

**Evaluación del estrés en pollos de cigüeña blanca (*Ciconia ciconia*) en un gradiente de uso de vertederos como fuente de alimento.**

**Septiembre, 2017**

**Claudia Santillán Arnaiz**

**Director: José Ignacio Aguirre**

**Codirector: Javier Pineda Pampliega**





**Universidad Complutense de Madrid  
Máster Universitario en Zoología**

**Evaluación del estrés en pollos de cigüeña  
blanca (*Ciconia ciconia*) en un gradiente de uso  
de vertederos como fuente de alimento.**

**- Trabajo Fin de Máster -**

**Claudia Santillán Arnaiz**

**Departamento de Zoología y Antropología Física. Facultad de  
Biología. Universidad Complutense de Madrid (España).**

**Septiembre, 2017**

**Autora:  
Claudia Santillán Arnaiz**

**Fdo.: \_\_\_\_\_**

**Codirector:  
Javier Pineda Pampliega**

**Director:  
Jose Ignacio Aguirre**

**Fdo.: \_\_\_\_\_  
Dpto. de Zoología y Antropología Física.  
Facultad de Biología. Universidad  
Complutense de Madrid (España).**

**Fdo.: \_\_\_\_\_  
Dpto. de Zoología y Antropología  
Física. Facultad de Biología.  
Universidad Complutense de  
Madrid (España).**

## Índice

1. Introducción.....	1
2. Objetivos .....	6
3. Material y métodos .....	6
3.1. Área de estudio.....	6
3.2. Evaluación del ratio H/L .....	7
3.3. Evaluación de las barras de falta .....	10
3.4. Análisis estadísticos.....	12
4. Resultados .....	13
4.1. Frotis sanguíneos: ratio H/L.....	13
4.2. Plumas.....	14
4.2.1. Presencia - ausencia de barras de falta .....	14
4.2.2. Número de barras de falta.....	15
4.3. Frotis y plumas: ratio H/L, número y presencia/ausencia de barras de falta.....	16
5. Discusión.....	17
6. Conclusiones.....	20
7. Agradecimientos.....	20
8. Bibliografía .....	21

## Resumen

A lo largo del tiempo, la cigüeña blanca ha sido estudiada desde múltiples puntos de vista, tanto ecológicos como comportamentales. Se han analizado los cambios en su migración, en su dieta o en su nidotópica, muy a menudo asociada al ser humano; sin embargo aún hay relativamente poca información sobre los cambios en los parámetros fisiológicos relacionados con esta convivencia.

El presente trabajo estudia los diferentes valores de estrés que pueden tener los pollos de cuatro colonias de cigüeña blanca de la Comunidad de Madrid, atendiendo al tipo de alimentación predominante de cada una de ellas según su proximidad a los vertederos de residuos sólidos urbanos. La evaluación del estrés se realiza a través de la estima de la relación entre heterófilos y linfocitos (ratio H/L) así como de la presencia de barras de falta en las plumas, intentando dilucidar si ambas muestran diferentes valores para las diferentes colonias, además de ver si existe una posible correlación directa entre ellas.

Los resultados muestran que a pesar de que ninguno de los análisis presentó una significación estadística, sí que se observan tendencias que indican que las colonias más cercanas a los vertederos tienen valores más bajos tanto de ratio H/L, como de presencia-ausencia y número de barras de falta. También se muestra una correlación ligeramente positiva entre las barras de falta y el ratio H/L como indicadores de estrés.

**Palabras clave:** Barras de falta, *Ciconia ciconia*, Comunidad de Madrid, Estrés, Ratio H/L, Recursos tróficos, Vertedero.

**Key words:** *Ciconia ciconia*, Community of Madrid, Fault bars, H/L ratio, Rubbish dump, Stress, Trophic resources.

## 1. Introducción

Las actividades del ser humano cambian y evolucionan arrastrando consigo a las especies que conviven con él. El incremento y la modificación de zonas urbanizadas durante las últimas décadas (Ministerio de Fomento, 2006, 2016), ha provocado que la biología de muchas especies asociadas a asentamientos humanos haya sufrido alteraciones sustanciales (McKinney, 2008). Aspectos relacionados con la explotación del alimento (Faeth *et al.*, 2005; Fischer *et al.*, 2012), la variación fenotípica (Lande & Shannon, 1996) e incluso los hábitos migratorios (Del Riego, 2015), han sufrido cambios drásticos en muchas especies animales.

También en las últimas décadas y debido a las imposiciones de las legislaciones europeas, la generación, disposición y gestión de los vertederos de residuos sólidos urbanos se ha modificado (Directiva 2008/98/CE), creando una nueva fuente de recursos tróficos que son aprovechados por numerosas especies, entre ellas, por la cigüeña blanca (*Ciconia ciconia*, L. 1758) (Tortosa *et al.*, 2002).

Esta será la especie modelo elegida para este estudio. Ciconiforme de aproximadamente un metro de alto y dos de envergadura, es una especie utilizada en numerosas investigaciones relacionadas con los efectos antrópicos sobre la fauna, bien como bioindicadora de contaminación química (Blázquez *et al.*, 2006), desde el punto de vista de la conservación (Tryjanowski *et al.*, 2009), o incluso mediante el estudio directo de aspectos propios como la migración (Shamoun-Baranes *et al.*, 2003; Shephard *et al.*, 2015; Flack *et al.*, 2016) o su fenología (Ptaszyk *et al.*, 2003).

Sus nidos suelen ser muy llamativos y generalmente ponen un promedio de unos 4 huevos entre los meses de abril y mayo. Ambos padres participan tanto en la incubación, que dura alrededor de 5 semanas, como en la cría de polluelos ya que estos se alimentan únicamente de la comida proporcionada por sus progenitores. Hasta que la nidada puede valerse por sí misma y abandonar el nido pasarán entre 50 y 70 días. No obstante, las 3 primeras semanas del desarrollo en el nido son críticas, ya que los pollos deben alimentarse exclusivamente de alimentación natural, aún no termorregulan por

sí mismos y son muy sensibles a las condiciones ambientales, lo que a su vez les hace susceptibles a enfermedades (Jovani & Tella, 2004; Eggers *et al.*, 2015). Unas buenas condiciones alimenticias permiten el correcto y rápido desarrollo de la prole e incluso determinan tamaños de puesta más grandes (Djerdali *et al.*, 2008).

Su dieta se basa principalmente en insectos, anfibios y pequeños roedores, y nidifican preferentemente en campos húmedos abiertos, dos variables cada vez más reducidas debido al monocultivo extensivo, al empleo de herbicidas o a la consecuente expansión y ocupación humanas de los campos y pastos (Kosicki, 2010). En España, además de en las zonas naturales, la nueva gestión de los vertederos comentada anteriormente, ha provocado que esta especie nidifique ahora también en zonas antropizadas.

La nueva fuente de alimento que representan los vertederos, que es constante durante todo el año y que no requiere de técnicas de caza por parte de las cigüeñas, ha desencadenado un incremento poblacional de la especie (Tortosa *et al.*, 2002), que desde mediados del siglo XX había visto reducidas sus poblaciones (Chozas, 1984). Pero también ha provocado que determinados individuos o poblaciones reduzcan su actividad migratoria tanto en el tiempo como en el espacio, llegando en algunos casos y especialmente en individuos de edades más avanzadas, a suprimirlas totalmente. (Del Riego, 2015).

Los vertederos también presentan desventajas; como que además de comida también hay objetos de plástico, gomas y residuos que, por ejemplo en aves marinas se ha visto que llegan a afectar, además de a los padres, directamente a los pollos (Ryan, 1988). Incluso se ha comprobado que aves que tenían cuerpos plásticos en su estomago se mostraban más aletargadas e incluso desorientadas (Peris, 2003).

Entonces, si la creación de estos espacios está afectando a un patrón comportamental tan arraigado como la migración de las cigüeñas, ¿qué efectos negativos o positivos podrían estar provocando los vertederos o la influencia antrópica? Puede que ahora las cigüeñas que no tengan esa disponibilidad continua de alimento y que dependan de las zonas naturales y de sus dotes de caza, probablemente padezcan un mayor estrés trófico.

La respuesta fisiológica a un estrés ya sea natural o inducido y que incluso es común para los 5 taxones de vertebrados, consiste en una cascada de efectos que en última instancia provoca un aumento de los niveles de hormonas glucocorticoides suprarrenales en el plasma sanguíneo. En aves, esta hormona mayoritaria es la corticosterona, y provoca un aumento de heterófilos (neutrófilos en humanos) a la vez que disminuye los niveles de linfocitos en sangre. Para medir las concentraciones de corticosterona en sangre a través de esta fluctuación de tipos leucocitarios, se utiliza el llamado ratio heterófilos/linfocitos o ratio H/L (Davis *et al.*, 2008).

Desde que se empleó por primera vez la técnica del estudio del ratio H/L en pollos de corral (Gross & Siegel, 1983), son cada vez más las ocasiones en las que los parámetros leucocitarios también se utilizan en aves silvestres para ver las relaciones de los factores de estrés con la radiación (Camplani *et al.*, 1999), la migración (Owen & Moore, 2006) o elementos de salud y bienestar.

En aves de corral, se ha demostrado incluso que altos valores del ratio H/L en los pollos recién nacidos, puede indicar una mayor probabilidad de contracción de enfermedades e infecciones en un futuro (Al-Murrani *et al.*, 2002). O que si se reduce la cantidad de alimento proporcionado, aumentan los niveles tanto de corticosterona plasmática como del ratio H/L (Davis *et al.*, 2000).

El ratio H/L no solo está relacionado directamente con el estrés fisiológico del ave, sino que también requiere un muestreo muy poco invasivo, rápido y relativamente barato. Para un estudio de la corticosterona se requiere casi seis veces más volumen de sangre (Washburn *et al.*, 2002), que para evaluar el ratio H/L, ya que basta con tan sólo realizar un frotis sanguíneo para el que se necesita prácticamente una gota de sangre (unos 10 microlitros). Además, se ha comprobado que los niveles de corticosterona en plasma aumentan drásticamente justo después de la captura del animal (Romero & Reed, 2005), mientras que el ratio H/L no aumentaba en absoluto y era mantenido incluso una hora después de la captura (Davis, 2005). Esto hace que el ratio H/L sea una medida más estable para medir el estrés ambiental. Curiosamente, a la hora de medir un estrés crónico, utilizar el ratio H/L parece de nuevo la decisión más acertada, ya que se ha estudiado que una exposición



crónica a elementos estresantes en pollos, provoca aumentos tanto en la corticosterona como en el ratio H/L, pero tras una semana, mientras este último se mantenía elevado, las concentraciones plasmáticas de corticosterona habían disminuido a valores normales (McFarlane *et al.*, 1989).

Sin embargo y pese a todas las ventajas que presenta el empleo del ratio H/L para evaluar la situación o situaciones de estrés a las que ha podido estar sometida un ave, proporciona escasa información por ejemplo, sobre las capacidades de adaptación como puede ser su disposición para desencadenar su respuesta inmune (Davis *et al.*, 2008). Es por eso que, en este caso se ha decidido completar la información sobre el estrés ambiental que proporcionan los frotis y sus correspondientes valores de ratio H/L, con los datos sobre estrés que pueden proporcionar, por ejemplo, las barras de falta en las plumas.

El plumaje es uno de los elementos anatómicos más importantes que posee un ave, sus funciones son muy diversas y van desde la proporción de un asilamiento térmico y protección ante radiación solar o agua, hasta la comunicación, el éxito reproductor o el camuflaje, pasando por el soporte mecánico o el transporte de agua (Senar, 2004). Se da por sentado entonces que un fallo en este elemento clave puede provocar graves problemas al ave.

La anomalía más común en las plumas son las barras de falta. Son bandas que aparecen perpendiculares al raquis y que se deben al crecimiento incompleto de las bárbulas que conectan las barbas adyacentes; indican una regeneración anormal (dismorfogénesis) de la pluma (Domènech & Senar, 1997). Pueden ser desde una simple muesca de difícil apreciación en la superficie del estandarte, hasta una ausencia total de bárbulas que permiten ver a través de la pluma (Jovani & Diaz-Real, 2012).

La controversia aparece a la hora de intentar discernir qué factores son los que influyen a la hora de que un ave desarrolle barras de falta en sus plumas. Una cosa está clara, son una respuesta a un estrés que el ave padece durante la formación o regeneración de esa pluma (Jovani & Diaz-Real, 2012). Sin embargo, el factor estresante no es tan fácil de determinar.



Por una parte, se conoce que cada par de bandas de crecimiento que se dan en las plumas, también perpendiculares al raquis y formadas cada 24h (Senar, 2004), están relacionadas con la condición corporal del ave, ya que son más anchas cuanto mejor estado nutricional posea el individuo (Grubb, 1989). Bajo la suposición de que algo parecido ocurre con las barras de falta, se llegó a considerar en un principio el hambre o la desnutrición como únicos causantes del estrés (Harrison, 1985), no obstante y con el avance de las investigaciones, a la malnutrición se han sumado factores como la manipulación humana (King & Murphy, 1984; Machmer *et al.*, 1992; Negro *et al.*, 1994), las condiciones ambientales (Jovani & Tella, 2004), el tamaño del nido o la perturbación humana (Erritzoe, in press), conformando así un complejo de factores de estrés con el elemento común de que todos afectan directa o indirectamente a los procesos metabólicos (Buchanan, 2000).

Por otra parte, también hay que tener en cuenta que se trata de pollos de cigüeña, no de adultos, y que el período de crecimiento de las plumas es un momento muy delicado ya que existe un compromiso entre el crecimiento de estructuras corporales y el desarrollo de las plumas. Por ello, los pollos son mucho más sensibles al estrés aún siendo éste bajo, por lo que serán más propensos a generar barras de falta (Jovani & Blas, 2004).

Por lo tanto, sabiendo por un lado que, gracias a las investigaciones previas expuestas, la principal causa de la formación de barras de falta en las plumas es el estrés y conociendo por otra parte que las 4 colonias de cigüeña blanca estudiadas tienen 4 tipos de alimentación diferentes (ingiriendo más o menos alimento natural o procesado, lo que a su vez conlleva más o menos tiempo de los parentales en el nido); se plantea muy interesante la idea de estudiar si a través de las anomalías en las plumas se puede conocer si un determinado tipo de alimentación provoca un mayor o menor estrés en el pollo.

Entonces, si el ratio H/L permite estimar el estrés padecido por un ave y dado que las barras de falta se forman bajo situaciones también de estrés, se ha decidido estudiar también si ambos parámetros podrían estar relacionados. De manera que un pollo que presente un ratio H/L elevado y que por tanto ha estado sometido a un estrés, muestre también más barras de falta en sus plumas que otro que tiene los valores H/L más bajos.

## 2. Objetivos

La investigación pretende estudiar las posibles relaciones entre el ratio H/L y las barras de falta con el tipo de alimentación diferente y característico de cada una de las 4 colonias estudiadas en la Comunidad de Madrid, analizando y comprobando a su vez si existe una relación entre el ratio H/L y las barras de falta como medidas de estrés en pollos de cigüeña blanca. Por lo tanto el objetivo principal será dar respuesta a las siguientes preguntas:

1. ¿Hay algún tipo de relación entre el ratio H/L o las barras de falta y el estrés ambiental medido en un gradiente de alimentación en la Comunidad de Madrid?
2. ¿Existe una correlación entre el ratio H:L y las barras de falta?

## 3. Material y métodos

### 3.1. Área de estudio

Para el muestreo de la presente investigación se seleccionaron cuatro colonias de cigüeña blanca en la Comunidad de Madrid correspondientes a las localidades de Pinilla del Valle (30T 431266, 4531897), Prado Herrero (30T 430936, 4510821), Alcalá de Henares (30T 468694, 4481135) y La Torrecilla (30T 447312, 4462710) (Figura 1).



Figura 1. Localización de las colonias muestreadas en la primavera del 2014 en la Comunidad de Madrid.

El criterio de selección, atendió al tipo de alimentación de estas aves teniendo en cuenta las distancias de las colonias a vertederos de residuos sólidos urbanos (VRSU), basándose en que una mayor proximidad conlleva un mayor uso de los mismos. Se creó así un gradiente de alimentación clasificado en: alimentación natural (Pinilla), seminatural (Prado Herrero), semiartificial (Alcalá) y artificial (La Torrecilla); que además, se distribuye de norte a sur.

Una alimentación natural implica que los padres alimentan a los polluelos únicamente con comida de origen natural, mientras que una alimentación artificial conlleva una dieta exclusivamente de alimentos procedentes de vertederos. La alimentación seminatural atiende a un 60% de alimentación natural y un 40% de alimentación en vertederos, y la semiartificial con un 40% alimentación natural y un 60% de alimentación en vertederos. Hay que tener en cuenta que durante las dos primeras semanas de vida de los pollos y por razones puramente mecánicas, estos solo pueden recibir alimentación natural en todos los casos.

La recogida de muestras tuvo lugar entre el 23 de mayo y el 6 de junio del 2014. Se anillaron todos los pollos de cada nido aunque no se muestrearon todos los nidos de cada localidad.

### **3.2. Evaluación del ratio H/L**

El material revisado en esta investigación como son los frotis sanguíneos y las plumas, fue cedido por Javier Pineda y José I. Aguirre, pertenecientes al departamento de Zoología y Antropología Física de la Universidad Complutense de Madrid.

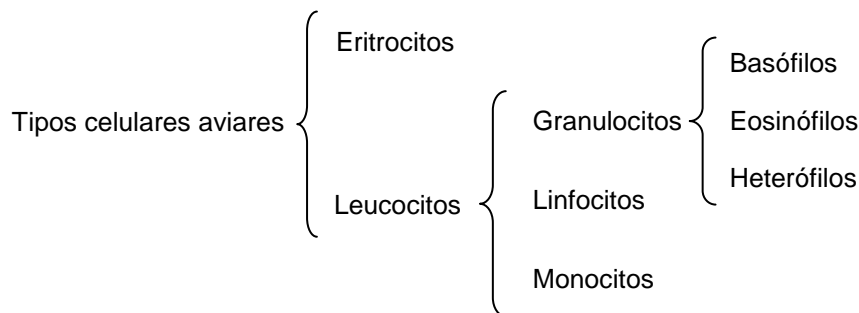
Durante la temporada de cría del 2014, se obtuvieron frotis sanguíneos, mediante una extracción de unos 3ml de sangre de la vena braquial de pollos de entre 21 y 58 días de desarrollo en el nido. Inmediatamente después, se colocó una gota en un portaobjetos para realizar el frotis correspondiente. En el laboratorio se fijó con etanol al 100% y se tiñó con la técnica de Giemsa (Jovani *et al.*, 2002).

Posteriormente se procedió al recuento celular de los frotis mediante microscopía óptica, siguiendo para todos ellos el mismo procedimiento y siendo siempre la misma persona quién los realizaba.

Con el objetivo de inmersión (100x10 aumentos), la luz casi al máximo y un contraste abierto aproximadamente un 40%, se comenzó a revisar la muestra hasta contar un total de 100 tipos celulares de leucocitos. Dado que este recuento se realiza en una superficie plana y no se puede estimar el número de tipos de leucocitos por volumen sanguíneo, se llevaron a cabo tres recuentos de eritrocitos aviares repartidos durante el conteo de los 100 tipos celulares de leucocitos.

No se cuantificaron las células que se encontraban sobrepasando o rozando los bordes del campo del microscopio.

Gracias a la tinción, en cada frotis pueden distinguirse:



Los más frecuentes serían los eritrocitos > linfocitos > heterófilos > monocitos > basófilos > eosinófilos.

Aunque se contaron todos los tipos celulares señalados, dado que el dato a obtener es el ratio heterófilos/linfocitos, a continuación se describen dichos tipos celulares para favorecer su reconocimiento.

- Los linfocitos aviares recuerdan a los linfocitos propios de mamíferos, suelen ser más o menos redondeados, con un núcleo que ocupa casi todo el interior celular dejando un citoplasma escaso, irregular, oscuro y con inclusiones granulares (Camp-bell & Ellis, 2007).

Dado que son pollos en desarrollo, muchas veces aparecen fases de la eritropoyesis que pueden llevar a la confusión con posibles linfocitos, ante la duda, no se contabilizan (Fig. 2).

- En cuanto a los heterófilos, se asemejan a los neutrófilos de los mamíferos, son relativamente redondeados, con un núcleo bi o trilobulado y un citoplasma generalmente transparente aunque a veces puede verse oscurecido por los gránulos citoplasmáticos (Camp-bell & Ellis, 2007) (Fig.2).

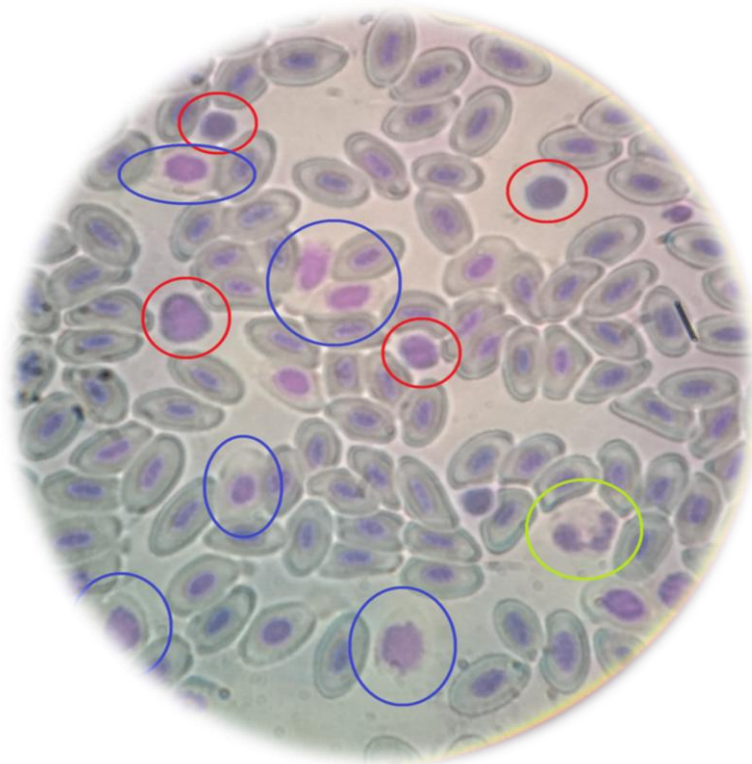


Figura 2. Se muestra una imagen correspondiente a un campo del microscopio a 1000X en la que se señalan los eritrocitos en fases de desarrollo rodeados en azul, los linfocitos en rojo y los heterófilos en verde. El resto de células de la imagen son eritrocitos. Fotografía: Claudia Santillán.

Al finalizar el recuento de todas las muestras recogidas, se volvieron a revisar al menos tres de los primeros frotis examinados para comprobar la repetibilidad de las medidas.

### 3.3. Evaluación de las barras de falta

En cuanto a las plumas, se seleccionaron las coberteras escapulares (Fig.3) (aunque también se puede trabajar con las rémiges o rectrices) porque son las primeras en desarrollarse totalmente (aproximadamente a los 30 días). De esta manera queda asegurado que el pollo las tenga y porque son las que suelen presentar mayor variación ambiental. La extracción debe ser siempre en la misma región para todos los pollos y se realizó mediante tracción manual. El número total de plumas obtenidas de cada pollo nunca superó la decena. Una vez adquiridas, se introdujeron en sobres de papel.

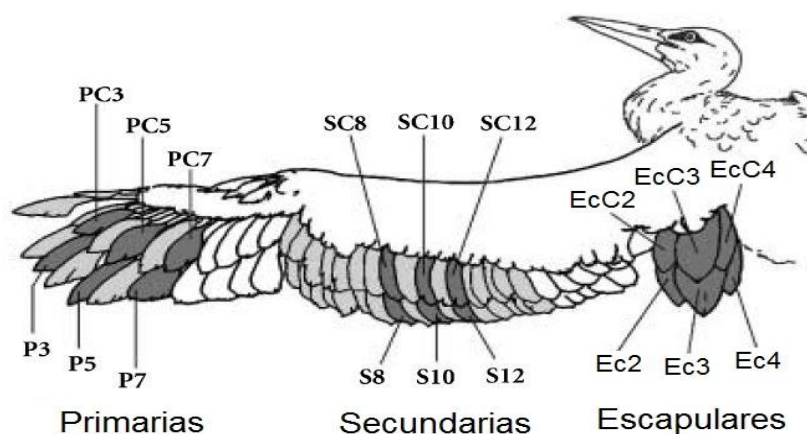


Figura 3. Esquema del ala izquierda de un pollo de *Ciconia ciconia* donde se muestra la localización de las plumas de estudio (EcC=cobertera escapular). Modificado de Jovani & Blas (2004).

En el laboratorio se procedió al pesado (en gramos) y a la medición (en milímetros) de las plumas. Se analizaron un máximo de 3 plumas por individuo sacándolas de manera aleatoria de los sobres a la hora de estudiarlas.

Para pesarlas (balanza Kern PCB  $\pm 0,001g$ ), se colocaron con la combadura hacia arriba para que las plumas grandes pudieran caber en el plato de pesado. Una vez colocada, se esperó un mínimo de 3 segundos a que se estabilizara la báscula antes de apuntar el peso.

Para la medición, se colocaron sobre un papel milimetrado y, sin tener nunca en cuenta el plumón, se tomaron las siguientes medidas, que pueden verse representadas en la figura 4:

- La longitud total de bandera (LTB).
- El ancho máximo (AM).
- El número de barras de falta (BF1, BF2,...).

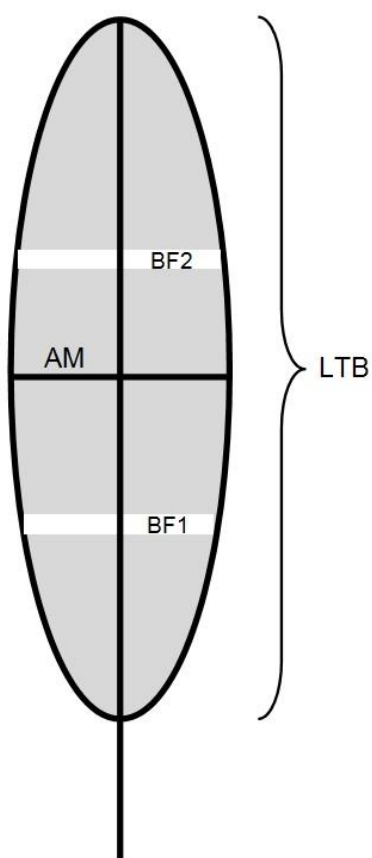


Figura 4. Esquema de una pluma estándar con dos barras de falta (BF1 y BF2) en la que se muestran las medidas tomadas. Longitud total de bandera (LTB) y ancho máximo (AM).

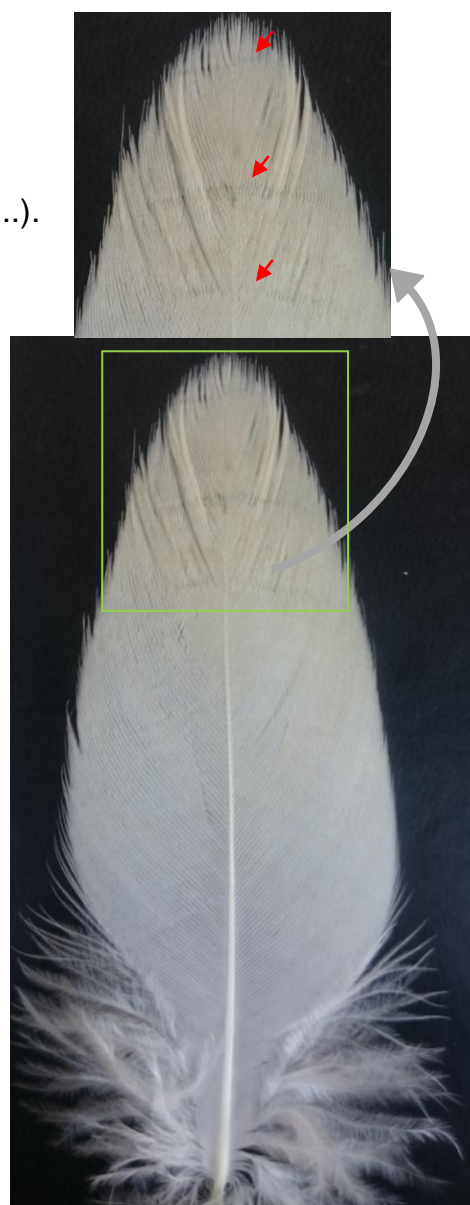


Figura 5. Pluma cobertera escapular de *Ciconia ciconia* en la que se aprecian 3 barras de falta (señaladas en rojo). Fotografía: Claudia Santillán.

Las barras de falta (Fig.5) se contabilizaron como tal, únicamente si salían directamente del raquis, en el que caso de que empezaran en mitad del estandarte, no se computaron. Fueron numeradas del cálamo hacia arriba.



### 3.4. Análisis estadísticos

Además de las variables de estudio (ratio H/L y barras de falta), durante la recogida de datos en el campo, se registraron covariables como: número de hermanos, nido, localidad, longitud del pico y del tarso y la edad.

Dada la cantidad de covariables a considerar, para poder seleccionar el modelo estadístico óptimo, se han seguido procedimientos *backwards* de manera que se comenzó introduciendo todas las covariables, para luego ir extrayendo del modelo aquellas que dieron resultados no significativos, empezando por las que presentaban valores de p más altos.

Durante todo el proceso de análisis estadísticos y para todos los apartados contemplados a continuación, se ha comprobado que la distribución de los residuos es normal.

También es muy importante aleatorizar los datos para evitar pseudorréplicas, ya que al ser un estudio con grupos de hermanos hay que tener en cuenta el efecto de la consanguinidad. Por este motivo, se introdujeron como factores aleatorios los nidos tanto para los análisis con los frotis como para los estudios con las barras de falta. Además, en el caso del estudio de las plumas se han realizado los análisis con el promedio de todos los datos, obtenidos de todas las barras de falta de todas las plumas de un mismo pollo, consiguiendo así una media por individuo.

-Para comprobar si existen diferencias significativas en el ratio H/L entre localidades, se construyó un modelo lineal general mixto con el ratio H/L como variable respuesta y el resto de covariables (localidad y número de hermanos) como variables explicativas. Como se ha comentado anteriormente, se fueron extrayendo una a una las variables que no daban significación, eliminando primero la menos significativa. En ningún caso se quitó la variable localidad puesto que es la variable a analizar.

-En el caso de las plumas, tanto para ver si existían diferencias significativas entre localidades en el número de barras de falta, como en la presencia-ausencia de las mismas, se procedió de manera análoga al análisis estadístico con el ratio H/L. En este caso, con la salvedad de que se introdujo la variable longitud total de bandera de la pluma (LTB) como factor de corrección, ya que una pluma más pequeña o joven tiene menos probabilidades de presentar barras de falta, por lo que fue necesario corregir ese sesgo. Por esta razón y al igual que ocurre con la variable localidad, LTB nunca se elimina de los análisis durante el procedimiento *backwards*. Para la comparación de la presencia-ausencia de barras de falta con la localidad, puesto que es una variable binomial, se realizó un modelo lineal generalizado mixto.

- Finalmente, para poder investigar si el ratio H/L está relacionado con el número de barras de falta o con la presencia o ausencia de ellas, se realizó un modelo de regresión lineal.

El software estadístico utilizado para todos los análisis fue el R 3.4.0 (R Core Team, 2017), usando los paquetes *lme4* (Bates *et al.*, 2017), *Matrix* (Bates & Maechler, 2017), *lmerTest* (Kuznetsova *et al.* 2016) y *car* (Fox *et al.*, 2017).

## 4. Resultados

### 4.1. Frotis sanguíneos: ratio H/L

No se han encontrado diferencias significativas entre localidades en cuanto al ratio H/L (Tabla 1).

Se observa que Alcalá de Henares tiene el valor medio más alto, aunque queda muy cercano al valor de Pinilla. La localidad de Prado Herrero obtiene más o menos valores intermedios y en La Torrecilla se recogen los datos más bajos.

Tabla 1. Se muestran los valores medios y su desviación típica, del ratio H/L para las 4 localidades de estudio, así como los valores de F y p obtenidos.

	Pinilla	Prado Herrero	Alcalá de Henares	La Torrecilla	F	p valor
Ratio H/L	0,82 ± 0,51	0,73 ± 0,46	0,84 ± 0,52	0,54 ± 0,24	0,9896	0,4091

## 4.2. Plumas

### 4.2.1. Presencia - ausencia de barras de falta

El análisis se ha llevado a cabo por localidades pero en este caso al ser una variable binomial de presencia/ausencia, no se obtienen valores de F sino de chi cuadrado y su p correspondiente (Tabla 2). A la vista queda que aparentemente la localidad no tiene un efecto sobre el hecho de que los pollos de las mismas presenten o no barras de falta en sus plumas.

Tabla 2. Se muestran los resultados obtenidos en la prueba de chi cuadrado y de p-valor, manteniendo la longitud de bandera de la pluma (LTB) como valor de corrección.

Presencia - ausencia de barras de falta		
	chi cuadrado	p valor
Localidad	2,9073	0,4061
LTB	2,2361	0,1348

Se realizó también un estudio en cada localidad para conocer el porcentaje de individuos que presentaban o no barras de falta. De esta manera, y tal y como se muestra en la figura 6, Alcalá y La Torrecilla presentan un casi un mismo número de pollos con y sin barras de falta. Sin embargo, parece que prima con bastante más fuerza la presencia de esta anomalía en las plumas, en Pinilla con más del 60% y en Prado Herrero con un 83%.

Con esto se indica que el orden de localidades según tengan más porcentaje de pollos con barras de falta que pollos sin ellas, sería: Prado Herrero > Pinilla > La Torrecilla > Alcalá de Henares.

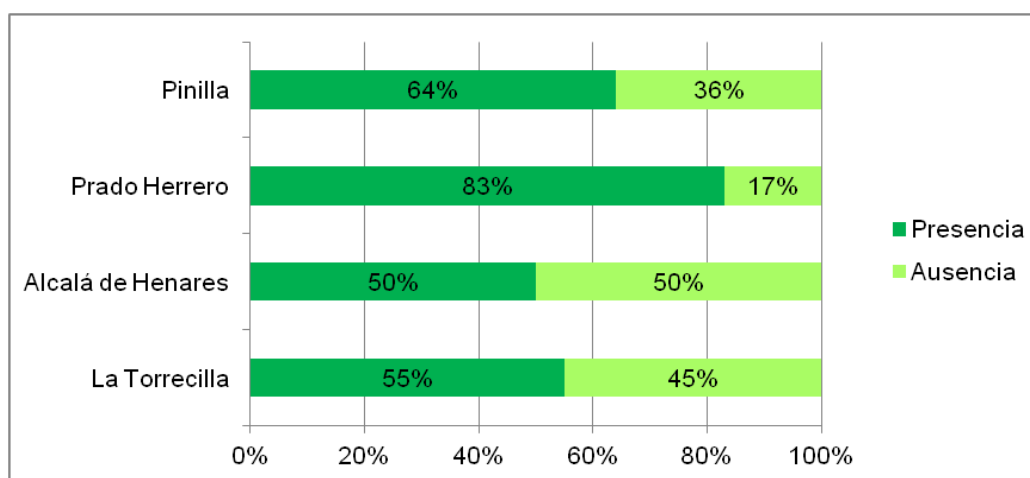


Figura 6. Representación gráfica del porcentaje de pollos que presentan barras de falta en sus plumas y del porcentaje de los mismos que no las presentan, atendiendo a las 4 localidades.

#### 4.2.2. Número de barras de falta

En cuanto al análisis del número de barras de falta por localidades, según los resultados de los análisis estadísticos, parece que la localidad en la que se críen los pollos no influye en cuanto al número de barras de falta en las plumas de los mismos se refiere, ya que no se muestran diferencias significativas (Tabla 3).

Tabla 3. Resultados obtenidos en el análisis del número de barras de falta según la localidad y con la longitud total de bandera de la pluma (LTB) como valor de corrección.

	Número de barras de falta	
	F	p valor
Localidad	2,2527	0,1070
LTB	0,8278	0,3668

Tal y como se observa en la figura 7, Prado Herrero obtiene el mayor número de barras de falta con una de media de 0,83; seguido de Pinilla. La Torrecilla obtiene valores intermedios entre las dos localidades aledañas en el gráfico y Alcalá de Henares, con 0,24, se corresponde con el menor número de barras de falta en las plumas de los pollos que se crían allí.

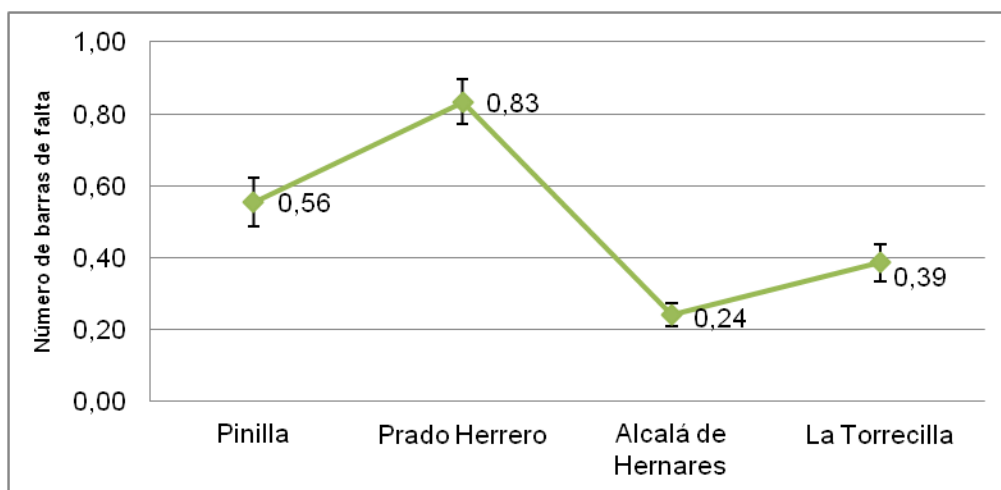


Figura 7. Se representan las medias del número de barras de falta por localidad con sus errores típicos correspondientes.

### 4.3. Frotis y plumas: ratio H/L, número y presencia/ausencia de barras de falta

Aunque se sugiere que un aumento del ratio H/L en sangre provoca un ligero incremento del número de barras de falta en la pluma (Fig. 8), los resultados no quedan respaldados estadísticamente (Tabla 4).

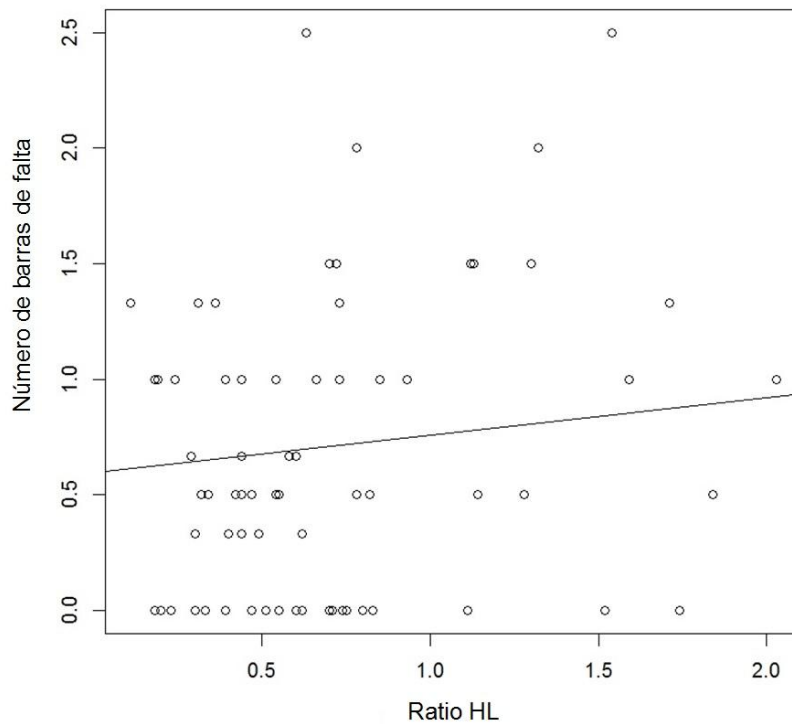


Figura 8. Se representa un diagrama de dispersión con el ratio H/L en el eje X y el número de barras de falta en el Y.

Tabla 4. Se muestran los valores de F y p para el estudio conjunto del ratio H/L con el número de barras de falta (BDF) y con la presencia/ausencia de barras de falta.

	Ratio H/L	
	F	p valor
Número de BDF	1,0411	0,3112
Presencia/ausencia de BDF	0.20574	0,6517

## 5. Discusión

Tal y como se presenta en la introducción, una de las principales ventajas de los vertederos es que son una fuente de alimento constante y fácil de conseguir, lo que probablemente deriva en un menor estrés alimenticio y con ello una reducción del estrés crónico de los pollos.

A la vista de los resultados queda patente que el valor de ratio H/L más bajo lo presenta la colonia de La Torrecilla, que se corresponde con un 100% de alimentación en vertederos, además de que se ha observado que hay un menor porcentaje de pollos con barras de falta y con menor número de ellas en las colonias con mayor proporción de alimento en vertederos. Si bien los datos no quedan respaldados con una significación estadística, no es difícil asociar que una mayor cercanía a los vertederos implica una provisión continua de alimento (Vergara *et al.*, 2003), así como un menor tiempo empleado en la caza, lo que se traduce en que los pollos no tendrían prácticamente carencias alimenticias y su tiempo solos en el nido sería reducido drásticamente. La suma de todo ello conlleva que los pollos cuyos padres pueden acceder a los recursos de los vertederos, tengan un menor estrés, lo que se refleja en ratios H/L bajos así como en una menor aparición y número de barras de falta.

En contraposición surge el efecto opuesto, de manera que las colonias cuya alimentación natural constituye entre el 60 y el 100% de su dieta, se obtiene que sus pollos poseen unos mayores niveles de estrés ya que pueden no estar todo lo bien alimentados que deberían dado que sus fuentes de alimento no son tan permanentes, además de pasar más tiempo solos en el nido.

Pero no todo lo que presentan los vertederos son ventajas, ya que hay factores que en este estudio no se han evaluado como que el alimento que allí se encuentra puede ser muy abundante pero no tiene por qué ser de calidad (Polo, 2016). De manera que aunque el pollo tenga su sustento diario este puede no estar aportándole todos los nutrientes necesarios, por lo que padecería un estrés alimenticio aunque tenga acceso a una fuente constante de alimento. Esto puede ser una razón por la que los resultados obtenidos no presenten grandes diferencias entre los distintos tipos de alimentación y que sean no significativos estadísticamente.

Es más, tal y como se comenta, cuando se analizan tanto la presencia- ausencia como el número de barras de falta se obtiene que son menores en Alcalá y en La Torrecilla (las más relacionadas con vertederos). Pero curiosamente dentro de estas dos La Torrecilla presenta valores ligeramente más altos. Si se enlaza con lo anterior y sabiendo que las colonias de Alcalá aún incluyen un 40% de alimentación natural su dieta, quizá las carencias que implica una dieta exclusiva de vertederos sean subsanadas si mantienen un mínimo de su dieta natural, lo que se traduce en un nivel de estrés incluso menor.

No obstante, esta singularidad no se da al analizar el ratio H/L ya que Alcalá presenta valores mucho más altos que La Torrecilla. En este caso y sin haber podido profundizar demasiado en temas inmunológicos, es posible que exista una ligera respuesta inmune frente a la toxicidad de los alimentos del vertedero o los microorganismos presentes, lo cual empañaría los resultados a la hora de medir el ratio H/L puesto que no serían más altos por una respuesta al estrés, sino por una respuesta frente a toxicidad o enfermedad (Davis *et al.*, 2008). También cabe la posibilidad de que estas carencias no impliquen un estrés crónico por lo que no pueden verse reflejadas en esos análisis. Sin embargo y dado que no se ha realizado un estudio inmunológico completo, esto queda únicamente en una mera apreciación.

Ahora bien, hay que tener en cuenta que ambas medidas, tanto el ratio H/L como las barras de falta, son técnicas indirectas por lo que puede que no sean todo lo precisas que deberían, además, en lo referente a las barras de falta, es un campo dónde aún se ha indagado muy poco (Erritzoe, comunicación personal). Posiblemente una medición más directa como puede ser un estudio bioquímico completo de la sangre o una cuantificación directa de la corticosterona en plumas (Blas *et al.*, 2006), serían opciones a considerar y donde es posible que sí se encontrasen diferencias significativas. Sin embargo, en los últimos años, el campo referente a la experimentación o manipulación animal ha requerido del desarrollo de nuevas técnicas y procedimientos que sean lo menos invasivos posibles (Directiva 2010/63/UE), por lo que para el presente estudio fue importante comprobar primero si a través de medidas indirectas y con ello menos invasivas, era posible cuantificar las diferencias



entre colonias en un gradiente alimenticio. Por ejemplo, en el caso de haber llegado a un resultado significativo en la relación del ratio H/L y las barras de falta, implicaría que de cara a futuros estudios, si se quiere medir el estrés ya no haría falta ni siquiera la extracción de sangre, bastaría solo con la extracción de una pluma.

Por otra parte y como otra posible razón para la falta de significación en los resultados, hay que tener en cuenta que los datos obtenidos son solo de una única temporada de cría, por lo que para conseguir una mayor precisión a la vez que se consigue aumentar el tamaño muestral, sería conveniente repetir el procedimiento a lo largo de unos años para tener un estudio mucho más completo y minucioso.

De la misma manera, convendría realizar un estudio climatológico paralelo a los muestreos de las colonias, ya que se ha demostrado que en años estables las parejas criaban ya en su segundo año (normalmente es entre los 3 y los 5 años de edad) (Marchamalo & Traverso, 1996). De esta forma se tendría en cuenta que puede haber años en los que las cigüeñas que tengan mayor porcentaje de alimentación natural, tengan unos picos de estrés más altos porque las condiciones ambientales hayan sido más desfavorables. Siguiendo por esta línea, convendría también tener en cuenta el número de nidos que conforman una colonia ya que los recursos no se repartirían de la misma manera (Vergara & Aguirre, 2006).

Por último, en el caso de este estudio el foco de la atención se centra en los pollos y sin embargo, de la misma manera que unos pueden tener mayor o menor nivel de estrés según de donde consigan el alimento sus padres, también podría estar influyendo en ese estrés la propia edad o experiencia de los progenitores. No es lo mismo un individuo relativamente joven y quizá con menor experiencia, que un individuo más adulto y experimentado (Vergara & Aguirre, 2006; Papies, 2010). Por ello, puede ser conveniente ampliar el espectro e incluir también la condición o edad de los padres como covariable.

## **6. Conclusiones**

Como conclusiones se señala que:

1. El ratio H/L y las barras de falta no muestran diferencias significativas entre las colonias, aunque sí que se observa la tendencia de que son menores en pollos alimentados con comida proveniente de vertederos.
2. No existe una correlación significativa entre el ratio H/L y las barras de falta, ni con su presencia-ausencia, ni con su número; aunque se observa una relación positiva.

## **7. Agradecimientos**

Las siglas de un TFM no se reducen solo a Trabajo Fin de Máster, para mí también deberían traducirse como The Family Matters. Sin tu gente esto no se saca adelante.

Para mí esa gente han sido mis tutores Chechu y Javi, quiénes a parte de cederme las muestras, se implicaron en que también aprendiera el trabajo de campo, que me calzase las botas y me aventurase con mi vértigo como acompañante, en la hazaña de bajar pollitos de cigüeña del nido para aprender cómo se habían obtenido mis muestras. Fueron ellos también los que decidieron acompañarme en verano en el maravilloso mundo de las correcciones a distancia y los correos, y gracias a los que puedo presentar mi trabajo en estas fechas.

Esa gente han sido mis compañeros del Máster, ellos más que nadie saben que este camino no ha sido fácil, pero también entienden mejor que ninguno que la recompensa vale el doble.

Han sido mis reinas de Cluster, mi indomable Alberto, mi noble Francisco José Maximiliano y mi excepcional Elena, quienes vivieron mi estrés día a día y quienes escuchaban mis audios como una tertulia matutina con una paciencia infinita. Estaban ahí, estarán ahí, son mi familia y serán mi familia.

Y como broche de oro, esa gente han sido mis pilares: mis padres, mis abuelas, mis tíos y mis primos. Es por todos ellos que hago lo que hago y por los que sigo teniendo ilusión, por los que gano confianza y por los que soy quién soy. Ya lo decía un sabio norteño:

"el lobo solitario muere, pero la manada sobrevive".

## 8. Bibliografía

- Al-Murrani, W.K., Al-Rawi, I.K. & Raof, N.M. (2002) Genetic resistance to *Salmonella typhimurium* in two lines of chickens selected as resistant and sensitive on the basis of heterophil/lymphocyte ratio. *British Poultry Science*, **43**, pp. 501–507.
- Bates, D. & Maechler, M. (2017) *Sparse and Dense Matrix Classes and Methods*. Disponible en: <http://matrix.r-forge.r-project.org/>
- Bates, D., Maechler, M., Bolker, B., Walker, S., Christensen, R.H.B., Singmann, H., Dai, B., Grothendieck, G. & Green, P. (2017) *Linear Mixed-Effects Models using 'Eigen' and S4*. Disponible en: <http://lme4.r-forge.r-project.org/>
- Blas, J., Baos, R., Bortolotti, G.R., Marchant, T.A. & Hiraldo, F. (2006) Age-related variation in the adrenocortical response to stress in nestling white storks (*Ciconia ciconia*) supports the developmental hypothesis. *General and Comparative Endocrinology*, **148**, pp. 172-180.
- Blázquez, E., Aguirre, J.I., Martínez-Haro, M., Mateo, R. & Jiménez, B. (2006). The use of white stork (*Ciconia ciconia*) nestling in a biomonitoring programme for organochlorines through the region of Madrid (Spain). *Organohalogen Compounds*, **68**, pp. 2081-2085.
- Buchanan, K.L. (2000) Stress and the evolution of condition-dependent signals. *Trends in Ecology & Evolution*, **15**, pp. 156-160.
- Camp-bell, T. & Ellis, C.K. (2007) *Avian and Exotic Animal Hematology and Cytology*, 3ª edn. Blackwell Publishing, Iowa.
- Camplani, A., Saino, N. & Moller, A.P. (1999) Carotenoids, sexual signals and immune function in barn swallows from Chernobyl. *Proceedings of the Royal Society of London Series B, Biological Sciences*, **266**, pp. 1111–1116.
- Chozas, P. (1984) Situación de la población de cigüeña blanca (*Ciconia ciconia*) en España, según los últimos censos nacionales (1979-1981). *Boletín de la Estación Central de Ecología*, **13(25)**, pp. 29-48.
- Davis, A. K., Maney, D. L. & Maerz, J. C. (2008) The use of leukocyte profiles to measure stress in vertebrates: a review for ecologists. *Functional Ecology*, **22**, pp. 760-772.
- Davis, A.K. (2005) Effects of handling time and repeated sampling on avian white blood cell counts. *Journal of Field Ornithology*, **76**, pp. 334–338.
- Davis, G.S., Anderson, K.E. & Carroll, A.S. (2000) The effects of long-term caging and molt of single comb white leghorn hens on heterophil to lymphocyte ratios, corticosterone and thyroid hormones. *Poultry Science*, **79**, pp. 514–518.
- Del Riego, M. N. (2015). Ecología espacial de la cigüeña blanca (*Ciconia ciconia*) mediante telemetría satelital gps en relación con la disponibilidad de alimento predecible. Universidad Complutense de Madrid. MSC thesis.
- Directiva 2008/98/CE del Parlamento Europeo y del Consejo, de 19 de noviembre de 2008, sobre los residuos y por la que se derogan determinadas Directivas.
- Directiva 2010/63/UE del Parlamento Europeo y del Consejo, de 22 de septiembre de 2010, relativa a la protección de los animales utilizados para fines científicos.
- Djerdali, S., Tortosa, F.S., Hillstrom, L. & Doumandji, S. (2008). Food supply and external cues limit the clutch size and hatchability in the white stork *Ciconia ciconia*. *Acta Ornithologica*, **43(2)**, pp.145–150.
- Domènech, J. & Senar, J.C. (1997) Medición de la condición física de las aves a través de la Ptilocronología. *Etioguía*, **15**, pp. 37-44.
- Eggers, U., Arens, M., Firla, M., & Wallschläger, D. (2015). To fledge or not to fledge: factors influencing the number of eggs and the eggs-to-fledglings rate in White Storks *Ciconia ciconia* in an agricultural environment. *Journal of Ornithology*, 1-13.

- Erritzoe, J. (in press) Fault bars – a review.  
<http://www.birdresearch.dk/unilang/faultbars/Faultbar5.pdf> (accessed 20-09-2017).
- Faeth, S.H., Warren, P.S., Shochat, Eyal & Marrusich, W.A. (2005) Trophic dynamics in urban communities. *BioScience*, **55(5)**, pp. 399-407.
- Fischer, J.D., Cleeton, S.H., Lyons, T.P. & Miller, J.R. (2012) Urbanization and the predation paradox: the role of trophic dynamics in structuring vertebrate communities. *BioScience*, **62(9)**, pp. 809-818.
- Flack, A., Fiedler, W., Blas, J., Pokrovsky, I., Kaatz, M., Mitropolosky, M., Aghababayan, K., Fakriadis, I., Makrigianni, E., Jerzak, L., Azafzaf, H., Feltrup-Azafzaf, C., Rotics, S., Mokotjomela, T., Nathan, R. & Wikelski, M. (2016) Costs of migratory decisions: A comparison across eight white stork populations. *Science Advances*, **2**, pp. 1-7.
- Fox, J., Weisberg, S., Adler, D., Bates, D., Baud-Bovy, G., Ellison, S., Firth, D., Friendly, M., Gorjanc, G., Graves, S., Heiberger, R., Laboissiere, R., Monette, R., Murdoch, D., Nilsson, H., Ogle, D., Ripley, B., Venables, W., Winsemius, D., Zeileis, A. & R-Core. (2017) *Companion to Applied Regression*. Disponible en: <https://r-forge.r-project.org/projects/car/>
- Gross, W.B. & Siegel, H.S. (1983) Evaluation of the heterophil/lymphocyte ratio as a measure of stress in chickens. *Avian Diseases*, **27**, pp. 972–979.
- Grubb Jr, T.C. (1989) Ptilochronology: feather growth bars as indicators of nutritional status. *The Auk*, **106**, pp. 314–320.
- Harrison, C.J.O. (1985) Plumage. *A Dictionary of Birds* (ed. By B. Campbell & E. Lack), pp. 472-474. T. & A. D. Poyser, Calton.
- Jovani, R & Blas, J. (2004) Adaptive allocation of stress-induced deformities on bird feathers. *Journal of Evolutionary Biology*, **17**, pp. 294-301.
- Jovani, R & Diaz-Real, J. (2012) Fault bars timing and duration: the power of studying feather fault bars and growth bands together. *Journal of Avian Biology*, **43**, pp.97-101.
- Jovani, R. & Tella, J.L. (2004) Age-related environmental sensitivity and weather mediated nestling mortality in white storks *Ciconia ciconia*. *Ecography*, **27**, pp. 611–618.
- Jovani, R., Tella, J.L., Blanco, G. & Bertellotti, M. (2002) Absence of haematozoa on colonial White Storks *Ciconia ciconia* throughout their distribution range in Spain. *Ornis Fennica*, **79**, pp. 41-44.
- King, J.R. & Murphy, M.E. (1984) Fault bars in the feathers of White-crowned sparrows: dietary deficiency or stress of captivity and handling?. *The Auk*, **101**, pp.168–169.
- Kosicki, J.Z. (2010) Reproductive success of the white stork *Ciconia ciconia* population in intensively cultivated farmlands in Western Poland. *Ardeola*, **57(2)**, pp. 243-255.
- Kuznetsova, A., Brockhoff, P.B. & Christensen, R.H.B. (2016) *Tests in Linear Mixed Effects Models*.
- Lande, R. & Shannon, S. (1996) The role of genetic variation in adaptation and population persistence in a changing environment. *Evolution*, **50(1)**, pp. 434-437.
- Machmer, M.M., Esselink, H., Steeger, C. & Ydenberg, C. (1992) The occurrence of fault bars in the plumage of nestling ospreys. *Ardea*, **80**, pp.261-272.
- Marchamalo, J. & Traverso, J.M. (1996) Dispersión y madurez reproductiva de la Cigüeña Blanca *Ciconia ciconia* en Madrid (centro de España). *Butll. GCA*, **13**, pp. 37-40.
- McFarlane, J.M., Curtis, S.E., Simon, J. & Izquierdo, O.A. (1989) Multiple concurrent stressors in chicks 2. Effects on hematologic, body composition, and pathologic traits. *Poultry Science*, **68**, pp. 510–521.
- McKinney, M.L. (2008) Effects of urbanization on species richness: a review of plants and animals. *Urban Ecosystems*, **11**, pp. 161–176.

- Ministerio de Fomento (2006) Atlas Estadístico de las áreas urbanas en España. Ministerio de Fomento. Madrid
- Ministerio de Fomento (2016) Atlas Estadístico de las áreas urbanas en España. Ministerio de Fomento. Madrid
- Negro, J.J., Bildstein, K.L. & Bird, D.M. (1994) Effects of food deprivation and handling stress on fault-bar formation in nestling American Kestrels. *Ardea*, **82 (2)**, pp. 263-267.
- Owen, J.C. & Moore, F.R. (2006) Seasonal differences in immunological condition of three species of thrushes. *Condor*, **108**, pp. 389–398.
- Papies, M. (2010) *Breeding success in a population of European White Storks Ciconia ciconia*. MSC thesis, Wageningen University, Netherlands.
- Peris, S.J. (2003) Feeding in urban refuse dumps: Ingestion of plastic objects by the White Stork (*Ciconia ciconia*). *Ardeola*, **50(1)**, pp. 81-84.
- Polo Moreno, J. (2016) *La cigüeña blanca (Ciconia ciconia) como especie bioindicadora para evaluar la contaminación por retardantes de llama bromados y clorados en la Comunidad de Madrid (2006-2016)*. Trabajo fin de Máster, Universidad Complutense de Madrid, España.
- Ptaszyk, J., Kosicki, J., Sparks, T.H. & Tryjanowski, P. (2003) Changes in the timing and pattern of arrival of the White Stork (*Ciconia ciconia*) in western Poland. *Journal of Ornithology*, **144**, pp. 323-329.
- R Core Team (2017) *R: A language and environment for statistical computing*. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. Disponible en: <http://www.R-project.org/>
- Romero, L.M. & Reed, J.M. (2005) Collecting baseline corticosterone samples in the field: is under 3 min good enough? *Comparative Biochemistry and Physiology A – Molecular and Integrative Physiology*, **140**, pp. 73–79.
- Ryan, P.G. (1988) Effects of ingested plastic on seabirds feeding: evidence from chickens. *Marine Pollution Bulletin*, **19**, pp. 125-128.
- Senar, J.C. (2004) *Mucho más que plumas*. Monografies del Museu de Ciències Naturals 2. Barcelona.
- Shamoun-Baranes, J., Baharad, A., Alpert, P., Berthold, P., Yom-Tov, Y., Dvir, Y. & Leshem, Y. (2003). The effect wind season and latitude an the migration speed of white storks *Ciconia ciconia*, along the eastern migration route. *Journal of Avian Biology*, **34**, pp. 97-104.
- Shephard, J.M., Rycken, S., Almalik, O., StruyfL K. & Van Erp-van der Kooij, K. (2015) Migration strategies revealed by satellite tracking among descendants of a population of European white stork (*Ciconia ciconia*) reintroduced to Belgium. *Journal of Ornithology*, **156**, pp. 943-953.
- Tortosa, F.S., Caballero, J.M. & Reyes-López, J. (2002). Effect of the rubbish dumps on breeding success in the white stork in Southern Spain. *Waterbirds*, **25(1)**, pp. 39-43.
- Tryjanowski, P., Sparks, T.H. & Profus, P. (2009) Severe flooding causes a crash in production of white stork (*Ciconia ciconia*) chicks across central and eastern Europe. *Basic and Applied Ecology*, **10**, pp. 387–392.
- Vergara, P., & Aguirre, J. I. (2006) Age and breeding success related to nest position in a white stork *Ciconia ciconia* colony. *Acta oecologica*, **30(3)**, pp. 414-418.
- Vergara, P., Aguirre, J.I. & Fernández-Cruz, M. (2003) Fidelidad a los sitios y fenología de la invernada de la cigüeña blanca (*Ciconia ciconia*) en la Comunidad de Madrid (1998-2002). *Anuario Ornitológico de Madrid*, pp. 74-85.
- Washburn, B.E., Morris, D.L., Millspaugh, J.J., Faaborg, J. & Schulz, J.H. (2002) Using a commercially available radioimmunoassay to quantify corticosterone in avian plasma. *Condor*, **104**, pp. 558–563.