barreras geográficas, genéticas, etc.), podría tener consecuencias mucho más rápidas y evidentes, y de carácter más grave de cara a la subsistencia de la población. El seguimiento de las poblaciones de aves en Doñana durante los últimos años no ofrece datos que apoyen esta hipótesis (Ramo *et al.* 2013), pero conviene tenerla en cuenta en futuras investigaciones como posible mecanismo subyacente dentro de la dinámica de poblaciones y de cara a la conservación de especies, sobre todo de aquellas que presentan cierto grado de amenaza y/o sufren otras perturbaciones ambientales, de carácter antropogénico o no. Además, a escala global, sin duda existen problemas similares relacionados con la exposición a contaminantes en otros lugares que, sin embargo, carecen de una vigilancia o seguimiento adecuados. Este seguimiento se hace especialmente necesario allí donde la diversidad de especies y procesos necesitan ser conservados o protegidos.

Agradecimientos

Este trabajo es el resultado de muchas horas de campo, conversaciones y discusiones con Julio Blas, Roger Jovani, José L. Tella, Begoña Jiménez, Judit Smits, Gary R. Bortolotti, Tracy Marchant, David Serrano, Nuria Pastor, Felipe Cortés y M^a José González. Los investigadores y el personal de apoyo a la investigación de la Estación Biológica de Doñana (CSIC) estuvieron siempre dispuestos a ofrecer su ayuda y asesoramiento para resolver los problemas que se fueron planteando durante más de una década de trabajo. Nuestro agradecimiento también a la labor del Equipo de Seguimiento de Procesos Naturales de la Estación Biológica de Doñana (especialmente a Luis García, Manuel Máñez, Héctor Garrido, Fernando Ibáñez, José L. Arroyo y Manuel Vázquez), a José J. Chans, Gema García, Juanma Terrero, Francisco G. Vilches, Hugo Lefranc, Sonia Cabezas, Carmen Quintero, Rosa Rodríguez, Enrique Luque, José M. Hernández, Manuela G. Forero, Juan M. Grande, Miguel A. Bravo, Charo Cañas, Antonio Sánchez, Carmen Medina, Mariano Guerrero, Gema Gómez, M^a Carmen Tábera y muchos otros que colaboraron en el ingente trabajo de campo y laboratorio necesario para poder realizar la tesis origen de esta revisión. La Consejería de Medio Ambiente de la Junta de Andalucía financió gran parte de los proyectos que permitieron llevar a cabo estos estudios.

Resum

Efectes subletals de l'exposició a l'abocament tòxic d'Aznalcóllar en aus de vida llarga

El 1998, la ruptura de la bassa de residus de la mina d'Aznalcóllar (Sevilla) va provocar un abocament tòxic a les rodalies del Parc Nacional de Doñana. En aquesta revisió s'estudia el potencial impacte d'aquest abocament en les aus de Doñana, fent servir la cigonya blanca *Ciconia ciconia* i el milà negre *Milvus migrans* com a espècies bioindicadores. Utilitzant un conjunt de biomarcadors, es van avaluar les relacions entre els nivells en sang de Pb, Cd, Zn, Cd i As (els metalls més abundants en l'abocament) i aspectes moleculars, bioquímics, cel·lulars i fisiològics de vital importància per al funcionament del organisme com el sistema immune, el dany en l'ADN, la resposta adrenocortical a l'estrès, i el metabolisme i desenvolupament ossi. Trobem que, tot i per estar sota dels llindars de toxicitat, els nivells d'alguns metalls (p. ex. Cu) van estar relacionats amb l'alteració de la resposta immune cel·lular (test de la fitohemaglutinina) i amb el dany en l'ADN (assaig de l'estel) en els pollets de les dues espècies; la resposta adrenocortical a l'estrès en pollets de cigonya blanca va estar positivament relacionada amb nivells baixos de Pb. Aquesta associació va ser més intensa en els individus que havien experimentat un estrès addicional a causa d'altres factors ambientals. Les deformacions morfològiques detectades en els pollets de cigonya blanca després de l'abocament van estar relacionades amb un metabolisme ossi alterat (nivells de P, Ca; P fosfatasa alcalina òssia), especialment en les aus de menor edat. A més, les femelles de cigonya blanca exposades a l'abocament durant el seu desenvolupament van mostrar, en comparació amb les no exposades (nascudes abans de l'abocament), un patró alterat de la reproducció dependent de l'edat, caracteritzat per una major productivitat inicial i una prematura senescència reproductiva; el cost dels efectes subletals experimentats durant el desenvolupament podria determinar aquest patró, consistent amb mecanismes d'inversió terminal. En resum, els biomarcadors estudiats a curt i mitjà termini constitueixen, en conjunt, un sistema d'alerta primerenca útil per detectar efectes a més llarg termini dels contaminants sobre la biologia de les aus silvestres. Aquesta revisió mostra que l'exposició a contaminants durant les primeres etapes del desenvolupament, fins i tot a nivells baixos, pot afectar l'eficàcia biològica dels individus (reproducció), posant de manifest la necessitat de seguiments llargs en el temps per a una correcta valoració de l'impacte real de l'exposició a contaminants en les poblacions de fauna silvestre. L'abocament d'Aznalcóllar constitueix l'origen més probable de les alteracions detectades en cigonyes i milans. No obstant això, no es descarta que aquestes

anomalies puguin resultar de l'exposició conjunta als tòxics de l'abocament i d'altres contaminants vinculats a l'activitat industrial i agrícola a les rodalies de l'Espai Natural Doñana.

Resumen

Efectos subletales de la exposición al vertido tóxico de Aznalcóllar en aves de larga vida

En 1998, la rotura de la balsa de residuos de la mina de Aznalcóllar (Sevilla) provocó un vertido tóxico en los alrededores del Parque Nacional de Doñana. En esta revisión se estudia el potencial impacto de este vertido en las aves de Doñana y su entorno, usando la cigüeña blanca *Ciconia ciconia* y el milano negro *Milvus migrans* como especies centinela. Utilizando un conjunto de biomarcadores, se evaluaron las relaciones entre los niveles en sangre de Pb, Cd, Zn, Cd y As (los metales más abundantes en el vertido) y aspectos moleculares, bioquímicos, celulares y fisiológicos de vital importancia para el funcionamiento del organismo como el sistema inmune, el daño en el ADN, la respuesta adrenocortical al estrés, y el metabolismo y desarrollo óseo. Encontramos que, aun por debajo de los umbrales de toxicidad, los niveles de algunos metales (p.ej. Cu) estuvieron relacionados con la alteración de la respuesta inmune celular (test de la fitohemaglutinina) y con el daño en el ADN (ensayo del cometa) en los pollos de ambas especies; la respuesta adrenocortical al estrés en pollos de cigüeña blanca estuvo positivamente relacionada con niveles bajos de Pb. Esta asociación fue más intensa en los individuos que habían experimentado un estrés adicional debido a otros factores ambientales. Las deformaciones morfológicas detectadas en los pollos de cigüeña tras el vertido estuvieron relacionadas con un metabolismo óseo alterado (niveles de P, Ca:P, fosfatasa alcalina ósea), especialmente en las aves de menor edad. Además, las hembras de cigüeña blanca expuestas al vertido durante su desarrollo mostraron, en comparación con las no expuestas (nacidas antes del vertido) un patrón alterado de la reproducción dependiente de la edad, caracterizado por una mayor productividad inicial y una prematura senescencia reproductiva; el coste de los efectos subletales experimentados durante el desarrollo podría determinar este patrón, consistente con mecanismos de inversión terminal. En resumen, los biomarcadores estudiados a corto y medio plazo constituyen, en su conjunto, un sistema de alerta temprana útil para detectar efectos a más largo plazo de los contaminantes sobre la biología de las aves silvestres. Esta revisión muestra que la exposición a contaminantes durante las primeras etapas del desarrollo, incluso a niveles bajos, puede afectar a la eficacia biológica de los individuos (reproducción),

poniendo de manifiesto la necesidad de seguimientos prolongados en el tiempo para una correcta valoración del impacto real de la exposición a contaminantes en las poblaciones de fauna silvestre. El vertido de Aznalcóllar constituye el origen más probable de las alteraciones detectadas en cigüeñas y milanos. No obstante, no se descarta que estas anomalías pudieran resultar de la exposición conjunta a los tóxicos del vertido y de otros contaminantes vinculados a la actividad industrial y agrícola en los alrededores del Espacio Natural Doñana.

Bibliografía

- Alzaga, R., Mesas, A., Ortiz, L. & Bayona, J.M.** 1999. Characterization of organic compounds in soil and water affected by pyrite tailings spillage. *Sci. Tot. Environ.* 242: 167-178.
- Anderson, S.L., Sadinski, W., Shugart, L., Brusard, P., Depledge, M., Ford, T. Hose, J., Stegeman, J., Suk, W., Wirgin, I. & Wogan, G.** 1994. Genetic and molecular ecotoxicology: A research framework. *Environ. Health Persp.* 102: 3-8.
- Anderson, S.L. & Wild, G.C.** 1994. Linking genotoxic responses and reproductive success in ecotoxicology. *Environ. Health Persp.* 102: 9-12.
- ATSDR** (Agency for Toxic Substances and Disease Registry). 2004. Interaction Profiles for Toxic Substances. Disponible en: <http://www.atsdr.cdc.gov/interactionprofiles/ip04.html>.
- Banks, J.E. & Starks, J.D.** 1998. What is ecotoxicology? An ad-hoc grab bag or an interdisciplinary science? *Integr. Biol.* 1: 195-204.
- Baos, R.** 2016. *Efectos subletales de la exposición al vertido tóxico de Aznalcóllar en aves de larga vida*. Tesis doctoral. Madrid: Universidad Autónoma. Disponible en: <http://hdl.handle.net/10261/129789>
- Baos, R. & Blas, J.** 2008. Adrenal Toxicology in Birds: Environmental Contaminants and the Avian Response to Stress. In Harvey, P.W., Everett, D.J. & Springall, C.J. (eds): *Adrenal Toxicology*. Pp. 257-294. New York: Informa Healthcare.
- Baos, R., Blas, J., Hiraldo, F., Gómez, G., Jiménez, B., González, M.J., Benito, V., Vélez, D. & Montoro, R.** 2003. Niveles de metales pesados y arsénico en las aves de Doñana y su entorno tras el vertido de las minas de Aznalcóllar. Efecto a nivel de individuo e impacto en las poblaciones. In Consejería de Medio Ambiente-Junta de Andalucía (ed): *Ciencia y Restauración del Río Guadiamar: Resultados del Programa de Investigación del Corredor Verde del Guadiamar: 1998-2002*. Pp. 210-225. Salamanca: Kadmos.
- Baos, R., Jovani, R., Forero, M.G., Tella, J.L., Gómez, G., Jiménez, B., González, M.J. & Hiraldo, F.** 2006a. Relationships between T-cell-mediated immune response and Pb, Zn, Cu, Cd, and As concentrations in blood of nestling White Stork *Ciconia ciconia* and Black Kite *Milvus migrans* from Doñana (southwestern Spain) after the Aznalcóllar toxic spill. *Environ. Toxicol. Chem.* 25: 1153-1159.
- Baos, R., Jovani, R., Pastor, N., Tella, J.L., Jiménez, B., Gómez, G., González, M.J. & Hiraldo,**

- F. 2006b. Evaluation of genotoxic effects of heavy metals and arsenic in wild nestling White Stork *Ciconia ciconia* and Black Kites *Milvus migrans* from southwestern Spain after a mining accident. *Environ. Toxicol. Chem.* 25: 2794–2803.
- Baos, R., Blas, J., Bortolotti, G.R., Marchant, T.A. & Hiraldo, F.** 2006c. Adrenocortical response to stress and thyroid hormone status in free-living nestling white storks *Ciconia ciconia* exposed to heavy metals and arsenic contamination. *Environ. Health Persp.* 114: 1497–1501.
- Baos, R., Jovani, R., Serrano, D., Tella, J.L. & Hiraldo, F.** 2012. Developmental exposure to a toxic spill compromises long-term reproductive performance in a wild, long-lived bird: The White Stork *Ciconia ciconia*. *PLoS ONE* 7: e34716.
- Barbraud, C., Barbraud, J.C. & Barbraud, M.** 1999. Population dynamics of the White Stork *Ciconia ciconia* in western France. *Ibis* 141: 469–479.
- Barrot, M., Marinelli, M., Abrous, D.N., Rougepont, F., Le Moal, M. & Piazza, P.V.** 2000. The dopaminergic hyper-responsiveness of the shell of the nucleus accumbens is hormone-dependent. *Eur. J. Neurosci.* 12: 973–979.
- Bateson, P., Barker, D., Clutton-Brock, T., Deb, D., D'Udine, B., Foley, R.A., Gluckman, P., Godfrey, K., Kirkwood, T., Mirazón Lahr, M., McNamara, J., Metcalfe, N.B., Monaghan, P., Spencer, H.G. & Sultan, S.E.** 2004. Developmental plasticity and human health. *Nature* 430: 419–421.
- Becker, P.H.** 2003. Biomonitoring with birds. In Markert, B.A., Breure, A.M. & Zechmeister, H.G. (eds): *Bioindicators and biomonitors*. Pp. 677–736. Oxford: Elsevier.
- Beisel, W.R.** 1982. Single nutrients in immunity. *Am. J. Clin. Nutr.* 35: 417–468.
- Benito, V., Devesa, V., Muñoz, O., Suñer, M.A., Montoro R., Baos, R., Hiraldo, F., Ferrer, M., Fernández, M. & González, M.J.** 1999. Trace elements in blood collected from birds feeding in the area around Doñana National Park affected by the toxic spill from the Aznalcóllar mine. *Sci. Tot. Environ.* 242: 309–323.
- Berglund, M., Akesson, A., Bjellerup, P. & Vahter, M.** 2000. Metal-bone interactions. *Toxicol. Lett.* 112–113: 219–225.
- Bize, P., Devevey, G., Monaghan, P., Doligez, B. & Christe, P.** 2008. Fecundity and survival in relation to resistance to oxidative stress in a free-living bird. *Ecology* 89: 2584–2593.
- Blas, J., Bortolotti, G.R., Tella, J.L., Baos, R. & Marchant, T.A.** 2007. Stress response during development predicts fitness in a wild, long lived vertebrate. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 104: 8880–8884.
- Bonisoli-Alquati, A., Voris, A., Mousseau, T.A., Møller, A.P., Saino, N. & Wyatt, M.D.** 2010. DNA damage in Barn Swallows *Hirundo rustica* from the Chernobyl region detected by use of the comet assay. *Comp. Biochem. Phys. C* 151: 271–277.
- Bowerman, W.W.** 1994. Observed abnormalities in mandibles of nestling Bald Eagles *Haliaeetus leucocephalus*. *B. Environ. Contam. Tox.* 53: 450–457.
- Burger, J., Diaz-Barriga, F., Marafante, E., Pounds, J. & Robson, M.** 2003. Methodologies to examine the importance of host factors in bioavailability of metals. *Ecotox. Environ. Safe.* 56: 20–31.
- Burger, J., Fossi, C., McClellan-Green, P. & Orlando, E.F.** 2007. Methodologies, bioindicators, and biomarkers for assessing gender-related differences in wildlife exposed to environmental chemicals. *Environ. Res.* 104: 135–152.
- Burrell, G.A. & Seibert, F.M.** 1916. *Gases found in coal mines*. Miners' Circular 14. Bureau of Mines. Washington: Department of the Interior.
- Bustnes, J.O., Erikstad, K.E., Skaare, J.U., Bakken, V. & Mehlum, F.** 2003. Ecological effects of organochlorine pollutants in the Arctic: A study of the Glaucous Gull. *Ecol. Appl.* 13: 504–515.
- Bustnes, J.O., Tveraa, T., Varpe, O., Henden, J.A. & Skaare, J.U.** 2007. Reproductive performance and organochlorine pollutants in an Antarctic marine top predator: The South Polar Skua. *Environ. Int.* 33: 911–918.
- Cheek, A.O.** 2006. Subtle sabotage: Endocrine disruption in wild populations. *Rev. Biol. Trop.* 54: 1–19.
- Clements, W.H.** 2000. Integrating effects of contaminants across levels of biological organization: An overview. *J. Aquat. Ecosyst. Stress Recov.* 7: 113–116.
- Clutton-Brock, T.H.** 1984. Reproductive effort and terminal investment in iteroparous animals. *Am. Nat.* 123: 212–229.
- Colborn, T. & Clement, C.** (eds). 1992. *Chemically-induced alterations in sexual and functional development: The wildlife/human connection*. Princeton: Princeton Scientific Pub.
- Cory-Slechta, D.A., McCoy, L. & Richfield, E.K.** 1997. Time course and regional basis of Pb-induced changes in MK-801 binding: Reversal by chronic treatment with the dopamine agonist apomorphine but not the D1 agonist SKF-28958. *J. Neurochem.* 68: 2012–2023.
- Cory-Slechta, D.A., Virgolini, M.B., Thiruchelvam, M., Weston, D.D. & Bauter, M.R.** 2004. Maternal stress modulates the effects of developmental lead exposure. *Environ. Health Persp.* 112: 717–730.
- Cotelle, S. & Féryard, J.F.** 1999. Comet assay in genetic ecotoxicology: A review. *Environ. Mol. Mutagen.* 34: 246–255.
- Damstra, T., Barlow, S., Bergman, A., Kavlock, R. & Van der Kraak, G.** (eds). 2002. *Global Assessment of the State-of-the-Science of Endocrine Disruptors*. Geneva: WHO.
- Del Valls, T.A. & Blasco, J.** (eds). 2005. *Integrated assessment and management of the ecosystems affected by the Aznalcóllar mining spill (SW, Spain)*. Cádiz: Cátedra UNESCO Unitwin.
- Delibes, M., Cabezas, S., Jiménez, B. & González, M.J.** 2009. Animal decisions and conservation: The recolonization of a severely polluted river by the Eurasian Otter. *Anim. Conserv.* 12: 400–407.
- Depledge, M.H.** 1994. The rational basis for the use of biomarkers as ecotoxicological tools. In Fossi, M.C. & Leonzio, C. (eds): *Nondestructive biomarkers in vertebrates*. Pp. 271–295. Boca Raton: Lewis Publishers.
- Depledge, M.H.** 2009. Novel approaches and technologies in pollution assessment and monitoring: A UK perspective. *Ocean. Coast. Manage.* 52: 336–341.
- Depledge, M.H., Agaard, A. & Györkös, P.** 1995. Assessment of trace metal toxicity using molecular,

- physiological, and behavioral biomarkers. *Mar. Pollut. Bull.* 31: 19–27.
- Der, R., Yousef, M., Fahim, Z. & Fahim, M.** 1977. Effects of lead and cadmium on adrenal and thyroid function in rats. *Res. Commun. Chem. Path.* 17: 237–253.
- Dickerson, S.M. & Gore, A.C.** 2007. Estrogenic environmental endocrine-disrupting chemical effects on reproductive neuroendocrine function and dysfunction across the life cycle. *Rev. Endocr. Metab. Dis.* 8: 143–159.
- Di Giulio, R.T. & Tillitt, D.E.** (eds). 1999. *Reproductive and developmental effects of contaminants in oviparous vertebrates*. Pensacola: SETAC Pub.
- Eeva, T., Hasselquist, D., Langefors, A., Tummeleht, L., Nikinmaa, M. & Ilmonen, P.** 2005. Pollution related effects on immune function and stress in a free-living population of Pied Flycatcher *Ficedula hypoleuca*. *J. Avian Biol.* 36: 405–412.
- Eeva, T., Lehikoinen, E. & Nikinmaa, M.** 2003. Pollution-induced nutritional stress in birds: an experimental study of direct and indirect effects. *Ecol. Appl.* 13: 1242–1249.
- Ellegren, H., Lindgren, G., Primmer, C.R. & Møller, A.P.** 1997. Fitness loss and germline mutations in Barn Swallows breeding in Chernobyl. *Nature* 389: 593–596.
- Evers, D.C., Savoy, L.J., DeSorbo, C.R., Yates, D.E., Hanson, W., Taylor, K.M., Siegel, L.S., Cooley Jr, J.H., Bank, M.S., Major, A., Munney, K., Mower, B.F., Vogel, H.S., Schoch, N., Pokras, M., Goodale, M.W. & Fair, J.** 2008. Adverse effects from environmental mercury loads on breeding Common Loons. *Ecotoxicology* 17: 69–81.
- Fair, J.M. & Myers, O.B.** 2002. The ecological and physiological costs of lead shot and immunological challenge to developing Western Bluebirds. *Ecotoxicology* 11: 199–208.
- Fairbrother, A., Smits, J. & Grasman, K.A.** 2004. Avian immunotoxicology. *J. Toxicol. Env. Heal. B* 7: 105–137.
- Fairbrother, A., Wenstel, R., Sappington, K. & Wood, W.** 2007. Framework for metals risk assessment. *Ecotox. Environ. Safe.* 68: 145–227.
- Fernie, K.J., Smits, J. & Bortolotti, G.** 2003. Developmental toxicity of in ovo exposure to polychlorinated biphenyls: I. Immediate and subsequent effects on first-generation nestling American Kestrels *Falco sparverius*. *Environ. Toxicol. Chem.* 22: 554–560.
- Fernie, K.J., Smits, J.E.G., Bortolotti, G.R. & Bird, D.M.** 2001. In ovo exposure to polychlorinated biphenyls: Reproductive effects on second-generation American Kestrels. *Arch. Environ. Con. Tox.* 40: 544–550.
- Florea, A.M. & Buesselberg, D.** 2006. Occurrence, use and potential toxic effects of metals and metal compounds. *Biomaterials* 19: 419–427.
- Forslund, P. & Pärt, T.** 1995. Age and reproduction in birds – Hypothesis and tests. *Trends Ecol. Evol.* 10: 374–378.
- Fossi, M.C.** 1994. Nondestructive biomarkers in ecotoxicology. *Environ. Health Persp.* 102: 49–54.
- Fossi, M.C., Casini, S. & Marsili, L.** 1999. Non-destructive biomarkers of exposure to endocrine disrupting chemicals in endangered species of wildlife. *Chemosphere* 39: 1273–1285.
- Fossi, M.C. & Leonzio, C.** (eds). 1994. *Nondestructive biomarkers in vertebrates*. Boca Raton: Lewis Publishers.
- Fowler, M.E.** 1986. Metabolic bone disease. In Fowler, M.E. (ed): *Zoo and Wild Animal Medicine*. Pp. 69–90. Philadelphia: WB Saunders Co.
- Fox, G.A.** 1991. Practical causal inference for eco-epidemiologists. *J. Toxicol. Env. Heal. A* 33: 359–373.
- Fox, G.A.** 1993. What have biomarkers told us about the effects of contaminants on the health of fish-eating birds in the Great Lakes? The theory and a literature review. *J. Great Lakes Res.* 19: 722–736.
- Fox, G.A.** 2001. Wildlife as sentinels of human health effects in the Great Lakes-St. Lawrence Basin. *Environ. Health Persp.* 109: 853–861.
- Frame, L. & Dickerson, R.L.** 2006. Fish and wildlife as sentinels of environmental contamination. In Norris, D.O. & Carr, J.A. (eds): *Endocrine disruption: Biological bases for health effects in wildlife and humans*. Pp. 202–222. New York: Oxford University Press.
- Franson, J.** 1996. Interpretation of tissue lead residues in birds other than waterfowl. In Beyer, N.W., Heinz, G.H. & Redmon-Norwood, A.W. (eds): *Environmental contaminants in wildlife: Interpreting tissue concentrations*. Pp. 265–279. Boca Raton: Lewis Publishers.
- Fry, D.M.** 1995. Reproductive effects in birds exposed to pesticides and industrial chemicals. *Environ. Health Persp.* 103: 165–171.
- Furness, R.W.** 1993. Birds as monitors of pollutants. In Furness, R.W. & Greenwood, J.J.D. (eds): *Birds as monitors of environmental change*. Pp. 87–143. London: Chapman & Hall.
- Galloway, T. & Handy, R.** 2003. Immunotoxicity of organophosphorous pesticides. *Ecotoxicology* 12: 345–363.
- Gangoso, L., Álvarez-Lloret, P., Rodríguez-Navarro, A.A.B., Mateo, R., Hiraldo, F. & Donazar, J.A.** 2009. Long-term effects of lead poisoning on bone mineralization in vultures exposed to ammunition sources. *Environ. Pollut.* 157: 569–574.
- García-Lestón, J., Méndez, J., Pásaro, E. & Laffon, B.** 2010. Genotoxic effects of lead: An updated review. *Environ. Int.* 36: 623–636.
- Gilbertson, M., Kubiak, T., Ludwig, J. & Fox, G.A.** 1991. Great Lakes Embryo Mortality, Edema, and Deformities Syndrome (GLEMEDS) in colonial fish-eating birds: Similarity to chick-edema disease. *J. Toxicol. Env. Heal. A* 33: 455–520.
- Gochfeld, M.** 1997. Factors influencing susceptibility to metals. *Environ. Health Persp.* 105: 817–822.
- Gómara, B., González, M.J., Baos, R., Hiraldo, F., Abad, E., Rivera, J. & Jiménez, B.** 2008. Unexpected high PCB and total DDT levels in the breeding population of Red Kite *Milvus milvus* from Doñana National Park, South-western Spain. *Environ. Int.* 34: 73–78.
- Goodhead, R.M. & Tyler, C.R.** 2009. Endocrine-disrupting chemicals and their environmental impacts. In Walker, C.H. (ed): *Organic pollutants: An ecotoxicological perspective*. Pp. 265–292. Devon: CRC Press.
- Gordo, O. & Avilés, J.M.** 2017. El valor de los estudios a largo plazo en la ecología del comportamiento. *Ecosistemas* 26 (3): 21–31.
- Gore, A.C.** 2008. Developmental programming and endocrine disruptor effects on reproductive neu-

- roendocrine systems. *Front. Neuroendocrin.* 29: 358–374.
- Goyer, R.A.** 1997. Toxic and essential metal interactions. *Annu. Rev. Nutr.* 17: 37–50.
- Grasman, K.A.** 2002. Assessing immunological function in toxicological studies of avian wildlife. *Integr. Comp. Biol.* 42: 34–42.
- Grasman, K.A., Scanlon, P.F. & Fox, G.A.** 1998. Reproductive and physiological effects of environmental contaminants in fish-eating birds of the Great Lakes: A review of historical trends. *Environ. Monitor. Assess.* 53: 117–145.
- Grimalt, J.O. & Macpherson, E.** (eds). 1999. The environmental impact of the mine tailing accident in Aznalcóllar (South-west Spain). *Sci. Tot. Environ.* 242 (1–3, Special Issue).
- Grimalt, J.O., Ferrer, M. & Macpherson, E.** 1999. The mine tailing accident in Aznalcóllar. *Sci. Tot. Environ.* 242: 3–11.
- Guillette, L.J.Jr.** 2006. Endocrine disrupting contaminants - Beyond the dogma. *Environ. Health Persp.* 104: 9–12.
- Guterman, L.** 2009. Exxon Valdez turns 20. *Science* 323: 1558–1559.
- Hagger, J.A., Jones, M.B., Leonard, D.R.P., Owen, R. & Galloway, T.S.** 2006. Biomarkers and integrated environmental risk assessment: Are there more questions than answers? *Integr. Environ. Assess. Manage.* 2: 312–329.
- Handy, R.D., Galloway, T.S. & Depledge, M.H.** 2003. A proposal for the use of biomarkers for the assessment of chronic pollution and in regulatory toxicology. *Ecotoxicology* 12: 331–343.
- Hanssen, S.A.** 2006. Costs of immune challenge and terminal investment in a long-lived bird. *Ecology* 87: 2440–2446.
- Harshman, L.G. & Zera, A. J.** 2007. The cost of reproduction: The devil in the details. *Trends Ecol. Evol.* 22: 80–86.
- Helberg, M., Bustnes, J.O., Erikstad, K.E., Kristiansen, K.O. & Skaare, J.U.** 2005. Relationships between reproductive performance and organochlorine contaminants in Great Black-backed Gulls *Larus marinus*. *Environ. Pollut.* 134: 475–483.
- Hernández, L.M., Gómara B., Fernández, M., Jiménez, B., González, M.J., Baos, R., Hiraldo, F., Ferrer, M., Benito, V. Suárez, M.A., Devesa, V. Muñoz, O. & Montoro, R.** 1999. Accumulation of heavy metals and As in wetland birds in the area around Doñana National Park affected by the Aznalcóllar toxic spill. *Sci. Tot. Environ.* 242: 293–308.
- Hickey, J.J. & Anderson, D.W.** 1968. Chlorinated hydrocarbons and eggshell changes in raptorial and fish-eating birds. *Science* 162: 271–273.
- Hinson, J.P. & Raven, P.W.** 2006. Effects of endocrine-disrupting chemicals on adrenal function. *Best Pract. Res. Cl. En.* 20: 111–120.
- Hoffman, D.J., Ohlendorf, H.M. & Aldrich, T.W.** 1988. Selenium teratogenesis in natural populations of aquatic birds in Central California. *Arch. Environ. Con. Tox.* 17: 519–525.
- Hose, J.E. & Guillette, L.J.** 1995. Defining the role of pollutants in the disruption of reproduction in wildlife. *Environ. Health Persp.* 103: 87–91.
- Hotchkiss, A.K.** 2008. Fifteen years after “Wingspread” –Environmental endocrine disrupters and human and wildlife health: Where we are today and where we need to go. *Toxicol. Scr.* 105: 235–259.
- Hugget, R.J., Kimerle, R.A., Mehrle, P.M.Jr. & Bergman, H.L.** (eds). 2002. *Biomarkers: Biochemical, physiological, and histological markers of anthropogenic stress*. Boca Raton: Lewis Publishers.
- Iwaniuk, A.N., Koperski, D.T., Cheng, K.M., Elliott, J.E., Smith, L.K., Wilson, L.K. & Wylie, D.R.W.** 2006. The effects of environmental exposure to DDT on the brain of a songbird: Changes in structures associated with mating and song. *Behav. Brain Res.* 173: 1–10.
- Jiménez, B., Gómara, B., Baos, R., Hiraldo, F., Eljarrat, E., Rivera, J. & González, M.J.** 2000. A study of the toxic equivalents derived from PCDDs, PCDFs, and dioxin-like PCBs in two bird species *Ciconia ciconia* and *Milvus migrans* nesting in a protected Area (Doñana National Park, Spain). *Organohalogen Compounds* 46: 542–545.
- Jovani, R. & Tella, J.L.** 2004. Age-related environmental sensitivity and weather mediated nestling mortality in white storks *Ciconia ciconia*. *Ecography* 27: 611–618.
- Kakkar, P. & Jaffery, F.N.** 2005. Biological markers for metal toxicity. *Environ. Toxicol. Phar.* 19: 335–349.
- Kendall, R.J., Dickerson, R., Giesy, J. & Suk, W.** 1998. *Principles and processes for evaluating endocrine disruptors in wildlife*. Pensacola: SETAC Press.
- Kim, S.Y., Velando, A., Sorci, G. & Alonso-Álvarez, C.** 2009. Genetic correlation between resistance to oxidative stress and reproductive life span in a bird species. *Evolution* 64: 852–857.
- Kitaysky, A.S., Kitaiskaia, E.V., Piatt, J.F. & Wingfield, J.C.** 2003. Benefits and costs of increased levels of corticosterone in seabird chicks. *Horm. Behav.* 43: 140–149.
- Kushlan, J.A.** 1993. Colonial waterbirds as bioindicators of environmental change. *Colon. Waterbird.* 16: 223–251.
- LeBlanc, G.A.** 1995. Are environmental sentinels signaling? *Environ. Health Persp.* 103: 888–890.
- Letcher, R.J., Bustnes, J.O., Dietz, R., Jenssen, B.M., Jørgensen, E.H., Sonne, C., Verreault, J., Vijayan, M.M. & Gabrielsen, G.W.** 2010. Exposure and effects assessment of persistent organohalogen contaminants in Arctic wildlife and fish. *Sci. Tot. Environ.* 408: 2995–3043.
- Lindström, J.** 1999. Early development and fitness in birds and mammals. *Trends Ecol. Evol.* 14: 343–348.
- Mallory, M.L. Robinson, S.A., Hebert, C.E. & Forbes, M.R.** 2010. Seabirds as indicators of aquatic ecosystem conditions: A case for gathering multiple proxies of seabird health. *Mar. Pollut. Bull.* 60: 7–12.
- Mason, K.E.** 1979. A conspectus of research on copper metabolism and requirements of man. *J. Nutr.* 109: 1979–2066.
- Matthiessen, P. & Gibbs, P.E.** 1998. Critical appraisal of the evidence for tributyltin-mediated endocrine disruption in mollusks. *Environ. Toxicol. Chem.* 17: 37–43.
- McArthur, M.L.B., Fox, G.A., Peakall, D.B. & Philogène, B.J.R.** 1983. Ecological significance of behavioral and hormonal abnormalities in bre-

- eding Ring Doves fed an organochlorine chemical mixture. *Arch. Environ. Con. Tox.* 12: 343-353.
- McCarthy, J.F. & Shugart, L.R.** (eds). 1990. *Biomarkers of environmental contamination*. Boca Raton: Lewis Publishers, CRC Press.
- McCarty, J.P.** 2002. Use of Tree Swallows in studies of environmental stress. *Rev. Toxicol.* 4: 61-104.
- McNabb, F.M.A.** 2000. Thyroids. In Whittow, G.C. (ed). *Sturkie's avian physiology*. Pp. 461-471. New York: Academic Press.
- Meharg, A.A., Pain, D.J., Ellam, R.M., Baos, R., Olive, V., Joyson, A., Powell, N., Green, A.J. & Hiraldo, F.** 2002. Isotopic identification of sources of lead contamination for White Stork *Ciconia ciconia* in a marshland ecosystem (Doñana, S.W. Spain). *Sci. Tot. Environ.* 300: 81-86.
- Melancon, M.J.** 2003. Bioindicators of contaminant exposure and effect in aquatic and terrestrial monitoring. In Hoffman, D.J., Rattner, B.A., Burton, G.A.Jr. & Cairns, J.Jr. (eds): *Handbook of ecotoxicology*. Pp. 257-278. Boca Raton: CRC Press.
- Metcalfe, N.B. & Monaghan, P.** 2001. Compensation for a bad start: grow now, pay later? *Trends Ecol. Evol.* 16: 254-260.
- Mitchelmore, C.L. & Chipman, J.K.** 1998. DNA strand breakage in aquatic organisms and the potential value of the comet assay in environmental monitoring. *Mutat. Res.* 399: 135-147.
- Monaghan, P., Charmantier, A., Nussey, D.H. & Ricklefs, R.E.** 2008. The evolutionary ecology of senescence. *Funct. Ecol.* 22: 371-378.
- Moore, M.N., Depledge, M.H., Readman, J.W. & Paul Leonard, D.R.** 2004. An integrated biomarker-based strategy for ecotoxicological evaluation of risk in environmental management. *Mutat. Res.* 552: 247-268.
- Muñoz-Arnanz, J., Sáez, M., Aguirre, J.I., Hiraldo, F., Baos, R., Papepavicius, G., Alae, M. & Jiménez, B.** 2011a. Predominance of BDE-209 and other higher brominated diphenyl ethers in eggs of White Stork *Ciconia ciconia* colonies from Spain. *Environ. Int.* 37: 572-576.
- Muñoz-Arnanz, J., Sáez, M., Hiraldo, F., Baos, R., Papepavicius, G., Alae, M. & Jiménez, B.** 2011b. Dechlorane plus and possible degradation products in White Stork eggs from Spain. *Environ. Int.* 37: 1164-1168.
- Naef-Daenzer, B., Widmer, F. & Nuber M.** 2001. Differential post-fledging survival of Great and Coal Tits in relation to their condition and fledging date. *J. Anim. Ecol.* 70: 730-738.
- Newton, I.** 1998. Pesticides and pollutants. In: *Population limitation in birds*. Pp. 407-447. San Diego: Academic Press.
- Norris, D.O.** 2000. Endocrine disruptors of the stress axis in natural populations: How can we tell? *Am. Zool.* 40: 393-401.
- Norris, D.O. & Carr, J.A.** (eds). 2006. *Endocrine disruption: Biological bases for health effects in wildlife and humans*. New York: Oxford University Press.
- Ottinger, M.A., Lavoie, E., Thompson, N., Barton, A., Whitehouse, K., Barton, M., Abdelnabi, M., Quinn Jr, M., Panzica, G. & Viglietti-Panzica, C.** 2008. Neuroendocrine and behavioural effects of embryonic exposure to endocrine disrupting chemicals in birds. *Brain Res. Rev.* 57: 376-385.
- Pain, D.J., Sánchez, A. & Meharg, A.A.** 1998. The Doñana ecological disaster: Contamination of a world heritage estuarine marsh ecosystem with acidified pyrite mine waste. *Sci. Tot. Environ.* 222: 45-54.
- Pastor, N., Baos, R., López-Lázaro, M., Jovani, R., Tella, J.L., Hajji, N., Hiraldo, F. & Cortés, F.** (2004). A 4-year follow-up analysis of genotoxic damage in birds of the Doñana área (SW Spain) in the wake of the 1998 mining waste spill. *Mutagenesis* 19: 61-65.
- Pastor, N., López-Lázaro, M., Tella, J.L., Baos, R., Hiraldo, F. & Cortés F.** 2001. Assessment of genotoxic damage by the comet assay in White Storks *Ciconia ciconia* after the Doñana ecological disaster. *Mutagenesis* 16: 219-223.
- Pattee, O.H. & Pain, D.J.** 2003. Lead in the environment. In Hoffman, D.J., Rattner, B.A., Burton, G.A.Jr. & Cairns, J.Jr. (eds): *Handbook of ecotoxicology*. 2nd Ed. Pp. 373-408. Boca Raton: CRC Press.
- Peakall, D.B.** 1994. The role of biomarkers in environmental assessment (1). Introduction. *Ecotoxicology* 3: 157-160.
- Peakall, D.B. & Burger, J.** 2003. Methodologies for assessing exposure to metals: Speciation, bioavailability of metals, and ecological host factors. *Ecotox. Environ. Safe.* 56: 110-121.
- Peakall, D.B. & Walker, C.H.** 1994. The role of biomarkers in environmental assessment (3). Vertebrates. *Ecotoxicology* 3: 173-179.
- Peterson, C.H., Rice, S.D., Short, J.W., Esler, D., Bodkin, J.L., Ballachey, B.E. & Irons, D.B.** 2003. Long-term ecosystem response to the Exxon Valdez oil spill. *Science* 302: 2082-2086.
- Pocino, M., Baute, L. & Malavé, I.** 1991. Influence of the oral administration of excess copper on the immune response. *Fund. Appl Toxicol.* 16: 249-256.
- Quinn, M.J.Jr., Summitt, C.L. & Ottinger, M.A.** 2008. Consequences of in ovo exposure to p,p'-DDE on reproductive development and function in Japanese Quail. *Horm. Behav.* 53: 249-253.
- Ramo, C., Aguilera, E., Figuerola, J., Mániz, M. & Green, A.** 2013. Long-term population trends of colonial wading birds breeding in Doñana (SW Spain) in relation to environmental and anthropogenic factors. *Ardeola* 60: 305-326.
- Ratcliffe, D.A.** 1970. Changes attributed to pesticides in egg breakage frequency and eggshell thickness in some British birds. *J. Appl. Ecol.* 7: 67-115.
- Rauschenberger, R.H., Wiebe, J.J., Sepúlveda, M.S., Scarborough, J.E. & Gross, T.S.** 2007. Parental exposure to pesticides and poor clutch viability in American alligators. *Environ. Sci. Technol.* 41: 5559-5563.
- Redig, P.T., Lawler, E.M., Schwartz, S., Dunnette, J.L., Stephenson, B. & Duke, G.E.** 1991. Effects of chronic exposure to sublethal concentrations of lead acetate on heme synthesis and immune function in Red-tailed Hawks. *Arch. Environ. Con. Tox.* 21: 72-77.
- Reed, T.E., Kruuk, L.E.B., Wanless S., Frederiksen, M., Cunningham, E.J.A. & Harris, M.P.** 2008. Reproductive senescence in a long-lived seabird: rates of decline in late life performance are associated with varying costs of early reproduction. *Am. Nat.* 171: E89-E101.
- Rendón, M.A., Green, A.J., Aguilera, E. & Almaraz, P.** 2008. Status, distribution and long-term changes in the waterbird community wintering in

- Doñana, South-west Spain. *Biol. Conserv.* 141: 1371-1388.
- Ringsby, T.H., Saether, B.E. & Solberg, J.** 1998. Factors affecting juvenile survival in House Sparrow *Passer domesticus*. *J. Avian Biol.* 29: 241-247.
- Rojas, E., Herrera, L.A., Poirier, L.A. & Ostrosky-Wegman, P.** 1999. Are metals dietary carcinogens? *Mutat. Res.* 443: 157-181.
- Román, J. & Vilà M.** 2014. *Censos aéreos de las aves acuáticas en Doñana: cuarenta años de seguimiento de procesos naturales*. Madrid: CSIC.
- Romijn, C.A., Grau, R., Guth, J.A., Harrison, E.G., Jackson, C.M., Lefebvre, B., Smith, W.W. & Street, J.R.** 1995. The use of Japanese and Bobwhite Quail as indicator species in avian toxicity test. *Chemosphere* 30: 1033-1040.
- Rowe, C.L.** 2008. "The calamity of so long life": Life histories, contaminants, and potential emerging threats to long-lived vertebrates. *Bioscience* 58: 623-631.
- Rowe, C.L., Hopkins, W.A. & Congdon, J.D.** 2001. Integrating individual-based indices of contaminant effects. How multiple sublethal effects may ultimately reduce amphibian recruitment from a contaminated breeding site. *Sci. World J.* 1: 703-712.
- Sapolsky, R.M., Romero, L.M. & Munck, A.U.** 2000. How glucocorticoids influence stress responses? Integrating permissive, suppressive, stimulatory, and preparative actions. *Endocr. Rev.* 21: 55-89.
- Scanes, C.G. & McNabb, F.M.A.** 2003. Avian models for research in toxicology and endocrine disruption. *Avian Poult. Biol. Rev.* 14: 21-52.
- Schantz, S.L. & Widholm, J.J.** 2001. Cognitive effects of endocrine disrupting chemicals in animals. *Environ. Health Persp.* 109: 1197-1206.
- Scheuhammer, A.M.** 1987. The chronic toxicity of aluminium, cadmium, mercury, and lead in birds: A review. *Environ. Pollut.* 46: 263-295.
- Schwabe, C.W.** 1984. Animal monitors of the environment. In *Veterinary medicine and human health*. Pp. 562-578. Baltimore: Williams & Wilkins.
- Segner, H.** 2007. Ecotoxicology - How to assess the impact of toxicants in a multi-factorial environment? In Mothersill, C., Mosse, I. & Seymour, C. (eds): *Multiple stressors: A challenge for the future*. NATO science for peace and security Series C: Environmental security. Pp. 39-56. Dordrecht: Springer.
- Sheffield, S.R., Matter, J.M., Rattner, B.A. & Guiney, P.D.** 1998. Fish and wildlife species as sentinels for environmental endocrine disrupters. In Kendall, R.J., Dickerson, R.L., Giesy, J. & Suk, W. (eds): *Principles and processes for evaluating endocrine disruption in wildlife*. Pp. 369-430. Pensacola: SETAC Press.
- Shugart, L.R.** 2000. DNA damage as biomarker of exposure. *Ecotoxicology* 9: 329-340.
- Sih, A., Bell, A.M. & Kerby, J.L.** 2004. Two stressors are far deadlier than one. *Trends Ecol. Evol.* 19: 274-276.
- Singh, N.P., McCoy, M.T., Tice, R.R. & Schneider, E.L.** 1988. A simple technique for quantification of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp. Cell Res.* 175: 184-191.
- Smits, J.E., Bortolotti, G.R. & Tella, J.L.** 1999. Simplifying the phytohemagglutinin skin testing technique in studies of avian immunocompetence. *Funct. Ecol.* 13: 567-572.
- Smits, J.E.G., Bortolotti, G.R., Baos, R., Blas, J., Hiraldo, F. & Xie, Q.L.** 2005. Skeletal pathology in White Storks *Ciconia ciconia* associated with heavy metal contamination in Southwestern Spain. *Toxicol. Pathol.* 33: 441-448.
- Smits, J.E.G., Bortolotti, G.R., Baos, R., Jovani, R., Tella, J.L. & Hoffmann W.E.** 2007. Disrupted bone metabolism in contaminant-exposed White Storks *Ciconia ciconia* in southwestern Spain. *Environ. Pollut.* 145: 538-544.
- Smits, J.E., Fernie, K.J., Bortolotti, G.R. & Marchant, T.A.** 2002. Thyroid hormone suppression and cell-mediated immunomodulation in American Kestrels *Falco sparverius* exposed to PCBs. *Arch. Environ. Con. Tox.* 43: 338-344.
- Snoeijs, T., Dauwe, T., Pinxten, R., Darras, V.M., Arckens, L. & Eens, M.** 2005. The combined effect of lead exposure and high or low dietary calcium on health and immunocompetence in the Zebra Finch *Taeniopygia guttata*. *Environ. Pollut.* 134: 123-132.
- Spahn, S.A. & Sherry, T.W.** 1999. Cadmium and lead exposure associated with reduced growth rates, poorer fledging success of Little Blue Heron chicks *Egretta caerulea* in South Louisiana wetlands. *Arch. Environ. Con. Tox.* 37: 377-384.
- Spencer, K.A., Heidinger, B.J., D'Alba, L.B., Evans, N.P. & Monaghan, P.** 2010. Then versus now: Effect of developmental and current environmental condition on incubation effort in birds. *Behav. Ecol.* 21: 999-1004.
- Stahl, R.G. Jr.** 1997. Can mammalian and non-mammalian "Sentinel Species" data be used to evaluate the human health application of environmental contaminants? *Hum. Ecol. Risk Assess.* 3: 329-335.
- Taggart, M.A., Figuerola, J., Green, A.J., Mateo, R., Deacon, C., Osborn, D. & Meharg, A.A.** 2006. After the Aznalcollar mine spill: Arsenic, zinc, selenium, lead and copper levels in the livers and bones of five waterfowl species. *Environ. Res.* 100: 349-361.
- Tilgar, V., Ots, I. & Mänd, R.** 2004. Bone alkaline phosphatase as a sensitive indicator of skeletal development in birds: a study of Great Tit nestlings. *Physiol. Biochem. Zool.* 77: 530-535.
- Tortosa, F.S. & Caballero, J.M.** 2002. Effect of rubbish dumps on breeding success, age of first breeding and migration in the White Stork in Southern Spain. *Waterbirds* 25: 39-43.
- Vasseur, P. & Cossu-Leguille, C.** 2006. Linking molecular interactions to consequent effects of persistent organic pollutants (POPs) upon populations. *Chemosphere* 62: 1033-1042.
- Velando, A., Álvarez, D., Mouriño, J., Arcos, F. & Barros, A.** 2005. Populations trends and reproductive success of the European Shag *Phalacrocorax aristotelis* on the Iberian Peninsula following the Prestige oil spill. *J. Ornithol.* 146: 116-120.
- Velando, A., Drummond, H. & Torres, R.** 2006. Senescent birds redouble reproductive effort when ill: Confirmation of the terminal investment hypothesis. *Proc. R. Soc. B*: 273: 1443-1448.
- Verreault, J., Gabrielsen, G.W. & Bustnes, J.O.** 2010. The Svalbard Glaucous Gull as bioindicator species in the European Arctic: Insights from 35 years of contamination research. *Rev. Environ. Contam. T.* 205: 77-116.

- Vos, J.G., Dybing, E., Greim, H.A., Ladefoged, O., Lambre, C., Tarazona, J.V., Brandt, I. & Vethaak, A.D.** 2000. Health effects of endocrine-disrupting chemicals on wildlife, with special reference to the European situation. *Crit. Rev. Toxicol.* 30: 71–133.
- Vyskocil, A., Fiala, Z., Ettlerova, E. & Tenjnorova, I.** 1990. Influence of chronic lead exposure on hormone levels in developing rats. *J. Appl. Toxicol.* 10: 301–302.
- Walker, C.H., Hopkin, S.P., Sibly, R.M. & Peakall, D.B.** (eds). 2001. *Principles of ecotoxicology*. New York: Taylor & Francis.
- White, L.D., Cory-Slechta, D.A., Gilbert, M.E., Tiffany-Castiglioni, E., Zawia, N.H., Virgolini, M., Rossi-George, A., Lasley, S.M., Qian, Y.C. & Basha, Md.R.** 2007. New and evolving concepts in the neurotoxicology of lead. *Toxicol. Appl. Pharm.* 225: 1–27.
- Wiens, J.A., Day, R.H., Murphy, S.M. & Parker, K.R.** 2004. Changing habitat and habitat use by birds after the Exxon Valdez oil spill, 1989-2001. *Ecol. Appl.* 14: 1806–1825.
- Wikelski, M., Wong, V., Chevalier, B., Rattenborg, N. & Snell, H.** 2002. Marine iguanas die from trace oil pollution. *Nature* 417: 607–608.
- Wingfield, J.C. & Kitaysky, A.S.** 2002. Endocrine responses to unpredictable environmental stress: Stress or anti-stress hormones? *Integr. Comp. Biol.* 42: 600–609.
- Wingfield, J.C. & Mukai, M.** 2009. Endocrine disruption in the context of life cycles: Perception and transduction of environmental cues. *Comp. Endocrin.* 163: 92–96.
- Wong, S., Fournier, M., Coderre, D. & Krzystyniak, K.** 1992. Environmental immunotoxicology. In Peakall, D.B. (ed): *Animal biomarkers as pollution indicators*. Pp. 167–189. Chapman & Hall.
- Woodward, R.L., Percival, H.F., Rauschenberger, R.H., Gross, T.S., Rice, K.G. & Conrow, R.** 2011. Abnormal alligators and organochlorine pesticides in Lake Apopka, Florida. In Elliott, J.E., Bishop, C. & Morrissey, C. (eds): *Wildlife ecotoxicology: Forensic approaches, emerging topics in ecotoxicology*. Pp. 153–187. New York: Springer.
- Zuberogoitia, I., Martínez, J.A., Iraeta, A., Azkona, A., Zabala, J., Jiménez, B., Merino, R. & Gómez, G.** 2006. Short term effects of the Prestige oil spill on the Peregrine Falcon *Falco peregrinus*. *Mar. Pollut. Bull.* 52: 1176–1181.