

EFFECTOS DEL ECOTURISMO SOBRE LAS RESPUESTAS FISIOLÓGICAS DE ESTRÉS EN CIGÜEÑAS BLANCAS DEL PARQUE NACIONAL DE DOÑANA

JULIO BLAS^{1*}, FERNANDO TORRES-MEDINA¹⁻², SONIA CABEZAS¹⁻²,
FABRIZIO SERGIO¹, TRACY A. MARCHANT²

RESUMEN

El aumento de la presencia humana en el medio natural constituye una realidad global, cuyos efectos sobre la fauna silvestre son motivo de preocupación para científicos y gestores de la biodiversidad. La Red de Parques Nacionales permite mantener poblaciones de fauna libres de presiones antrópicas, pero la conservación resulta más efectiva propiciando una conciencia pública de conocimiento y valoración de los recursos basada en la interacción con el medio natural. Por este motivo, el fomento de las actividades ecoturísticas resulta igualmente prioritario en los Parques Nacionales, generando un posible conflicto con la conservación. En este trabajo, comprobamos si el ecoturismo constituye una fuente de estrés para las poblaciones de cigüeña blanca *Ciconia ciconia* del Parque Nacional de Doñana y su entorno. Para estimar la respuesta fisiológica de estrés, se cuantificaron niveles de corticosterona (hormona del estrés en aves) en polluelos de cigüeña expuestos a diferentes grados de presencia ecoturística. Nuestros resultados mostraron diferencias en la actividad adrenocortical de cigüeñas blancas expuestas al ecoturismo respecto a con-específicos libres de presencia humana. Dichas diferencias se manifestaron al utilizar medidas de corticosterona en pluma (que permiten estimar trayectorias fisiológicas a largo plazo) y pasaron desapercibidas en muestras de sangre (que sólo reflejan trayectorias fisiológicas a corto plazo). Los inferiores niveles de corticosterona en plumas de aves expuestas al ecoturismo pueden reflejar una des-sensibilización fisiológica compatible con estrés crónico, y/o una menor exposición a perturbaciones en las zonas ecoturísticas mediada por el efecto «escudo humano» de protección frente a depredadores. Las consecuencias de estos dos procesos se han demostrado deletéreas para la conservación de otras poblaciones de vertebrados, reforzando la necesidad de utilizar los Parques Nacionales para limitar el contacto entre humanos y fauna silvestre, y justificando la existencia de áreas de acceso público restringido como las que actualmente existen en el Parque Nacional de Doñana.

Palabras clave: *Ciconia ciconia*, Corticosterona, Ecoturismo, Estrés, Efecto Escudo Humano, Hipótesis del Habitat Seguro, Parque Nacional de Doñana, Presión antrópica, Respuesta adrenocortical.

¹ Estación Biológica de Doñana, Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC), 41092. Sevilla.

² Department of Biology, University of Saskatchewan. 112 Science Place, Saskatoon, SK. S7N5E2. Canadá.

EFFECTS OF ECOTOURISM ON THE PHYSIOLOGICAL RESPONSE TO STRESS IN WHITE STORKS FROM DOÑANA NATIONAL PARK

ABSTRACT

The increased presence of humans in the natural environment constitutes a global reality, whose effects on wildlife are of concern to scientists and managers of biodiversity. The National Parks Network allows maintaining wildlife populations free of anthropogenic pressures, but conservation is more effective when it fosters public awareness and knowledge as well as an appraisal of resources based on interactions with the natural environment. For this reason, the promotion of ecotourism activities is also a priority for National Parks, generating a potential conflict with conservation. In this work, we tested whether ecotourism is a source of stress for white stork *Ciconia ciconia* populations in Doñana National Park and its surroundings. In order to assess the physiological stress response, levels of corticosterone (the avian stress hormone) were quantified in stork chicks exposed to different degrees of ecotourism presence. Our results showed differences in the adrenocortical activity of white storks exposed to ecotourism with respect to conspecifics that were not subjected to human presence. These differences were manifested when using corticosterone measurements in feathers (which allow estimating long-term physiological trajectories) and went unnoticed in blood samples (which only reflect short-term physiological trajectories). The lower levels of corticosterone in the feathers of birds exposed to ecotourism may reflect a physiological de-sensitization compatible with chronic stress, and/or a lower exposure to disturbances mediated by a «human shield» effect against predators in ecotouristic areas. The consequences of these two processes have proved deleterious for the conservation of other vertebrate populations, reinforcing the need to use National Parks to limit contact between humans and wildlife, and justifying the existence of areas of restricted public access such as those currently existing in Doñana National Park.

Key words: *Ciconia ciconia*, Corticosterone, Ecotourism, Stress, Human Shield Effect, Safe Habitat Hypothesis, Doñana National Park, Anthropogenic pressure, Adrenocortical response.

INTRODUCCIÓN

El aumento de la presión antrópica en los ecosistemas naturales constituye una realidad a nivel global (ELLIS & RAMANKUTTY 2008). Incluso cuando no se ejerce una transformación física del hábitat, la mera presencia humana en el medio puede interferir con el normal comportamiento y actividades vitales de la fauna silvestre (McCLUNG *et al.*, 2004; ELLENBERG *et al.*, 2007), pudiendo comprometer la viabilidad de poblaciones y ser causa de preocupación para gestores e investigadores (GILL *et al.*, 2001; MOORHOUSE 2015). La determinación de los niveles de estrés fisiológico en vertebrados silvestres y la obtención de estimas que informen sobre su capacidad para hacer frente a las perturbaciones pueden ser cruciales para anticipar y corregir problemas de conservación. Esta necesidad explica el reciente auge de la «fisiología de la conservación» en general (WIKELSKI & COOKE 2006), y de la «endocrinología de campo» en particular (WALKER *et al.*, 2005; MADLIGER *et al.*, 2016). La endocrinología de campo es una disciplina transversal que integra herramientas tradicionalmente desarrolladas en el ámbito de la endocrinología (originalmente basadas en trabajos de laboratorio con roedores como modelos animales) y técnicas de campo propias de la ecología y la biología de la conservación (WALKER *et al.*, 2005; MADLIGER *et al.*, 2016).

Desde un punto de vista fisiológico, la exposición a estímulos ambientales potencialmente nocivos activa una «respuesta adrenocortical al estrés» cuyos mecanismos están ampliamente conservados en la historia evolutiva de los vertebrados (Figura 1; BLAS 2015). En el caso de las aves, la percepción de una situación de riesgo o amenaza genera una cascada de secreciones hormonales que involucran al eje endocrino hipotálamo-pituitaria-adrenal (HPA), y que conduce a la elevación de sus niveles circulantes de corticosterona (CORT; la principal hormona del estrés en este grupo de vertebrados). En ausencia de perturbaciones, los niveles de CORT son generalmente bajos, fluctuando diaria y estacionalmente en un rango de valores basales que permiten al individuo ajustar sus ritmos de actividad y funciones metabólicas a las demandas energéticas predecibles del medio (McEWEN & WINGFIELD 2003). Superpuesto a este patrón, la CORT circulante puede

mostrar elevaciones rápidas como respuesta a perturbaciones ambientales impredecibles (e.g., predadores, meteorología adversa, parásitos). Cuando estas elevaciones «agudas» o «inducidas por estrés» se mantienen a corto plazo (i.e., durante minutos u horas), la CORT facilitará cambios fisiológicos y de comportamiento encaminados a maximizar una supervivencia inmediata, suprimiendo actividades no esenciales para sobrellevar la emergencia. Aunque una vez transcurrida la amenaza la CORT circulante generalmente retorna hasta niveles basales, una exposición prolongada o repetida a los estímulos nocivos puede generar la desregulación crónica del eje HPA (WALKER *et al.*, 2005; DICKENS & ROMERO 2013). Esta desregulación, traducida en hiper- o en hipo-secreción de CORT puede mermar el desempeño funcional del organismo cuando se mantiene a largo plazo (i.e., durante días o semanas), interfiriendo con su normal comportamiento, metabolismo, respuesta inmune, crecimiento, reproducción, etc (DICKENS & ROMERO 2013; KLEIST *et al.*, 2018). En última instancia, cada nivel de CORT circulante puede facilitar cambios específicos en caracteres fisiológicos, morfológicos y de comportamiento (Figura 1, Panel 5; SAPOLSKY *et al.*, 2000), condicionando potencialmente el desempeño funcional y la eficacia biológica del organismo (BLAS *et al.*, 2007). La cuantificación de los niveles de CORT puede por tanto servir para estimar cómo son percibidos diferentes escenarios ambientales por las poblaciones de fauna silvestre, determinar qué actividades humanas constituyen una perturbación, comprobar si están generando respuestas de estrés, identificar problemas y eventualmente adelantar soluciones de conservación (DANTZER 2014; MADLIGER *et al.*, 2016).

Uno de los motivos para la creación de la Red de Parques Nacionales es el mantenimiento de espacios naturales donde las poblaciones silvestres estén a salvo de presiones antrópicas. Sin embargo, la conservación del medio natural resulta más efectiva cuando se propicia una conciencia pública de conocimiento, respeto y valoración de los recursos basados en la experiencia e interacción con el medio ambiente (GIANNECCHINI 1993). Por este motivo, el fomento de las actividades de ecoturismo, observación, ocio y recreo en la naturaleza («actividades ecoturísticas» en adelante) resulta

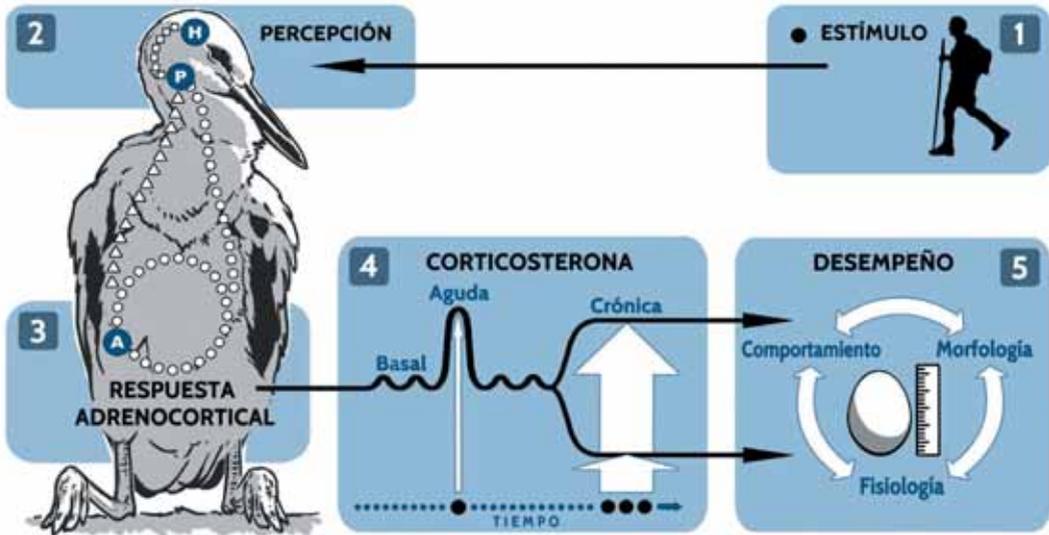


Figura 1. Representación esquemática de la respuesta adrenocortical al estrés en aves. La exposición a estímulos potencialmente nocivos en el medio natural [Panel 1] y su correspondiente percepción e integración [Panel 2], genera la activación del eje endocrino hipotálamo-pituitaria-adrenal [H-P-A: Paneles 2-3]. Dicha activación implica la secreción en cascada de una serie de hormonas, que culmina con la liberación de corticosterona desde el tejido adrenocortical hasta el torrente circulatorio. Los niveles de corticosterona circulante pueden cambiar de forma drástica a lo largo del tiempo, en función de la exposición a perturbaciones [Panel 4]. En condiciones normales la corticosterona fluctúa en un rango estrecho de valores basales (permitiendo al organismo ajustar sus ritmos de actividad y funciones metabólicas básicas, anticipándose al cambio ambiental). La exposición puntual a una perturbación (puntos negros en el eje del tiempo) genera una rápida elevación de la corticosterona hasta niveles agudos, facilitando cambios reactivos en su fisiología y comportamiento encaminados a maximizar una supervivencia inmediata. Una vez transcurrida la perturbación, la corticosterona retorna a sus niveles basales. Sin embargo, la exposición prolongada o repetida a estímulos nocivos puede generar una disregulación crónica del eje H-P-A, que se traducirá en hiper- o en hipo-secreción de corticosterona. A largo plazo, esta disregulación crónica puede mermar el desempeño funcional del organismo, interfiriendo con su normal comportamiento, metabolismo, respuesta inmune, crecimiento, reproducción, etc. En última instancia, cada nivel de corticosterona circulante facilita diferentes cambios en caracteres fisiológicos, morfológicos y de comportamiento [Panel 5], condicionando potencialmente el desempeño funcional del organismo.

Figure 1. Schematic representation of the adrenocortical response to stress in birds. Exposure to potentially noxious environmental stimuli [Panel 1] and subsequent perception and integration of such external signals [Panel 2] triggers the activation of the Hypothalamus-Pituitary-Adrenal axis [H-P-A: Panels 2-3]. Such activation involves the secretion of a cascade of hormones that culminates with the release of corticosterone from the adrenocortical tissue into the blood stream. Circulating corticosterone levels can change drastically as a function of time-related exposure to perturbations [Panel 4]. Under normal (unstressed) conditions, corticosterone titers fluctuate within a narrow range of typically low baseline levels (allowing a predictable adjustment of activity rhythms and basic metabolic functions in anticipation of change). Short-term exposure to perturbations (black circles in x-axis) produces a rapid elevation of corticosterone into stress-induced («acute») levels, which facilitate reactive changes in physiology and behavior aimed at maximizing immediate survival (at the expense of suppressing non-essential activities). Once the perturbation has passed, corticosterone levels return to their baseline range. However, prolonged or repeated exposure to noxious stimuli can generate dysregulation of the H-P-A axis, and this will lead to either hyper- or hypo-secretion of corticosterone. In the long term, chronic dysregulation can jeopardize the functional performance of the organism, interfering with normal behavior, metabolism, immune function, growth, reproduction, etc. Ultimately, each level of corticosterone may facilitate specific changes in physiology, morphology and behavior [Panel 5], potentially affecting the functional performance and fitness of the individual.

igualmente prioritario en la gestión de los espacios naturales protegidos, generando una actividad económica valorada en millones de dólares anualmente (KNIGHT 2009). La existencia de estas actividades puede no obstante entrar en conflicto con la propia conservación de la biodiversidad, demandando el trabajo conjunto de gestores y científicos para la detección y resolución de problemas. En el caso particular del Parque Nacional de Doñana y su entorno, se han puesto en práctica numerosas estrategias de gestión encaminadas a minimizar el potencial impacto de la presencia humana sobre las poblaciones de fauna silvestre. Estas medidas incluyen la restricción y prohibición del tránsito en zonas de reproducción de especies emblemáticas amenazadas (e.g., QUIRÓS & BLANCO 2012), la delimitación de itinerarios y zonas de paso para usos tradicionales (e.g., romería de El Rocío) y la adecuación de espacios públicos donde concentrar actividades ecoturísticas. Pero, ¿cómo responden las poblaciones de aves a estas medidas? ¿Es posible determinar si las actividades ecoturísticas constituyen una fuente de estrés? ¿Puede el ecoturismo actuar como un factor selectivo modificando los fenotipos poblacionales?

El presente trabajo pretende abordar las cuestiones arriba planteadas determinando los niveles de CORT en aves expuestas a diferentes grados de presencia ecoturística en Doñana. A priori, podemos plantear la hipótesis de que el ecoturismo constituye una fuente de estrés crónico para las poblaciones de aves. Aunque el paradigma tradicionalmente aceptado para considerar que un estímulo ambiental genera estrés crónico postulaba una mayor secreción de CORT (i.e., hiper-activación del eje HPA), actualmente no existe un consenso a este respecto (DICKENS & ROMERO 2013). En su lugar, se postula que la dirección del cambio (aumento o disminución de la secreción) es poco importante comparado con el hecho de que se produzca en sí un cambio en la secreción de CORT ligado al estímulo antrópico (DICKENS & ROMERO 2013). Por ello, la hipótesis del estrés crónico predice una relación significativa, ya sea positiva (hiper-secreción) o negativa (hipo-secreción), entre los niveles de CORT basal o integrada y la intensidad de exposición ecoturística. Para comprobar estas hipótesis se utilizó a la población de cigüeñas blancas *Ciconia ciconia* de Doñana y su entorno (Figura 2). Este modelo

de estudio fue elegido por tratarse de una especie abundante y mostrar una amplia distribución espacial durante la reproducción, con presencia en zonas con exposición ecoturística nula, intermedia y elevada. Los resultados de este trabajo se encuadran en el proyecto titulado «La respuesta hormonal al estrés como indicador biológico de perturbaciones antrópicas en el Parque Nacional de Doñana» ejecutado durante el periodo 2013-2016 en el Parque Nacional de Doñana y su entorno, y subvencionado por el Organismo Autónomo Parques Nacionales.

MATERIAL Y MÉTODOS

Selección del modelo y las zonas de estudio

Al inicio del proyecto de investigación, entre marzo y junio de 2013, se realizaron prospecciones espaciales intensivas de las zonas recreativas, de ocio y observación de la naturaleza del Parque Nacional de Doñana y su entorno inmediato, así como entrevistas con personal ligado al parque (guardas, gestores, ornitólogos e investigadores). Estas actividades tuvieron por finalidad localizar poblaciones de aves que fueran adecuadas para comprobar las hipótesis planteadas en el marco del presente proyecto, y concluyeron con la selección de la población reproductora de cigüeña blanca como modelo de estudio. La cigüeña blanca (Figura 2A) es un ciconiforme de gran tamaño (peso 2275-4400 g), dieta carnívora y oportunista, ligada a zonas húmedas y pastizales y abundante como reproductor en la vera, lagunas y arrozales del Parque Nacional de Doñana y su entorno. Se trata de un ave potencialmente longeva, con estrategias migratorias mixtas (en la población coexisten individuos sedentarios y migradores; BÉCARES, BLAS *et al.*, 2019), socialmente monógama (pero ver TURJEMAN *et al.*, 2016) y con reproducción anual concentrada en los meses de marzo a julio. En Doñana nidifica sobre plataformas construidas en árboles (principalmente alcornoques, encinas, acebuches, pinos y eucaliptos) que puede reutilizar durante décadas, y pone entre 1 y 5 huevos durante los meses de marzo-abril. Ambos sexos comparten la incubación (que dura 33-34 días) y los cuidados parentales. Los pollos eclosionan en mayo y muestran un desarrollo semi-altricial que se prolonga durante 60-90 días de estancia en



Figura 2. La cigüeña blanca (A) fue utilizada como modelo de estudio para cuantificar los efectos del ecoturismo sobre los niveles de glucocorticoides. En la foto se muestra una pareja de cigüeñas adultas (nótese el color rojo de los picos) posadas sobre su nido, junto a sus tres polluelos (de picos negros). El nivel inferior de presencia ecoturística correspondió a nidos localizados en la finca de Matasgordas, en el interior del Parque Nacional de Doñana (B). Aquí la exposición ecoturística es nula, al tratarse de una finca vallada, de acceso prohibido al público y con presencia humana muy limitada. En contraposición, el nivel de exposición ecoturística máximo correspondió a nidos localizados en la Dehesa de Abajo, una Reserva Natural situada en el borde Noreste del Espacio Natural de Doñana (C). En la foto, se observan dos nidos con adultos incubando (círculos rojos) localizados a escasos metros de las infraestructuras recreativas.

Figure 2. The white stork (A) was used as a study model to quantify the effects of ecotourism on glucocorticoid levels. The photo shows a pair of adult storks (note the red color of the beaks) perched on their nest, beside their three chicks (note their black beaks). The lowest level of ecotouristic presence corresponded to nests located in Matasgordas, a plot of land in the interior of the Doñana National Park (B). Here the ecotouristic presence is null, as the plot is fenced, with access forbidden to the public and very limited human presence. In contrast, the maximum level of ecotouristic exposure corresponded to nests located in the Dehesa de Abajo, a Natural Reserve located on the Northeast edge of the Doñana Natural Area (C). The photo shows two nests with adults incubating (red circles) located a few meters from the recreational infrastructures.

nido (CRAMP & SIMMONS 1977; REDONDO *et al.*, 1995). Investigaciones previas han demostrado que el desarrollo de la respuesta adrenocortical al estrés en los pollos de cigüeña es un proceso gradual, y los niveles de CORT aguda muestran un marcado aumento ligado a la edad (BLAS *et al.*, 2006).

Los pollos de cigüeña muestreados procedieron de nidos situados en zonas con presencia ecoturística que pudo ser nula, intermedia o elevada (niveles 0,1 y 2, respectivamente; ver abajo). Para este estudio se

seleccionó la información colectada en estas tres zonas durante el año 2013, incluyendo un total de 287 muestras de sangre y 189 muestras de pluma. El nivel inferior de presencia ecoturística (nivel 0) correspondió a nidos localizados en la finca de Matasgordas (Figura 2B), una dehesa abierta de alcornoques, fresnos, tamariz y pastizal junto al borde norte de la marisma, 2 Km al Este de El Rocío (Huelva) y dentro del Parque Nacional de Doñana. La presencia humana en esta zona es mínima al tratarse de una finca vallada y de acceso prohibido al público. El tránsito de vehículos y personas es muy reducido,

y está generalmente relegado a las actividades de gestión del parque e investigación científica. Los nidos muestreados en esta zona se hallaron por tanto alejados de cualquier actividad recreativa. En contraposición, los niveles de exposición ecoturística intermedia y elevada (niveles 1 y 2, respectivamente) correspondieron a nidos localizados en la Dehesa de Abajo (Puebla del Río, Sevilla), una Reserva Natural concertada de c.a. 600 Ha, situada junto a la desembocadura del río Guadamar, en el borde Noroeste del Espacio Natural de Doñana y en la zona de contacto entre marismas y arrozales. Este espacio cuenta con un bosque laxo de acebuches, pinares, encinas adhesionadas y pastizales en torno a una laguna permanente. Además, existe una abundante infraestructura ecoturística que incluye caminos y senderos para recorrer a pie, en bicicleta y a caballo, observatorios ornitológicos, carteles informativos, merenderos al aire libre, un centro de interpretación de la naturaleza con restaurante-bar y varias zonas destinadas a parking. Este enclave protegido, cuyo logotipo es una cigüeña blanca incubando, constituye un destino ecoturístico de referencia para la observación de cigüeñas blancas, alojando hasta c.a. 400 parejas en una de las mayores colonias del Paleártico occidental. En este estudio consideramos que el nivel de exposición ecoturística más elevado (nivel 2) ocurrió en los nidos que mostraron un contacto directo con la mencionada infraestructura (Figura 2C), ya fuera en los árboles situados al borde de los caminos, dentro del área reservada para merendero al aire libre, junto al parking, o en su inmediata proximidad (a distancias <50 m de la mencionada infraestructura). El nivel de exposición intermedio (nivel 1) ocurrió en nidos apartados de la infraestructura ecoturística, a distancias superiores a 50 m, tanto en el interior del acebuchal como en la dehesa de encinas. En esta zona la prohibición de tránsito humano está indicada mediante una cartelería escasa (limitada a 1-2 carteles) pero no existen barreras físicas que impidan la entrada del público.

Protocolos de muestreo en campo

La utilización de muestras de sangre como sustrato para cuantificar niveles de CORT es el método más habitual para estimar la función adrenocortical en aves silvestres (BLAS 2015). Sin embargo, debe tenerse en cuenta que la propia captura y manipu-

lación del ave constituye en sí una perturbación, y por tanto que la CORT circulante previsiblemente se elevará en función del tipo de manejo y su duración (pudiendo interferir con la interpretación de resultados). Para evitar esta posible interferencia y asegurar que las muestras colectadas fueran comparables, los protocolos de manejo y extracción de sangre fueron estandarizados durante nuestro estudio, y los tiempos transcurridos desde la captura hasta la extracción fueron: (i) medidos con precisión para controlar su efecto *a posteriori*, o bien (ii) fijados *a priori*, estableciendo un rango temporal estrecho y estricto en los muestreos. De esta forma, la captura y manipulación fue utilizada como parte del diseño experimental encaminado a cuantificar la capacidad de respuesta al estrés de los sujetos muestreados. Adicionalmente (iii) se optó por utilizar muestras de pluma como sustrato biológico sobre el que cuantificar niveles de CORT. Los niveles de CORT en pluma registran la actividad adrenocortical experimentada por el ave durante el periodo de crecimiento de la misma, quedando la hormona «secuestrada» en la matriz inerte de queratina y células muertas (BORTOLOTTI *et al.*, 2008). La colección de muestras se realizó siguiendo tres protocolos:

(i) *Protocolo de muestreo a tiempos aleatorios.* Se obtuvieron 154 muestras de sangre a tiempos aleatorios, dentro de un intervalo temporal amplio comprendido entre 2 y 16 minutos. Tras acceder al nido mediante una escalera plegable, los pollos fueron capturados, marcados (mediante anillas de metal y de plástico), medidos (masa corporal en g y longitudes de pico y ala en mm), y a continuación transportados al suelo para proceder a la extracción de una sola muestra de sangre por ave. El tiempo de manipulación individual se calculó siempre como el intervalo transcurrido entre la captura del primer pollo de cada nido y el sangrado de cada uno de los pollos de ese mismo nido. A continuación los pollos fueron devueltos a su nido.

(ii) *Protocolo de muestreo mediante series de estrés.* Se obtuvieron 133 muestras de sangre a dos tiempos fijos, próximos a los minutos 2 y 30 tras la captura. Accediendo al nido mediante una escalera plegable, los pollos fueron capturados e inmediatamente transportados al suelo para proceder a la extracción

de dos muestras de sangre secuenciales. El protocolo de captura y restricción («capture and restraint protocol»); WINGFIELD & RAMENOFSKY 1999) incluyó una primera muestra obtenida pocos minutos tras la captura (rango: 2-5 minutos; media \pm error típico: 2.40 ± 0.08) y una segunda muestra 30 minutos más tarde (rango: 29-33 minutos tras la captura; media \pm error típico: 30.20 ± 0.10). Entre sucesivas muestras, los sujetos experimentales se mantuvieron aislados individualmente, en el suelo y en silencio, realizando las operaciones de marcaje y medición al concluir la extracción de la segunda muestra de sangre, justo antes de ser devueltos a su nido.

(iii) *Obtención de muestras de plumas.* Adicionalmente a los muestreos arriba descritos se tomaron muestras de pluma, seleccionado para ello tractos corporales no involucrados en el ejercicio de vuelo. En particular, se procedió a arrancar una pluma escapular de la espalda de cada ave (N=189), desechando la porción basal (irrigada, y aún en desarrollo) de las mismas y guardando el resto de la pluma en un sobre de papel etiquetado hasta su posterior análisis en el laboratorio. Las aves fueron marcadas y medidas como se ha descrito arriba, siendo devueltas a su nido a continuación.

Todas las muestras de sangre (0.5-1.0 ml por muestra; colectivamente <0.05% del peso corporal por individuo) se obtuvieron mediante punción de la vena braquial, utilizando agujas hipodérmicas y jeringas desechables. Las muestras se mantuvieron frescas en el interior de neveras portátiles hasta ser centrifugadas (1250 g, 10 minutos) el mismo día de su extracción, separando a continuación el plasma y manteniéndolo congelado (-80 °C) hasta realizar los análisis de laboratorio.

Análisis de laboratorio

La extracción de CORT se realizó utilizando éter dietílico en las muestras de plasma (siguiendo a WAYLAND *et al.*, 2002), y metanol para las muestras de pluma (siguiendo a BORTOLOTTI *et al.*, 2008). La eficiencia de extracción fue estimada atendiendo al porcentaje de recuperación radioactiva en muestras marcadas con 5000 CPM de CORT tritiada (incorporadas a cada una de las tandas de extracción), y resultó

ser siempre superior al 90% tanto en las muestras de plasma como en las de pluma. Los niveles de CORT fueron cuantificados mediante radioinmunoensayo sobre extractos previamente reconstituidos con 300 μ l (plasma) ó 600 μ l (plumas) de tampón fosfato salino (PBS, 0.05 M y pH 7.6). El anticuerpo (C8784; lote 090M47520) y la CORT estándar (C2505, lote 22K1439) fueron adquiridos de Sigma Chemicals (St Louis, MO, USA), y la CORT tritiada de Amersham Bioscience. Todas las muestras se analizaron por duplicado, y las diluciones seriadas de extractos mostraron siempre curvas de desplazamiento paralelas a la curva patrón. La variabilidad de los ensayos fue calculada mediante el coeficiente de variación (CV) asociado a los valores de CORT resultantes de seis muestras estándar (preparadas con una cantidad de CORT exacta conocida) incorporadas en cada uno de los ensayos. Los coeficientes de variación intra-ensayo y entre-ensayos fueron siempre inferiores al 7% y 11%, respectivamente. Todas las muestras mostraron valores por encima de los límites de detección de los radioinmunoensayos, que se llevaron a cabo en los laboratorios del Departamento de Biología de la Universidad de Saskatchewan (Canadá).

Tratamiento estadístico

La comprobación del efecto de la exposición ecoturística sobre los parámetros de actividad adrenocortical en pollos de cigüeña se realizó construyendo Modelos Lineales Generales Mixtos GLMM (ZUUR *et al.*, 2009), utilizando la librería «nlme» (<https://CRAN.R-project.org/package=nlme>) en R 3.2.3 (<https://www.r-project.org/>). Cada parámetro de actividad adrenocortical (niveles de CORT en plasma y en pluma; ver detalles abajo) fue considerado como una variable dependiente, y modelada asumiendo una distribución de errores de tipo normal con función de enlace identidad. La identidad del nido fue siempre incluida como un factor aleatorio, al objeto de controlar la posible pseudo-replicación asociada al muestreo de varios hermanos dentro de la misma nidada. Puesto que la edad de los pollos condiciona su capacidad de respuesta adrenocortical (BLAS *et al.*, 2005; 2006), esta variable fue calculada a partir de las medidas de longitud de ala (siguiendo a CHOZAS 1983) e incorporada a los modelos como covariable independiente. La exposición ecoturística fue considerada como un

factor con tres niveles: nula, intermedia y elevada (niveles 0, 1 y 2 respectivamente). El nivel de rechazo estadístico fue establecido *a priori* como $\alpha > 0.05$ (pruebas a dos colas). Los parámetros de actividad adrenocortical (variables dependientes) considerados, fueron:

(i) CORT plasmática obtenida por muestreo a tiempos aleatorios (ng/ml). Puesto que se espera que el tiempo de manejo (2-16 minutos) ejerza un efecto positivo sobre la secreción de CORT, esta variable y su interacción con la presencia ecoturística fueron incluidas en el GLMM como efectos independientes.

(ii) CORT plasmática basal, obtenida mediante series de estrés (ng/ml). Puesto que estas muestras fueron sistemáticamente obtenidas pocos minutos tras la captura del primer pollo del nido (y la CORT no mostró ninguna asociación con el tiempo de manejo; $R=0.161$; $P=0.193$), se consideró que los niveles de CORT correspondieron a los niveles basales, siendo por tanto representativos de la activación adrenocortical experimentada por el ave (i.e. pre-existente) antes de nuestras manipulaciones.

(iii) CORT plasmática aguda, obtenida mediante series de estrés (ng/ml). Puesto que estas muestras fueron sistemáticamente obtenidas c.a. 30 minutos tras la captura del primer pollo del nido (y la CORT resultante no mostró ninguna asociación con el tiempo de manejo: $R=0.054$; $P=0.665$), los niveles de CORT aguda o inducida por el estrés experimental se utilizaron como una estima representativa de la capacidad de respuesta al estrés a corto plazo del ave.

(iv) CORT plasmática integrada durante la series de estrés (ng*min/ml). Esta medida se calculó mediante la regla aritmética del trapecioide (BREUNER *et al.*, 1999; WALKER 2005b), estimando así el área bajo la curva formada por los niveles de CORT basales y agudos a lo largo de 30 minutos. Conceptualmente, este parámetro integra tanto las tasas de secreción como las de eliminación hormonal, proporcionando una estima de la cantidad total de CORT experimentada por el individuo durante el intervalo temporal asociado a una serie de estrés (BREUNER *et al.*, 1999; WALKER 2005b).

(v) CORT en plumas (pg/mm). Puesto que la pluma previsiblemente registra las variaciones hormonales circulantes experimentadas durante todo su crecimiento (incluyendo tanto las fluctuaciones basales como las agudas, y a lo largo de varias semanas), los niveles de CORT en pluma constituyeron una estima a largo plazo de la actividad adrenocortical del ave (BORTOLOTTI *et al.*, 2008).

RESULTADOS

Los niveles de CORT plasmática en muestras obtenidas a tiempos aleatorios tras la captura mostraron un marcado aumento ligado al tiempo de manipulación (Figura 3). Sin embargo, ni los valores medios ni la pendiente generada por el tiempo de manejo se vieron afectadas por el nivel de exposición ecoturística (Tabla 1-A). En las muestras de sangre obtenidas mediante series de estrés, la CORT basal mostró unos valores promedio de 5.9 ng/ml. Estos niveles basales fueron independientes del nivel de exposición ecoturística (Tabla 1-B; Figura 4A). Tras 30 minutos de res-

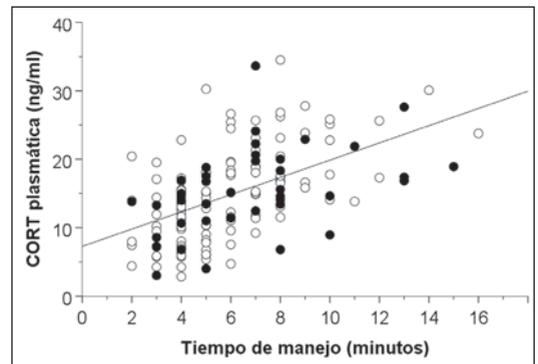


Figura 3. Niveles de corticosterona plasmática circulante en muestras de sangre obtenidas entre 2 y 16 minutos tras la captura y restricción experimental de pollos de cigüeña blanca procedentes de nidos expuestos a niveles moderados y elevados de presencia ecoturística (puntos blancos y negros respectivamente). La línea muestra los valores de corticosterona predichos mediante regresión lineal por el tiempo de manejo.

Figure 3. Plasma corticosterone levels in blood samples collected from nestling white storks after 2-16 minutes of experimental capture and restraint. Storks came from nests exposed to moderate or elevated ecotouristic presence (open and filled circles respectively). The line represents values predicted by handling time through linear regression.

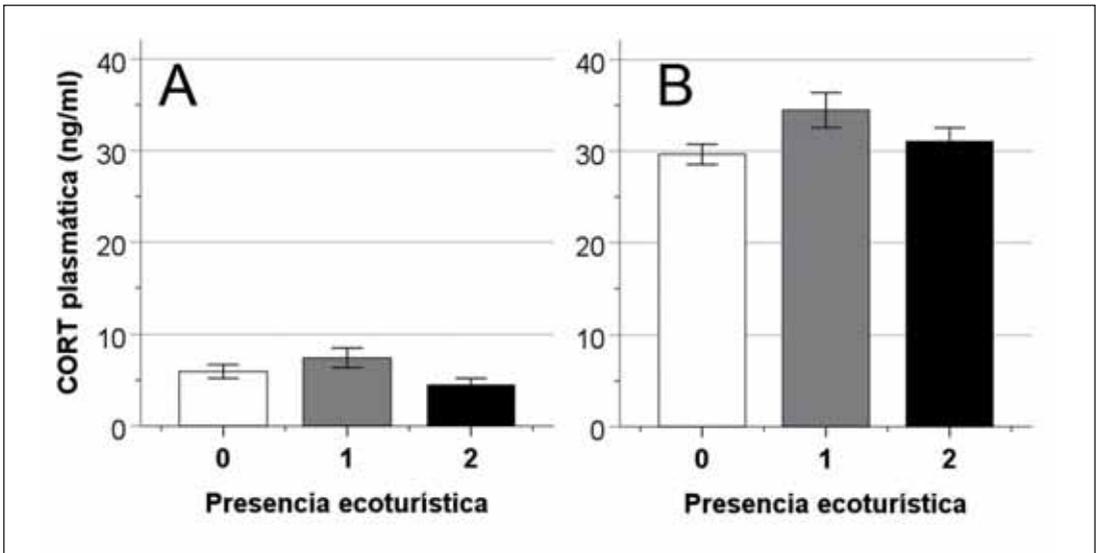


Figura 4. Niveles de corticosterona plasmática basal (panel A) y aguda (panel B) en muestras de sangre obtenidas durante series de estrés estandarizadas en pollos de cigüeña blanca, y en función de su nivel de exposición ecoturística. Las muestras de sangre basal y agudas fueron obtenidas respectivamente 2 y 30 minutos tras la captura. Las barras de error representan valores medios y errores típicos.

Figure 4. Levels of baseline (panel A) and stress-induced («acute»; panel B) corticosterone levels in blood samples collected through standardized stress series in white stork nestlings, and according to the level of ecotouristic exposure. Blood samples collected 2 and 30 minutes post-capture were used to characterize basal and stress-induced corticosterone levels respectively. Bars represent mean values and standard errors.

tricción en condiciones estandarizadas, la CORT circulante aumentó más de cinco veces en relación a los niveles basales (Figura 4), alcanzando unas concentraciones agudas promedio de 31.6 ng/ml. Los niveles de CORT aguda circulante mostraron un efecto positivo de la edad del pollo, pero no se vieron afectados por el nivel de exposición ecoturística (Tabla 1-C; Figura 4B). Ni la edad de los pollos ni la exposición ecoturística ejercieron efectos estadísticamente significativos sobre la CORT plasmática integrada (Tabla 1-D; Figura 5A). Sin embargo, ambos factores condicionaron la CORT en plumas (Tabla 1-E; Figura 5B). Los niveles de CORT en plumas fueron superiores en la zona con exposición ecoturística nula comparado con los registrados en zonas con exposiciones intermedias y elevadas (contrastes post-hoc de Tukey con corrección de Bonferroni: $Z=-3.22$, $P<0.01$ y $Z=-2.41$, $P<0.05$ respectivamente), que a su vez no mostraron diferencias entre sí ($Z=1.01$, $P=0.94$).

DISCUSION

Las concentraciones de CORT plasmática medidas a partir de muestras de sangre resultaron independientes del grado de exposición ecoturística al que se vieron expuestos los pollos de cigüeña blanca en Doñana. La mayoría de los estudios que han demostrado impactos del ecoturismo sobre los niveles circulantes de CORT en aves han utilizado protocolos de muestreo similares a los nuestros, describiendo cambios en uno o varios de los parámetros de estrés fisiológico considerados en nuestro trabajo. Aunque la presencia ecoturística raramente ha manifestado efectos sobre los niveles de CORT basal o integrada (ver resumen en VILLANUEVA *et al.*, 2012), la verificación de impactos sobre los niveles de CORT aguda constituye un resultado más habitual (e.g., MULLNER *et al.*, 2004; WALKER *et al.*, 2006; ELLEMBERG *et al.*, 2007). El aumento de los niveles de CORT aguda respecto a situaciones control

Modelo	Variable *	Estima del parámetro \pm error típico.	χ^2_{gl}	P
A. Dependiente: Corticosterona plasmática a tiempos aleatorios. N=154				
	Intercepto [†]	6.44 \pm 2.79	5.31 ₁	0.02
	Tiempo de manejo (minutos)	1.55 \pm 0.20	56.56 ₁	<0.01
	Edad (días)	-0.01 \pm 0.06	0.07 ₁	0.77
	Presencia ecoturística (2)	2.69 \pm 2.61	1.06 ₁	0.30
	Tiempo x Presencia ecoturística (2)	-0.52 \pm 0.36	2.09 ₁	0.14
B. Dependiente: Corticosterona plasmática BASAL (serie de estrés). N=67				
	Intercepto ^{††}	5.80 \pm 4.01	2.09 ₁	0.14
	Presencia ecoturística (1)	1.53 \pm 1.77	2.87 ₂	0.23
	Presencia ecoturística (2)	-1.41 \pm 1.62	-	-
	Edad (días)	3 x 10 ⁻⁰³ \pm 0.07	2 x 10 ⁻⁰³ ₁	0.96
C. Dependiente: Corticosterona plasmática AGUDA (serie de estrés). N=66				
	Intercepto ^{††}	4.64 \pm 6.01	0.59 ₁	0.43
	Presencia ecoturística (1)	1.91 \pm 2.50	1.17 ₂	0.55
	Presencia ecoturística (2)	-0.58 \pm 2.23	-	-
	Edad (días)	0.51 \pm 0.11	18.49 ₁	<0.01
D. Dependiente: Cort. plasmática INTEGRADA (serie de estrés). N=58				
	Intercepto ^{††}	288.35 \pm 133.54	4.66 ₁	0.03
	Presencia ecoturística (1)	119.18 \pm 67.38	5.09 ₂	0.07
	Presencia ecoturística (2)	-19.77 \pm 58.70	-	-
	Edad (días)	4.91 \pm 2.63	3.46 ₁	0.06
E. Dependiente: Corticosterona en PLUMA. N=189				
	Intercepto ^{††}	246.32 \pm 23.58	109.11 ₁	<0.01
	Presencia ecoturística (1)	-41.14 \pm 12.74	10.43 ₂	<0.01
	Presencia ecoturística (2)	-32.17 \pm 13.33	-	-
	Edad (días)	-2.70 \pm 0.42	40.76 ₁	<0.01

*Los valores numéricos mostrados entre paréntesis indican los niveles de la variable categórica «Presencia ecoturística». La estima para el nivel de presencia ecoturística 1(†) ó 0(††) está incluida en el valor del intercepto.

Tabla 1. Comprobación de los efectos de la presencia ecoturística sobre diferentes parámetros descriptores de la respuesta hormonal al estrés en cigüeñas blancas de Doñana. Se construyeron Modelos Lineales Generales Mixtos donde la identidad del nido fue considerada como un factor aleatorio (al objeto de controlar la posible pseudoreplicación asociada a varios pollos muestreados dentro de un mismo nido).

Table 1. Effects of eco-touristic presence on several adrenocortical parameters describing the hormonal response to stress in white storks from Doñana. We built General Linear Mixed Models with nest identity as a random term (to control the potential pseudoreplication associated to sampling several siblings within the same nests).

ha sido probado en adultos de pingüino ojigualdo *Megadyptes antipodes* (ELLEMBERG *et al.*, 2007), en pollos de pingüino patagónico *Spheniscus magellanicus* (WALKER *et al.*, 2005b) y en juveniles de hoacín *Opisthocomus hoazin* (MULLNER *et al.*, 2004) expuestos al ecoturismo y sugiriendo en todos los casos una sensibilización o acentuamiento

de las respuestas de estrés que aparentemente no sucede en los pollos de cigüeña. La respuesta contraria (i.e., disminución de las elevaciones de CORT aguda respecto a situaciones control) ha sido probada en otros tres estudios con pingüinos patagónicos expuestos a la presencia ecoturística (FOWLER 1999, WALKER *et al.*, 2006; VILLANUEVA *et al.*,

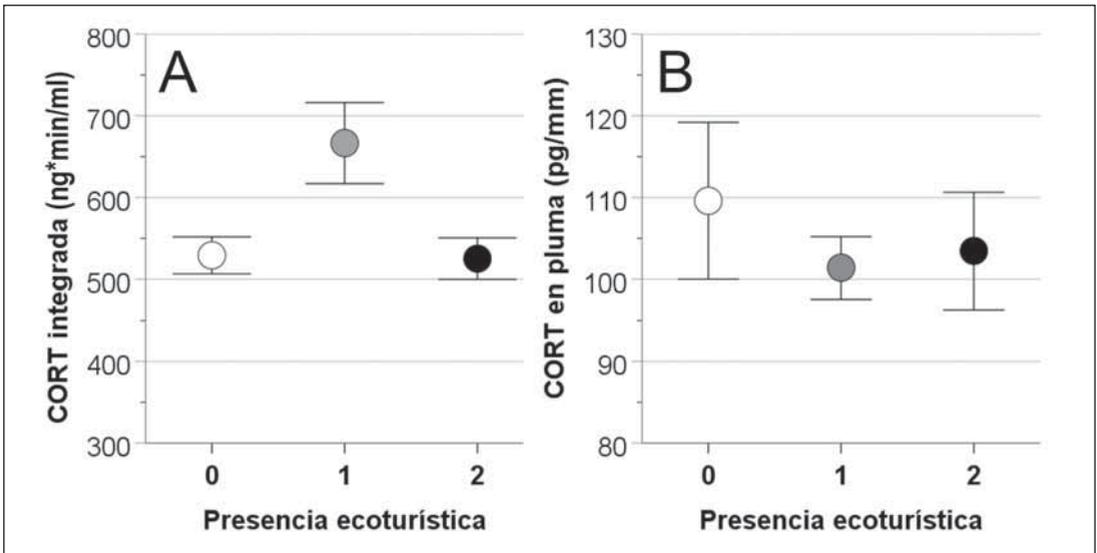


Figura 5. Niveles de corticosterona plasmática integrada durante los 30 minutos de manejo asociado a las series de estrés experimentales (panel A) y niveles de corticosterona en pluma (panel B) en pollos de cigüeña blanca. Se muestran valores medios y errores típicos en función del nivel de exposición ecoturística.

Figure 5. Levels of integrated plasma corticosterone during 30 minutes of capture and restraint stress series (panel A), and feather corticosterone titres (panel B) in nestling white stork nestlings. Mean values and standard errors are displayed as a function of the level of ecotouristic exposure.

2012), pero tampoco fue observada en las muestras de plasma de cigüeña. A priori, la ausencia de resultados en esta línea podría sugerir que el ecoturismo no afecta a la fisiología del estrés de los pollos de cigüeña en Doñana. Sin embargo, la resolución temporal asociada a los muestreos de sangre conlleva una serie de limitaciones que condicionan esa interpretación. La CORT plasmática constituye una medida instantánea, útil para estimar la trayectoria fisiológica del individuo en los momentos previos a su captura (a partir de muestras basales) y/o para inferir su capacidad de respuesta adrenocortical durante un lapso temporal concreto (i.e., el intervalo diseñado para las series de estrés). Por lo tanto, las posibles diferencias en niveles de CORT basal acontecidas antes de nuestros muestreos, o en niveles agudos a partir de 30 minutos pasarán posiblemente desapercibidas. Estas limitaciones ponen en evidencia la necesidad de obtener estimas sobre la trayectoria fisiológica del estrés en el individuo a más largo plazo, que ha sido en parte solucionada con el reciente desarrollo de técnicas para cuanti-

ficar niveles de CORT en plumas (BORTOLOTTI *et al.*, 2008; 2009). Al contrario de lo que ocurre en muestras de sangre, los niveles de CORT en plumas reflejan la exposición hormonal experimentada por el individuo durante el periodo de crecimiento de las mismas (BORTOLOTTI *et al.*, 2008), ofreciendo así una estima retrospectiva que integra niveles basales y agudos (ROMERO & FAIRHURST 2016) y que en el caso de las cigüeñas abarcó varias semanas de su crecimiento y desarrollo en el nido.

En nuestro estudio, los niveles de CORT en plumas resultaron significativamente inferiores en las aves expuestas al ecoturismo respecto a cigüeñas libres de presencia humana en el interior del Parque Nacional de Doñana. El patrón hallado podría responder a dos procesos complementarios potencialmente mediados por el ecoturismo: (i) la atenuación crónica de respuestas hormonales (hipótesis de la des-sensibilización fisiológica; CYR & ROMERO 2009), que reducirían las elevaciones de CORT aguda a partir de los 30 minutos muestreados, y/o (ii) la

creación de «hábitats seguros» mediante presencia ecoturística (Hipótesis del Hábitat Seguro; VALCARCEL & FERNÁNDEZ-JURICIC 2009) que disminuiría la frecuencia de perturbaciones y con ello los niveles de CORT depositados en plumas. A continuación se discutirán las condiciones que permiten estos dos procesos, y sus consecuencias para la coexistencia de poblaciones de aves silvestres y ecoturismo en los Parques Nacionales.

La reducción de los niveles de CORT agudos en respuesta al estrés (comparado con las elevaciones registradas en grupos control), ha sido un hallazgo frecuentemente ligado al ecoturismo. Por ejemplo, este efecto se ha descrito en pollos de pingüino patagónico de Punta Tombo (Argentina) sometidos a 5 minutos de exposición a la presencia humana (FOWLER 1999), en adultos de la misma especie sometidos a 15 minutos de presencia humana (VILLANUEVA *et al.*, 2012) ó 30 minutos de manipulación experimental (WALKER *et al.*, 2006) y en Iguanas marinas *Amblyrhynchus cristatus* de las islas Galápagos sometidas al mismo protocolo (ROMERO & WIKESKI 2002). Tradicionalmente, esta atenuación de las respuestas de estrés se consideraba suficiente para inferir una habituación fisiológica a la presencia humana. El proceso de habituación implica un aprendizaje, donde el animal expuesto al ecoturismo aprende a ignorar determinado estímulo específico (la presencia humana, que inicialmente era identificada como peligrosa) una vez que se demuestra inocua con el paso del tiempo y la experiencia. Sin embargo, recientemente se ha puesto de manifiesto que resulta incorrecto (y un error de consecuencias potencialmente graves para la conservación) asumir que la atenuación de las respuestas de estrés constituye por sí sola una prueba de habituación (CYR & ROMERO 2009). En su lugar, cuando dicha atenuación ocurre de forma inespecífica y/o general (e.g., WALKER *et al.*, 2006), estará realmente manifestando una alteración fisiológica consistente con el estrés crónico (mediado, por ejemplo, por sobreactivación de la retroalimentación o «feed-back» negativo; CYR & ROMERO 2009). Un animal crónicamente estresado puede por tanto secretar menos CORT a consecuencia de una desregulación de su respuesta de estrés, sin por ello dejar de identificar al humano como un estímulo perturbador. La literatura biomé-

dica asocia la des-sensibilización de las respuestas de estrés con los síndromes de fatiga crónica y de estrés posttraumático (McEWEN 1998; MILLER *et al.*, 2007), condiciones potencialmente análogas al estrés crónico en fauna silvestre. En nuestro caso de estudio, cabe pues plantear que los inferiores niveles de CORT cuantificados en plumas de zonas ecoturísticas reflejen una reducción genérica de las respuestas de estrés en los pollos de cigüeña, que sería compatible con el estrés crónico. En este mismo sentido apuntan los resultados del único estudio previo que ha utilizado los niveles de CORT en plumas para estudiar los efectos del ecoturismo. Los niveles de CORT en plumas de pingüino papúa *Pygoscelis papua* en Punta Hannah (una de las colonias más populares para el ecoturismo Antártico) resultaron inferiores a las registradas en Zonas Antárticas Especialmente Protegidas (BARBOSA *et al.*, 2013). Además, los reducidos niveles de CORT en pluma se relacionaron con una mayor contaminación por metales (Plomo y Niquel), sugiriendo una mayor exposición al estrés crónico en las colonias frecuentadas por ecoturistas (BARBOSA *et al.*, 2013). Una interpretación alternativa para el patrón hallado en nuestro estudio es que el ecoturismo actúe como una presión selectiva favoreciendo los fenotipos con mayor capacidad de ejercer feed-back negativo sobre el eje HPA. Este patrón ha sido hallado en poblaciones urbanas de mirlo europeo *Turdus merula*, que muestran una marcada disminución en los niveles de CORT aguda (inducida mediante la captura y manejo) respecto a poblaciones rurales (PARTECKE *et al.*, 2006).

Otro mecanismo complementario a los arriba descritos, es que la presencia humana transforme el medio en un lugar más seguro (Hipótesis del Hábitat Seguro; VALCARCEL & FERNÁNDEZ-JURICIC 2009), explicando los descensos de CORT en plumas registrados en zonas ecoturísticas de Doñana por la disminución de los factores que normalmente causarían estrés. Este proceso puede estar mediado por un descenso en el número de predadores, un efecto descrito como «Escudo Humano» (BERGER 2007). Incluso cuando la presencia humana ocurre puntualmente y ligada a actividades ecoturísticas, el descenso de la presión de predación puede liberar a las poblaciones presa de una importante fuente de estrés. Por ejemplo, la presencia

ecoturística ha demostrado reducir la probabilidad de encuentros entre cercopitecos verdes *Chlorocebus pygerythrus* y leopardos *Panthera pardus* en Parques Nacionales de Kenia (ISBELL & YOUNG 1993), y ofrecer refugio a ciervos y antílopes frente a sus predadores naturales en el Parque Nacional Grand Teton de EEUU (SHANNON *et al.*, 2014). En Doñana, este efecto Escudo Humano podría reducir la frecuencia con que las cigüeñas de zonas ecoturísticas experimentan unas perturbaciones que normalmente elevarían su CORT circulante, explicando el descenso de los niveles registrados en plumas. Además, vivir en un entorno libre de predadores permite reducir la inversión en vigilancia y aumentar el tiempo dedicado a otras actividades, como los cuidados parentales o la alimentación (WASSER *et al.*, 2014, NOWAK *et al.*, 2014). De esta forma, se minimizarían otras fuentes de estrés que normalmente elevan la CORT depositada en plumas, contribuyendo a explicar el patrón observado. Pero, ¿qué consecuencias tiene el efecto Escudo Humano para la conservación? Una de las repercusiones más patentes es la modificación de los fenotipos silvestres, que se transforman en animales más dóciles y atrevidos al interactuar repetidamente con humanos (que dejan de ser vistos como una amenaza, HIGHAM & SHELTON 2011), mostrando menos miedo y relajando su comportamiento antipredatorio natural (GEFFROY *et al.*, 2015). En nuestro modelo de estudio con las cigüeñas de Doñana, estos efectos quedan patentes al cuantificar las distancias de huida de aves adultas, que son marcadamente inferiores en las zonas con mayor exposición ecoturística (VÁZQUEZ-HIDALGO 2013). *A priori*, esta relajación de las respuestas antipredatorias frente al humano podría considerarse ventajosa, pues facilita una interacción más próxima entre ecoturistas y fauna silvestre, aumentando así la satisfacción del visitante. De hecho, la habituación comportamental al ecoturista ha llegado a ser promovida por los propios guardas y gestores en determinados Parques nacionales (e.g., para favorecer la observación de chimpancés *Pan troglodytes* en el Parque Nacional de Kibale, Uganda; LLOYD & AJAROVA 2005). Sin embargo, estos mismos fenotipos dóciles, atrevidos y con reducidas respuestas de huida pueden ser particularmente vulnerables a la predación y a la caza furtiva. Por ejemplo, se ha demostrado que las ardillas zorro *Sciurus niger* habi-

tuadas a la presencia humana reducen su respuesta antipredatoria frente a vocalizaciones experimentales de rapaces y carnívoros (predadores naturales de esta especie), sugiriendo una «transferencia» de la habituación inicialmente desarrollada en humanos, y posteriormente generalizada a otros predadores (McCLEERY 2009). En esta misma línea argumental, un reciente experimento con palomas *Columbia livia* radiomarcadas demostró que los individuos más dóciles y atrevidos en su interacción con humanos resultaban más frecuentemente depredados por rapaces (SANTOS *et al.*, 2015). Como ejemplo extremo, los gorilas *Gorilla gorilla* del Parque Nacional Kahuzi Biega (R.D. Congo) son 1.6 veces más susceptibles a la caza furtiva cuando han sido habituados a la presencia ecoturística (KASEREKA *et al.*, 2006). En conjunto, estos ejemplos justifican una llamada de atención a los científicos, gestores y conservadores de poblaciones de fauna expuestas al ecoturismo (GEFFROY *et al.*, 2015; 2016). Aunque la intensidad del ecoturismo como presión selectiva es predeciblemente más moderada que los procesos de domesticación y urbanización, muchos de sus efectos ocurren en el mismo sentido (GEFFROY *et al.*, 2015), pudiendo generar evolución genética y pérdida de biodiversidad. Si además consideramos que en ambientes libres de predadores el comportamiento antipredatorio puede desaparecer por completo en pocas generaciones (BLUMSTEIN *et al.*, 2004), el ecoturismo debe ser considerado como una presión selectiva real, con capacidad potencial para erosionar la diversidad genética de las poblaciones de fauna silvestre.

Recapitulando, nuestros resultados muestran diferencias en la actividad adrenocortical de cigüeñas blancas expuestas al ecoturismo, respecto a con-específicos libres de presencia humana. Dichas diferencias se manifiestan al utilizar medidas de CORT en pluma (que permiten estimar trayectorias fisiológicas a largo plazo) y pasan desapercibidas en muestras de sangre (que sólo reflejan la trayectoria fisiológica del individuo a corto plazo). Los inferiores niveles de CORT en plumas de aves expuestas al ecoturismo pueden reflejar una des-sensibilización fisiológica compatible con estrés crónico, y/o una menor exposición a factores de estrés en las zonas ecoturísticas. Las consecuencias de estos dos procesos se han demostrado deletéreas para la con-

servación de otras poblaciones de fauna silvestre, reforzando la necesidad de utilizar los Parques Nacionales para limitar el contacto entre humanos y fauna silvestre y justificando la existencia de áreas de acceso público restringido como las que actualmente existen en el Parque Nacional de Doñana.

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos al Organismo Autónomo Parques Nacionales (Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente) la financiación del proyecto 511/2012. También agradecemos la atención y apoyo que nos prestó en todo momento el personal del Espacio Natural de Doñana y del Equipo de Seguimiento de Procesos Naturales de la Estación Biológica de Doñana (EBD-CSIC). La Consejería

de Medio Ambiente de la Junta de Andalucía y el Ayuntamiento de Puebla del Río proporcionaron los permisos necesarios para llevar a cabo los trabajos de campo, que contaron con la inestimable colaboración de Basti Palacios, D. Vázquez, M. Ardila, J. Ayala, el Equipo de Seguimiento de Procesos Naturales y numerosos voluntarios de la EBD. Pep Amengual y un revisor anónimo aportaron comentarios y correcciones a una versión previa que contribuyeron a mejorar la calidad de este trabajo. Julio Blas fue financiado mediante el contrato RYC-2010-07120 del programa Ramón y Cajal (Ministerio de Ciencia e Innovación, CSIC y fondos FEDER) y Fernando Torres-Medina mediante la beca Isabel María López Martínez (Departamento de Biología, Universidad de Saskatchewan, Canadá). Francisco Hernández Fernández realizó las ilustraciones de la Figura 1.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BARBOSA, A.; DE MAS, E.; BENZAL, J.; DIAZ, J. I.; MOTAS, M.; JEREZ, S.; PERTIERRA, L.; BEAYAS, J.; JUSTEL, A.; LAUZURICA, P.; GARCIA-PEÑA, F. J.; SERRANO, T. 2013. Pollution and physiological variability in gentoo penguins at two rookeries with different levels of human visitation. *Antarctic Science* 25(2):329-338.
- BÉCARES, J.; BLAS, J.; LÓPEZ-LÓPEZ, P.; SCHULZ, H; TORRES-MEDINA, F.; FLACK, A.; ENG-GIST, P.; HÖFLE, U.; BERMEJO, A.; DE LA PUENTE, J. 2019. Migración y ecología espacial de la cigüeña blanca en España. Monografía nº 5 del programa Migra SEO/BirdLife, Madrid.
- BERGER, J. 2007. Fear, human shields and the redistribution of prey and predators in protected areas. *Biology Letters* 3:620-623
- BLAS, J. 2015. Stress in birds. En: C.G. Scanes (ed.) *Sturkie's Avian Physiology* (sixth edition). pp. 769-810. San Diego, CA; Elsevier.
- BLAS, J.; BAOS, R.; BORTOLOTTI, G.R.; MARCHANT, T.A.; HIRALDO, F. 2005. A multi-tier approach to identifying environmental stress in altricial nestling birds. *Functional Ecology* 19:315-322.
- 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(2):172-180.
- BLAS, J.; BORTOLOTTI, G.; TELLA, J.L.; BAOS, R.; MARCHANT, T. 2007. Stress response during development predicts fitness in a wild, long lived vertebrate. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 104:8080-8084.
- BLUMSTEIN, D.T.; DANIEL, J.C.; SPRINGETT, B.P. 2004. A test of the multi-predator hypothesis: rapid loss of antipredator behavior after 130 years of isolation. *Ethology* 110(11):919-934.
- BORTOLOTTI, G.R.; MARCHANT, T.A.; BLAS, J.; GERMAN, T. 2008. Corticosterone in feathers is a long-term, integrated measure of avian stress physiology. *Functional Ecology*, 22(3):494-500.

- BORTOLOTTI, G. R.; MARCHANT, T.; BLAS, J.; CABEZAS, S. 2009. Tracking stress: localization, deposition and stability of corticosterone in feathers. *Journal of Experimental Biology* 212(10):1477-1482.
- BREUNER, C. W.; J. C. WINGFIELD, L. M. ROMERO. 1999. Diel rhythms of basal and stress-induced corticosterone in a wild, seasonal vertebrate, Gambel's White-crowned Sparrow. *Journal of Experimental Zoology* 284:334-342.
- CHOZAS, P. 1983. Estudio general sobre la población de la dinámica de población de la cigüeña *Ciconia ciconia* en España. Tesis doctoral. Universidad Complutense de Madrid.
- CRAMP, S.; SIMMONS, K.E.L. (eds.) 1977. Handbook of the Birds of Europe, the Middle East and North Africa: The Birds of the Western Palearctic, Volume 1: Ostrich to Ducks. Oxford University Press.
- CYR, N. E.; ROMERO, L. M. 2009. Identifying hormonal habituation in field studies of stress. *General and comparative endocrinology* 161(3): 295-303
- DANTZER, B.; FLETCHER, Q. E.; BOONSTRA, R.; SHERIFF, M. J. 2014. Measures of physiological stress: a transparent or opaque window into the status, management and conservation of species? *Conservation Physiology* 2(1): cou023
- DICKENS, M. J.; ROMERO, L. M. 2013. A consensus endocrine profile for chronically stressed wild animals does not exist. *General and Comparative Endocrinology* 191:177-189.
- ELLENBERG, U.; SETIAWAN, A. N.; CREE, A.; HOUSTON, D. M.; SEDDON, P. J. 2007. Elevated hormonal stress response and reduced reproductive output in Yellow-eyed penguins exposed to unregulated tourism. *General and comparative endocrinology* 152:54-63.
- ELLIS, E.C.; RAMANKUTTY, N. 2008. Putting people in the map: anthropogenic biomes of the World. *Frontiers in Ecology and the Environment* 6:439-447.
- FOWLER, G. S. 1999. Behavioral and hormonal responses of Magellanic penguins (*Spheniscus magellanicus*) to tourism and nest site visitation. *Biological Conservation* 90:143-149.
- GEFFROY, B.; SAMIA, D. S.; BESSA, E.; BLUMSTEIN, D. T. 2015. How nature-based tourism might increase prey vulnerability to predators. *Trends in Ecology & Evolution* 30(12):755-765.
- GEFFROY, B.; SAMIA, D. S.; BESSA, E.; BLUMSTEIN, D. T. 2016. Nature-based tourism and prey vulnerability to predators: a reply to Fitzgerald and Stronza. *Trends in Ecology & Evolution*, 31(2):95-96.
- GIANNECCHINI, J. 1993. Ecotourism: new partners, new relationships. *Conservation Biology* 7:429-432.
- GILL, J.A.; NORRIS, K.; SUTHERLAND, W.J. 2001. Why behavioural responses may not reflect the population consequences of human disturbance. *Biological Conservation* 97:265-268.
- HIGHAM, J.E.S.; SHELTON, E.J. 2011. Tourism and wildlife habituation: reduced population fitness or cessation of impact? *Tourism Management* 32:1290-1298.
- ISBELL, L.A.; YOUNG, T.P. 1993. Human presence reduces predation in a free-ranging vervet monkey population in Kenya. *Animal Behavior* 45: 1233-1235.
- KASEREKA, B.; MUHIGWA, J. B. B.; SHALUKOMA, C.; KAHEKWA, J. M. 2006. Vulnerability of habituated Grauer's gorilla to poaching in the Kahuzi-Biega National Park, DRC. *African Study Monographs* 27(1):15-26.
- KLEIST, N.J.; GURALNICK, R.P.; CRUZ, A.; LOWRY, C.A.; FRANCIS, C.D. 2018. Chronic anthropogenic noise disrupts glucocorticoid signaling and has multiple effects on fitness in an avian community. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 115(4):E648-E657.
- KNIGHT, J. 2009. Making wildlife viewable: habituation and attraction. *Society & Animals* 17:167-184.
- LLOYD, J.; AJAROVA, L. 2005. Chimpanzee habituation for tourism. En: J. Caldecott & L. Miles (eds.) *World Atlas of Great Apes and their Conservation*. Pp. 76-77. University of California Press.

- MADLIGER, C. L.; COOKE, S. J.; CRESPI, E. J.; FUNK, J. L.; HULTINE, K. R.; HUNT, K. E.; LOVE, O. P. 2016. Success stories and emerging themes in conservation physiology. *Conservation physiology* 4(1): cov057
- McCLEERY, R.A. 2009. Changes in fox squirrel anti-predator behaviors across the urban-rural gradient. *Landscape Ecology* 24:483-493.
- McEWEN, B.S. 1998. Protective and damaging effects of stress mediators. *New England Journal of Medicine* 338:171-179.
- McEWEN, B.S.; WINGFIELD, J.C. 2003. The concept of allostasis in biology and biomedicine. *Hormones and Behavior* 43:2-15
- McLUNG, M. R.; SEDDON, P. J.; MASSARO, M.; SETIAWAN, A. N. 2004. Nature-based tourism impacts on yellow-eyed penguins *Megadyptes antipodes*: does unregulated visitor access affect fledging weight and juvenile survival? *Biological Conservation* 119:279-285.
- MILLER, G.E.; CHEN, E.; ZHOU, E.S. 2007. If it goes up, must it come down? Chronic stress and the hypothalamic-pituitary-adrenocortical axis in humans. *Psychological Bulletin* 133:25-45.
- MOORHOUSE, T. P.; DAHLSJÖ, C. A.; BAKER, S. E.; D'CRUZE, N. C.; MACDONALD, D. W. 2015. The customer isn't always right—conservation and animal welfare implications of the increasing demand for wildlife tourism. *PloS one* 10(10):e0138939.
- MÜLLNER, A.; LINSENMAIR, K. E.; WIKELSKI, M. 2004. Exposure to ecotourism reduces survival and affects stress response in hoatzin chicks (*Opisthocomus hoazin*). *Biological Conservation* 118(4): 549-558.
- NOWAK, K.; LE ROUX, A.; RICHARDS, S. A.; SCHEIJEN, C. P.; HILL, R. A. 2014. Human observers impact habituated samango monkeys' perceived landscape of fear. *Behavioral Ecology* 25(5):1199-1204.
- PARTECKE, J.; SCHWABL, I.; GWINNER, E. 2006. Stress and the city: urbanization and its effects on the stress physiology in European blackbirds. *Ecology* 87(8):1945-1952.
- QUIRÓS, F.; BLANCO, J.C. 2012. Normas a seguir para garantizar la reproducción del águila imperial ibérica y otras rapaces y acuáticas coloniales en el Espacio Natural de Doñana. Circular normativa interna 1/2012. Consejería de Medio Ambiente de la Junta de Andalucía.
- REDONDO, T.; TORTOSA, F.S.; ARIAS DE REYNA, L. 1995. Nest switching and alloparental care in colonial white storks. *Animal Behaviour* 49(4):1097-1110.
- ROMERO, L.M.; FAIRHURST, G.D. 2016. Measuring corticosterone in feathers: strengths, limitations, and suggestions for the future. *Comparative Biochemistry and Physiology. Part A, Molecular & integrative physiology* 202:112-122.
- ROMERO, L.M.; WIKELSKI, M.; 2002. Exposure to tourism reduces stress-induced corticosterone levels in Galapagos marine iguanas. *Biological Conservation* 108:371-374.
- SANTOS, C. D.; CRAMER, J. F.; PÂRÂU, L. G.; MIRANDA, A. C.; WIKELSKI, M.; DECHMANN, D. K. 2015. Personality and morphological traits affect pigeon survival from raptor attacks. *Scientific reports* 5:15490.
- SAPOLSKY, R.M.; ROMERO, L.M.; MUNCK, A.U. 2000. How do glucocorticoids influence stress-responses? Integrating permissive, suppressive, stimulatory, and adaptive actions. *Endocrine Reviews* 21:55-89.
- SHANNON, G.; CORDES, L. S.; HARDY, A. R.; ANGELONI, L. M.; CROOKS, K. R. 2014. Behavioral responses associated with a human-mediated predator shelter. *PLoS One* 9(4): e94630.
- TURJEMAN, S.F.; CENTENO-CUADROS, A.; EGGERS, U.; ROTICS, S.; BLAS, J.; FIEDLER, W.; KAATZ, M.; JELTSCH, F.; WIKELSKI, M AND NATHAN, R. 2016. Extra-pair paternity in the

- socially monogamous white stork (*Ciconia ciconia*) is fairly common and independent of local density. *Scientific Reports* 6:27976.
- VALCARCEL, A.; FERNÁNDEZ-JURICIC, E. 2009. Antipredator strategies of house finches: are urban habitats safe spots from predators even when humans are around? *Behavioral Ecology and Sociobiology* 63:673-685.
- VÁZQUEZ-HIDALGO, D. 2013. Tímidos y atrevidos: ¿Quién ganará la carrera en ambientes humanizados? Tesis de Master. Universidad Pablo de Olavide. Sevilla.
- VILLANUEVA, C.; WALKER, B. G.; BERTELLOTTI, M. 2012. A matter of history: effects of tourism on physiology, behaviour and breeding parameters in Magellanic Penguins (*Spheniscus magellanicus*) at two colonies in Argentina. *Journal of Ornithology* 153(1):219-228.
- WALKER, B.G.; BOERSMA P.D.; WINGFIELD, J.C.; 2005. Field endocrinology and Conservation Biology. *Integrative and Comparative Biology* 45(1):12-18.
- WALKER, B. G.; BOERSMA, P. D.; WINGFIELD, J. C. 2005b. Physiological and behavioral differences in Magellanic Penguin chicks in undisturbed and tourist-visited locations of a colony. *Conservation Biology* 19(5):1571-1577.
- WALKER, B. G.; DEE BOERSMA, P.; WINGFIELD, J. C. 2006. Habituation of adult Magellanic penguins to human visitation as expressed through behavior and corticosterone secretion. *Conservation Biology* 20(1):146-154.
- WASER, N. M.; PRICE, M. V.; BLUMSTEIN, D. T.; ARÓZQUETA, S. R.; ESCOBAR, B. D. C.; PICKENS, R.; PISTOIA, A. 2014. Coyotes, deer, and wildflowers: diverse evidence points to a trophic cascade. *Naturwissenschaften* 101(5): 427-436.
- WAYLAND, M.; GILCHRIST, H. G.; MARCHANT, T.; KEATING, J.; SMITS, J. E. 2002. Immune function, stress response, and body condition in arctic-breeding common eiders in relation to cadmium, mercury, and selenium concentrations. *Environmental Research* 90(1): 47-60.
- WINGFIELD, J.C.; RAMENOFSKY, M. 1999 Hormones and the behavioral ecology of stress. En: Balm PHM (ed.) *Stress physiology in animals*. Academic Press, Sheffield, pp 1-51.
- WIKELSKI, M.; COOKE, S.J. 2006. Conservation physiology. *Trends in Ecology and Evolution* 21(1): 38-46.
- ZUUR, A. F.; IENO, E. N.; WALKER, N. J.; SAVELIEV, A. A.; SMITH, G. M. 2009. Mixed effects models and extensions in ecology with R. Springer, New York, NY.