

EVALUACIÓN NO DESTRUCTIVA DE LA EXPOSICIÓN A PLOMO EN RAPACES AMENAZADAS EN PARQUES NACIONALES: EL ÁGUILA IMPERIAL IBÉRICA (*AQUILA ADALBERTI*) Y EL QUEBRANTAHUESOS (*GYPAETUS BARBATUS*)

JOSÉ LUIS ROSCALES^{1, 2}, MÓNICA SÁEZ¹, ENRIQUE BLÁZQUEZ¹, MIGUEL FERRER³, JUAN ANTONIO GIL⁴, RAFAEL MATEO⁵ Y BEGOÑA JIMÉNEZ^{1*}

RESUMEN

Se ha evaluado la exposición a plomo en rapaces amenazadas mediante una metodología no destructiva basada en la utilización de plumas. A tal fin se han determinado las concentraciones de plomo en plumas de águila imperial ibérica (*Aquila adalberti*) y quebrantahuesos (*Gypaetus barbatus*) procedentes del Parque Nacional de Doñana y Parque Nacional de Ordesa y Monte Perdido respectivamente.

Para el águila imperial ibérica, la concentración media de plomo encontrada en rémiges es de 4,5 ppm, constatándose una exposición para la especie a este elemento tóxico que no excede los umbrales de riesgo descritos para aves. En el caso concreto del águila imperial ibérica, los niveles de plomo tienden a ser mayores cuando las plumas proceden de fuera del Parque Nacional de Doñana y si son anteriores al año 2002, si bien ninguno de los factores estudiados ha resultado ser significativo. Esta tendencia tiene sentido especial para el águila imperial ibérica en el Parque Nacional de Doñana, ya que los datos indican que la aplicación del real decreto RD581/2001 en humedales ha sido efectiva y por tanto redundante como elemento positivo de gestión para el Parque Nacional de Doñana.

Las concentraciones medias de plomo encontradas en plumas de la población pirenaica de quebrantahuesos fueron inferiores a las encontradas en águila imperial, del orden de 2 ppm, no habiéndose encontrado diferencias significativas ni en los niveles de plomo en pluma a lo largo del período de estudio comprendido entre 1994 y 2006, ni entre los individuos pertenecientes o no al Parque Nacional de Ordesa y Monte Perdido. Los valores de plomo detectados en ambas especies indican un fenómeno de exposición a este contaminante, si bien las diferencias encontradas entre ambas especies explican los mayores niveles encontrados en el águila imperial teniendo en cuenta el tipo de dieta del águila imperial, con una importante contribución de aves acuáticas, que serían presas potencialmente contaminadas por plomo.

El estudio llevado a cabo demuestra que el método no invasivo empleado para monitorizar plomo en especies con especial nivel de protección puede ser adecuado a pesar de las limitaciones que supone el empleo de plumas (e.g. disponibilidad del tipo y tamaño de muestra adecuados).

¹Departamento de Análisis Instrumental y Química Ambiental, Instituto de Química Orgánica General del CSIC. Juan de la Cierva 3, 28006 Madrid. e-mail: bjimenez@iqog.csic.es Tel. 91 2587616.

²Universidad de Barcelona, Departamento de Biología Animal, Barcelona.

³Estación Biológica de Doñana (CSIC, Sevilla).

⁴Fundación para la Conservación del Quebrantahuesos, Zaragoza.

⁵Instituto de Investigación en Recursos Cinegéticos (CSIC-UCLM, Ciudad Real).

El hecho de haber encontrado que los niveles de plomo en águila imperial varían según los años, representa una importante llamada de atención para hacer un seguimiento temporal continuado. Esta propuesta se puede abordar fácilmente y requiere pequeños esfuerzos logísticos y económicos que recomendamos implementar con un abordaje multispecies. Consideramos que para llevar a cabo este seguimiento se deben crear bancos de muestras que nos permitirán hacer una lectura detallada de lo que está pasando. A tal fin LA PLUMA es un material ideal.

Palabras clave: Plomo, Parque Nacional de Doñana, Parque Nacional de Ordesa y Monte Perdido, águila imperial ibérica, quebrantahuesos.

SUMMARY

Lead exposure was evaluated in threatened raptors by a nondestructive method based on the use of feathers. For this purpose lead concentrations were determined in feathers from the Spanish imperial eagle (*Aquila adalberti*) and bearded vulture (*Gypaetus barbatus*) from the Doñana National Park and Ordesa and Monte Perdido National Park, respectively.

For the Spanish imperial eagle, the average concentration of lead found in remige feathers is 4.5 ppm, confirming exposure to the toxic element in this species, but not exceeding the threshold of risk described for birds. In the case of the Spanish imperial eagle, lead levels tend to be higher when the feathers come from outside the Doñana National Park and are prior to 2002, while none of the factors studied has proved to be significant. This trend has special meaning for the Spanish imperial eagle in Doñana National Park, as the data indicate that the actual implementation of the decree 581/2001 in wetlands has been effective and therefore it is as a positive management for Doñana National Park.

Average lead concentrations in feathers of vultures from the Pyrenees population were below those found in imperial eagle, within the range of 2 ppm. No significant differences were found in the levels of lead neither throughout the period 1994-2006, nor between individuals within and outside the National Park of Ordesa and Monte Perdido. The lead values detected in both species show a clear exposure to this contaminant. The diet of Spanish imperial eagle largely consists of waterfowl, a potential lead source which would explain the higher levels of lead found in this species. The study shows that the non-invasive method used to monitor lead levels in species with special protection may be appropriate despite the constraints posed by the use of feathers (e.g. type and availability of adequate sample size).

The variation in lead levels found in Spanish imperial eagle over the years highlights the importance of monitoring temporal trends. This monitoring can be easily performed and requires little economic and logistical efforts. Furthermore, we encourage implementing this monitoring with a multispecies approach. In our opinion to achieve a successful monitoring, is important to create banks of samples which would allow a detailed study of temporal trends. For this purpose, feather samples represent an ideal material.

Key words: lead, Parque Nacional de Doñana, Parque Nacional de Ordesa y Monte Perdido, Spanish imperial eagle, bearded vulture.

INTRODUCCIÓN

Numerosos efectos tóxicos provocados por el plomo en seres vivos, tales como alteraciones hematológicas y nerviosas (HODGSON y LEVI 1997), efectos en la reproducción (MORGAN *et al.* 1975, BURGER *et al.* 1986), el sistema inmunitario (ROCKE y SAMUEL 1991, TRUST *et al.* 1990), e incluso como posible cancerígeno (GOYER 1996), han sido constatados en las aves (MATEO *et al.* 2003a, 2003b). La intoxicación por ingestión de objetos de Pb es una de las más frecuentes en aves silvestres (LABONDE 1995), siendo las acuáticas –principalmente patos, gansos y cisnes– y las rapaces, los grupos más afectados (FRIEND 1987, LOCKE y FRIEND 1992).

En el caso de las aves rapaces, la intoxicación puede ser debida al consumo de carroñas de animales muertos por disparo, o bien al cazar animales que han sido heridos pero que sobreviven con algunos perdigones de Pb en su cuerpo (FRIEND 1987). En las zonas húmedas el problema es más patente, ya que el volumen de animales cazados es muy alto y la liberación de perdigones se concentra en áreas relativamente pequeñas. En estos hábitats la recuperación de las presas abatidas por parte de los cazadores no es total, llegándose a estimar que un 15-20% de presas no son recogidas (U.S.F.W.S. 1975), y por tanto pueden ser aprovechadas por rapaces oportunistas como el pigargo americano *Haliaetus leucocephalus* (PATTEE y HENNES 1983), el aguilucho lagunero *Circus aeruginosus* (PAIN y AMIARD-TRIQUET 1993, PAIN *et al.* 1993, 1997, MATEO *et al.* 1999) o el águila imperial ibérica *Aquila adalberti* (MATEO *et al.* 2001), ingiriendo accidentalmente los perdigones incrustados en estas presas. También en las presas vivas se puede encontrar con frecuencia la presencia de perdigones en su cuerpo, por haber sido disparadas por cazadores y habiéndose recuperado después. La presencia de perdigones de plomo en aves acuáticas vivas varía entre el 10 y el 68% dependiendo de la especie y la zona de estudio (SHEUHAMMER y NORRIS 1996). No existen datos de la prevalencia de aves terrestres vivas (p.e. palomas o perdices) con perdigones en su cuerpo.

Por todo lo expuesto, no es extraño observar que en algunas poblaciones silvestres de aves rapaces

la ingestión de perdigones de Pb es frecuente, como se puede extraer del estudio de sus egagrópilas. Estas egagrópilas contienen todo el material que el ave no puede digerir y que regurgita periódicamente. Concretamente, se ha observado que entre el 10 y el 70% de las egagrópilas de pigargo americano en los EE.UU. (PLATT 1976; PATTEE y HENNES 1983) y el 70% de las de águila real en Noruega (PAIN y AMIARD-TRIQUET 1993) contenían perdigones de Pb antes de su prohibición. Aunque muchos de estos perdigones pueden ser eliminados en estas egagrópilas, su permanencia (de 12 a 48 h) (REDIG 1987) en el medio ácido de la molleja hace que la ingestión-regurgitación continuada de perdigones de Pb pueda generar plumbismo e incluso la muerte de aves rapaces (PATTEE *et al.* 1981). De hecho, se ha calculado que la intoxicación por Pb en el pigargo americano representa entre el 5,2 y el 7,6% de las causas de mortalidad para un período comprendido entre la mitad de la década de los '60 y principios de los '80 (PATTEE y HENNES 1983, REICHEL *et al.* 1984). También en el cóndor californiano, *Gymnogyps californianus*, una especie en grave peligro de extinción, el plumbismo producía el 20% de la mortalidad en los años 80 (WIEMEYER *et al.* 1988), y actualmente hace peligrar su reintroducción (BEHRENS y BROOKS 2000). A nivel mundial, se ha descrito la intoxicación tras la ingestión de munición de Pb (perdigones o balas) por el consumo de presas tiroteadas en 18 especies de aves rapaces en todo el mundo.

Es menos conocida la exposición a los perdigones de plomo en las aves rapaces, y las silvestres en general, fuera de las zonas húmedas (KENDALL *et al.* 1996). Algunas zonas naturales terrestres, sustentan una intensa caza de paloma, perdiz y conejo en España, y de hecho han sido descritos en España casos de plumbismo en águila real (*Aquila chrysaetos*) (CERRADELO *et al.* 1992), águila imperial ibérica (*Aquila adalberti*) (HERNÁNDEZ 1995), buitre leonado (*Gyps fulvus*) (MATEO *et al.* 1997), ratonero común (*Buteo buteo*), lechuza común (*Tyto alba*), búho chico (*Asio otus*) (GUITART *et al.* 1999), milano real (*Milvus milvus*) y búho real (*Bubo bubo*) (MATEO *et al.* 2003c).

El **águila imperial ibérica** (*Aquila adalberti*), es el águila más amenazada del continente Europeo y una de las cuatro aves de presa más escasas del

planeta. Su estatus a nivel mundial es cercano a las 200 parejas, de las cuales una cuarta parte se encuentra en Andalucía (GONZÁLEZ *et al.* 2008). Su carácter endémico y su temprana inclusión por todos los organismos internacionales en la categoría de "amenazada de extinción" han promovido, desde finales de los años 60, diversas actuaciones encaminadas a su conservación. Aunque durante la época de cría es una especie eminentemente cazadora, durante el invierno consume altas proporciones de carroña, y por tanto puede estar expuesta a la contaminación por plomo. Es sabido que la ingestión de perdigones de plomo era frecuente en el águila imperial en Doñana antes de la prohibición de esta munición en humedales (RD581/2001), habiéndose detectado perdigones en el 15% de sus egrópilas durante el invierno (MATEO *et al.* 2001). Aunque nunca se ha constatado la muerte por plumbismo de águila imperial en Doñana, un caso clínico fue descrito por HERNÁNDEZ (1995) en el centro de España.

Por otro lado, el **quebrantahuesos** (*Gypaetus barbatus*) es también una de las rapaces más amenazadas de Europa y también puede estar expuesta a la contaminación por plomo por sus hábitos carroñeros. Durante los últimos años esta especie ha sido objeto de planes de conservación en los diferentes países europeos. Con la publicación de la Ley 4/1989, en la que se recoge la figura de los Planes de Recuperación como instrumento para la conservación de las especies catalogadas "En Peligro de Extinción", las CCAA (Aragón, Cataluña y Navarra) implicadas en la conservación del quebrantahuesos elaboran y aprueban sus correspondientes planes de recuperación. Los Pirineos poseen 125 unidades reproductoras (España, Francia y Andorra), el 81% de toda la población europea (FCQ 2008). Su inclusión entre las especies objeto de estudio, permite comparar claramente la exposición al plomo respecto a especies localizadas en zonas de humedales.

La pluma representa un tejido excepcional para abordar el estudio de metales pesados, especialmente cuando se trata de especies de aves sensibles. Por un lado, teniendo en cuenta que muchas especies de aves rapaces están protegidas, es necesario emplear técnicas no destructivas y a ser

posible **NO INVASIVAS**, y este es el caso de las plumas. Estas se pueden recoger con facilidad en las proximidades del nido y diferentes estudios han demostrado que las plumas de rapaces son muestras adecuadas para biomonitorizar metales pesados (HAHN *et al.* 1993, DENNEMAN and DOUBEN, 1993). Asimismo, esta metodología presenta generalmente la ventaja de permitir recoger tamaños de muestra mayores que cuando se han de capturar los animales, eliminando además todos los riesgos asociados con el trampeo. Por otro lado las plumas nos ofrecen una medida de la exposición al plomo durante un período de tiempo determinado y de una forma fiable. Los metales pesados pueden unirse a las proteínas en la pluma durante el período de crecimiento de la misma cuando ésta está conectada con el torrente circulatorio a través de pequeños capilares (BURGER, 1993). Una vez que la pluma se ha formado completamente, se atrofian estos capilares sanguíneos y la pluma se transforma en un tejido inerte que refleja los niveles de metales pesados incorporados a través de la dieta durante un determinado período de tiempo (DENNEMAN DOUBEN, 1993). La ventana temporal que refleja cada pluma depende del momento en que esta creció y, por tanto, del patrón de muda de la especie (BURGER, 1993; HUGHES *et al.*, 1997). De hecho, varios estudios han puesto de manifiesto claras variaciones en la carga de metales pesados entre plumas de un individuo (FURNESS *et al.*, 1986; ALTMAYER *et al.*, 1991; DMOWSKI *et al.*, 1984; WEYERS *et al.*, 1988). De forma general, estas diferencias entre plumas se pueden deber a cambios sufridos en la exposición al plomo del individuo, por ejemplo variaciones estacionales de la dieta o del área de alimentación (especialmente en especies migratorias) y también a otras cuestiones como el orden específico de cada pluma en el patrón de muda o diferencias en la contaminación externa. Recientemente, GOLDEN *et al.* (2003) en un estudio experimental con martinetes *Nycticorax nycticorax* expuestos a plomo durante el crecimiento de las plumas en las primeras semanas de vida han evidenciado la utilidad de esta muestra para reflejar la exposición al plomo. Los niveles de plomo en plumas estuvieron muy correlacionados con los niveles en hueso y riñón ($r=0,64$ y $0,74$), aunque mucho menos con las concentra-

ciones en hígado ($r=0,32$). Sorprendentemente, fueron plumas y huesos las muestras que mejor reflejaron un aumento en las concentraciones de Pb al aumentar la dosis. La actividad de la delta-ALAD, un enzima especialmente inhibido por el Pb, mostró una correlación negativa con los niveles de plomo en plumas ($r=-0,62$). Todo esto parece indicar que la pluma, puede reflejar bien la exposición al Pb durante el período en el que está creció y siempre que no exista una contaminación externa importante (PAIN *et al.* 1992).

El objetivo general del presente trabajo es evaluar el grado de contaminación por **plomo** y su posible influencia negativa en la **conservación de especies prioritarias** como el **águila imperial ibérica** y otras rapaces sensibles al mismo, como el **quebrantahuesos**, comparando dichos niveles en ejemplares que habitan dentro de Parques Nacionales con los de otros presentes en su entorno. Este objetivo general permitiría comprobar si está siendo eficaz el cumplimiento de una de las medidas de protección como la prohibición del perdigón de plomo en las Marismas del Guadalquivir (Real Decreto 581/2001 de 1 de junio, con moratoria de adaptación para la temporada 2001-02, por el que en determinadas zonas húmedas se prohíbe la tenencia y el uso de municiones que contengan plomo para el ejercicio de la caza y el tiro deportivo, BOE núm. 143, 15/6/2001).

MATERIAL Y MÉTODOS

Recogida de muestras

Dentro de los Parques Nacionales de España, se ha seleccionado el **águila imperial** (*Aquila adalberti*), presente en el **Parque Nacional de Doñana**, y el **quebrantahuesos** (*Gypaetus barbatus*), presente en el **Parque Nacional de Ordesa y Monte Perdido**. Para el águila imperial ibérica se han obtenido y analizado un total de 214 plumas, correspondientes al período 1987-2008. Hay que señalar que el tamaño total de la muestra incluye varios tipos de plumas y en el caso de algunos territorios, se recogieron varias plumas. Por ello, de cara a los análisis estadísticos para evaluar el efecto del Real Decreto 581/2001 y la pertenencia o no al Parque

Nacional de Doñana, se ha seleccionado una única pluma por territorio y un único tipo de pluma, en concreto las rémiges (primarias y secundarias) que son mudadas durante el período reproductor y por tanto reflejarán los niveles de plomo correspondientes al área de cría (CRAMP SIMMONS, 1977).

En el caso del quebrantahuesos se ha analizado un total de 61 plumas, correspondientes al período 1994-2006, todas ellas de pecho de distintos individuos pertenecientes a distintas clases de edad. La recogida de muestras de pluma de quebrantahuesos se ha realizado dentro del programa de captura, marcaje y seguimiento de esta especie en los Pirineos, desarrollado por la FCQ (Fundación para la Conservación del Quebrantahuesos) y el Gobierno de Aragón (GA). Las muestras proceden de pollos marcados en nidos y preadultos marcados en Puntos de Alimentación Suplementaria (PAS).

Análisis de plomo en plumas

Tratamiento de muestra

Previamente al análisis instrumental, la muestra de pluma debe someterse a un lavado exhaustivo con el objeto de eliminar la contaminación exógena de la misma. A tal fin una cantidad correspondiente a aproximadamente 200 mg de pluma se somete a varios lavados con una mezcla de agua/acetona en un baño de ultrasonidos y posteriormente se secan en una estufa a 40 °C durante toda una noche. La digestión se lleva a cabo en medio ácido. Para ello, en un reactor de teflón (#561R2, Savillex), se mezcla la muestra con 0,5 ml de ácido nítrico concentrado al 69% (Trace Pur, Merck) y cuatro gotas de peróxido de hidrógeno (Panreac). Se cierra herméticamente el reactor de teflón y se mantiene en estufa durante seis horas a una temperatura aproximada de unos 100°C para favorecer el ataque ácido de la muestra. Una vez finalizado este proceso, se deja enfriar el reactor y se filtra la digestión, en un matraz aforado, con papel de filtro libre de cenizas (Whatman). Tras sucesivos lavados del reactor de teflón con agua Milli-Q, se enrasa a un volumen de 10 ml.

Determinación instrumental de Pb

La cuantificación de Pb se realiza mediante Espectrofotometría de Absorción Atómica con Cámara de Grafito (AAAnalyst 600, equipado con un corrector de fondo Zeeman y un automuestreador AS-800, Perkin Elmer), aplicando para la determinación analítica el método de adición de patrón. El equipo realiza las diluciones necesarias (a partir del patrón más concentrado), para obtener la recta de calibrado, empleando como diluyente ácido nítrico al 1%. La medida de la señal de la muestra se realiza en área de pico y se hacen dos réplicas para cada medida, tanto de los patrones como de las muestras. Para controlar la sensibilidad del equipo, se usa la masa característica. En el caso del Pb, la masa característica es 30 pg/0,0044 A-s y se utiliza un patrón de Pb de 50 µg/L para el cual se consideran correctas las variaciones de $\pm 20\%$ en su masa característica. Los límites de detección instrumental establecidos para el Pb son de 0,2 mg/L. Para evaluar y controlar la calidad de los resultados, se ha empleado material de referencia certificado.

Análisis estadístico

Las concentraciones de plomo se transformaron logarítmicamente (usando \log_{10}) para ajustarlas a una distribución normal. Para validar dicha distribución se empleó el test de Shapiro-Wilk y se examinaron las gráficas Q-Q. En el caso del Águila Imperial se ha utilizado un Modelo Lineal Generalizado (GLM; F-test, Suma de cuadrados tipo III) para evaluar las diferencias en los niveles de plomo determinados ya que permite considerar varios factores y sus posibles interacciones en un conjunto de datos desbalanceado. La concentración de plomo representa la variable dependiente y en el modelo se incluye el período en el que creció la pluma (antes o después del 2002), si la muestra ha sido recogida o no dentro del Parque Nacional de Doñana y el tipo de pluma analizada (primaria o secundaria) como factores fijos. Además se ha considerado la interacción período*Parque Nacional como un factor fijo más ya que podría explicar diferentes tendencias temporales entre las muestras pertenecientes al área protegida y las recogidas en otras áreas. Para comparar los niveles de plomo entre

rémiges y rectrices se ha utilizado el MANOVA considerando tipo de pluma como factor intra-sujetos (medidas repetidas) y período anterior/posterior al 2002 y pertenencia o no al Parque Nacional como factores inter-sujetos.

En el caso del quebrantahuesos también se ha utilizado un GLM (F-test, Suma de cuadrados tipo III) debido al diseño desbalanceado que presentan las muestras entre los grupos de edad y los años de muestreo. Nuevamente la concentración de plomo es la variable dependiente y el año de muestreo, edad y su interacción se consideraron factores fijos en el modelo. Los años para los que el tamaño muestral era igual o menor que 2 se han excluido del análisis. Las diferencias en los niveles de plomo entre los pollos crecidos en el Parque Nacional de Ordesa y Monte Perdido y otras zonas se evaluaron mediante el test T de Student para muestras independientes.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados de concentraciones medias de plomo en las especies seleccionadas, águila imperial ibérica y quebrantahuesos, se presentan en la Figura 1. El águila imperial ibérica es la especie que exhibe los mayores niveles medios, alcanzando 4,5 ppm ($\mu\text{g/g}$ peso seco), mientras que los valores medios detectados en quebrantahuesos, son menores, con niveles medios del orden de 2 ppm ($\mu\text{g/g}$ peso seco).

La comparación de estas especies, con claras diferencias en sus hábitos alimenticios, es de interés ya que el mayor nivel medio de plomo detectado en el águila imperial ibérica podría venir explicado por el hecho de que, además de ser carroñera como el quebrantahuesos, se alimenta de conejo y aves acuáticas, presas que podrían ser las responsables de los mayores niveles medios de plomo detectados en esta especie.

En estudios de laboratorio, concentraciones de plomo en pluma superiores a 5 ppm se han asociado con problemas de comportamiento, supervivencia y retraso en el crecimiento en gaviota argétea *Larus argentatus* (BURGER and GOCH-

FELD 1995, 2000). Este valor se ha empleado para varias especies de aves marinas, si bien no hay información disponible para las especies que nos ocupan por razones obvias y se debe tener la precaución de considerar que no todas las especies tienen la misma sensibilidad a este elemento tóxico. En el presente trabajo, los valores medios encontrados en las especies estudiadas no superan este valor de referencia, si bien en el águila imperial ibérica los valores medios encontrados están muy próximos. Más específicamente, el estudio de PAIN *et al.* (2005) llevado a cabo en águila imperial con plumas de museo del período 1980-1999 toma como valor de referencia para exposiciones elevadas 15 ppm (ug/g), valor que en el presente estudio sólo se ha detectado en una de las muestras analizadas, por lo que podríamos decir que los resultados obtenidos en el presente estudio serían únicamente indicativos de exposición a este elemento tóxico.

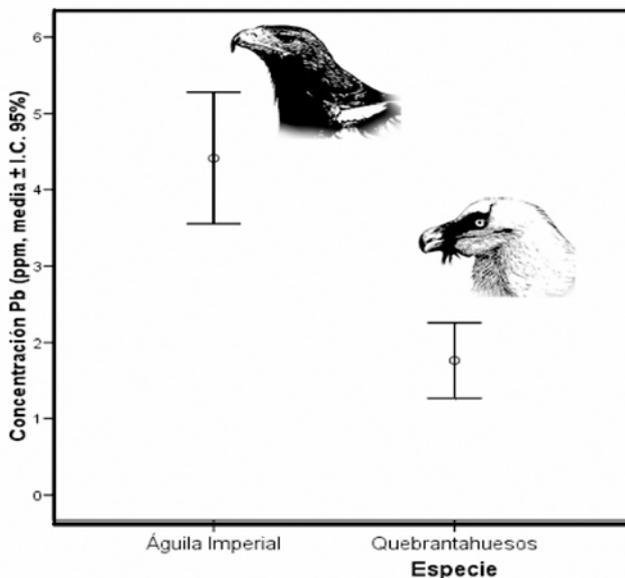


Figura 1. Diferencias en los niveles medios de plomo y nivel de confianza del 95% entre plumas de águila imperial ibérica y quebrantahuesos.

Figure 1. Differences in mean values of lead between Spanish imperial eagle and bearded vulture feathers.

En el caso del águila imperial ibérica es sabido que las plumas de vuelo (primarias y secundarias) se mudan durante el período reproductor y por tanto estarían reflejando los niveles locales de la zona de cría. En el caso de la cola, no es bien conocida esta información y para verificar un po-

sible sesgo debido al tipo de pluma, para aquellos individuos (n=22) en los que se disponía de plumas de ala y cola se ha realizado un MANOVA que reveló que los niveles de plomo detectados en rémiges y rectrices respectivamente (Figura 2) difieren de forma significativa (Lambda de Wilks $F_{1,22}=9,187$; $P=0,007$).

Los factores Inter-sujetos anterior/posterior 2002 y pertenencia o no al Parque Nacional, así como las posibles interacciones, no resultaron significativos. Las diferencias en los niveles de plomo entre los tipos de pluma considerados podrían estar relacionadas con cambios estacionales en la preferencia de presas (por ejemplo, presencia estacional de acuáticas) y ponen de manifiesto la importancia del conocimiento del patrón de muda de las especies a la hora de elegir la pluma adecuada para este tipo de estudios. La influencia que tiene el tipo de pluma seleccionada para determinar las concentraciones de plomo ha sido demostrada en algunos estudios llevados a cabo con diferentes especies de aves, habiéndose atribuido a factores como el patrón de muda (FURNESS *et al.* 1986), pigmentación o contaminación externa por deposición ambiental o excreción de la glándula uropigial (DAUWE *et al.* 2003). En nuestro caso, la hipótesis más plausible que explique este tipo de diferencias estaría más relacionada con el patrón muda, teniendo en cuenta que se ha empleado una metodología de tratamiento de las muestras igual a la empleada en otros estudios (DAUWE *et al.* 2004, GOCHFELD *et al.* 1996), para la que se asume haber eliminado la contaminación externa, de manera que los niveles obtenidos estarían referidos a contaminación endógena. En base a estos resultados, todos los análisis sucesivos para evaluar la pertenencia al Parque Nacional de Doñana y el período de recogida de la pluma se llevó a cabo descartando las plumas de la cola.

El GLM utilizado en el caso del águila imperial ibérica reveló que el factor tipo de pluma, dentro del ala, no es significativo, indicando que no existen diferencias significativas en los niveles de plomo entre plumas primarias y secundarias ($F_{1,66}=1,11$; $P=0,29$). El resto de factores considerados tampoco resultaron significativos (Parque Nacional Doñana $F_{1,66}=0,633$; $P=0,42$; Período an-

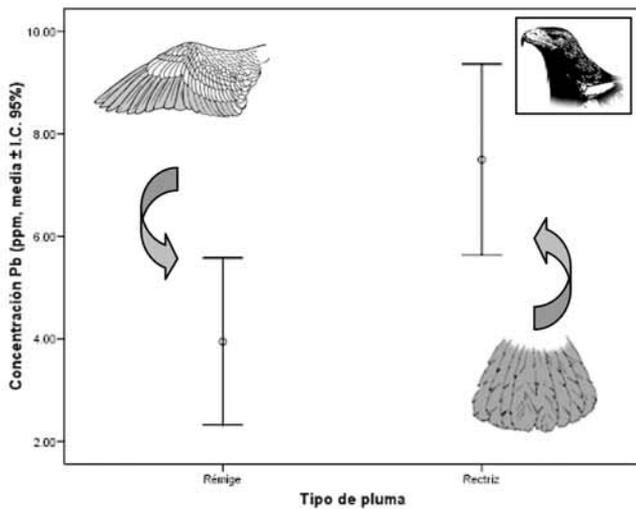


Figura 2. Diferencias en los niveles medios de plomo y nivel de confianza del 95% en águila imperial ibérica en función del tipo de pluma.

Figure 2. Differences in mean values of lead in Spanish imperial eagle depending on the feather type.

terior/posterior 2002 $F_{1,66}=1,259$; $P=0,22$; interacción de ambos factores $F_{1,66}=1,24$; $P=0,27$). Aunque existen diferencias en los niveles de plomo entre el período anterior y el posterior al 2002 (Figura 3) especialmente dentro del Parque Nacional de Doñana, estas diferencias no son lo suficientemente fuertes como para ser significativas. De hecho, los niveles detectados en ambos períodos, tanto dentro como fuera del Parque Nacional, son bajos (Tabla 1). Igualmente parece que no existen fuertes diferencias entre los individuos que crían en el área protegida y otras, si

bien parece que el efecto del real decreto es mas notable en el Parque Nacional.

En una investigación reciente de MATEO *et al.* (2007), en la que se lleva a cabo un estudio comparativo de especies afectadas por Pb en humedales, valorando las tendencias temporales, se encontró que la prevalencia de perdigones de Pb ingeridos en el águila imperial ha descendido significativamente, probablemente debido a las restricciones de las actividades cinegéticas y las altas precipitaciones en Doñana durante los últimos años. Estos resultados apoyan y coinciden con las tendencias observadas en el presente trabajo respecto a la disminución del contenido en Pb en las plumas de águila imperial ibérica dentro del Parque Nacional de Doñana.

En el caso del quebrantahuesos, no se han encontrado diferencias significativas en los niveles de plomo entre años ($F_{8,52}=1,03$; $P=0,44$) ni entre los grupos de edad ($F_{3,52}=1,01$; $P=0,40$) o su interacción ($F_{12,52}=1,26$; $P=0,29$). En la Figura 4 puede apreciarse la evolución de las concentraciones de Pb en pluma durante el período 1994-2006, no existiendo una variación significativa en los niveles de plomo en plumas a lo largo de estos últimos años. Como ya se ha señalado previamente los niveles medios de plomo son bajos a lo largo de todo el período de estudio y serían únicamente indicativos de exposición pero no se han detectado valores que indiquen exposición aguda a este elemento tóxico.

		Tipo de Pluma	Primaria	Primaria	Secundaria	Secundaria
			13	40	8	5
		Período	Antes 2002	2002-	Antes 2002	2002-
NO PARQUE	n					
	42	media	2,73	4,40	7,55	4,41
		SE	0,52	0,67	3,70	0,44
		min	1,49	0,78	3,85	3,42
		máx	4,58	13,84	11,25	5,97
PARQUE	n					
	24	media	5,74	2,53	6,25	-
		SE	1,49	0,36	2,05	-
		min	0,88	0,95	0,41	-
		máx	13,64	4,73	15,17	-

Tabla 1. Concentraciones medias de plomo, SE, mínimo y máximo en plumas de águila imperial ibérica en función del período de recogida, su pertenencia o no al Parque Nacional y tipo de pluma.

Table 1. Average concentrations of lead, SE, minimum and maximum in Spanish imperial eagle depending on the sampling period, its possible source from a National Park and the type of feather.

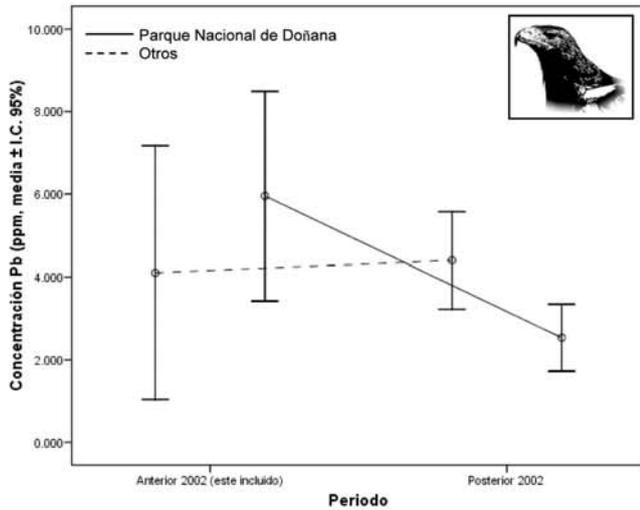


Figura 3. Tendencias en las concentraciones de plomo en plumas de ala de águila imperial ibérica, según su periodo, anterior o posterior al 2002 y su pertenencia o no al Parque Nacional de Doñana.

Figure 3. Trends in lead concentrations in wing feathers from the imperial eagle, before or after 2002 and belonging or not to the National Park of Doñana.

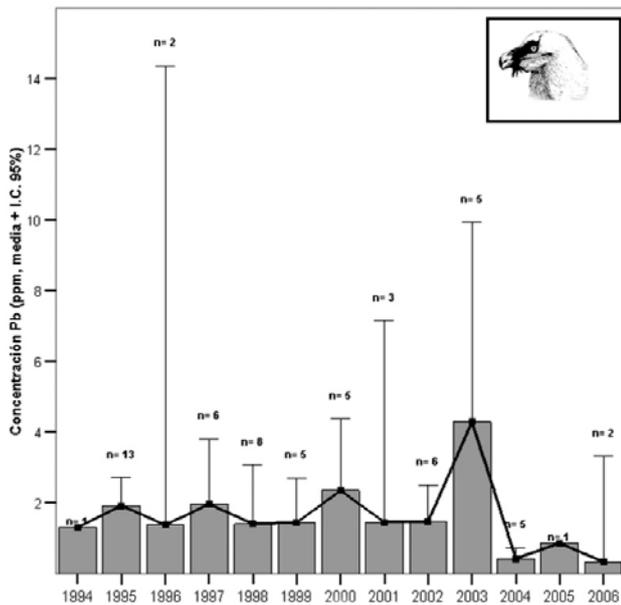


Figura 4. Concentraciones medias de Pb en quebrantahuesos a lo largo del periodo 1994-2006.

Figure 4. Average lead concentrations in bearded vulture during the period 1994-2006.

En la Figura 5, se presentan los valores medios de concentración de plomo encontrados para los diferentes grupos edad. El hecho de que los niveles de plomo no difieran apenas entre los gru-

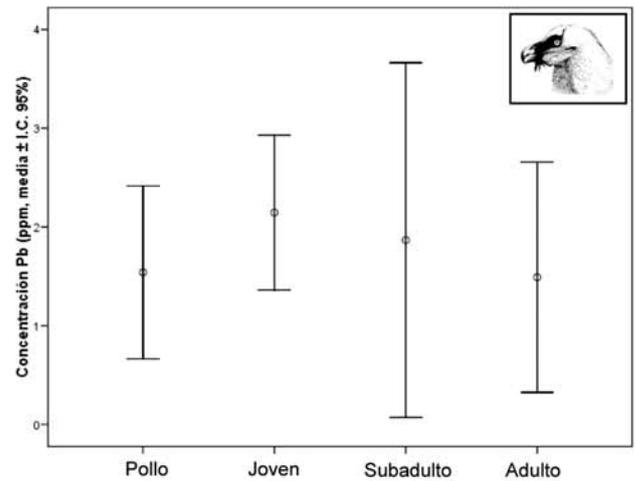


Figura 5. Concentraciones medias de Pb en quebrantahuesos en función del status.

Figure 5. Average lead concentrations in bearded vulture depending on the age classes.

pos podría deberse a que esta especie tiende a explotar presas con bajos niveles de plomo.

Puesto que no existen diferencias entre años, las diferencia en los niveles de plomo entre pollos del Parque Nacional de Ordesa y otros, se evaluaron directamente sin tener en cuenta este factor. Se seleccionaron los pollos, dentro de los diferentes grupos de edad, en base a que sus plumas estarían reflejando principalmente los niveles de plomo del área de cría, mientras que el resto de los grupos de edad se caracterizan por poseer extensas áreas de campeo en la búsqueda de alimento (a excepción de los adultos reproductores), que vendría también apoyado por la mayor dispersión encontrada en los valores de plomo en pluma para los adultos y subadultos (Figura 5). El test T de Student reveló que no existen diferencias en la exposición al plomo entre los pollos crecidos en el área protegida y otros ($t = -1,75; P=0,09$), si bien la dispersión es mayor dentro del Parque Nacional. Esto pone de manifiesto que para esta especie, el Parque Nacional, como área protegida no tiene ningún significado a efectos de favorecer una menor exposición a un contaminante ambiental como el plomo.

La publicación más reciente en la que se ha llevado a cabo una revisión exhaustiva sobre la intoxicación por plomo en aves de presa recoge un caso de plumbismo en los Alpes austríacos

(MATEO, 2009). HERNÁNDEZ (2005) proporciona información sobre exposición al plomo en la población pirenaica de quebrantahuesos en base a una metodología basada en el empleo de muestras de sangre, hígado y hueso, por lo que a día de hoy no existen datos en la literatura que nos permitan hacer un estudio comparativo con los resultados obtenidos en el presente estudio basado en el empleo de plumas. Aunque en principio esta especie, según HERNÁNDEZ (2005), por no vivir en zonas con alta presión cinegética, no sería un candidato potencial a sufrir intoxicación crónica por plomo, admite que TERRASSE llegó a plantear que la ingestión de aves migratorias en algunas zonas de la cordillera pirenaica podría suponer un riesgo de intoxicación para esta especie.

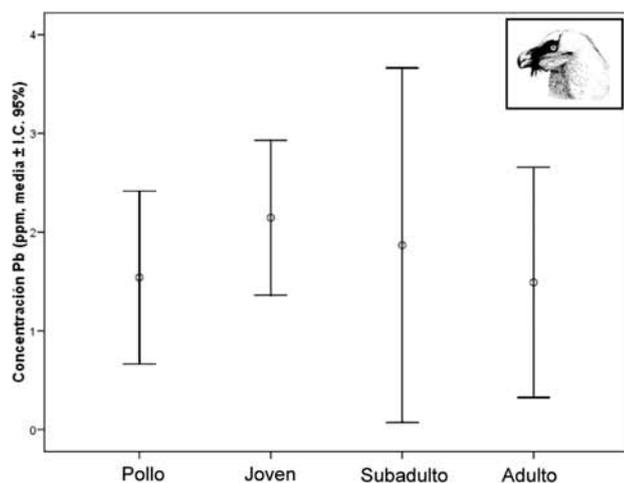


Figura 6. Concentraciones medias de Pb en plumas de pollos de quebrantahuesos en función de su pertenencia o no al Parque Nacional de Ordesa y Monte Perdido.

Figure 6. Average lead concentrations in feathers of bearded culture chicks from Parque Nacional de Ordesa y Monte Perdido and other areas.

Los valores detectados en sangre en el estudio de HERNÁNDEZ (2005), no llegan a superar el nivel considerado como umbral de intoxicación crónica, estando en concordancia con los niveles encontrados en las plumas de los ejemplares aquí estudiados. Asimismo, el estudio de HERNÁNDEZ no detectó una relación entre la edad y la tasa de plomo en sangre, como hemos visto igualmente para el caso de las plumas. El caso de los subadultos, que presentaron una mayor variabilidad, estos a su vez poseen extensas áreas de campeo (GIL *et*

al., 2005). Si bien debe tenerse en cuenta que los niveles de plomo en sangre sólo nos servirían de referencia para evaluar la exposición reciente a este metal, según PAIN y AMIARD-TRIQUET (1993). Los niveles de Pb detectados en hueso en el estudio de HERNÁNDEZ (2005) también confirman que en ninguno de los ejemplares se encontraron niveles de plomo próximos al nivel crítico de intoxicación crónica, habiéndose constatado únicamente que la exposición ha existido y que los valores encontrados sugieren que algún perdigón es ingerido de manera ocasional. El estudio de HERNÁNDEZ concluye que la exposición a plomo en la población pirenaica de quebrantahuesos es baja y que no se han encontrado evidencias de que pueda ser un factor significativo de mortalidad para esta población y está en concordancia con los resultados obtenidos en el presente trabajo basados en el análisis de plomo en plumas.

CONCLUSIONES

El presente estudio, basado en el empleo de una metodología **NO INVASIVA**, pone en evidencia que existe una exposición al plomo en las especies estudiadas, si bien los niveles medios de concentración de Pb detectados en plumas de águila imperial y quebrantahuesos son bajos, no llegando en ningún caso a alcanzar niveles considerados como indicativos de exposición aguda al plomo en ambas especies. Destacan los mayores niveles medios de Pb en el águila imperial, que podrían explicarse por la presencia en su dieta de aves acuáticas con potencial contaminación por perdigones de plomo.

Las diferencias significativas encontradas en las concentraciones de plomo, cuando se comparan las plumas rémiges y rectrices en águila imperial, ponen de manifiesto la importancia del conocimiento del patrón de muda de las especies a la hora de elegir la pluma adecuada para este tipo de estudios.

En términos de evaluar la efectividad del Real Decreto 581/2001, aunque no se han detectado diferencias significativas en las concentraciones de plomo en función del período (anterior o posterior al 2002), se aprecia que los niveles de plomo en las

plumas de águila imperial tienden a disminuir en el período posterior al 2002, especialmente dentro del Parque Nacional de Doñana. Los datos indican que la aplicación de este decreto en humedales ha sido efectiva ya que los niveles han disminuido y por tanto redunda como elemento positivo de gestión para el Parque Nacional de Doñana.

En el caso del quebrantahuesos no se han encontrado diferencias significativas en las concentraciones de plomo ni a lo largo del período 1994-2006 ni entre pollos pertenecientes o no al Parque Nacional de Ordesa y Monte Perdido. Esto pone de manifiesto que para esta especie el Parque Nacional, como área protegida, no tiene ningún significado a efectos de favorecer una menor exposición a un contaminante ambiental como el plomo.

Hay que dejar claro que este tipo de aproximación implica problemas derivados de las particularidades de las especies que se han seleccionado para el estudio dentro de los Parques Nacionales. En el caso del águila imperial, dentro del Parque Nacional de Doñana, teniendo en cuenta el pequeño tamaño poblacional de la especie, la disponibilidad de plumas, como material imprescindible para abordar este tipo de estudios, es limitada y redunda en una baja disponibilidad de datos. Un complemento para solucionar esta limitación consiste en seguir una aproximación multiespecies que además puede contribuir a dar una idea más global y detallada de la problemática de contaminación en los territorios de estudio.

El estudio llevado a cabo demuestra que el método **NO INVASIVO** empleado para monitorizar plomo en especies con especial nivel de protección puede ser adecuado para detectar exposición al plomo, teniendo en cuenta que estarían reflejando los niveles correspondientes al momento de crecimiento de la pluma. Además, el hecho de haber

encontrado que los niveles de plomo varían según los años en el caso del águila imperial, representa una importante llamada de atención para hacer un seguimiento temporal continuado.

Las técnicas de estudio no invasivas, basadas en el empleo de plumas, que se han aplicado en este proyecto de investigación son relativamente recientes, por lo que no existe un protocolo conocido y/o establecido a día de hoy, a nivel de gestión nacional. Nuestra recomendación es que debería generalizarse esta práctica para poder contar con un programa de seguimiento temporal y espacial continuado ya que se trata de una herramienta de control y seguimiento que puede proporcionar una valiosa información para detectar problemas puntuales de contaminación por plomo en especies particularmente sensibles de las que es imposible obtener, en muchas ocasiones, otro tipo de material biológico adecuado para medir los niveles. Consideramos que para llevar a cabo este seguimiento se deben crear bancos de muestras que permitirían hacer una lectura detallada de lo que está pasando. A tal fin **LA PLUMA** es un material ideal.

AGRADECIMIENTOS

A Peppa Saba, por el gran esfuerzo realizado en la recolección de plumas de águila imperial. Al Departamento de Medio Ambiente del Gobierno de Aragón (GA) y especialmente a los Jefes de Servicio de Biodiversidad Julio Guiral, Jesús Insausti y Manuel Alcántara. A la Fundación para la Conservación del Quebrantahuesos (FCQ) por proporcionar la colección de plumas de quebrantahuesos. La Dra. M. Sáez agradece su contrato como investigador dentro del proyecto RESIDUOS, financiado por la Comunidad de Madrid. J.L. Roscales disfruta de una beca FPI, E. Blázquez ha tenido un contrato I3P.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALTMAYER, M., DITTMAN, J., DMOWSKI, K., WAGNER, G., MULLER, P. 1991. Distribution of elements in flight feathers of a white-tailed eagle. *The Science of the Total Environment* 105: 157-164.
- BEHRENS, J., BROOKS, J. 2000. Wind in their wings: the condor recovery program. *Endangered Species Bulletin* 25: 8-9.

- BURGER, J. 1993. Metals in avian feathers: bioindicators of environmental pollution. *Reviews in Environmental Toxicology* 5: 203–311.
- BURGER, J., MIRARCHI, R.E., LISANO, M.E. 1986. Effects of lead shot ingestion on captive mourning dove survivability and reproduction. *Journal of Wildlife Management* 50: 1-8.
- BURGER, J., GOCHFELD, M. 1995. Effects of varying temporal exposure to lead on behavioral development in herring gull (*Larus argentatus*) chicks. *Pharmacology, biochemistry and behaviour* 52(3): 601-608.
- BURGER, J., GOCHFELD, M. 2000. Effects of lead on birds (Laridae): a review of laboratory and field studies. *Journal of Toxicology and Environmental Health* 3: 59-78.
- CERRADELO, S., MUÑOZ, E., TO-FIGUERAS, J., MATEO, R., GUITART, R. 1992. Intoxicación por ingestión de perdigones de plomo en dos águilas reales. Doñana, *Acta Vertebrata* 19: 122-127.
- CRAMP, S., SIMMONS, K.E.L. 1977. *The birds of the West Palearctic*. Oxford University Press: London, UK.
- DAUWE, T., BERVOETS, L., PINXTEN, R., BLUST, R., EENS, M., 2003. Variation of heavy metals within and among feathers of birds of prey: effects of molt and external contamination. *Environmental Pollution* 124: 429-436.
- DAUWE, T., JANSSENS, E., BERVOETS, L., BLUST, R., EENS, M., 2004. Relationships between metal concentrations in great tit nestlings and their environment and food. *Environmental Pollution* 131: 373-380.
- DENNEMAN, W.D., DOUBEN, P.E.T., 1993. Trace metals in primary feathers of the barn owl (*Tyto alba guttattus*) in the Netherlands. *Environmental Pollution* 82: 301–310.
- DMOWSKI, K., GAST, F., MULLER, P., WAGNER, G., 1984. Variability of cadmium and lead concentrations in bird feathers. *Naturwissenschaften* 71: 639–640.
- FRIEND, M. 1987. *Field guide to wildlife diseases*. US Department of the Interior, Fish and Wildlife Service, Washington, D.C.
- FURNESS, R.W., MUIRHEAD, S.J., WOODBURN, M., 1986. Using bird feathers to measure mercury in the environment: relationships between mercury content and moult. *Marine Pollution Bulletin* 17: 27–30.
- GIL, J.A., DIEZ, O., BÁGUENA, G., LORENTE, L., ANTOR, R., PÉREZ, C., LOSADA, J.A., LONGARES, L.A., ALCÁNTARA, M., 2005. Patrones de dispersion juvenile del quebrantahuesos (*Gypaetus barbatus*) en los Pirineos (1995-2003). FCQ, Gobierno de Aragón, Departamento de Medio Ambiente. Plan de recuperación del quebrantahuesos en Aragón.
- GOCHFELD, M., BELANT, J.L., SHUKLA, T., BENSON, T., BURGUER, T., 1996. Heavy metals in laughing gulls: gender, age and tissue differences. *Environmental Toxicology and Chemistry* 15: 2275-2283.
- GOLDEN, N.H., RATTNER, B.A., COHEN, J.B., HOFFMAN, D.J., RUSSEK-COHEN, E., OTTINGER, M.A. 2003. Lead accumulation in feathers of nestling black-crowned night herons (*Nycticorax nycticorax*) experimentally treated in the field. *Environmental Toxicology and Chemistry* 22(7): 1517-24.
- GONZÁLEZ, L.M., ORIA, J., SÁNCHEZ, R., MARGALIDA, A., ARANDA, A., PRADA, L., CALDERA, J., SÁNCHEZ, R. 2008. Status and habitat changes in the endangered Spanish Imperial Eagle *Aquila adalberti* population during 1974–2004: implications for its recovery. *Bird Conservation International* 18: 242-259
- GOYER, R.A. 1996. Toxic effects of metals. En Cassarett & Doull's toxicology, ed. Klaassen, C.D. pp. 691-736. McGraw-Hill, New York.
- GUITART, R., MAÑOSA, S., THOMAS, V.G., MATEO, R. 1999. Perdigones y pesos de plomo: ecotoxicología y efectos para la fauna. *Revista de Toxicología* 16: 3-11.
- HAHN, E., HAHN, K., STOEPLER, M. 1993. Bird feathers as bioindicators in areas of the German Environmental Specimen Bank— bioaccumulation of mercury in food chains and exogenous deposition of atmospheric pollution with lead and cadmium. *The Science of the Total Environment* 139/140: 259–270.

- HERNÁNDEZ, M. 1995. Lead poisoning in a free-ranging imperial eagle. Supplement to the Journal of Wildlife Diseases 31, Newsletter.
- HERNÁNDEZ, M. 2005. Exposición al plomo en la población pirenaica de quebrantahuesos. En Margalida, A. y Heredia, R. (Eds.) Biología de la Conservación del Quebrantahuesos *Gypaetus barbatus* en España: 165-174. Organismo Autónomo Parques Nacionales. Madrid.
- HODGSON, E., LEVI, P.E. 1997. A textbook of modern toxicology. Appleton & Lange, Stamford, Connecticut.
- HUGHES, K.D., EWINS, P.J., CLARK, K.E., 1997. A comparison of mercury levels in feathers and eggs of osprey (*Pandion haliaetus*) in the North American Great Lakes. Archives of Environmental Contamination and Toxicology 33: 441-452.
- KENDALL, R.J., LACHER, T.E., BUNCK, C., DANIEL, B., DRIVER, C., GRUE, C.E., LEIGHTON, F., STANSLEY, W., WATANABE, P.G., WHITWORTH, M. 1996. An ecological risk assessment of lead shot exposure in non-waterfowl avian species: Upland game birds and raptors. Environmental Toxicology and Chemistry 15: 4-20.
- LABONDE, J. 1995. Toxicity in pet avian patients. Seminars in Avian and Exotic Pet Medicine 4, 23-31.
- LOCKE, L.N., FRIEND, M. 1992. Lead poisoning of avian species other than waterfowl. En Lead poisoning in waterfowl, ed. Pain, D.J. pp. 19-22. The International Waterfowl and Wetland Research Bureau. Slimbridge, Reino Unido.
- MATEO, R., ESTRADA, J., PAQUET, J-Y., RIERA, X., DOMÍNGUEZ, L., GUITART, R., MARTÍNEZ-VIALTA, A. 1999. Lead shot ingestion by marsh harriers *Circus aeruginosus* from the Ebro delta, Spain. Environmental Pollution 104: 435-440.
- MATEO, R., CADENAS, R., MÁÑEZ, M., GUITART, R. 2001. Lead shot ingestion in two raptor species from Doñana, Spain. Ecotoxicology and Environmental Safety 48: 6-10.
- MATEO, R., MOLINA, R., GRÍFOLS, J., GUITART, R. 1997. Lead poisoning in a free ranging griffon vulture (*Gyps fulvus*). The Veterinary Record 140: 47-48.
- MATEO, R., TAGGART, M., MEHARG, A.A. 2003c. Lead and arsenic in bones of birds of prey from Spain. Environmental Pollution 126: 107-114.
- MATEO, R., BEYER, W.N., RAMIS, A., SPANN, J.W., HOFFMAN, D.J. 2003a. Relationship between oxidative stress, pathology and behavioral signs of lead poisoning in mallards. Journal of Toxicology and Environmental Health-Part A 66: 1371-1389.
- MATEO, R., BEYER, W.N., SPANN, J.W., HOFFMAN, D.J. 2003b. Relation of fatty acid composition in lead-exposed mallards to fat mobilization, lipid peroxidation and alkaline phosphatase activity. Comparative Biochemistry and Physiology-Part C. 135: 451-458.
- MATEO, R., GREEN, A.J., LEFRANC, H., BAOS, R., FIGUEROLA, J. 2007. Lead poisoning in wild birds from southern Spain: A comparative study of wetland areas and species affected, and trends over time. Ecotoxicology and Environmental Safety 66: 119-126.
- MATEO, R., 2009. Lead poisoning in wild birds in Europe and the regulations adopted by different countries. In R. T. Watson, M. Fuller, M. Pokras and W.G. Hunt (Eds.). Ingestion of Lead from Spent Ammunition: Implications for Wildlife and Humans. The Peregrine Fund, Boise, Idaho, USA.
- MORGAN, G.W., EDENS, F.W., THAXTON, P., PARKHURST, C.R. 1975. Toxicity of dietary lead in Japanese Quail. Poultry Science 54: 1636-1642.
- PAIN, D.J. 1992. Lead poisoning of waterfowl: A review. En Lead poisoning in waterfowl, ed. Pain, D.J. pp. 7-13. The International Waterfowl and Wetlands Research Bureau. Slimbridge, Reino Unido.
- PAIN, D.J., AMIARD-TRIQUET, C. 1993. Lead poisoning in raptors in France and elsewhere. Ecotoxicology and Environmental Safety 25: 183-192.
- PAIN, D.J., AMIARD-TRIQUET, C., BABOUX, C., BURNELEAU, G., EON, L., NICOLAU-GUILLAUMET, P. 1993. Lead poisoning in wild populations of Marsh Harrier *Circus aeruginosus* in the Camargue and Charente-Maritime, France. Ibis 135: 379-386.
- PAIN, D.J., BABOUX, C., BURNELEAU, G. 1997. Seasonal blood lead concentrations in marsh harriers *Circus aeruginosus* from Charente-Maritime, France: Relationship with the hunting season. Biological Conservation 81: 1-7.

- PAIN, D.J., MEHARG, A.A., FERRER, M., TAGGART, M., PENTERIANI, V. 2005. Lead concentrations in bones and feathers of the globally threatened Spanish imperial eagle. *Biological Conservation* 121: 603-610.
- PATTEE, O.H., HENNES, S.K. 1983. Bald eagles and waterfowl: the lead shot connection. En 48th North American Wildlife Conference 1983. pp. 230-237. The Wildlife Management Institute, Washington, D.C.
- PATTEE, O.H., WIEMEYER, S.N., MULHERN, B.M., SILEO, L., CARPENTER, J.W. 1981. Experimental lead-shot poisoning in bald eagles. *Journal of Wildlife Management* 45: 806-810.
- PLATT, J.B. 1976. Bald Eagles wintering in the Utah desert. *American Birds* 30: 783-788.
- REDIG, P.T. 1987. Medical management of birds of prey. pp. 72-76. The Raptor Center, University of Minnesota, St. Paul.
- REICHEL, W.L., SCHMELING, S.K., CROMARTIE, E., KAISER, T.E., KRYNITSKY, A.J., LAMONT, T.G., MULHERN, B.M., PROUTY, R.M., STAFFORD, D.J., SWINEFORD, D.M. 1984. Pesticide, PCB and lead residues and necropsy data from bald eagles for 32 states 1978-81. *Environmental Monitoring and Assessment* 4: 395-403.
- ROCKE, T.E., SAMUEL, M.D. 1991. Effects of lead shot ingestion on selected cells of the mallard immune system. *Journal of Wildlife Diseases* 27: 1-9.
- SCHEUHAMMER, A.M., NORRIS, S.L. 1996. The ecotoxicology of lead shot and lead fishing weights. *Ecotoxicology* 5: 279-295.
- TRUST, K.A., MILLER, M.W., RINGELMAN, J.K., ORME, I.M. 1990. Effects of ingested lead on antibody production in mallards (*Anas platyrhynchos*). *Journal of Wildlife Diseases* 26: 316-322.
- U.S.F.W.S. 1975. Issuance of annual regulations permitting the sport hunting of migratory birds. Final Environmental Statement. U. S. Fish and Wildlife Service, Washington, D.C.
- WEYERS, B., GLUCK, E., STOEPPLER, M. 1988. Investigation of the significance of heavy metal contents of blackbird feathers. *The Science of the Total Environment* 77: 61-67.
- WIEMEYER, S.N., SCOTT, J.M., ANDERSON, M.P., BLOOM, P.H., STAFFORD, C.J. 1988. Environmental contaminants in California condors. *Journal of Wildlife Management* 52: 238-247.