



Universidad Austral de Chile

Facultad de Ciencias Forestales y Recursos Naturales

**Evaluación de la transferencia maternal de hierro y zinc en
huevos de cisne de cuello negro (*Cygnus melancoryphus*) en el
Santuario de la Naturaleza Río Cruces y Chorocamayo, Región
de Los Ríos**

Patrocinante: Sr. Ignacio Rodríguez Jorquera
Co-Patrocinante: Sr. Eduardo Silva Rodríguez

Trabajo de Tesina presentado como parte
de los requisitos para optar al Título de
Ingeniero en Conservación de Recursos Naturales

BENJAMÍN IGNACIO SOTO RUPAYÁN

VALDIVIA

2025

Índice de materias

Página

i	Calificación del Comité de Titulación	i
ii	Agradecimientos	ii
iii	Dedicatoria	iii
iv	Resumen	iv
1	INTRODUCCIÓN	1
1.1	Crisis de biodiversidad y contaminación por metales en ecosistemas acuáticos	1
1.2	Transferencia maternal de metales en aves	2
1.3	Contaminación por hierro y zinc en aves	3
1.4	Disciplinas y técnicas involucradas en el biomonitoreo de contaminantes	4
1.5	Aves acuáticas como indicadores de contaminación por metales	6
1.6	Cisne de cuello negro como especie indicadora del humedal río Cruces	8
2	METODOLOGÍA	13
2.1	Área de estudio	13
2.2	Caracterización del comportamiento de nidificación	14
2.3	Micromuestreo de huevos y colecta de plumón blanco	17
2.4	Base de datos, determinación de metales en plumas y albúmina fina	18
2.5	Análisis estadístico	19
3	RESULTADOS	20
3.1	Comportamiento parental durante la nidificación del cisne de cuello negro	20
3.2	Determinación de concentraciones y correlaciones entre matrices biológicas	24
4	DISCUSIÓN	31
5	REFERENCIAS	34
Anexos	1 Señuelo utilizado para probar la instalación de cámaras trampa en nidos.	
	2 Vara de arrayán utilizada como pértiga fija para la instalación de la cámara trampa.	
	3 Procedimiento de instalación de cámaras trampa en nidos de cisne de cuello negro.	
	4 Colaboradores del proyecto Fondecyt de Iniciación N°11221213.	
	5 Restos de membranas dispersas en nido Cayumapu 2 (noviembre 2024).	
	6 Nido Pichoy 1 atacado por visón americano (<i>Neogale vison</i>) (noviembre 2024).	
	7 Depredación por visón americano (<i>Neogale vison</i>) en nido de cisne de cuello negro.	
	8 Cisnes macho volteando huevos (octubre – noviembre 2024).	

Calificación Comité de Titulación

		Nota
Patrocinante:	Sr. Ignacio Rodríguez Jorquera	6,9
Co Patrocinante:	Sr. Eduardo Silva Rodríguez	6,3
Informante:	Sr. Jorge Ruiz Troemel	6,8
Informante:	Sr. Mauricio Soto Gamboa	6,3

El Patrocinante acredita que el presente Trabajo de Titulación cumple con los requisitos de contenido y de forma contemplados en el Reglamento de Titulación de la Escuela. Del mismo modo, acredita que en el presente documento han sido consideradas las sugerencias y modificaciones propuestas por los demás integrantes del Comité de Titulación.



Sr. Ignacio Rodríguez Jorquera

Agradecimientos

Al Centro de Humedales Río Cruces (CEHUM) de la Universidad Austral de Chile (UACH) por acogerme tanto en mi etapa de practicante como de tesista, brindándome un espacio fundamental para mi desarrollo profesional. A Rodrigo Valenzuela Aceval, por su gestión y facilitación de las cámaras necesarias para este estudio, realizado en el marco del proyecto Fondecyt de Iniciación N°11221213.

A Jorge Tomasevic, por su memorable esfuerzo y dedicación, tanto en tierra como en agua; su compromiso y constante alegría fue un pilar para este trabajo. A Luis “Luchito” Miranda, por su compañía y apoyo en el reconocimiento de los sitios de nidificación, compartiendo siempre sus valiosos recuerdos y conocimientos en pos de la conservación efectiva de la biodiversidad del río Cruces.

Al Laboratorio del Instituto de Ciencias Químicas de la Facultad de Ciencias (UACH), especialmente al Profesor Claudio Bravo, a Marcela Cañoles y a Valentina López, por su disposición en la realización de los análisis, además de las enriquecedoras discusiones técnicas.

Al Bird Ecology Lab (BEL) del Instituto de Ciencias Marinas y Limnológicas (UACH), con especial gratitud al Dr. Jorge Ruiz por su inagotable paciencia y excelente disposición en terreno. Asimismo, al Laboratorio de Investigación en Fauna Silvestre (UACH), en particular al Dr. Eduardo Silva, por apoyar y brindar junto a su equipo una mano a quienes nos encontrábamos monitoreando con cámaras trampa.

A la Corporación Nacional Forestal (CONAF) de Valdivia, agradezco a Mario Maturana y Patricio Contreras por la ayuda y el apoyo logístico brindado para los terrenos. A George y Belén, por acogernos en su hogar y facilitarnos el acceso al humedal, y a Guido (Sutura F&V) por los registros durante la prueba de concepto en el Punucapa.

A Alice, por su invaluable compañía y cariño y al Campus Miraflores de la UACH por permitir el acceso al agua desde su orilla. A Alicia y Alejandro, del Fundo Copihual (Fundación para la Conservación Ambiental Zoológica - CAZ), por su apertura y colaboración con este Fondecyt.

Finalmente, extendiendo mi gratitud a todas aquellas personas que, de una u otra forma, se preocuparon y contribuyeron al éxito de esta investigación.

Dedicatoria

A mis abuelas y abuelos, por el esfuerzo y la resistencia para abrirse camino. A mi madre y mi padre, por ser el refugio constante y por cuidar siempre de nuestro nido.

A mis tías y maestras, por la guía y la sabiduría entregada.

A mis amistades y amores, por el cariño y por todo lo vivido en cada vuelo para llegar hasta aquí. A mi Pachi, Estebi, Javi, Vale, Sebita, Waso, Gabi, Yaky, Josefita, Cami, Sofí, Makita, Marquito, Manu, Nom, Meli, Isa, Basti, Gian, Cony, NatiV, Karol, Lea, Gabo, Cony, Julito, Meli, Maxi, Renzo y a muchas otras estrellas de este cielo.

A mis queridas Jessica Catalán, Natalia, Claudita y Susana Zenteno, por todo el apoyo y cariño.

Al Dr. Ignacio, por brindar una guía sincera y alegre, ágil e implacable, llena de los conocimientos, curiosidades, consejos y sensibilidades. Gracias por recordarme que siempre se puede.

Por mis alas y las de quienes eclosionarán.

En memoria quienes han luchado por una vida justa y libre de contaminación, defendiendo los derechos de las generaciones presentes y futuras. Está en nosotros, los jóvenes, estudiar, coordinarnos, monitorear y combatir las amenazas del futuro.

Esta historia continúa...

Resumen

La contaminación por metales en ecosistemas acuáticos constituye una amenaza crítica para la fauna silvestre, especialmente para especies con antecedentes de vulnerabilidad reproductiva. El presente estudio evaluó la transferencia maternal de hierro (Fe) y zinc (Zn) en el cisne de cuello negro (*Cygnus melancoryphus*) dentro del Santuario de la Naturaleza Río Cruces, primer sitio Ramsar de Chile. Estos metales son esenciales para el crecimiento y desarrollo del embrión aviar, no obstante, pueden volverse dañinos cuando exceden los límites fisiológicos o cuando su actividad es suplantada por metales de alta toxicidad. El propósito de este estudio fue determinar la relación entre las concentraciones de Fe y Zn en el plumón materno y la albúmina de los huevos mediante técnicas no letales. El diseño integró el uso de drones para el acercamiento a los nidos, la instalación de cámaras trampa (n=5) para validar el origen materno del plumón, y una técnica no letal denominada micromuestreo de huevos (total= 53 huevos) para la extracción de albúmina. Los resultados demostraron transferencia maternal de Fe y Zn durante 2023 y 2024. El Zn destacó por presentar diferencias interanuales significativas en albúmina y una correlación negativa significativa ($\rho = -0,667$; $p = 0,049$) entre ambas matrices. En el plumón, el Fe mostró diferencias interanuales significativas ($p = 0,000$), mientras que en albúmina no se presentaron variaciones, sugiriendo una posible regulación homeostática independiente de la carga materna. Se concluye que el cisne de cuello negro es bioindicador potencial para Zn y que las técnicas no letales aplicadas permitieron obtener los primeros datos ecotoxicológicos de transferencia maternal en albúmina para la especie. Este estudio ofrece datos de referencia y sienta las bases para la implementación de programas de monitoreo no letal mediante herramientas semiautomatizadas para el monitoreo etológico, fortaleciendo así la gestión de la conservación biológica en humedales.

Palabras clave: Transferencia materna, Descarga materna, Metales traza, Hierro (Fe), Zinc (Zn), Cisne de cuello negro, *Cygnus melancoryphus*, No letal, Chile, Humedal, Sitio Ramsar.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Crisis de biodiversidad y contaminación por metales en ecosistemas acuáticos

La contaminación acuática por metales representa un grave problema ambiental debido a la toxicidad y los efectos potencialmente nocivos sobre los organismos vivos, los cuales pueden impactar sobre diferentes sistemas ecológicos y el ambiente, acarreando consecuencias en la salud humana y la economía (Pabón *et al.* 2020, Mitra *et al.* 2022). En los últimos siglos, los ecosistemas de todo el mundo, entendidos como sistemas complejos, han enfrentado un deterioro creciente y acelerado, especialmente desde la década de 1970 (Díaz *et al.* 2019, Steffen *et al.* 2015), siendo gravemente afectados por la pérdida de biodiversidad a causa de la destrucción de hábitats, el transporte de especies invasoras, así como por la liberación de contaminantes tóxicos (Ceballos *et al.* 2010).

Ecosistemas costeros, incluidos estuarios y deltas, se ven afectados por cambios en el uso del mar y de la tierra. Entre estos cambios se encuentra el desarrollo de zonas costeras, la acuicultura en mar abierto, la maricultura, la expansión urbana a lo largo del litoral y la contaminación de los ríos (IPBES 2019). Aquellos estuarios urbanos, debido a su proximidad al océano abierto, reciben grandes cargas de contaminantes, los cuales se acumulan en los sedimentos, afectando tanto a la fauna como a los seres humanos (Phillips *et al.* 2015). Las consecuencias incluyen enfermedades tanto crónicas como agudas, lo que refuerza la urgencia de abordar estos desafíos ecológicos de manera integral (Phillips *et al.* 2015, Zemanova 2020).

En los ecosistemas de humedal, una de las mayores preocupaciones es la presencia de metales y su acumulación en los sedimentos. Estos sedimentos, mediante procesos fisicoquímicos, actúan como fuente y sumideros de contaminantes (Dalu *et al.* 2020). En particular, los sistemas costeros se han identificado como sumideros de diversos contaminantes (Escobar 2002, Li *et al.* 2007, Zhao *et al.* 2018) provenientes de fuentes puntuales como desechos industriales, puertos y aguas residuales, y de fuentes difusas, como escorrentías urbanas y agrícolas (Kroon *et al.* 2017).

Los metales y metaloides se clasifican en función de su densidad, peso atómico, número atómico y toxicidad, agrupándolos en categorías como metales ligeros, pesados, tóxicos y oligoelementos (micronutrientes o elementos traza) (Páez 2014). En ambientes acuáticos, la biodisponibilidad de los metales puede estar relacionada con su concentración en forma libre (Echeverría y Gold-Bouchot 2014). En sedimentos estuarinos, la concentración y biodisponibilidad dependen de varios factores, entre ellos

la movilización en el agua intersticial y su especiación química, las transformaciones químicas, el control ejercido por los componentes principales del sedimento (por ejemplo componentes orgánicos sobre óxidos de hierro), la competencia entre metales por los sitios de captación en los organismos, así como el pH, la salinidad, el potencial redox y la bioturbación (Echeverría y Gold-Bouchot 2014).

Los metales ingresan al ambiente de forma natural o como resultado de actividades antropogénicas (Bryan y Langston 1992, Agusa *et al.* 2005, Bhardwaj *et al.* 2021, Kroon *et al.* 2017). El mayor aporte de metales en el agua se debe al uso constante de estos elementos y a las descargas de aguas residuales, principalmente de origen industrial (Pabón *et al.* 2020). Esta perturbación puede variar tanto en frecuencia como en intensidad, por ejemplo, en pulsos constantes de baja intensidad (ej. efluentes) o un pulso de alta intensidad (como derrames) (Rodríguez-Jorquera *et al.* 2023). La exposición puede producirse mediante diferentes vías, como la inhalación, la absorción dérmica, la ingestión y la transferencia maternal (Ali *et al.* 2019, Rehman *et al.* 2021, Smith *et al.* 2007, Golden y Rattner 2003, Bargar *et al.* 2001).

1.2 Transferencia maternal de metales en aves

La exposición prolongada a metales puede derivar en su acumulación en tejidos biológicos (bioacumulación), fenómeno especialmente crítico en elementos lipófilos y persistentes (Rutkowska *et al.* 2018, Thongcharoen *et al.* 2018). Además de bioacumularse y biomagnificarse a lo largo de los niveles tróficos, estas sustancias pueden transferirse maternalmente entre generaciones (Peterson *et al.* 2017, Smith *et al.* 2007).

Durante la formación del huevo en aves, la hembra transfiere nutrientes esenciales que aseguran el adecuado desarrollo y crecimiento del embrión (Lemesle *et al.* 2024, Richards 1997). En este proceso, el hígado es el encargado de producir los componentes de la yema, los cuales son transportados por el torrente sanguíneo hasta el ovario (Nys y Guyot 2011). Durante la ovulación, el folículo ovárico de mayor tamaño libera la yema madura hacia el oviducto, donde, en sus distintos segmentos, se sintetizan y secretan sucesivamente los componentes de la membrana vitelina, la albúmina, las membranas de la cáscara y finalmente la cáscara, que se depositan alrededor de la yema (Nys y Guyot 2011). Durante el proceso de embriogénesis se establece una vía no despreciable de transferencia de contaminantes desde la madre, quien elimina o excreta contaminantes al secuestrarlos en la cáscara, el vitelo o la albúmina (Lemesle *et al.* 2024, Seco *et al.* 2011, Burger y Gochfeld 2001, Agusa *et al.* 2005).

La transferencia materna y la asimilación embrionaria en sistemas contaminados con múltiples oligoelementos, varía tanto entre elementos como entre especies (Ackerman *et al.* 2016), lo que dificulta determinar con precisión cuáles especies probablemente enfrentarán consecuencias reproductivas (Orłowski *et al.* 2017). Estas variaciones pueden ser inconsistentes incluso entre especies estrechamente relacionadas. No obstante, las diferencias en las concentraciones entre los diferentes sitios del huevo donde se depositan estos elementos específicos resultan menos relevantes, ya que los estudios ecotoxicológicos suelen centrarse en los niveles presentes en el contenido del huevo en su conjunto (Orłowski *et al.* 2017).

1.3 Contaminación por hierro y zinc en aves

Ciertos metales tienen la capacidad de interferir procesos metabólicos críticos para el organismo al alterar la función de elementos biológicamente esenciales, como el hierro (Fe) y el zinc (Zn) (Pandey y Madhuri 2014). Estos oligoelementos son esenciales para el crecimiento y desarrollo del embrión aviar, no obstante, pueden volverse dañinos cuando exceden los límites fisiológicos o cuando su actividad es suplantada por metales de alta toxicidad (Dmowski 1999, Pandey y Madhuri 2014). En vertebrados, el Fe actúa como un cofactor indispensable en muchos procesos vitales como la síntesis de ADN y el transporte de oxígeno y de electrones (Chen y Paw 2012). Sin embargo, debido a su limitada solubilidad a pH fisiológico y su elevada toxicidad en estado libre, el exceso de hierro intracelular cataliza la formación de radicales libres, desencadenando estrés oxidativo y apoptosis. Para mitigar estos efectos, los organismos han evolucionado sistemas homeostáticos altamente especializados para regular la importación, el transporte, el secuestro y la excreción de este metal (Chen y Paw 2012, Kozłowski *et al.* 2009).

En las aves, la homeostasis del Fe se regula principalmente mediante la absorción intestinal, siendo el hígado el órgano central para su almacenamiento y equilibrio sistémico (Cork 2000, Kitowski *et al.* 2024, Norambuena y Bozinovic 2009). Durante la formación de la yema, en este órgano se sintetizan la vitelogenina y las lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL_y), las cuales luego son secretadas al sistema circulatorio para ser incorporadas en los folículos ováricos (Daniels-Abdulahad *et al.* 2024). Una vez en el ovocito, la vitelogenina se cataboliza en lipovitelina y fosfovitelina; esta última posee una elevada capacidad de unión a metales esenciales, lo que permite enriquecer de Fe la yema de huevo (Daniels-Abdulahad *et al.* 2024). No obstante, cualquier alteración en este balance puede derivar en cuadros de deficiencias o sobrecargas (Chen y Paw 2012). El excedente de este metal se deposita como ferritina o

en forma de hemosiderina, particularmente en los hepatocitos, las células de Kupffer y en el bazo. Esta acumulación puede derivar en hemosiderosis (Cork 2000), condición que se manifiesta en cuadros de anemia, hemocromatosis o trastornos neurodegenerativos (UACH 2005, Artacho *et al.* 2007b, Kozłowski *et al.* 2009).

Como parte del sistema de regulación, el plumaje actúa como una vía de depósito o secuestro de metales provenientes de la dieta y del entorno (Kaur 1989). Mientras que el Fe es excretado de manera accidental a través de las plumas (Klasing *et al.* 2012), el Zn se integra estructuralmente en ellas; debido a este requerimiento, las concentraciones hepáticas de Zn pueden elevarse periódicamente, en especial durante el proceso de muda (Kitowski *et al.* 2024).

El Zn es un metal esencial que constituye una parte integral de más de 300 sistemas enzimáticos, participando en el metabolismo de los carbohidratos, ácidos nucleicos y proteínas (Tabatabaie *et al.* 2007). Asimismo, ejerce funciones protectoras frente al daño oxidativo (Kozłowski *et al.* 2009, Tabatabaie *et al.* 2007). En aves, el Zn participa en la formación de las plumas (Sunde 1972, Malik y Zeb 2009, Kitowski *et al.* 2024) y el desarrollo de los huevos, específicamente en el magnum, durante la deposición de albúmina, y en el istmo, donde se sintetizan las membranas de la cáscara (Tabatabaie *et al.* 2007). Por otro lado, desempeña un papel importante en el sistema inmunitario, así como en el transporte y utilización de la vitamina A (Tabatabaie *et al.* 2007). No obstante, altos niveles de Zn pueden acortar la vida de los eritrocitos e inducir anemia, debido a la interferencia en la absorción y metabolismo del Fe (Levengood *et al.* 2000). En los vertebrados, el Zn se acumula inicialmente en el hígado y posteriormente se distribuye y deposita en riñones, tejido muscular y glándulas sexuales (Bombik *et al.* 2024). En concentraciones excesivas, este elemento puede provocar daños en la función renal y comprometer la función reproductiva (Wang *et al.* 2017; Carpenter *et al.* 2004, Levengood *et al.* 1999).

1.4 Disciplinas y técnicas involucradas en el biomonitoreo de contaminantes

Debido a la complejidad de los problemas ambientales actuales, la ciencia de la conservación ha evolucionado hacia enfoques cada vez más interdisciplinarios. Entre las subdisciplinas que destacan en este contexto se encuentra la fisiología de la conservación, enfocada en estudiar las respuestas fisiológicas de los organismos ante los cambios ambientales provocados por la actividad humana. Esta área permite establecer relaciones causa-efecto entre el estrés ambiental y la disminución poblacional de especies, especialmente en vertebrados (Wikelski y Cooke 2006). De forma complementaria, la etología de la conservación (o comportamiento de la conservación) aplica principios y métodos del estudio del

comportamiento animal para comprender procesos demográficos clave, con el objetivo de desarrollar estrategias eficaces de gestión y conservación poblacional (Cooke *et al.* 2013).

Asimismo, se involucra la ecotoxicología, acuñada en 1969 por Truhaut como una extensión ecológica de la toxicología, ciencia que estudia los efectos de los tóxicos a nivel individual (Hoffman *et al.* 2003). La ecotoxicología se define como “la ciencia de los contaminantes de la biosfera y sus efectos sobre los componentes de la biosfera, incluidos los humanos” (Newman y Clements 2008). De esto, se desprende la ecotoxicología conductual, propuesta como indicador de alerta temprana (Hellou 2011) que estudia las respuestas conductuales de individuos, poblaciones y comunidades ante la exposición a contaminantes o factores estresantes del entorno. Este enfoque permite diagnosticar efectos tóxicos potenciales, comprender las respuestas adaptativas y evaluar los impactos ecológicos derivados de alteraciones en el comportamiento, especialmente en relación con contaminantes químicos (Peterson *et al.* 2017, Ford *et al.* 2021). El comportamiento puede cambiar tras la exposición aguda a contaminantes, teniendo en consideración que se puede dedicar menor energía al comportamiento en aquellos momentos cuando hay una inversión de energía para la reproducción (Hellou 2011).

En la búsqueda de evidencias científicas para preservar especies, se emplean técnicas que pueden llegar a causar sufrimiento animal. El monitoreo poblacional ha recurrido históricamente a métodos destructivos (como el muestreo letal) o invasivos (persecución, captura, toma de muestra de tejidos o sangre, marcaje o instalación de rastreadores), lo que puede comprometer tanto la integridad del animal como la fiabilidad de los resultados (Powell y Proulx 2003, Cattet 2013, Jewell 2013, Zemanova 2020). En el caso de la fauna silvestre, el muestreo debería ser idealmente no invasivo, entendido como aquel que no afecta la integridad física del animal (Lefort *et al.* 2019, Zemanova 2020). Sin embargo, en ciertas especies o contextos, estos métodos pueden no ser aplicables. El desarrollo de técnicas no invasivas implica procesos de varios pasos, necesarios para validar nuevos materiales y asegurar la confiabilidad de los resultados (Schilling *et al.* 2022).

Frente a esto, en el año 1959 se propusieron los principios de las 3R: “Reemplazar” el uso de animales en la investigación cuando sea posible, “Reducir” el número de individuos utilizados, y “Refinar” los métodos para minimizar el dolor y la angustia en los animales expuestos (Russell y Burch 1959). Aunque estos principios fueron concebidos originalmente para animales de laboratorio, hoy en día pueden y deben aplicarse en investigaciones con fauna silvestre (Schilling *et al.* 2022), sobre todo con especies que estén bajo amenaza.

1.5 Aves acuáticas como indicadores de contaminación por metales

Al evaluar los niveles de contaminación, resulta problemático, tanto técnica como económicamente, analizar directamente todos los componentes bióticos y abióticos del ambiente (Markowski *et al.* 2013, Rutkowska *et al.* 2018, Fraixedas *et al.* 2020). Como alternativa, se han desarrollado esquemas de monitoreo basados en el uso de especies indicadoras o bioindicadores. Estos se definen como aquellos organismos o grupos de organismos cuya ocurrencia o respuesta refleja la exposición a estímulos ambientales, permitiendo correlacionar una condición ambiental específica, como la presencia de contaminantes con el estado ecológico del entorno (Dmowski 1999, Abdullah *et al.* 2015). Además, estos indicadores proporcionan información sobre la biodisponibilidad de dichos contaminantes (Dmowski 1999, Rutkowska *et al.* 2018).

En este contexto, las aves silvestres han sido ampliamente reconocidas como bioindicadores eficaces debido a su amplia distribución geográfica, abundancia relativa, longevidad, hábitos alimentarios que abarcan diferentes niveles tróficos y la sensibilidad a cambios ambientales (Kitowski *et al.* 2017, Thongcharoen *et al.* 2018, Rothschild y Duffy 2005, Lucía *et al.* 2010). Dmowski (1999), detalla los criterios para seleccionar un bioindicador ideal, el cual debe cumplir con los siguientes requisitos: 1) tener una presencia generalizada; 2) poseer un territorio individual claramente definido y mostrar fidelidad de sitio; 3) ser común y de fácil captura; 4) presentar homogeneidad en el material biológico y posibilidad de estandarización; 5) tener un tamaño corporal suficiente para el seguimiento del animal y analizar sus tejidos; 6) contar con una biología bien conocida; 7) permitir la reproducción en condiciones de laboratorio; 8) ser capaz de bioacumular xenobióticos -cualquier sustancia extraña al cuerpo- o presentar reacciones claras ante ellos.

Tradicionalmente, se han utilizado tejidos internos de las aves como indicadores para evaluar la acumulación de contaminantes, sin embargo, debido a preocupaciones éticas y de conservación, ha surgido un enfoque creciente hacia el uso de muestras no letales (figura 1), tales como plumas y huevos (Abbasi *et al.* 2015). Las plumas ofrecen múltiples ventajas: son fáciles de recolectar, almacenar y transportar, permitiendo muestreos repetidos sin comprometer la vida del animal. Sin embargo, su uso requiere considerar variables como el momento de recolección, el tipo de pluma, los períodos de muda, la posible contaminación externa (Agusa *et al.* 2005), el estado nutricional, la edad y el sexo del ave (Rutkowska *et al.* 2018). Las plumas reflejan la acumulación de contaminantes, los cuales se

correlacionan con los niveles presentes en sangre durante su formación hasta una vez detenido su crecimiento (Goede y De Bruin 1986, Dauwe *et al.* 2003, Jaspers *et al.* 2004, en Tsipoura *et al.* 2017).

La muestra de sangre refleja información asociada principalmente a la ingesta de contaminantes en el sitio específico de captura, mientras que las plumas registran la concentración de estos elementos durante un período más prolongado. Por ello, se recomienda complementar este tipo de análisis con otras muestras biológicas para obtener una evaluación más precisa (Tsipoura *et al.* 2017, Lam *et al.* 2005) y considerar protocolos de limpieza para eliminar contaminantes adheridos. Para utilizar plumas en la evaluación de contaminación por oligoelementos, es necesario conocer la relación entre aquellas concentraciones en pluma y los tejidos internos de las aves (Agusa *et al.* 2005).

Los huevos de aves han sido utilizados como indicadores de contaminación ambiental, por ejemplo, en estudios sobre mercurio (Hartman *et al.* 2013, Ackerman *et al.* 2016, Stebbins *et al.* 2009, Zabala *et al.* 2019). Tanto el contenido del huevo como la cáscara reflejan la carga de contaminantes excretada por la hembra durante la formación del huevo (Thongcharoen *et al.* 2018). Esto permite evaluar los niveles de exposición a contaminantes en zonas de reproducción, donde las aves permanecen varias semanas antes de la puesta (Hashmi *et al.* 2013). La contaminación en áreas no reproductivas también influye en esta transferencia (Hashmi *et al.* 2013, Thongcharoen *et al.* 2018).



Figura 1. Representación esquemática de métodos aplicables al biomonitoreo de aves. En métodos letales se incluye la colecta de huevos. Entre los no letales el micromuestreo de huevos y la recolección de plumón mudado como método no invasivo. Elaboración propia.

1.6 Cisne de cuello negro como especie indicadora del humedal río Cruces

El cisne de cuello negro (*Cygnus melancoryphus* Molina 1782) perteneciente a la familia Anatidae, es la única especie representante de su género en el neotrópico. Su distribución abarca desde Tierra del Fuego en el extremo sur de Chile, la mayor parte de Argentina incluyendo las Islas Malvinas, las costas de Uruguay, Paraguay, hasta el sur de Brasil. Además, se han registrado avistamientos ocasionales en la península antártica y el archipiélago de Juan Fernández (Schlatter *et al.* 1991a, Corti y Schlatter 2002, Allendes *et al.* 2023). Esta especie está clasificada bajo preocupación menor (LC) a nivel mundial (UICN 2024). En Chile, posee la misma categoría de conservación (MMA 2019), pero su estado de protección varía según la zona geográfica, estando prohibida su caza en todo el territorio nacional (SAG 2018).

El humedal del río Cruces es uno de los humedales más emblemáticos y extenso del país. Este estuario se originó tras el hundimiento de amplias zonas de terrenos durante el terremoto del año 1960, convirtiéndose en un hábitat que alberga gran variedad de aves acuáticas, entre ellas, el cisne de cuello negro, especie que ha mantenido una importante colonia de nidificación en este humedal (Schlatter 1998, Jaramillo *et al.* 2007, Delgado y Marín 2013). Este sitio fue declarado Santuario el 3 de junio de 1981 por el Ministerio de Educación y el 27 de julio del mismo año se reconoció internacionalmente como el primer sitio RAMSAR de Chile, bajo el nombre de "Carlos Anwandter" (N°222) con una extensión de 4.896 ha, con 25 km de longitud y un ancho promedio de 2 km (CONAF 2019).

Esta especie influye significativamente en la estructura de sus hábitats, al consumir y regular el crecimiento de las plantas acuáticas, ralentizando la tasa sucesión en los humedales que habita (Corti y Schlatter 2002). Habita predominantemente pantanos de agua dulce, además de pantanos salobres, principalmente a baja altitud, pero se han encontrado individuos en lagos de tierras altas a orilla de *Scirpus sp* (Johnsgard 2016). Esta ave es susceptible a la pérdida de hábitat debido a las sequías, las cuales son cada vez más frecuentes (Rees *et al.* 2019). Es poco conocido su estatus de residente o migratoria, sin embargo, es evidente que muchos individuos invernan en la parte sur de su rango de distribución (Vuilleumier 1997). Basados en censos realizados en Uruguay, la mayoría de la población no realiza migraciones regulares (Vaz y Rilla 1991). *C. melancoryphus* experimenta desplazamientos oportunistas entre distintos humedales de la costa del pacífico de Chile, posiblemente influenciados por el fenómeno oceánico-atmosférico El Niño (Schlatter *et al.* 2002, Vilina *et al.* 2002, Norambuena *et al.* 2023).

Su dieta, en este humedal, se basa principalmente de la planta acuática sumergida *Egeria densa* (luchecillo), seguida por *Limnobium laevigatum*, con registros ocasionales de *Hydrocotyle ranunculoides*, *Potamogeton berteroanus*, *Ludwigia peploides*. Sin embargo, también se alimenta de huevos de peces e insectos acuáticos (Johnson y Goodall 1965, Schlatter *et al.* 1991b, Corti y Schlatter 2002). Se reconoce un dimorfismo sexual específico en el volumen de la carúncula del macho (Casares 1944), complementado por diferencias en su forma y tonalidad, la cual es más desarrollada, turgente y de color rojo con matices violáceos, especialmente durante el período de celo y cría (Haedo 1953). Otra característica que distingue al macho de la hembra es su mayor tamaño (Seijas 1996) siendo este algo más robusto (Casares 1944).

Esta especie es relativamente gregaria, con individuos no reproductores que pueden formar agrupaciones de varios miles de aves (Johnsgard 2016). Forman parejas estables de por vida (monogamia), comenzando la reproducción en condiciones naturales hacia el final del segundo año de vida (Silva *et al.* 2012, Johnsgard 2016, Weller 1967). En el centro de Chile, la reproducción se inicia en julio y agosto (Johnsgard 2016). En el río Cruces, los cisnes están presentes durante todo el año, aunque se observan comúnmente los mínimos poblacionales entre junio y agosto, y máximos entre septiembre y diciembre (Silva *et al.* 2012). El período reproductivo comienza en julio y puede terminar en marzo o abril del año siguiente (Schlatter 1991b). En este humedal, el período de anidación puede ir de junio a enero, con un pico anual entre septiembre y octubre (Figuroa-Fábrega *et al.* 2006).

Los cisnes suelen anidar en las proximidades del agua, en áreas donde el nivel hídrico es estable y la vegetación emergente es abundante (Silva *et al.* 2012). Se ha documentado nidificación en el humedal de Taim, en el estado de Río Grande del Sur, así como en el sistema de arroyos Del Rey entre las lagunas Mangueira y el lago Mein, en el Municipio de Santa Vitória do Palmar, Brasil (Gertum *et al.* 2007). Se encontraron nidos cerca de la Laguna de Rocha y en el arroyo Pando, en Uruguay (Vaz y Rilla 1991), en la provincia de Buenos Aires, Argentina (Weller 1967), y en las islas Malvinas (Medrano *et al.* 2018).

El macho y la hembra construyen nidos, usualmente semiflotantes, utilizando material vegetal del entorno (Silva *et al.* 2012). Estos nidos alcanzan aproximadamente 30 cm de altura y 1 metro de diámetro (Vaz y Rilla 1991). La hembra se encarga de la fase final de construcción (Figuroa-Fábrega *et al.* 2006), y una vez iniciada la incubación, añade plumón al nido, especialmente cuando sale del nido (Haedo 1953). Otros autores describen que el aporte de este plumón es realizado por la pareja (Cursach *et al.* 2021). La incubación es realizada exclusivamente por la hembra, quien descansa solo durante las horas

más cálidas del día para evitar la pérdida de calor en los huevos (Silva *et al.* 2012). Esta alta constancia de incubación podría provocar una pérdida en su masa corporal. La hembra permanece en el nido casi todo el tiempo, levantándose solo por breves momentos para alimentarse (Casares 1944).

La duración de la incubación varía entre 31 y 48 días (Silva *et al.* 2012), aunque se han reportado períodos más específicos: un período de 41 días (Casares 1944), 40 días (Johnson y Goodall 1965), y una duración de entre 34 y 36 días (Schlatter 1998, Figuerola y Green 2006). Los huevos, de color blanco sucio, pueden alcanzar dimensiones aproximadas de 101×66 mm (Figuerola-Fábrega *et al.* 2006), o de 105×65 mm y una masa de 247 g (Johnsgard 2016, Figuerola y Green 2006). Los huevos medidos en cautiverio presentan tamaños que varían entre 95 y 106,2 mm de longitud por 63,6 a 69,5 mm de ancho, con una masa que oscila entre 172,5 y 273,5 g (Carboneras *et al.* 2024).

La muda en esta especie comienza en otoño, una época en la que los individuos dedican más tiempo a la alimentación, y se preparan para el cortejo, la crianza y en algunos casos, la migración hacia otras áreas (Figuerola-Fábrega *et al.* 2006). Los cisnes realizan una sola muda al año (Seijas 1996). No todos los ejemplares mudan simultáneamente y se estima que el ciclo completo de muda dura aproximadamente 45 días a dos meses, período en el cual las aves pierden la capacidad de volar (Nascimento *et al.* 2001, Nunes da Rosa 2017). En general, los cisnes de cuello negro abandonan la zona de reproducción poco después de que sus crías empluman, y que mientras los pichones se encuentran en el proceso de emplumamiento, el cual se estima en unos 100 días, los adultos realizan su muda postnupcial (Johnsgard 2010). La muda en cisne negro (*Cygnus atratus*) se describe que comienza aproximadamente un mes después de la eclosión de los huevos (Van Dijk 1998).

La población de cisnes del Santuario de la Naturaleza Río Cruces fue afectada por la contaminación acuática, particularmente en el año 2004, cuando se registró una disminución poblacional del 95 %, reduciéndose de 8.000 individuos ese año a menos de 400 en 2006 (Jaramillo *et al.* 2007). Durante 2005 no se registró actividad reproductiva (Figuerola 2006). La causa fue un efecto en cascada provocado por los cambios en la calidad del agua, producto del vertimiento ilegal de aguas residuales por parte de una planta de celulosa ubicada 25 km aguas arriba de este humedal, lo que causó un profundo deterioro en el Santuario y una disminución ostensible de la fauna acuática (Jaramillo *et al.* 2018). Esta especie se vio afectada debido a la reducción de su principal alimento (UACH 2005), la macrófita brasileña invasora *E. densa*, la cual presentó altos niveles de metales, especialmente hierro, mostrando manchas necróticas y costras color pardo en hojas y tallos (Hauenstein 2004, Duarte *et al.* 2009).

Este evento derivó en la migración, muerte de cientos de cisnes (UACH 2005) y desnutrición (Artacho *et al.* 2007a). Asimismo, se detectaron altas concentraciones de hierro y otras anomalías histopatológicas en los hígados de esta especie (Jaramillo *et al.* 2007). A partir de los censos anuales realizados por guardaparques de CONAF antes y después de este evento de contaminación, se evidenciaron abundancias bajas y estables hasta el año 2011 (Jaramillo *et al.* 2018). Posteriormente, la población comenzó a incrementarse, alcanzando un máximo histórico en mayo de 2020, con hasta 22.419 individuos censados por CONAF (2020). Sin embargo, tras ese máximo, en el año 2021, CONAF (2021) reportó una marcada disminución poblacional, con una abundancia total de tan solo 1893 ejemplares en junio de ese año dentro del Santuario, y sin registro de polluelos y juveniles para ese período. Si bien la abundancia de individuos ha sido utilizada como indicador para evaluar el tiempo de recuperación de las poblaciones de cisne tras el evento de contaminación de 2004 (Jaramillo *et al.* 2018), para determinar posibles efectos crónicos de dicha contaminación, resulta fundamental integrar múltiples parámetros que permitan evaluar tanto el estado de salud actual como el grado de recuperación fisiológica (Rodríguez-Jorquera *et al.* 2023).

Preguntas de investigación:

¿Existe transferencia detectable de hierro (Fe) y zinc (Zn) desde las madres hacia los huevos del cisne de cuello negro (*Cygnus melancoryphus*) en la población del Santuario de la Naturaleza Río Cruces y Chorocamayo?

¿Cuál es la relación entre las concentraciones de hierro (Fe) y zinc (Zn) en albúmina de los huevos y las acumuladas en el plumón presente en su correspondiente nido?

Hipótesis científica: Existe una relación entre las concentraciones de hierro y zinc acumuladas en las plumas de las hembras de cisne de cuello negro y en las descargadas en la albúmina debido al fenómeno de transferencia maternal.

Objetivo general

Evaluar la relación entre las concentraciones de hierro (Fe) y zinc (Zn) transferido maternalmente hacia la albúmina de los huevos con lo bioacumulado en el plumón blanco presente en los nidos de cisne de cuello negro (*Cygnus melancoryphus*) del Santuario de la Naturaleza Río Cruces y Chorocamayo.

Objetivos específicos:

1. Caracterizar los patrones de comportamiento de nidificación del cisne de cuello negro en el Santuario de la Naturaleza Río Cruces y Chorocamayo, con el fin de confirmar el origen materno del plumón recolectado en los nidos.
2. Determinar las concentraciones de Fe y Zn en la albúmina de los huevos y en el plumón de los nidos, como indicadores de transferencia y bioacumulación, respectivamente.
3. Evaluar la correlación entre las concentraciones de Fe y Zn detectadas en albúmina y plumón.

2. METODOLOGÍA

2.1 Área de estudio

La presente investigación se realiza en el humedal del río Cruces, específicamente en el "Santuario de la Naturaleza Río Cruces y Chorocamayo" en la región de Los Ríos. Sus límites se establecen entre la parte norte de la Isla Teja en la comuna de Valdivia y 2 km al norte del Castillo San Luis de Alba de Cruces, en la comuna de San José de Mariquina, específicamente entre las coordenadas 39°35'17.92" y 39°47'13.72" de Latitud Sur y 73°7'24.12" y 73°16'49.83" de Longitud Oeste (CONAF 2019). En cuanto a precipitación y temperatura, la media registrada en la estación meteorológica Pichoy Valdivia Ad. (DMC: 390006) para el año 2023 fue de 1,468.6 mm y 11.2°C, respectivamente (CR² 2024). El estado actual de este humedal se formó producto de la subsidencia o hundimiento del terreno en 1.8 m como resultado del terremoto de 1960 (Guerra y Lara 2017). Todos los registros y muestras se obtienen en este humedal (figura 2), específicamente de los sectores de San Ramón, Cayumapu, Pichoy, Rialejo, Santa María y Quitaqui.

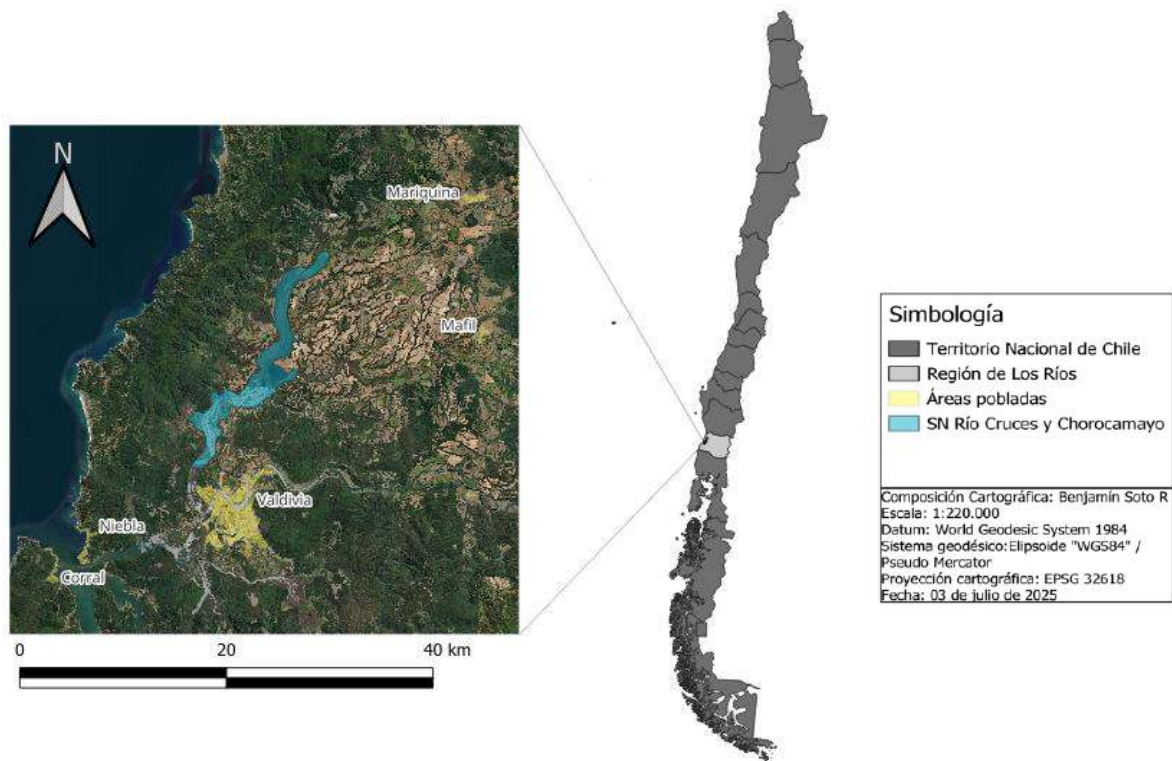


Figura 2. Humedal estuarino del río Cruces. En celeste se indican los límites del Santuario de la Naturaleza Río Cruces y Chorocamayo, Sitio Ramsar Carlos Anwandter. Elaboración propia.

2.2 Caracterización del comportamiento de nidificación

Durante octubre de 2024 se seleccionaron cinco nidos para la instalación de cámaras trampa en función de su accesibilidad. Para identificar y dirigir el acercamiento a los nidos, se empleó un dron modelo DJI Mavic 2 Zoom. Posteriormente, se utilizó un dron DJI Phantom 4 Multispectral para acompañar y guiar el avance en kayak hasta los nidos, con el fin de minimizar el estrés sobre los animales. Todos los procedimientos se realizaron con las medidas de seguridad y autorizaciones de rigor (resoluciones Nro. 4559/2018 y 2327/2024 del Servicio Agrícola y Ganadero (SAG), orden Nro. 1074/2023 del Consejo de Monumentos Nacionales (CMN), autorización Nro. 28651736 de la Corporación Nacional Forestal (CONAF) y el Protocolo de manejo animal Nro. 461/2022 Comité Institucional de cuidado y uso animal de la Universidad Austral de Chile).

Ente agosto y septiembre de 2024, se realizaron pruebas de configuración e instalación de cámaras trampa en dos humedales, uno en las dependencias del Centro de Humedales Río Cruces (CEHUM) y otro en el humedal del sector de Punucapa. Para dichas pruebas se utilizaron como pértigas una vara de aliso (*Alnus glutinosa* (L.) Gaertn.). Específicamente en CEHUM se empleó el uso de un señuelo con fines de simulación (ver Anexo 1).

Para la sujeción de la cámara, en dos de los cinco nidos se utilizó como pértiga una vara de aliso de aproximadamente 3 metros de longitud y 10 cm de diámetro. En los otros tres nidos restantes se emplearon varas de Arrayán (*Luma apiculata* (DC.) Burret) de longitud similar, pero con menor diámetro (ver Anexo 2). Cada vara fue enterrada manualmente hasta una profundidad de 100 a 150 cm, a una distancia aproximada de metro y medio frente a cada nido (ver Anexo 3).

De estas cámaras, dos fueron configuradas exclusivamente para capturar imágenes las 24 horas, mientras que las otras tres fueron programadas para registrar imágenes y videos de entre 2 y 10 segundos, a intervalos de 10 a 15 segundos, con sensibilidad baja, durante las 24 horas del día. La ubicación geográfica de cada nido fue registrada mediante las aplicaciones de celular Avenza Maps y Gaia GPS. El reemplazo de baterías y tarjetas de memoria se realizó cada dos a tres semanas, durante noviembre y diciembre de 2024. El tiempo promedio que operó cada cámara para el registro de foto y video fue de 1,25 días, mientras que aquellas que capturaron solo imágenes, operaron en promedio 6 días. Cada nido fue reconocido mediante un código específico definido por sigla del sector de estudio (ejemplo: PIC para Pichoy, CAY para Cayumapu y SR para San Ramón), la numeración del nido y el número de huevos

presente según el sector (ejemplo: CAY1 H5). Este código se utilizó para nombrar, distinguir y organizar cada carpeta de acuerdo con la fecha de instalación y reinstalación de la cámara.

Para corroborar el supuesto de si es la hembra quien aporta exclusivamente plumas al nido, se definieron criterios de clasificación del comportamiento. Estos comportamientos luego fueron comparados en función del sexo, la ubicación y la postura del individuo.

Criterios de clasificación: Las categorías de comportamiento de nidificación para el cisne de cuello negro (cuadro 1) se construyeron en base a la bibliografía disponible y a categorías previamente aplicadas en estudios de comportamiento en cisne mudo, cisne trompetero (*Cygnus buccinator* Richardson 1832), cisne silbador de Bewick (*Cygnus columbianus bewickii* Yarrell 1830) y del propio cisne de cuello negro (*Cygnus melancoryphus* Molina 1782) (Krivtov y Mineyev 1991, Tatu *et al.* 2007, Silva *et al.* 2012, Allendes-Muñoz *et al.* 2023).

Cuadro 1. Descripción de conductas nidificación para *Cygnus melancoryphus* definidas para el análisis.

Nº	Categoría	Descripción del(los) comportamiento(s) específico(s)
i	Automantenimiento	Individuo acicala, seca, o limpia sus plumas con el pico, sacudiendo o no sus alas, cabeza o cola.
ii	Desplume	El individuo arranca plumas de su propio cuerpo para agregarlas de forma inmediata al nido.
iii	Plumas de origen desconocido	Individuo agrega al nido plumas de origen desconocido, no provenientes de su propio cuerpo, recolectadas del entorno (agua, suelo o vegetación cercana), ya sean plumas caídas de otros individuos o adquiridas durante interacciones sociales.
iv	Mantenimiento nido	El individuo mueve, agrega o reorganiza material vegetal, o remueve elementos no deseados, con el fin de mantener o acondicionar la estructura del nido.
v	Acomodando los huevos	El individuo reorganiza o posiciona los huevos dentro del nido, utilizando el pico o las patas.
x	Otros	Comportamientos de vigilancia, descanso, forrajeo, defecación, interacciones sociales, agresiones con otros individuos, desplazamiento, comportamiento agonístico u otros comportamientos indefinidos.

La ubicación de los individuos fue categorizada en tres niveles de proximidad respecto al centro del nido: i) En el nido, comprendiendo desde la corona hasta un radio de 50 cm; ii) Junto al nido, abarcando la franja entre los 50 cm y los 2 m de distancia; y iii) Alejado, para todo registro que superara los 2 m de distancia desde el punto central. La postura de los individuos se categorizó en cuatro estados: flotando, de pie, posado sin contacto con la nidada y posada sobre los huevos. Complementariamente, se cuantificó el número de individuos presentes, la abundancia de huevos y la presencia de polluelos. La determinación del sexo se realizó mediante una combinación de criterios etológicos (conductas de incubación) y dimorfismo morfológico, considerando el tamaño corporal y el desarrollo de la carúncula. La identificación individual se efectuó mediante el patrón de la línea ocular, siguiendo la metodología propuesta por Seijas (1996). Finalmente, se excluyeron del análisis las categorías de comportamiento mutuamente excluyentes detectadas dentro de un mismo evento de observación.

Luego de la separación y depuración de los archivos correspondientes al inicio y al final del monitoreo (fase de instalación y retiro de las cámaras), se procedió al procesamiento de las imágenes. Este análisis se ejecutó de forma individual utilizando el software Timelapse (versión 2.3.2.8) (Greenberg *et al.* 2019). El proceso de clasificación de los comportamientos fue semiautomatizado mediante la revisión manual registro por registro. Aquellas capturas que contenían más de un individuo fueron debidamente duplicadas para clasificar de manera específica el comportamiento de cada ejemplar.

Se descartaron del análisis los registros que cumplieran con los siguientes criterios de exclusión específicos: ausencia de cisnes o ausencia de cisne y huevo (nido vacío). También se descartaron aquellas imágenes que presentaban problemas técnicos o ambientales, los cuales dificultaron la observación del comportamiento, como el lente oscurecido, fallos en el funcionamiento de la cámara, mala orientación de esta, gotas de lluvia en el lente, obstrucción por vegetación, condiciones climáticas adversas (lluvia o niebla), ráfagas de viento u otros. Asimismo, se excluyeron las fotografías en las que no era posible observar completamente la cabeza del animal ni su conducta asociada. Aquellos errores en la configuración de la fecha y hora en las cámaras se corrigieron con el mismo software Timelapse.

Debido a la corrupción de los datos en una unidad, se procedió al tratamiento de los registros de solo cuatro nidos: Cayumapu 1 H5 (CAY 1), Cayumapu 2 H5 (CAY 2), Pichoy 1 H1 (PICH 1) y San Ramón 1 H4 (SR 1). Entre los nidos se comparó la frecuencia promedio de imágenes por día que registraron cada comportamiento clasificado, con especial atención al comportamiento del “desplume” entre hembras y machos.

2.3 Micromuestreo de huevos y colecta de plumón blanco

La colecta de muestras fue realizada durante 2023 y 2024 por investigadores del Centro de Humedales Río Cruces (CEHUM) de la Universidad Austral de Chile, guiados estratégicamente por el Ex guardaparque de CONAF, don Luis Miranda (ver Anexo 4). Se contaron con las respectivas autorizaciones anteriormente mencionadas, para la obtención de 60 muestras de huevos en el Santuario. En todo momento fue requerido el uso guantes, mascarillas y antiparras como medidas de seguridad personal.

Previo a la colecta de muestras de albúmina, fue necesario evaluar el estado de desarrollo de cada embrión de la cría de cisne (muestreo por conveniencia). Esta evaluación fue realizada mediante observación a contraluz utilizando una tela negra de 1 m² y una linterna LED de 90.000 lúmenes, marca High Intensity Searchlight, modelo W5113. El procedimiento se realizó específicamente al huevo puesto dentro de los primeros 5 a 7 días (comúnmente al segundo huevo), siguiendo lo planteado por Stebbins *et al.* (2009).

La técnica fue aplicada por un investigador experimentado, y consistió en la realización de dos punciones en el cascarón, utilizando un Dremel con una broca de diamante de 3/32". La primera punción se realizó en la cámara de aire para aliviar la presión interna del huevo, seguida de una segunda punción para extraer entre 1 y 1,5 ml de albúmina fina. La extracción no superó el 1 % de la masa del huevo y fue obtenida mediante una jeringa de 3 ml equipada con aguja de calibre 21G. Tras la extracción, ambos orificios fueron sellados cuidadosamente con pegamento rápido.

Cada muestra fue almacenada en crioviales a 4°C en una hielera con hielo y posteriormente refrigerada hasta su análisis. Finalmente, cada huevo muestreado fue rotulado con un marcador en el extremo para su eventual reconocimiento. En algunos nidos visitados, especialmente en aquellos donde se realizó micromuestreo, se colectaron muestras de plumón en cantidades suficientes, de acuerdo con la disponibilidad presente en cada nido. Las muestras de pluma fueron almacenadas en bolsas de papel y, posteriormente, rotuladas y selladas en bolsas herméticas hasta el análisis de laboratorio.

El rotulado e identificación de cada muestra, tanto de pluma como de albúmina, utilizó el mismo código por sector y el número de huevos mencionados en el punto 2.2., agregándose la sigla FH (Fondecyt Huevo) con una numeración correlativa (ejemplo: CAY 1 H5 FH035).

2.4 Base de datos, determinación de metales en plumas y albúmina

Se colectaron 55 muestras de plumón (2023=40; 2024=15) de nidos independientes y 53 muestras de albúmina (2023=32; 2024=21) provenientes 43 nidos. Para el análisis de la transferencia materna, se consolidó una base de datos de correspondencia entre aquellos nidos donde se colectó muestra de albúmina y plumón. En esta última base de datos, para evitar pseudorreplicación, los resultados que correspondían a más de una muestra por huevo o a más de un huevo por nido, fueron promediados para obtener y analizar un único valor representativo por nido. Dos de los 43 nidos fueron excluido del análisis: uno por corresponder a un nido abandonado (huevo huero), y otro por presentar inconsistencia en su código de identificación.

Cada muestra fue analizada por profesionales del laboratorio del Instituto de Ciencias Químicas de la Universidad Austral de Chile. Para determinar la concentración de Fe y Zn en las muestras de albúmina, estas fueron descongeladas a temperatura ambiente y pesadas en una balanza de precisión (Shimadzu AUX 220; capacidad 10 mg–220 g, precisión $\pm 0,1$ mg). Se utilizó la totalidad de cada muestra hasta completa los 0,5 g, las cuales fueron sometidas a un proceso de digestión mediante la adición de 7 mL de ácido nítrico (HNO_3) al 65% y 1 mL de peróxido de hidrógeno (H_2O_2) al 30% v/v. Posteriormente, para la extracción de metales traza solubles en agua regia, se añadió 1 mL adicional de HNO_3 concentrado a cada muestra, las cuales fueron calentadas en etapas hasta alcanzar un reflujo suave, a una temperatura aproximada de entre 95 y 195 °C. Las soluciones se mantuvieron en reflujo durante 2 horas, hasta que cesó la emisión de vapores. Una vez enfriadas a temperatura ambiente, las muestras fueron filtradas mediante filtros de jeringa de celulosa (30 mm \times 0,45 μm) y transferidas cuantitativamente a matraces volumétricos de 10 mL, completando el volumen con ácido nítrico al 2% para su dilución final.

Todo el material utilizado para el manejo de las muestras durante los procesos de lixiviación, filtración y dilución fue previamente limpiado mediante inmersión en un baño de ácido nítrico (HNO_3) al 10% durante 24 horas, seguido de enjuague con agua desionizada. Los blancos de procedimiento (agua destilada) fueron preparados siguiendo los mismos pasos que las muestras. Tanto las muestras como los blancos fueron almacenados en tubos de centrifuga de 15 mL hasta el momento del análisis. La cuantificación de las concentraciones de hierro y zinc en las muestras de albúmina fina se realizó mediante espectroscopía de absorción atómica con llama (FAAS), con Límites de Detección (LOD) de 0,0016 mg Fe/kg y 0,0013 mg Zn/kg, y Límites de Cuantificación (LQQ) de 0,0052 mg Fe/kg y 0,0042 mg Zn/kg de muestra. Previo al análisis de las muestras de plumas, estas fueron seccionadas y colocadas

en tubos Falcon de 15 mL. Cada muestra fue sometida a tres lavados consecutivos con agua destilada y detergente, durante 15 minutos en un baño de ultrasonido. La cuantificación de elementos metálicos en estas muestras líquidas también se realizó mediante FAAS.

Se detectaron concentraciones de Fe y Zn en la totalidad de las muestras de plumón analizadas. Por el contrario, en la albúmina, los niveles de Fe fueron detectables en solo 31 muestras (2023=18; 2024=13), mientras que el Zn se detectó en 14 de ellas (2023=7; 2024=7). La ausencia de valores en el resto de las muestras de albúmina se atribuye a que las concentraciones se encontraban por debajo del límite de detección (LOD) del método analítico empleado.

2.5 Análisis estadístico

Para la evaluación etológica, se realizó una descripción estadística basada en las frecuencias de registros por comportamiento en función del total de imágenes por nido, diferenciando por ubicación, postura y sexo de los individuos observados.

En el análisis interanual de las concentraciones de Fe y Zn en plumón de nido y albúmina fina, se utilizaron pruebas de normalidad univariada (Shapiro-Wilk). Dado que no todas las variables presentaron distribución normal, se emplearon pruebas no paramétricas como la prueba de Wilcoxon para comprobar si existía diferencia significativa entre los años 2023 y 2024. Aquellos valores atípicos (outliers) fueron identificados con rojo según el método de Tukey, el cual reconoce valores que estén fuera del límite de 1,5 veces el rango intercuartílico (IQR).

Previa evaluación de la hipótesis de transferencia materna, se descartó la autocorrelación entre Fe y Zn dentro de cada matriz por separado (plumón y albúmina) mediante el uso del coeficiente de correlación de Spearman (Martínez *et al.* 2009). Luego, se evaluó el grado de asociación de las concentraciones de Fe y Zn entre la albúmina y el plumón de cada nido mediante el mismo coeficiente de correlación de Spearman. Estas pruebas fueron realizadas mediante el programa estadístico de R Studio. Para el tratamiento estadístico, de un tamaño muestral final de 41 albúmina, los valores reportados por debajo del límite de detección (LOD) no fueron considerados en los análisis, siendo registrados como blanco, reconociendo el sesgo potencial asociado a esta decisión.

3. RESULTADOS

3.1 Comportamiento parental durante la nidificación del cisne de cuello negro

De 65.639 archivos evaluados, la muestra final resultó en 50.423 registros. El cuadro 2 presenta el rango y el número de días efectivos en que las cámaras tomaron algún registro. La figura 3 presenta el promedio de frecuencia diaria de archivos entre los cuatro nidos evaluados, diferenciando el comportamiento de hembras y machos en función de su postura y ubicación respecto al nido.

Cuadro 2. Esfuerzo de muestreo por nido. Número total de archivos efectivos (fotografías y videos) y días de funcionamiento efectivos por cámara.

ID Nido	Instalación	Último registro	Muestra	Días efectivos
SR 1	22-oct-24	30-oct-24	10017	9
CAY 1	31-oct-24	06-dic-24	19490	7
CAY 2	31-oct-24	06-dic-24	16322	6
PICH 1	31-oct-24	07-dic-24	4594	4

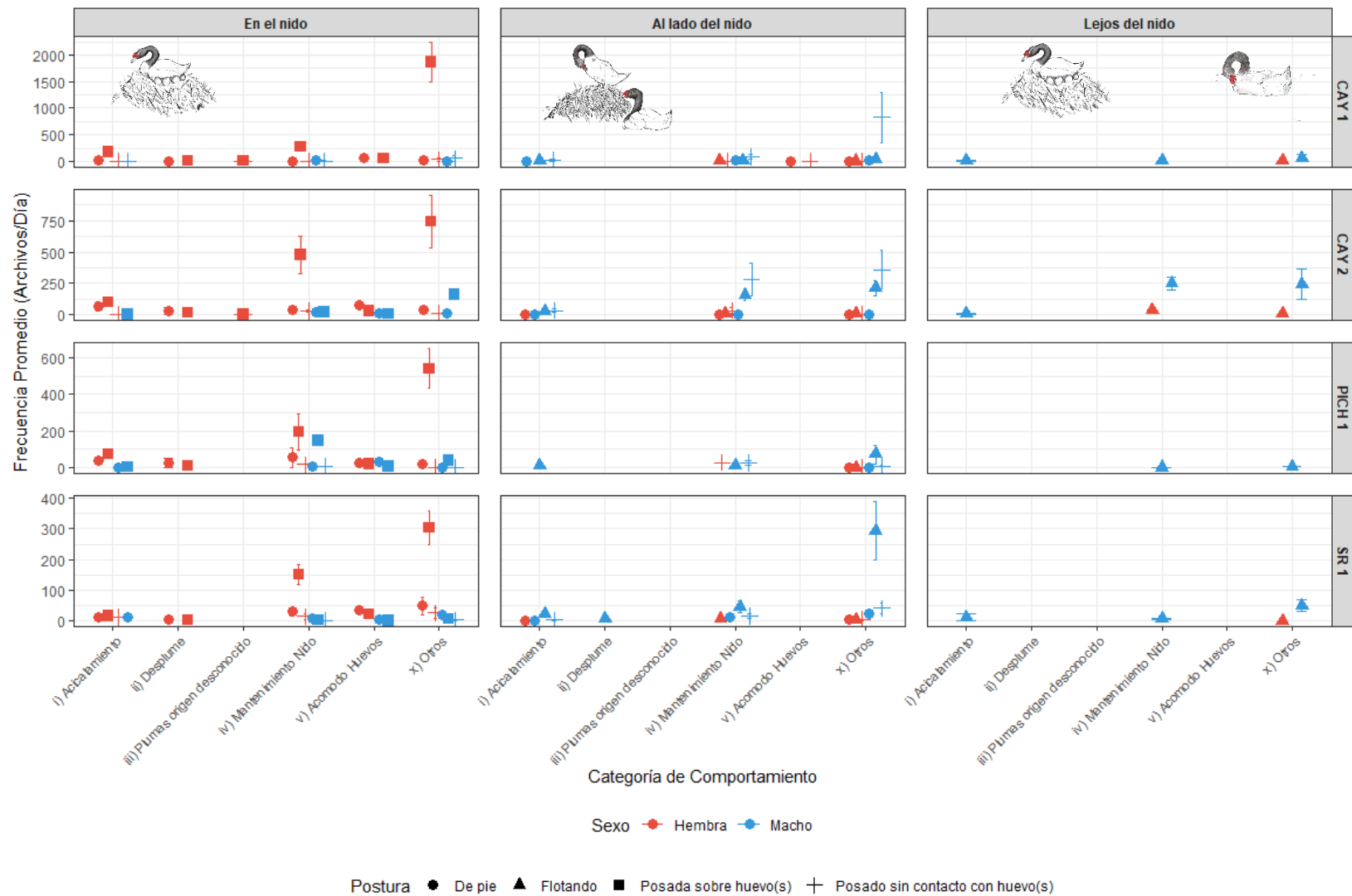


Figura 3. Comportamientos de nidificación de *Cygnus melancoryphus* en cuatro nidos de tres sectores del Santuario de la Naturaleza Río Cruces y Chorocamayo (Cayumapu, Pichoy y San Ramón) durante la temporada reproductiva 2024. Se presenta el promedio diario de registros por tipo de conducta clasificada (\pm D.E) por sexo, según su postura y ubicación relativa al centro de la corona del nido: En el nido ($\leq 0,5$ m radio), Junto al nido (desde 0,5 a < 2 m) y Alejado (≥ 2 m).

A través del análisis de las imágenes se evidenció un patrón de división de roles específicos. En función de la ubicación y postura, el sexo hembra presentó una mayor presencia en el nido, principalmente sobre los huevos o de pie (incubación), con pocos episodios de alejamiento flotando. El macho se mantuvo principalmente flotando o posado sin contacto directo con los huevos (cruces y triángulos azules). Sin embargo, se evidencia que el macho en reiteradas ocasiones ingresa al nido para hacer mantenciones y hasta para incubar (cuadrados azules). En todos los registros se constató que fue exclusivamente la hembra (cuadrados y círculos rojos en el nido) quien aportó plumas al nido (categoría ii), extrayéndolas específicamente desde su pecho, vientre o flancos.

El principal comportamiento para la hembra es el de “otros”, manteniendo períodos intermitentes de descanso (diurno) apoyando su cabeza entre su ala. Al despertar se estira, acicala sus plumas y sacude sus alas. Posteriormente, se incorpora para acomodar los huevos de pie o echada, mientras reordena, como segundo principal comportamiento, el material vegetal estructurante, agregando plumas extraídas desde su propio cuerpo (figura 4).

En uno de los cuatro nidos (CAY 2 FH036 H2) se evidenció la presencia de 4 de 5 membranas (ver Anexo 5). Dos de los tres nidos restantes sufrieron ataques por visón (*Neogale vison*): El nido PICHROY 1 FH037 H1 la hembra alcanzó a poner 2 huevos y fue encontrada muerta sobre su nido (ver Anexo 6), y en el nido CAY 1 FH035 H5 se evidenció la presencia y depredación por visón del último de 5 huevos puestos en ese nido (ver Anexo 7).





Figura 4. Capturas fotográficas del comportamiento de “Desplume” en hembras de cisne de cuello negro durante la temporada reproductiva de 2024. A) Hembra con cuatro huevos en el sector de San Ramón. B) Hembra agregando plumas al nido con un huevo en el sector de Pichoy. C) Pareja con tres huevos en el sector de Cayumapu.

3.2 Determinación de concentraciones y correlaciones entre matrices biológicas

Las concentraciones de Fe y Zn detectadas en plumón blanco (mg/kg de muestra) para los 55 nidos muestreados se presenta en la figura 5. Para determinar la robustez de las comparaciones interanuales, se evaluó la normalidad de las distribuciones mediante la prueba de Shapiro-Wilk, cuyos resultados, junto con la evaluación de diferencias significativas interanuales (prueba de Wilcoxon), se detallan en el cuadro 3.

Cuadro 3. Estadígrafos de tendencia central (\bar{x} = media aritmética; Me= mediana) y dispersión (σ = desviación estándar), pruebas de Shapiro-Wilk y de Wilcoxon en concentraciones de hierro (Fe) y zinc (Zn) en plumón colectado desde nidos (n=55) de *Cygnus melancoryphus* entre 2023 y 2024 en el Santuario de la Naturaleza Río Cruces.

Plumón blanco	n*	\bar{x} ($\pm\sigma$)	Me	<i>p</i> -valor Shapiro-Wilk	Diferencia interanual	<i>p</i> -valor
Fe 2023	40	71,8 (\pm 34,5)	65,1	0,014	Fe	<0,0001
Fe 2024	15	135 (\pm 36,1)	136	0,339		
Zn 2023	40	54,9 (\pm 29)	47	<0,0001	Zn	0,054
Zn 2024	15	42,8 (\pm 9,6)	41	0,180		

n* = Tamaño muestral con dato cuantificado

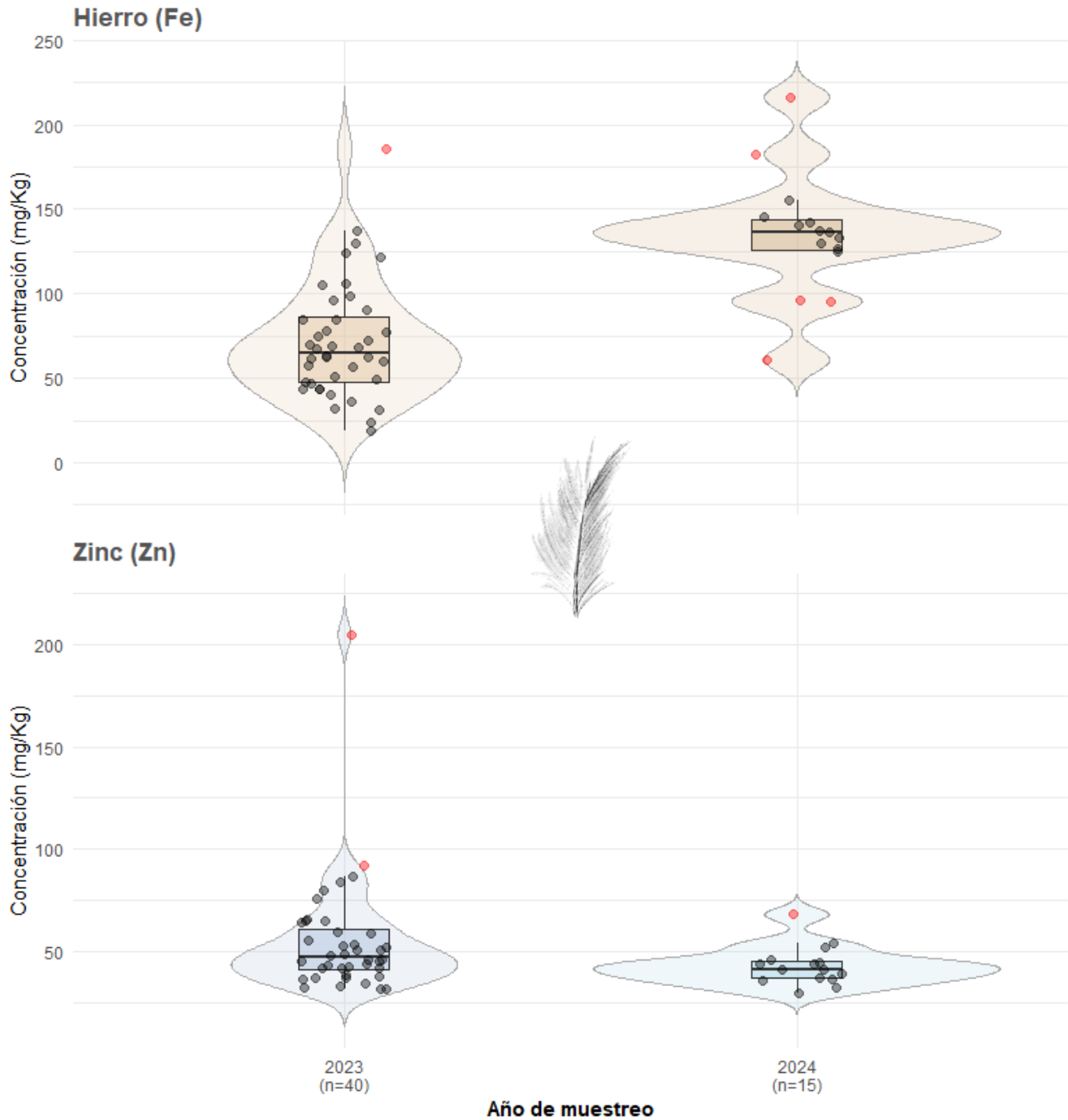


Figura 5. Concentraciones de hierro (Fe) y zinc (Zn) en plumón de cisne de cuello negro (*Cygnus melancoryphus*) colectado en nidos entre las temporadas reproductivas de 2023 y 2024 (n*=tamaño muestral con dato cuantificado). La amplitud del violín representa la distribución de frecuencias, mientras que los puntos rojos indican datos apartados (*outliers*) identificados mediante el método de Tukey (1,5 x IQR).

A continuación, la figura 6 presenta las concentraciones de Fe y Zn detectadas en la matriz biológica de albúmina en 41 nidos diferentes de cisne de cuello negro durante las épocas reproductivas durante 2023 y 2024 en el río Cruces. El cuadro 4 presenta los resultados obtenidos para las pruebas estadísticas.

Cuadro 4. Estadígrafos de tendencia central (\bar{x} = media aritmética; Me= mediana) y dispersión (σ = desviación estándar), pruebas de Shapiro-Wilk y de Wilcoxon en concentraciones de hierro (Fe) y zinc (Zn) en albúmina colectada desde nidos (n=41) de *Cygnus melancoryphus* durante 2023 y 2024 en el Santuario de la Naturaleza Río Cruces.

Albúmina	n*	\bar{x} ($\pm\sigma$)	Me	<i>p-valor</i> <i>Shapiro-Wilk</i>	Diferencia interanual	<i>p-valor</i>
Fe 2023	18	3,53 (\pm 9,7)	0,39	<0,001	Fe	0,237
Fe 2024	13	1,27 (\pm 0,769)	1,4	0,552		
Zn 2023	7	5,56 (\pm 8,15)	1,65	0,008	Zn	0,015
Zn 2024	7	37 (\pm 34,6)	28,3	0,355		

n* = Tamaño muestral con dato cuantificado

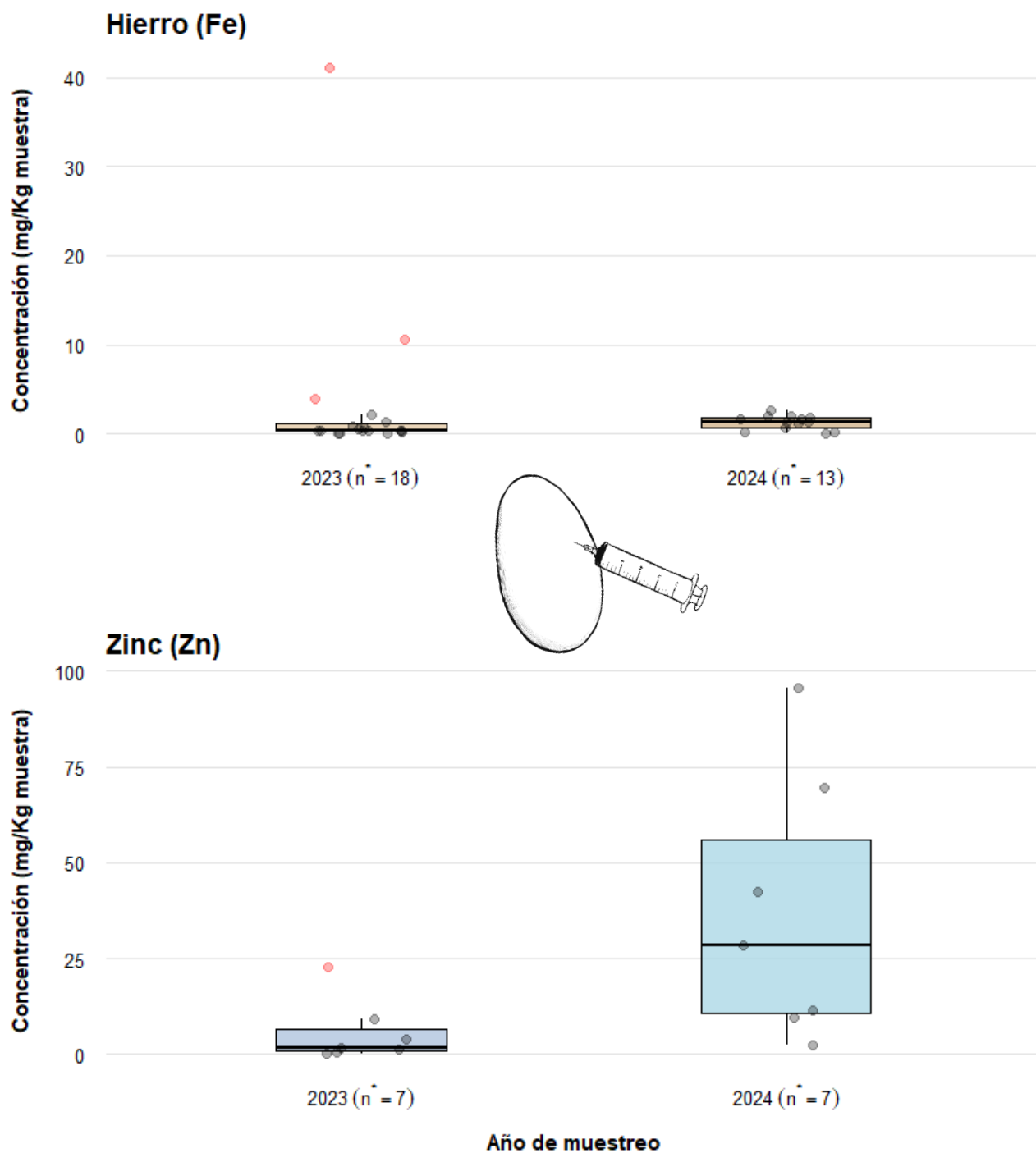


Figura 6. Concentraciones de hierro (Fe) y zinc (Zn) en albúmina obtenida por micromuestreo de 53 huevos en 41 nidos de *Cygnus melancoryphus* entre los años 2023 y 2024 (n* = tamaño muestral con dato cuantificado). En rojo se destacan los datos apartados (Tukey).

El análisis descriptivo de la matriz albúmina reveló que las concentraciones de metales en 2023 no presentan una distribución normal, lo cual es consistente con la presencia de valores atípicos identificados en la figura 6. Al comparar las temporadas de muestreo, se observó que Fe se mantuvo estable sin diferencias significativas entre 2023 y 2024. Por el contrario, el Zn mostró una variación interanual significativa.

A continuación, la figura 7 muestra las concentraciones de Fe en albúmina sin el ruido de los datos apartados, permitiendo optimizar la visualización de las concentraciones detectadas por año.

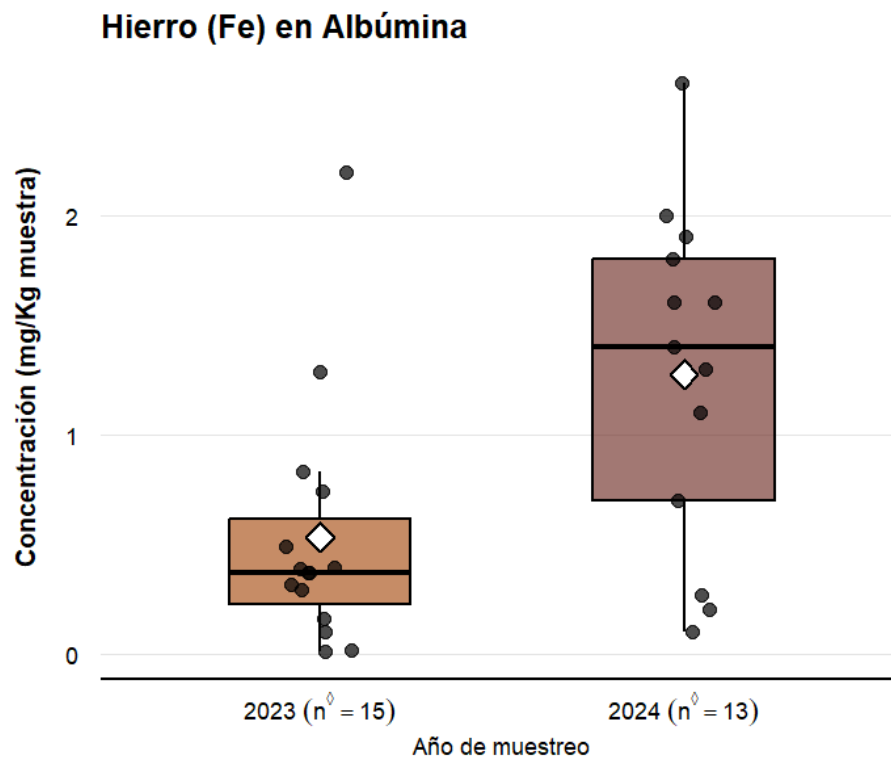


Figura 7. Escala optimizada de las concentraciones interanuales de hierro (Fe) en albúmina de *Cygnus melancoryphus*. El diamante blanco muestra la media aritmética (\bar{x}). Cada año se acompaña del tamaño muestral con dato cuantificado tras remoción de *outliers* (n^\diamond).

Los resultados de la autocorrelación evaluada entre los metales estudiados indicaron que, para ambas matrices biológicas, hay independencia estadística total (Plumón: $\rho = -0,01$; $p = 0,959$ | Albúmina: $\rho = 0,399$; $p = 0,1993$). Esto valida que ambos elementos pueden ser analizados como variables independientes.

Las correlaciones de Fe y Zn entre ambas matrices se grafican en la figura 8. Los resultados demuestran que no existe relación significativa entre el Fe de la pluma y el Fe detectado en la albúmina de los huevos ($\rho=0,062$; $p=0,7795$). Sin embargo, para el caso del Zn, se evidenció una relación negativa significativa entre las concentraciones de Zn estructural de la pluma y el Zn detectado en la albúmina ($\rho=-0,667$; $p=0,0499$) con un coeficiente de determinación (R^2) de 36,3%.

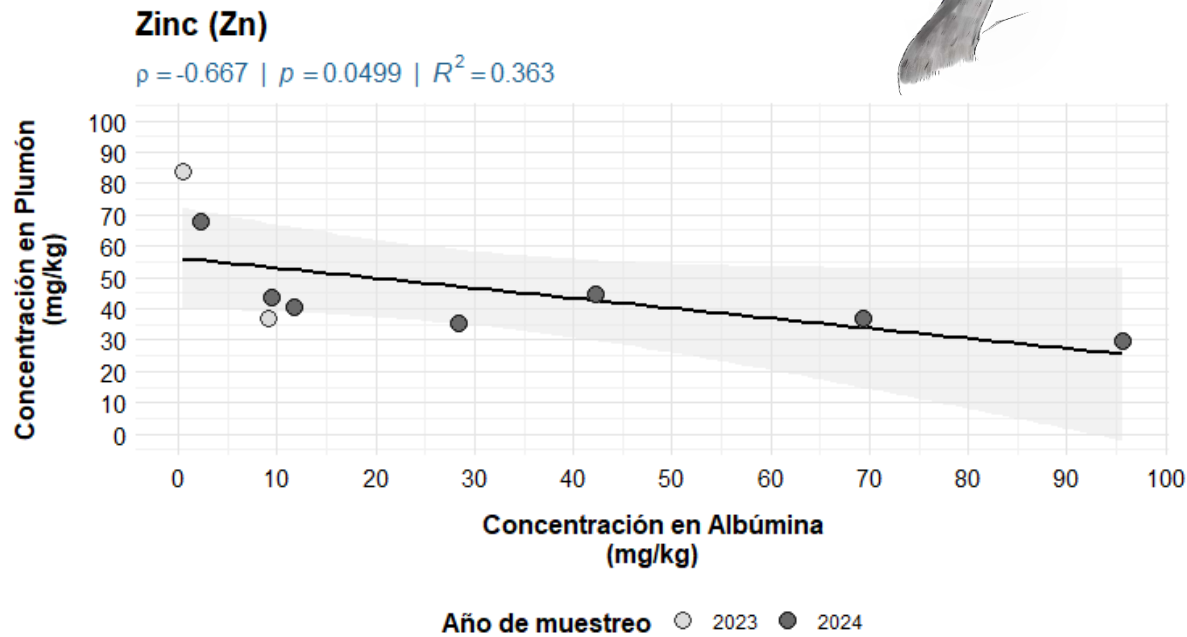
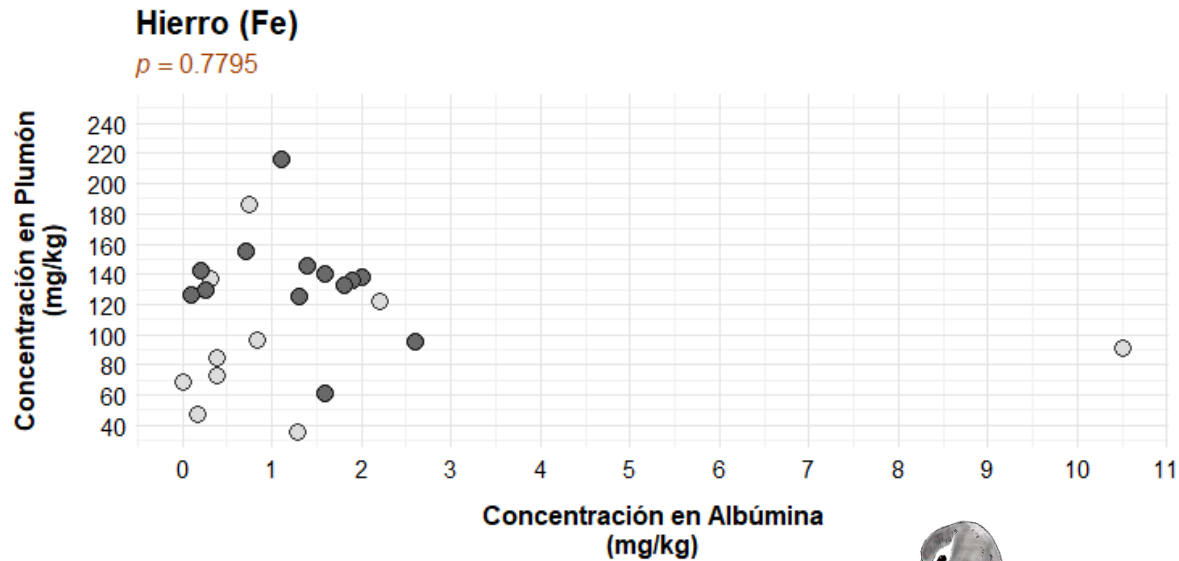


Figura 8. Relación entre las concentraciones de hierro (Fe) y zinc (Zn) en albúmina y plumón de *Cygnus melancoryphus* en el Santuario de la Naturaleza Río Cruces y Chorocamayo. Las etiquetas indican el coeficiente de correlación de Spearman (ρ), significancia (p) y determinación (R^2). Cada punto representa el par de datos cuantificados simultáneamente por nido ($n_{Fe} = 23$ y $n_{Zn} = 9$), diferenciando las temporadas 2023 (gris claro) y 2024 (negro). La línea de tendencia en el panel de Zinc ilustra el ajuste de regresión lineal para los valores detectados.

4. DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

El monitoreo etológico mediante cámaras trampa en los nidos de cisne de cuello negro (*Cygnus melancoryphus*) en el Santuario de la Naturaleza Río Cruces permite corroborar un supuesto fundamental para la validez de la técnica no invasiva de este estudio: las plumas incorporadas a la corona del nido proceden exclusivamente de la hembra. El análisis de los registros en los cuatro nidos confirma que durante el período de incubación la hembra se ubica principalmente en el nido, mientras que el macho se posiciona generalmente flotando a un costado o lejos de este. Esto se explicaría por la monogamia y la existencia de roles parentales definidos durante la nidificación, siendo la hembra quien asume la mayor parte de la carga térmica del nido y su mantenimiento estructural, mientras que el macho, si bien, también cumple un rol en el mantenimiento, su mayor comportamiento registrado figura en la categoría “(x) Otros”, la cual agrupa comportamientos como el descanso y la vigilancia.

Un hallazgo inédito para la especie es la participación del macho en el volteo de huevos en tres de los cuatro nidos analizados (ver Anexo 8), lo que sugiere una cooperación en la incubación de los huevos, crucial para su desarrollo (Pešková *et al.* 2026), no descrita previamente para parejas en estado silvestres. El comportamiento de desplume capturado por cámara valida el uso del plumón del nido como un marcador no invasivo de exposición de la hembra, lo que asegura que las concentraciones de metales detectadas reflejan su carga fisiológica durante el período de la pasada muda postnupcial.

Desde el punto de vista metodológico, el uso de técnicas no letales y no invasivas minimizan el estrés en una especie que ha enfrentado disminuciones en su reproducción, algunas debido a la contaminación por metales. El uso de drones para ubicar los nidos y el monitoreo con cámaras trampa resultan herramientas eficaces para evaluar comportamiento, la puesta de huevos y constatar la permanencia de los padres en el nido tras la manipulación durante el micromuestreo. Complementariamente, evidencia la visita de otras especies al nido, entre ellas, la especie exótica invasora visón americano, la cual fue capturada depredando un huevo.

En albúmina de los huevos, la detección de hierro (Fe) y zinc (Zn) evidencia una transferencia materna hacia la progenie durante las temporadas reproductivas de 2023 y 2024. Al no existir una autocorrelación directa entre ambos metales, se infiere que cada metal es independiente. En albúmina, el Zn destaca como el elemento con mayores concentraciones y diferencias interanuales significativas ($p=$

0,015), a pesar de que la sensibilidad analítica lo cuantifica solo en el 34% de los nidos, en contraste con Fe, positivo en el 76% de las muestras. En el plumón, el Fe se acumula diferente entre las poblaciones muestreadas en 2023 y 2024 ($p = <0,0001$), mientras que el Zn se mantiene sin diferencias significativas. La variabilidad registrada para estos metales se explicaría por la compleja dinámica de movilización, los niveles de excreción y el tiempo involucrado en la formación de cada matriz biológica estudiada.

Al comparar la concentración de metales en plumas con la literatura, se reconoce que las concentraciones de Zn detectadas para la especie se encuentran dentro del margen reportado en Brasil, con concentraciones promedio (\pm D.E.) de 42,46 mg/kg ($\pm 18,76$) en verano, y 77,01 mg/kg ($\pm 14,46$) para invierno (Nunes da Rosa 2017). Para otras especies del género, se reportan mayores concentraciones de Zn en plumas, las cuales para *Cygnus olor* rondan entre 73,14 mg/kg \pm 5,61 (Sinkakarimi y Hassanpour 2026) y 279,38 mg/kg \pm 217,92 (Komosa *et al.* 2012) y para *Cygnus atratus* entre 135,15 mg/kg \pm 4,79 y 209,9 mg/kg \pm 36,0. No existen reportes de Fe en plumas para la especie. Para plumas de *C. atratus* se reportan concentraciones de Fe entre 73,65 mg/kg \pm 18,93 (Nzabanita *et al.* 2024) y 436,3 mg/kg \pm 13,25 (Einoder *et al.* 2018). En albúmina, no existen reportes para el género *Cygnus*. Para otras especies como el pingüino de Humboldt se reporta una concentración de Fe en albúmina de 10,4 mg/kg \pm 16,03 y Zn de 3,99 mg/kg \pm 4,59 (Daniels-Abdulahad *et al.* 2024) y para patos de pastoreo libre de 23,19 mg Fe/kg \pm 8,36 y 54,21 mg Zn/kg \pm 11,9 (Szabó *et al.* 2024).

Un hallazgo central de esta investigación es la correlación negativa significativa hallada para el Zn entre la albúmina y el plumón ($\rho = -0,667$; $p = 0,049$). Este resultado, con un $n=9$ y un coeficiente de determinación de $R^2 = 0,363$, podría deberse a un compromiso fisiológico o *trade-off* en la partición del metal: El 36,3% de la variabilidad del Zn en el plumón de la madre está explicada por la concentración de Zn en la albúmina del huevo, o viceversa. Dado que el Zn es un cofactor enzimático esencial, su movilización hacia el contenido de huevo refleja una estrategia reproductiva de la hembra para garantizar la viabilidad de la cría (Huang *et al.* 2019, Bai *et al.* 2022, Daniels-Abdulahad *et al.* 2024). En contraste, el Fe no muestra asociaciones significativas entre matrices, lo que sugiere una regulación homeostática mucho más estricta que mantiene la concentración en el huevo estable e independiente de la carga acumulada durante la formación de su plumaje. Sin embargo, es imperativo señalar que, debido a limitaciones en la cantidad de muestra, no se cuenta con muestras duplicadas o con un volumen mayor para mejorar la determinación de los analitos (sobre todo Zn), lo cual representa una brecha metodológica que debe ser estandarizada en futuras investigaciones.

Se reconocen como limitaciones importantes el bajo contenido de muestras obtenido, debido principalmente a la complejidad logística de acceder al nido en la etapa de desarrollo embrionario óptimo para la extracción de albúmina. La colecta conservadora de muestras (promedio de 1 g de albúmina) afecta la detectabilidad analítica, dejando varios resultados bajo el límite de detección (LOD). Esta pérdida de datos se asocia a la sensibilidad del equipo utilizado y recalca la necesidad de emplear tecnologías de mayor precisión en estudios futuros para capturar concentraciones mínimas de metales esenciales. Se recomienda para nuevos estudios, pesar el huevo y coleccionar más cantidad de muestras por huevo, aumentando el volumen y la probabilidad de detección.

Los resultados obtenidos mediante el análisis de imágenes en el software Timelapse sientan una base de datos valiosa de comportamiento de nidificación para la especie, las cuales que podrán ser procesada mediante inteligencia artificial para el futuro reconocimiento automatizado de conductas, optimizando el monitoreo a largo plazo. En conclusión, este el primer estudio realizado con técnicas no letales para en la especie, donde se detecta una transferencia maternal de hierro y zinc en nidos del Santuario del Río Cruces, la cual puede ser evaluada mediante técnicas de micromuestreo, permitiendo el monitoreo a largo plazo esta especie, por ejemplo, para evaluar los efectos subletales por la contaminación de metales. El hallazgo de la correlación entre Zn transferido a la albúmina y el Zn acumulado en el plumón subraya la importancia de integrar la ecotoxicología con el monitoreo ambiental no letal, aportando evidencia científica clave para la base de datos de la especie y para la toma de decisiones en la conservación de humedales y el cumplimiento de los objetivos de reducción de la contaminación global. Finalmente, el presente trabajo demuestra que el cisne de cuello negro actúa potencialmente como una especie bioindicadora de la calidad ambiental, permitiendo monitorear la fisiología y el comportamiento para rastrear patrones temporales de exposición a metales.

5. REFERENCIAS

- Abbasi N, V Bernard, M Iqbal, S Ali, R Naseem. 2015. Influence of taxa, trophic level, and location on bioaccumulation of toxic metals in bird's feathers: A preliminary biomonitoring study using multiple bird species from Pakistan. *Chemosphere* 120:527-537. DOI:[10.1016/j.chemosphere.2014.08.054](https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2014.08.054)
- Abdullah M, M Fasola, A Muhammad, SA Malik, N Bostan, H Bokhari, MA Kamran, MN Shafqat, A Alamdar, M Khan, N Ali, SAMAS Eqani. 2015. Avian feathers as a non-destructive bio-monitoring tool of trace metals signatures: A case study from severely contaminated areas. *Chemosphere* 119:553–561. <http://dx.doi.org/10.1016/j.chemosphere.2014.06.068>
- Ackerman JT, CA Eagles-Smith, MP Herzog, CA Hartman. 2016. Maternal transfer of contaminants in birds: mercury and selenium concentrations in parents and their eggs. *Environmental Pollution* 210:145–154. DOI:[10.1016/j.envpol.2015.12.016](https://doi.org/10.1016/j.envpol.2015.12.016)
- Agusa T, T Matsumoto, T Ikemoto, Y Anan, R Kubota, G Yasunaga, T Kunito, S Tanabe, H Ogi, Y Shibata. 2005. Body distribution of trace elements in black-tailed gulls from Rishiri Island, Japan: age-dependent accumulation and transfer to feathers and eggs. *Environmental Chemistry* 24 (9):2107–2120. <https://doi.org/10.1897/04-617R.1>
- Ali H, E Khan, I Ilahi. 2019. Environmental chemistry and ecotoxicology of hazardous heavy metals: environmental persistence, toxicity, and bioaccumulation. *Hindawi Journal of Chemistry* 2019, Article ID 6730305:14. <https://doi.org/10.1155/2019/6730305>
- Allendes-Muñoz C, M Miranda, C Matus, F Lisón. 2023. Behaviour patterns of South American swans and potential ecosystem services supplied to salt production systems. *Gayana* 87(2):97-107. <https://doi.org/10.4067/S0717-65382023000200097>
- Artacho P, M Soto-Gamboa, C Verdugo, RF Nespolo. 2007a. Blood biochemistry reveals malnutrition in Black-necked Swans (*Cygnus melanocoryphus*) living in a conservation priority area. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part A, Molecular & Integrative Physiology* 146 (2):283–290. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2006.10.031>

- Artacho P, M Soto-Gamboa, C Verdugo, RF Nespolo. 2007b. Using haematological parameters to infer the health and nutritional status of an endangered black-necked swan population. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part A, Molecular & Integrative Physiology* 147 (4):1060–1066. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2007.03.017>
- Bai SP, W Gao, T Yuan, XY Ma, LJ He, L Huang, S Wei, C Liu, WC Wang, L Yang, YW Zhu. 2022. Change of zinc mobilization and gene expression of key zinc transport proteins between the yolk sac membrane and liver of duck embryonic developing. *Poultry Science* 101(1):101562. <https://doi.org/10.1016/j.psj.2021.101562>
- Bargar TA, GI Scott, GP Cobb. 2001. Maternal transfer of contaminants: Case study of the excretion of three polychlorinated biphenyl congeners and technical-grade endosulfan into eggs by White Leghorn chickens (*Gallus domesticus*). *Environmental Toxicology and Chemistry* 20(1):61–67.
- Bhardwaj JK, A Paliwal, P Saraf. 2021. Effects of heavy metals on reproduction owing to infertility. *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology* 35 (8), e22823:21. <https://doi.org/10.1002/jbt.22823>
- Bombik E, A Bombik, K Pietrzkiwicz. 2024. Analysis of zinc and copper content in selected tissues and organs of wild Mallard ducks (*Anas platyrhynchos* L.) in Poland. *Animals* 14(8):1176. <https://doi.org/10.3390/ani14081176>
- Bryan GW, WJ Langston. 1992. Bioavailability, accumulation and effects of heavy metals in sediments with special reference to United Kingdom estuaries: a review. *Environmental Pollution* 76: 89–131. [https://doi.org/10.1016/0269-7491\(92\)90099-V](https://doi.org/10.1016/0269-7491(92)90099-V)
- Burger J, M Gochfeld. 2001. Capítulo 15: Effects of chemicals and pollution on seabirds. En: Schreiber EA, Burger J (eds). *Biology of Marine Birds*. CRC Press, Boca Raton. pp. 485–525. <https://doi.org/10.1201/9781420036305>
- Carboneras C, G Kirwan, V Pantoja-Maggi. 2024. Black-necked Swan (*Cygnus melancoryphus*), versión 1.1 (Birds of the World. Cornell Lab of Ornithology). Consultado 17 jun. 2025. Disponible en <https://doi.org/10.2173/bow.blnswa2.01.1>

- Carpenter JW, GA Andrews, WN Beyer. 2004. Zinc Toxicosis in a Free-flying Trumpeter Swan (*Cygnus buccinator*). *Journal of Wildlife Diseases* 40(4):769–774. DOI:[10.7589/0090-3558-40.4.769](https://doi.org/10.7589/0090-3558-40.4.769)
- Casares J. 1944. El Cisne de Cuello Negro en La Barra de San Juan. Observaciones sobre su nidificación y cría. *Hornero* 8(03):525-528. <https://doi.org/10.56178/eh.v8i3.1399>
- Cattet MRL. 2013. Falling through the cracks: Shortcomings in the collaboration between biologists and veterinarians and their consequences for wildlife. *Institute for Laboratory Animal Research Journal* 54(1):33–40. <https://doi.org/10.1093/ilar/ilt010>
- Ceballos G, A Garcia, PR Ehrlich. 2010. The sixth extinction crisis: Loss of animal populations and species. *Journal of Cosmology* 8:1821-1831.
- Chen C, BH Paw. 2012. Cellular and mitochondrial iron homeostasis in vertebrates. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* 1823(9):1459–1467. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2012.01.003>
- CONAF (Corporación Nacional Forestal, CL). 2019. Plan de manejo Monumento Nacional Santuario de la Naturaleza Río Cruces y Chorocamayo, Sitio Ramsar Carlos Anwandter. Sistema Nacional de Áreas Protegidas del Estado. 378 p.
- CONAF (Corporación Nacional Forestal, CL). 2020. Informe Monitoreo Avifauna, octubre 2020. Oficina Provincial de Valdivia. 28 p.
- CONAF (Corporación Nacional Forestal, CL). 2021. Informe Monitoreo Avifauna, 5 julio 2021. Oficina Provincial de Valdivia. 30 p.
- Cooke SJ, DT Blumstein, R Buchholz, T Caro, E Fernández-Juricic, CE Franklin, J Metcalfe, CM O'Connor, CC St. Clair, WJ Sutherland, M Wikelski. 2013. Physiology, Behavior, and Conservation. *Physiological and Biochemical Zoology* 87(1):14. DOI:[10.1086/671165](https://doi.org/10.1086/671165)
- Cork SC. 2000. Iron storage diseases in birds. *Avian Pathology* 29(1):7–12. <https://doi.org/10.1080/03079450094216>

- Corti P, P Schlatter. 2002. Feeding Ecology of the Black-necked Swan *Cygnus melancoryphus* in Two Wetlands of Southern Chile. *Studies on Neotropical Fauna and Environment* 37(1):9-14. DOI:[10.1076/snfe.37.1.9.2118](https://doi.org/10.1076/snfe.37.1.9.2118)
- CR² (Centro de Ciencia del Clima y la Resiliencia, CL). 2024. Explorador Climático. Consultado 16 jul. 2024. Disponible en <https://explorador.cr2.cl/>
- Cursach JA, JR Rau, CN Tobar, J Vilugrón, F Brañas. 2021. Reproductive ecology of the Black-necked Swan (*Cygnus melancoryphus*) in a marine wetland of southern Chile. *Marine Ornithology* 49:205–209. <http://doi.org/10.5038/2074-1235.49.2.1425>
- Dalu T, R Tshivhase, RN Cuthbert, FM Murungweni, RJ Wasserman. 2020. Metal distribution and sediment quality variation across sediment depths of a subtropical Ramsar-declared wetland. *Water* 12:2779. <https://doi.org/10.3390/w12102779>
- Daniels-Abdulahad M, D Giarikos, MJ Adkesson, AC Hirons. 2024. Evaluation of Metal Partitioning across Humboldt Penguin (*Spheniscus humboldti*) Egg Components. *Journal of Wildlife Diseases* 60(2):474–489. <https://doi.org/10.7589/JWD-D-22-00176>
- Dauwe T, L Bervoets, R Pinxten, R Blust, M Eens. 2003. Variation of heavy metals within and among feathers of birds of prey: effects of molt and external contamination. *Environmental Pollution* 124:429–436. DOI:[10.1016/s0269-7491\(03\)00044-7](https://doi.org/10.1016/s0269-7491(03)00044-7)
- Delgado LE, VH Marín. 2013. Interannual changes in the habitat area of the black-necked swan, *Cygnus melancoryphus*, in the Carlos Anwandter Sanctuary, southern Chile: A remote sensing approach. *Wetlands* 33:91–99. <https://doi.org/10.1007/s13157-012-0354-0>
- Díaz S, J Settele, ES Brondízio, HT Ngo, J Agard, A Arneth, P Balvanera, KA Brauman, SHM Butchart, KMA Chan, LA Garibaldi, K Ichii, J Liu, SM Subramanian, GF Midgley, P Miloslavich, Z Molnár, D Obura, A Pfaff, S Polasky, A Purvis, J Razzaque, B Reyers, R Roy Chowdhury, Y-J Shin, I Visseren-Hamakers, KJ Willis, CN Zayas. 2019. Pervasive human-driven decline of life on Earth points to the need for transformative change. *Science* 366(6471):10. <https://doi.org/10.1126/science.aax3100>

- Dmowski K. 1999. Birds as bioindicators of heavy metal pollution: Review and examples concerning European species. *Acta Ornithologica* 34(1):25.
- Duarte C, E Jaramillo, B Peruzzo, R Silva. 2009. Concentraciones de metales pesados en agua y plantas de lucheillo (*Egeria densa*) en humedales del sur de Chile. Programa VI Congreso Sociedad Chilena de Limnología. Resúmenes: 20/94 p.
- Echeverría AW, G Gold-Bouchot. 2014. Metales pesados en la fauna silvestre. In Botello AV, J Rendón von Osten, JA Benítez, G Gold-Bouchot eds. *Golfo de México. Contaminación e impacto ambiental: diagnóstico y tendencias*. UAC, UNAM-ICMyL, CINVESTAV-Unidad Mérida. p. 521–546.
- Einoder LD, CK MacLeod, C Coughanowr. 2018. Metal and isotope analysis of bird feathers in a contaminated estuary reveals bioaccumulation, biomagnification, and potential toxic effects. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 75:96–110. <https://doi.org/10.1007/s00244-018-0532-z>
- Escobar J. 2002. La contaminación de los ríos y sus efectos en las áreas costeras y el mar. *CEPAL - Serie Recursos Naturales e Infraestructura* N° 50. Naciones Unidas. 68 p.
- Figuerola L. 2006. Informe mensual de las actividades realizadas en el Humedal del Río Cruces. Informe 2. Corporación Nacional Forestal, provincia de Valdivia, región de Los Lagos. 37 p.
- Figuerola-Fábrega L, JL Galaz, C Merino. 2006. Knowledge and Conservation of Black-Necked Swan *Cygnus melancoryphus* (Molina, 1782) in the Rio Cruces Wetland, Valdivia, Chile. *Gestión Ambiental* 12:77-89.
- Figuerola J, A Green. 2006. A comparative study of egg mass and clutch size in the Anseriformes. *Journal of Ornithology* 147(1):57–68. <https://doi.org/10.1007/s10336-005-0017-5>
- Ford AT, M Ågerstrand, BW Brooks, J Allen, MG Bertram, T Brodin, Z Dang, S Duquesne, R Sahn, F Hoffmann, H Hollert, S Jacob, N Klüver, JM Lazorchak, M Ledesma, SD Melvin, S Mohr, S Padilla, GG Pyle, S Scholz, M Saaristo, E Smit, JA Steevens, S van den Berg, W Kloas, BBM

- Wong, M Ziegler, G Maack. 2021. The role of behavioral ecotoxicology in environmental protection. *Environmental Science & Technology* 55:5620–5628. DOI:[10.1021/acs.est.0c06493](https://doi.org/10.1021/acs.est.0c06493)
- Fraixedas S, A Lindén, M Pihla, M Cabeza, R Gregory, A Lehikoinen. 2020. A state-of-the-art review on birds as indicators of biodiversity: Advances, challenges, and future directions. *Ecological Indicators* 118:106728. <https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2020.106728>
- Gertum F, R Aranha, L de Azevedo. 2007. *Biodiversidade: Regiões da Lagoa do Casamento e dos Butiazais de Tapes, planície costeira do Rio Grande do Sul*. Ministério do Meio Ambiente, Fundação Zoobotânica do Rio Grande do Sul. 388 p.
- Goede AA, M de Bruin. 1986. The use of bird feathers for indicating heavy metal pollution. *Environmental Monitoring and Assessment* 7 (3):249–256. DOI:[10.1007/BF00418017](https://doi.org/10.1007/BF00418017)
- Golden NH, BA Rattner. 2003. Ranking Terrestrial Vertebrate Species for Utility in Biomonitoring and Vulnerability to Environmental Contaminants. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology* 176:67–136. https://doi.org/10.1007/978-1-4612-0013-0_3
- Greenberg S, T Godin, J Whittington. 2019. Design patterns for wildlife-related camera trap image analysis. *Ecology and Evolution* 9(24): 13706–13730. <https://doi.org/10.1002/ece3.5767>
- Guerra F, M Lara. 2017. ¿Públicos o privados? Desafíos para la protección de los humedales urbanos y periurbanos de Valdivia a partir de la regulación de los cauces naturales. *Revista de Derecho Ambiental* 5(8):184-206. <https://doi.org/10.5354/0719-4633.2017.47916>
- Haedo JA. 1953. Contribución al conocimiento de la biología del Cisne de Cuello Negro. *El Hornero, Revista de Ornitología Neotropical* 10(1):1-17. <https://doi.org/10.56178/eh.v10i1.1348>
- Hartman CA, JT Ackerman, G Herring, J Isanhart, M Herzog. 2013. Marsh wrens as bioindicators of mercury in wetlands of Great Salt Lake: Do blood and feathers reflect site-specific exposure risk to bird reproduction? *Environmental Science & Technology* 47(12):6597–6605. <https://doi.org/10.1021/es400910x>

- Hashmi MZ, RN Malik, M Shahbaz. 2013. Heavy metals in eggshells of cattle egret (*Bubulcus ibis*) and little egret (*Egretta garzetta*) from the Punjab province, Pakistan. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 89:158–165. DOI:[10.1016/j.ecoenv.2012.11.029](https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2012.11.029)
- Hauenstein E. 2004. Antecedentes sobre *Egeria densa* (luchecillo), hidrófita importante en la alimentación del cisne de cuello negro. *Gestión Ambiental* 10:89–95.
- Hellou J. 2011. Behavioural ecotoxicology, an “early warning” signal to assess environmental quality. *Environmental Science and Pollution Research* 18:1–11. DOI:[10.1007/s11356-010-0367-2](https://doi.org/10.1007/s11356-010-0367-2)
- Hoffman DJ, BA Rattner, GA Burton, J Cairns. 2003. *Handbook of Ecotoxicology, Second Edition*. 106 p.
- Huang L, X Li, W Wang, L Yang, Y Zhu. 2019. The Role of Zinc in Poultry Breeder and Hen Nutrition: an Update. *Biological Trace Element Research* 191(1):191–200. <https://doi.org/10.1007/s12011-019-1659-0>
- IPBES (Plataforma Intergubernamental Científico-Normativa sobre Diversidad Biológica y Servicios de los Ecosistemas). 2019. Resumen para los encargados de la formulación de políticas del informe de la evaluación mundial de la IPBES sobre la diversidad biológica y los servicios de los ecosistemas. 56 p. (Díaz S, J Settele, ES Brondízio, HT Ngo, M Guèze *et al.* eds. IPBES secretariat, Bonn, Alemania).
- Jaramillo E, NA Lagos, FA Labra, E Paredes, E Acuña, D Melnick, M Manzano, C Velásquez, C Duarte. 2018. Recovery of black-necked swans, macrophytes and water quality in a Ramsar wetland of southern Chile: Assessing resilience following sudden anthropogenic disturbances. *Science of the Total Environment* 628–629:291–301. DOI:[10.1016/j.scitotenv.2018.01.333](https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.01.333)
- Jaramillo E, R Schlatter, H Cifuentes, C Duarte, N Lagos, E Paredes, J Ulloa, G Valenzuela, B Peruzzo, R Silva. 2007. Emigration and Mortality of Black-necked Swans (*Cygnus melancoryphus*) and Disappearance of the Macrophyte *Egeria densa* in a Ramsar Wetland Site of Southern Chile. *AMBIO: A Journal of the Human Environment* 36(7):607-610. [https://doi.org/10.1579/0044-7447\(2007\)36\[607:EAMOBS\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1579/0044-7447(2007)36[607:EAMOBS]2.0.CO;2)

- Jewell Z. 2013. Effect of monitoring technique on quality of conservation science. *Conservation Biology* 27(3): 501–508. <https://doi.org/10.1111/cobi.12066>
- Johnsgard P. 2010. Ducks, Geese, and Swans of the World, Revised Edition. Electronic edition. University of Nebraska–Lincoln Libraries. 387 p.
- Johnsgard P. 2016. Swans: Their Biology and Natural History. Zea E-Books. University of Nebraska–Lincoln Libraries. Book 38. 111 p.
- Johnson AW, JD Goodall. 1965. The birds of Chile and adjacent regions of Argentina, Bolivia and Perú. Platt Establecimientos gráficos S.A. Volumen 1. 397 p.
- Kaur S. 1989. Accumulation of lead, zinc and cadmium in the nestling feathers of hoopoe (*Upupa epops*). *Journal of the Bombay Natural History Society* 86:244–245.
- Kitowski I, D Wiacek, A Sujak, A Komosa, M Świetlicki. 2017. Factors affecting trace element accumulation in livers of avian species from East Poland. *Turkish Journal of Zoology* 41(5):901–913. <https://doi.org/10.3906/zoo-1606-43>
- Kitowski J, R Łopucki, D Wiacek, G Pitucha, A Sujak, D Jakubas. 2024. Concentration of metals and metalloids in livers of birds of various foraging guilds collected during the autumn migration period in Poland. *Environmental Science and Pollution Research* 31:21913–21934. <https://doi.org/10.1007/s11356-024-32502-y>
- Klasing KC, ES Dierenfeld, EA Koutsos. 2012. Avian iron storage disease: Variations on a common theme? *Journal of Zoo and Wildlife Medicine* 43(3):S27–S34. <https://doi.org/10.1638/2011-0157.1>
- Komosa A, I Kitowski, Z Komosa. 2012. Essential trace (Zn, Cu, Mn) and toxic (Cd, Pb, Cr) elements in the liver of birds from eastern Poland. *Acta Veterinaria* 62(5-6):579–589. <https://doi.org/10.2298/AVB1206579K>
- Kozłowski H, A Janicka-Kłos, J Brasun, E Gaggelli, D Valensin, G Valensin. 2009. Copper, iron, and zinc ions homeostasis and their role in neurodegenerative disorders (metal uptake, transport,

distribution and regulation). *Coordination Chemistry Reviews* 253:2665–2685.
<https://doi.org/10.1016/j.ccr.2009.05.011>

Krivtsov SK, YN Mineyev. 1991. Daily time and energy budgets of Whooper Swans *Cygnus cygnus* and Bewick's Swans *Cygnus bewickii* in the breeding season. *Supplement* No. 1:319–321.

Kroon F, C Streten, S Harries. 2017. A protocol for identifying suitable biomarkers to assess fish health: a systematic review. *PLOS ONE* 12:1–43. DOI:[10.1371/journal.pone.0174762](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0174762)

Lam JC, S Tanabe, MH Lam, PK Lam. 2005. Risk to breeding success of waterbirds by contaminants in Hong Kong: evidence from trace elements in eggs. *Environmental Pollution* 135:481–90. DOI:[10.1016/j.envpol.2004.11.021](https://doi.org/10.1016/j.envpol.2004.11.021)

Lefort M-C, RH Cruickshank, K Descovich, NJ Adams, A Barun, A Emami-Khoyi, J Ridden, VR Smith, R Sprague, BR Waterhouse, S Boyer. 2019. Blood, sweat and tears: a review of non-invasive DNA sampling. *bioRxiv*:385120. <https://doi.org/10.1101/385120>

Lemesle P, SH Froyland, A Ask, J Zhang, TM Ciesielski, AG Asimakopoulos, K Noreikiene, NM Wilson, C Sonne, SE Garbus, VLB Jaspers, C Arzel. 2024. From mother to egg: variability in maternal transfer of trace elements and steroid hormones in common eider (*Somateria mollissima*). *Science of the Total Environment* 956:176935. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2024.176935>

Levengood JM, GC Sanderson, WL Anderson, GL Foley, LM Skowron, PW Brown, JW Seets. 1999. Acute Toxicity of Ingested Zinc Shot to Game-farm Mallards. *Illinois Natural History Survey Bulletin* 36(1):1–36.

Levengood JM, GC Sanderson, WL Anderson, GL Foley, PW Brown, JW Seets. 2000. Influence of diet on the hematology and serum biochemistry of zinc-intoxicated mallards. *Journal of Wildlife Diseases* 36(1):111–123. DOI:[10.7589/0090-3558-36.1.111](https://doi.org/10.7589/0090-3558-36.1.111)

Li G, Z Cao, D Lan, J Xu, S Wang, W Yin. 2007. Spatial variations in grain size distribution and selected metal contents in the Xiamen Bay, China. *Environmental Geology* 52:1559–1567. <https://doi.org/10.1007/s00254-006-0600-y>

- Lucía M, J André, K Gontier, N Diot, J Veiga, S Davail. 2010. Trace Element Concentrations (Mercury, Cadmium, Copper, Zinc, Lead, Aluminium, Nickel, Arsenic, and Selenium) in Some Aquatic Birds of the Southwest Atlantic Coast of France. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 58:844–853. DOI:[10.1007/s00244-009-9393-9](https://doi.org/10.1007/s00244-009-9393-9)
- Malik RN, N Zeb. 2009. Assessment of environmental contamination using feathers of *Bubulcus ibis* L. as a biomonitor of heavy metal pollution, Pakistan. *Ecotoxicology* 18:522–536. <https://doi.org/10.1007/s10646-009-0310-9>
- Markowski M, A Kaliński, J Skwarska, J Wawrzyniak, M Bańbura, J Markowski, P Zieliński, J Bańbura. 2013. Avian feathers as bioindicators of the exposure to heavy metal contamination of food. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 91:302–305. <https://doi.org/10.1007/s00128-013-1065-9>
- Martínez R, LC Tuya, M Martínez, A Pérez, AM Cánovas. 2009. El coeficiente de correlación de los rangos de Spearman: caracterización. *Revista Habanera de Ciencias Médicas* 8(2).
- Medrano F, R Barros, HV Norambuena, R Matus, F Schmitt. 2018. Atlas de las aves nidificantes de Chile. Santiago, Chile. Red de Observadores de Aves y Vida Silvestre de Chile. 672 p.
- Mitra S, AJ Chakraborty, AM Tareq, TB Emran, F Nainu, A Khusro, AM Idris, MU Khandaker, H Osman, FA Alhumaydhi, J Simal-Gandara. 2022. Heavy metals in edible aquatic animals and their health impacts: Current status and future perspectives. *Journal of King Saud University - Science* 34(3):101865. <https://doi.org/10.1016/j.jksus.2022.101865>
- MMA (Ministerio de Medio Ambiente, CL). 2019. Listado 16vo Proceso de Clasificación. Clasificación de Especies del Ministerio del Medio Ambiente. Consultado 3 jul. 2024. Disponible en <https://clasificacionespecies.mma.gob.cl/procesos-de-clasificacion/18o-proceso-de-clasificacion-de-especies-2022/listado-final-18vo-proceso-de-clasificacion/>
- Nascimento JLX, JM Flores, BS Ataguile, M Koch, SB Scherer, PJP Santos. 2001. Biological aspects of the Black-necked Swan (*Cygnus melancoryphus*) and Coscoroba Swan (*Coscoroba coscoroba*) in Rio Grande do Sul state, Brazil. *Melopsittacus* 4(1):31–38. <https://www.researchgate.net/publication/355653147>

- Newman M, WH Clements. 2008. *Ecotoxicology: a comprehensive treatment*. CRC Press. 829 p.
- Nys Y, N Guyot. 2011. Chapter 6: Egg formation and chemistry. In: *Improving the Safety and Quality of Eggs and Egg Products*. Volumen 1: Egg Chemistry, Production and Consumption. *Woodhead Publishing Series in Food Science, Technology and Nutrition*:83–132. <https://doi.org/10.1533/9780857093912.1.83>
- Norambuena MC, F Bozinovic. 2009. Effect of Malnutrition on Iron Homeostasis in Black-Necked Swans (*Cygnus melanocoryphus*). *Journal of Zoo and Wildlife Medicine* 40(4):624–631. <http://dx.doi.org/10.1638/2007-0160.1>
- Norambuena C, M Jélvez, M Mena, M Ratto. 2023. Seasonality in the feeding ecology of Black-necked swans (*Cygnus melancoryphus*) in a temperate wetland of southern Chile. *Gayana* 87 (1):10-17. <https://doi.org/10.4067/S0717-65382023000100010>
- Nunes da Rosa N. 2017. Contaminación por metales pesados en el cisne de cuello negro (*Cygnus melanocoryphus*) en el sur de Brasil. Tesis de Maestría en Ciencia Animal. Universidad Federal Rural del Semi-Árido, Brasil.
- Orłowski G, L Hałupka, P Pokorny, E Klimczuk, H Sztwiertnia, W Dobicki, R Polechoński. 2017. The pattern of distribution and interaction of metals and calcium in eggshells and egg contents in relation to the embryonic development of eggs in a small passerine bird. *Journal of Ornithology* 158:297–309. <https://doi.org/10.1007/s10336-016-1366-y>
- Pabón S, R Benítez, R Sarria, J Gallo. 2020. Contaminación del agua por metales pesados, métodos de análisis y tecnologías de remoción. Una revisión. *Entre Ciencia e Ingeniería* 14(27):9-18.
- Páez F. 2014. Metales y metaloides: origen, movilidad y ciclos biogeoquímicos. In Botello AV, J Rendón von Osten, JA Benítez, G Gold-Bouchot eds. *Golfo de México. Contaminación e impacto ambiental: diagnóstico y tendencias*. UAC, UNAM-ICMyL, CINVESTAV-Unidad Mérida. p. 505–520.
- Pandey G, S Madhuri. 2014. Heavy metals causing toxicity in animals and fishes. *Research Journal of Animal, Veterinary and Fishery Sciences* 2(2):17–23.

- Pešková L, M Sládeček, M Šálek, K Brynychová, P Chajma, CD Soulsbury, DC Deeming. 2026. Egg-turning rates in birds: A review of recording methods and the influence of egg composition and developmental maturity. *Ornithology* 143(1):1–14. <https://doi.org/10.1093/ornithology/ukaf045>
- Peterson EK, DB Buchwalter, JL Kerby, MK Lefauve, CW Varian-Ramos, JP Swaddle. 2017. Integrative behavioral ecotoxicology: bringing together fields to establish new insight to behavioral ecology, toxicology, and conservation. *Current Zoology* 63(2):185–194. DOI: [10.1093/cz/zox010](https://doi.org/10.1093/cz/zox010)
- Phillips DP, LRD Human, JB Adams. 2015. Wetland plants as indicators of heavy metal contamination. *Marine Pollution Bulletin* 92:227–232. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2014.12.038>
- Powell RA, G Proulx. 2003. Trapping and marking terrestrial mammals for research: Integrating ethics, performance criteria, techniques, and common sense. *Institute for Laboratory Animal Research Journal* 44(4):259–276. <https://doi.org/10.1093/ilar.44.4.259>
- Rees E, L Cao, P Clausen, J Coleman, J Cornely, O Einarsson, C Ely, R Kingsford, M Ma, C Mitchell, S Nagy, T Shimada, J Snyder, D Solovyeva, W Tijssen, Y Vilina, R Włodarczyk, K Brides. 2019. Conservation status of the world’s swan populations, *Cygnus* sp. and *Coscoroba* sp.: A review of current trends and gaps in knowledge. *Wildfowl* (Special Issue 5):35–72.
- Rehman AU, S Nazir, R Irshad, K Tahir, K ur Rehman, R Ul Islam, Z Wahab. 2021. Toxicity of heavy metals in plants and animals and their uptake by magnetic iron oxide nanoparticles. *Journal of Molecular Liquids* 321, 114455: 33 p. <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2020.114455>
- Richards M. 1997. Trace mineral metabolism in the avian embryo. *Poultry Science* 76:152–164. <https://doi.org/10.1093/ps/76.1.152>
- Rodríguez-Jorquera I, J Lenzi, M Maturana, G Biscarra, J Ruíz, J Navedo. 2023. Exploring the recovery of a large wetland using black-necked swan blood parameters and body condition 16 years after a pollution-induced disturbance. *Integrated Environmental Assessment and Management* 19(3):663–675. DOI:[10.1002/ieam.4748](https://doi.org/10.1002/ieam.4748)

- Rothschild RFN, LK Duffy. 2005. Mercury concentrations in muscle, brain and bone of Western Alaskan waterfowl. *Science of the Total Environment* 349 (1–3):277–283. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2005.05.021>
- Russell WMS, RL Burch. 1959. *The principles of humane experimental technique*. London: Methuen & Co. Ltd. xiv. 238 p. In: Zemanova M. Towards more compassionate wildlife research through the 3Rs principles: moving from invasive to non-invasive methods, 2020. *Wildlife Biology* 2020 (1):1–17.
- Rutkowska M, J Płotka-Wasyłka, M Lubinska-Szczygeł, A Róžańska, J Możejko-Ciesielska, J Namieśnik. 2018. Birds' feathers, Suitable samples for determination of environmental pollutants. *Trends in Analytical Chemistry* 109:97-115. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2018.09.022>
- SAG (Servicio Agrícola y Ganadero, CL). 2018. Legislación. Ley N°19.473 y su Reglamento. División de Protección de los Recursos Naturales Renovables, Departamento de Vida Silvestre. 108 p.
- Schilling AK, MV Mazzamuto, C Romeo. 2022. A review of non-invasive sampling in wildlife disease and health research: what's new? *Animals* 12:1719. <https://doi.org/10.3390/ani12131719>
- Schlatter R. 1998. Ficha informativa de los humedales de Ramsar: categorías aprobadas por la Recomendación 4.7 de la Conferencia de las Partes Contratantes. 19 p.
- Schlatter R, J Salazar, A Villa, J Meza. 1991a. Demography of Black-necked swans *Cygnus melancoryphus* in three Chilean wetland areas. In: Sears J, PJ Bacon eds. Proceedings of the Third International Swan Symposium, Oxford, England, 1989. *Waterfowl*, Special Supplement (1):88–94.
- Schlatter R, J Salazar, A Villa, J Meza. 1991b. Reproductive biology of black necked Swans *Cygnus melancoryphus* at three Chilean wetland areas and feeding ecology at Rio Cruces. In: Sears J, PJ Bacon eds. Proceedings of the Third International Swan Symposium, Oxford, England, 1989. *Waterfowl*, Special Supplement (1):268-271.
- Schlatter R, R Navarro, P Corti. 2002. Effects of El Nino Southern Oscillation on Numbers of Black-Necked Swans at Rio Cruces Sanctuary, Chile. *Waterbirds: The International Journal of*

- Waterbird Biology* 25 (Special Publication 1: Proceedings of the Fourth International Swan Symposium 2001):114-122. <https://www.jstor.org/stable/1522341>
- Seco JP, O Beltrame, J Marcovecchio, M Favero, P Gandini. 2011. Trace metals (Cd, Cr, Cu, Fe, Ni, Pb, and Zn) in feathers of Black-browed Albatross (*Thalassarche melanophrys*) attending the Patagonian Shelf. *Marine Environmental Research* 72(1–2):40–45. <https://doi.org/10.1016/j.marenvres.2011.04.004>
- Seijas MS. 1996. Identificación individual en el cisne de cuello negro (*Cygnus melancoryphus*) a través de la línea ocular. *Ornitología Neotropical* 7(2):171-172. https://digitalcommons.usf.edu/ornitologia_neotropical/vol7/iss2/10
- Silva CP, RP Schlatter, M Soto. 2012. Reproductive biology and pair behavior during incubation of the black-necked swan (*Cygnus melanocoryphus*). *Ornitología neotropical* 23:55-567. https://digitalcommons.usf.edu/ornitologia_neotropical/vol7/iss2/10
- Sinkakarimi MH, M Hassanpour. 2026. Effect of taxonomy and feeding guilds on waterbirds of the Southern Caspian Sea, Iran. *PLoS One* 21(2): e0334915. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0334915>
- Smith PN, GP Cobb, C Godard-Codding, D Hoff, ST McMurry, TR Rainwater, KD Reynolds. 2007. Contaminant exposure in terrestrial vertebrates. *Environmental Pollution* 150(1):41–64. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2007.06.009>
- Stebbins KR, JD Klimstra, CA Eagles-Smith, JT Ackerman, GH Heinz, 2009. A nonlethal microsampling technique to monitor the effects of mercury on wild bird eggs. *Environmental Toxicology and Chemistry* 28(3):465–470. DOI:[10.1897/08-316.1](https://doi.org/10.1897/08-316.1)
- Steffen W, W Broadgate, L Deutsch, O Gaffney, C Ludwig. 2015. The trajectory of the Anthropocene: The Great Acceleration. *The Anthropocene Review* 2(1):81–98. <https://doi.org/10.1177/2053019614564785>
- Sunde ML. 1972. Zinc requirement for normal feathering of commercial Leghorn-type pullets. *Poultry Science* 51(4):1316–1322. <https://doi.org/10.3382/ps.0511316>

- Tabatabaie MM, H Aliarabi, AA Saki, A Ahmadi, SA Hosseini Siyar. 2007. Effect of different sources and levels of zinc on egg quality and laying hen performance. *Pakistan Journal of Biological Sciences* 10 (19):3476–3478. <https://doi.org/10.3923/pjbs.2007.3476.3478>
- Tatu KS, JT Anderson, LJ Hindman, G Seidel. 2007. Diurnal foraging activities of mute swans in Chesapeake Bay, Maryland. *Waterbirds* 30(1):121–128. [http://dx.doi.org/10.1675/1524-4695\(2007\)030\[0121:DFAOMS\]2.0.CO;2](http://dx.doi.org/10.1675/1524-4695(2007)030[0121:DFAOMS]2.0.CO;2)
- Thongcharoen K, MG Robson, S Keithmaleesatti. 2018. Determination of heavy metals in eggs of Little Grebe (*Tachybaptus ruficollis*) around the wastewater treatment ponds, Khon Kaen University Kanokporn. *Human and Ecological Risk Assessment* 24(2):362-376. DOI:[10.1080/10807039.2017.1383851](https://doi.org/10.1080/10807039.2017.1383851)
- Tsipoura N, J Burger, L Niles, A Dey, M Gochfeld, M Peck, D Mizrahi. 2017. Metal levels in shorebird feathers and blood during migration. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 72:562–574. DOI:[10.1007/s00244-017-0400-2](https://doi.org/10.1007/s00244-017-0400-2)
- UACh (Universidad Austral de Chile, CL). 2005. Estudio sobre origen de mortalidades y disminución poblacional de aves acuáticas en el Santuario de la Naturaleza Carlos Anwandter, en la provincia de Valdivia. Informe final. 443 pp.
- UICN (Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza). 2024. Red list of threatened species. Consultado 7 jul. 2024. Disponible en <https://www.iucnredlist.org/>
- Van Dijk K. 1998. Ruiende Zwarte Zwanen *Cygnus atratus* op bet IJsselmeer. Korte bijdragen. *Limosa* 71(2):78–80.
- Vaz R, F Rilla. 1991. Black-necked Swan *Cygnus melancoryphus* and Coscoroba Swan *Coscoroba coscoroba* in a wetland in Uruguay. Departamento de Zoología Vertebrados, Facultad de Humanidades y Ciencias de la Universidad, Uruguay. *Supplement* (1):272-277.
- Vilina Y, HL Cofre, C Silva-Garcia, MD García, C Perez-Friedenthal. 2002. Effects of El Nino on Abundance and Breeding of Black-Necked Swans on El Yali Wetland in Chile. *Waterbird Society* 25 (Special Publication 1):123-127. <http://jstor.org/stable/1522342?origin=JSTOR-pdf>

- Vuilleumier F. 1997. A large autumn concentration of swans (*Cygnus melancoryphus* and *Coscoroba coscoroba*) and other waterbirds at Puerto Natales, Magallanes, Chilean Patagonia, and its significance for swan and waterfowl conservation. *Ornitología Neotropical* 8(1):1-5.
- Wang F, S Xu, Y Zhou, P Wang, X Zhang. 2017. Trace element exposure of whooper swans (*Cygnus cygnus*) wintering in a marine lagoon (Swan Lake), northern China. *Marine Pollution Bulletin* 119:60-67. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2017.03.063>
- Weller M. 1967. Notes on some marsh birds of Cape San Antonio, Argentina. *Ibis* 109:391–441. <https://doi.org/10.1111/j.1474-919X.1967.tb04013.x>
- Wikelski M, S Cooke. 2006. Physiology Conservation. *Trends in Ecology Evolution* 21(2):38-46. <https://doi.org/10.1016/j.tree.2005.10.018>
- Zabala J, IA Rodríguez-Jorquera, SC Orzechowski, P Frederick. 2019. Mercury concentration in nestling feathers better predicts individual reproductive success than egg or nestling blood in a piscivorous bird. *Environmental Science & Technology* 53:1150–1156. <https://doi.org/10.1021/acs.est.8b05424>
- Zemanova M. 2020. Towards more compassionate wildlife research through the 3Rs principles: moving from invasive to non-invasive methods. *Wildlife Biology* 2020 (1):1–17. <https://doi.org/10.2981/wlb.00607>
- Zhao Y, M Xu, Q Liu, Z Wang, L Zhao, Y Chen. 2018. Study of heavy metal pollution, ecological risk and source apportionment in the surface water and sediments of the Jiangsu coastal region, China: a case study of the Sheyang Estuary. *Marine Pollution Bulletin* 137:601–609. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2018.10.044>

Anexo 1. Señuelo utilizado para calibración de imagen y ajustes de ángulo para instalación de cámaras trampa en nidos de cisne de cuello negro. Construcción propia.



Anexo 2. Vara de arrayán utilizada como pértiga fija para la instalación de la cámara trampa. Elaborada por Luis Miranda (Guardaparque).



Anexo 3. Procedimiento de instalación de cámaras trampa frente a nidos de *C. melancoryphus*, Santuario de la Naturaleza Río Cruces y Chorocamayo, sector de San Ramón (octubre 2024).



Anexo 4. Colaboradores del proyecto Fondecyt de Iniciación N°11221213 que participaron en los terrenos durante la investigación (2023 - 2024).



Anexo 5. Restos de membranas dispersas en nido Cayumapu 2, evidencia aparente de cuatro huevos eclosionados (noviembre 2024).



Anexo 6. Nido Pichoy 1 atacado por visón (noviembre 2024). Santuario de la Naturaleza Río Cruces y Chorocamayo.



Anexo 7. Depredación por visón (*Neogale vison*) en nido de cisne de cuello negro. Se registra la depredación del último de cinco huevos, el cual se encontraba en proceso de eclosión (noviembre 2024). Santuario de la Naturaleza Río Cruces y Chorocamayo.



Anexo 8. Cisnes macho volteando huevos (octubre – noviembre 2024).

