

CINCIA Protocolos de Métodos M-006

Colecta de Pelos de Murciélagos para Análisis de Mercurio

Procedimiento Operativo Estándar

CINCIA Programa de Mercurio

Nombre Protocolo	:	Colecta de pelos para análisis de mercurio
Código Protocolo	:	M-006
Fecha publicación	:	31 octubre 2020
Autor	:	Blga Jessica N. Pisconte, Blgo Alejandro Portillo, PhD Claudia M. Vega
Contacto autor	:	vegacm@wfu.edu
Revisado por	:	Carol L. Mitchell PhD. Asesora Científica – CINCIA
Aprobado por	:	César Ascorra Guanira. Director Nacional - CINCIA

1. Resumen del procedimiento

Este protocolo describe el procedimiento de colecta de pelos de murciélago en campo para análisis de mercurio, detallando los pasos desde la instalación de redes hasta la obtención de la muestra, haciendo uso de métodos eficaces que generen el menor estrés posible al animal.

2. Introducción

El Programa de Mercurio del Centro de Innovación Científica Amazónica a través del uso de bioindicadores busca entender el flujo del mercurio en ecosistemas impactados por minería artesanal.

Para el monitoreo de mercurio en murciélagos serán empleados los pelos, el cual representa un método no invasivo procurando el bienestar de los individuos.

En este protocolo se muestran los pasos para realizar el monitoreo de mercurio partiendo por la instalación de redes hasta la captura, toma de datos y toma de muestras y está dirigido a investigadores, asistentes de campo y estudiantes.

3. Materiales y equipos

- Redes de neblina de 12 x 2.5 m
- Bolsas de tela
- Driza de 3/16"
- Cinta marcadora
- Tableros de madera
- Calibrador o vernier
- Balanza de resorte "Pesola" (50 g y 100 g)
- Sobres de papel
- Lápiz
- Plumón indeleble
- Tijeras de acero inoxidable
- Alcohol de 70°
- Alcohol gel
- Algodón
- Guantes de cuero
- Mascarillas (recomendable en cuevas)
- Linterna de cabeza
- Formato para toma de datos
- Cámara fotográfica (opcional)
- Claves de identificación de murciélagos
- Formato para toma de datos
- GPS

* Las cantidades pueden variar de acuerdo con el objetivo de colecta

4. Procedimiento operativo

El procedimiento para la colecta de pelos se realizará siguiendo la secuencia mostrada en el siguiente diagrama de flujo (Fig.1):

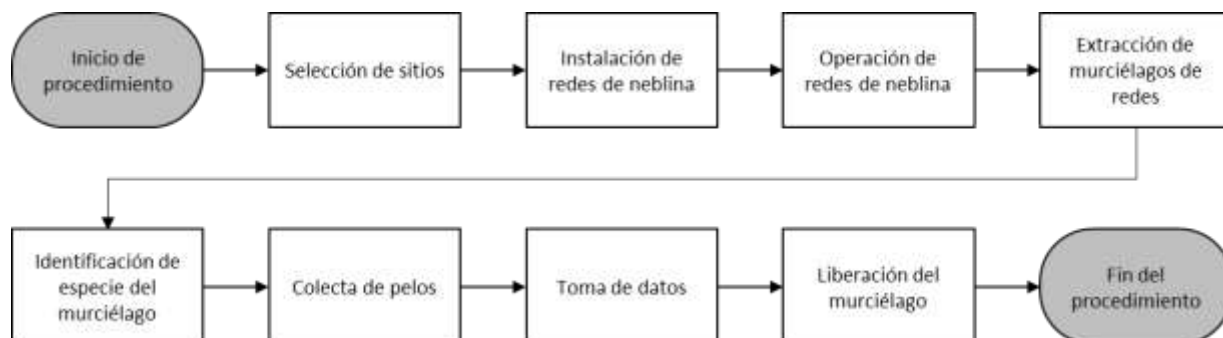


Fig. 1 Diagrama de flujo para la colecta de pelos

Para el inicio del proceso de captura y toma de muestras, es necesario contar con un equipo de al menos 03 personas por cada estación de procesamiento de murciélagos (lugar donde se procesarán datos y coleccionarán muestras). El equipo estará conformado por 01 especialista con entrenamiento comprobado y 02 asistentes con un entrenamiento básico. El profesional a cargo debe proporcionar un tratamiento ético y adecuado durante la captura, toma de datos, colecta o liberación de los animales. El número ideal de redes de niebla es de 10 por cada noche de capturas y unidad de vegetación (MINAM, 2015), sin embargo esta cantidad es variable y debe ser definida por el investigador.

Nota: El diseño de los puntos de captura puede variar de acuerdo a los objetivos, pero debe considerar mantener una estandarización si desea realizar comparaciones entre lugares de muestreo.

4.1 Medidas de precaución para la salud

Este es un punto importante a considerar debido a que la manipulación de murciélagos presenta riesgos entre ellos el contraer enfermedades zoonóticas como la rabia por mordeduras o exposición a la saliva, otra enfermedad transmisible es la histoplasmosis causada por esporas de hongos presentes en las heces de estos animales. Las medidas preventivas para el personal de campo son:

- Luego de cada manipulación, realice la limpieza y desinfección de manos con alcohol gel o alcohol 70°. Si es posible lavar las manos con agua y jabón, la frecuencia de esta actividad dependerá del suministro de agua, de contar con el servicio de forma permanente deberá lavar las manos después de cada manipulación, de lo contrario, debe realizar esta actividad inmediatamente al retornar de campo.
- Uso de guantes de cuero, como medio de protección ante una posible mordida. Puede utilizar guantes de látex o nitrilo debajo de los guantes de cuero, el uso de estos facilita la desinfección con alcohol y evita reseca las manos frente a su uso continuo. Algunas instituciones recomiendan utilizarlos sobre los guantes de cuero (NPS Institutional Animal Care & Use Committee, 2016).

- Uso de mascarilla filtrante (normas N95, FFP2 o FFP3 o equivalente) principalmente al realizar el monitoreo en cuevas.
- Todo el personal de campo encargado del monitoreo debe tener la vacuna antirrábica vigente.

4.2 Consideraciones para el uso de redes de neblina

El uso de redes de neblina es un método tradicional para las capturas de aves y murciélagos y son herramientas efectivas para el monitoreo de sus poblaciones en diferentes ecosistemas.

Las redes estándar tienen 12 m de largo, 2.5 m de alto, con 05 o 06 guías. A continuación, detallamos las consideraciones previas a su operación:

4.2.1 Selección de sitios

La selección del lugar para colocar las redes de neblina dependerá del objetivo y del lugar donde se realizarán las colectas. A continuación, damos algunas consideraciones generales para la elección de los sitios de colocación:

- La ubicación para la instalación de redes de captura podría situarse en el límite de dos tipos de hábitats, por ejemplo, el límite entre un bosque y un pastizal o una zona descubierta.
- Dentro del bosque podría considerar una línea divisoria, como un camino (trocha) o una zona de arbustos en el interior de este.
- Se sugiere instalar las redes cerca de una fuente permanente de agua, por ejemplo, en el borde de un lago, la ribera de un río o quebrada.
- Colocar las redes procurando se encuentren separadas al menos unos 200 m, el especialista puede determinar las distancias *in situ*.
- Puede cambiar las redes de lugar o dirección, también moverlas a distancias cortas a fin de evitar que los murciélagos identifiquen las redes, reduciendo el número de capturas, este procedimiento puede realizarlo cada 2 o 3 días.

4.2.2 Instalación de redes de neblina

La instalación de redes puede depender del grupo de murciélagos de interés, la estructura y altura de la vegetación, la accesibilidad, proximidad a la estación de procesamiento, tipo de suelo o profundidad del agua. En caso exista vegetación abundante, retire 1 m de vegetación a cada lado de la red, para permitir el acceso adecuado al momento de las revisiones (Ralph et al., 1996).

Las redes pueden ser instaladas de dos formas:

a) Redes de neblina en sotobosque

Son utilizadas esencialmente para el registro de murciélagos de la familia Phyllostomidae (Voss & Emmons, 1996). Este tipo de redes deben ser colocadas en el sotobosque a una altura no mayor a los 3m (Fig. 2) utilizando varillas a ambos extremos (Aguirre, 2007; Voss & Emmons, 1996), en sitios donde haya mayor probabilidad de captura, colocando las redes en paralelo, perpendicular o atravesando las vías de vuelo que por lo general son espacios abiertos presentes en los caminos, senderos, así como cerca de fuentes de agua y sitios de alimentación (Kunz et al., 1996; Voss & Emmons, 1996).

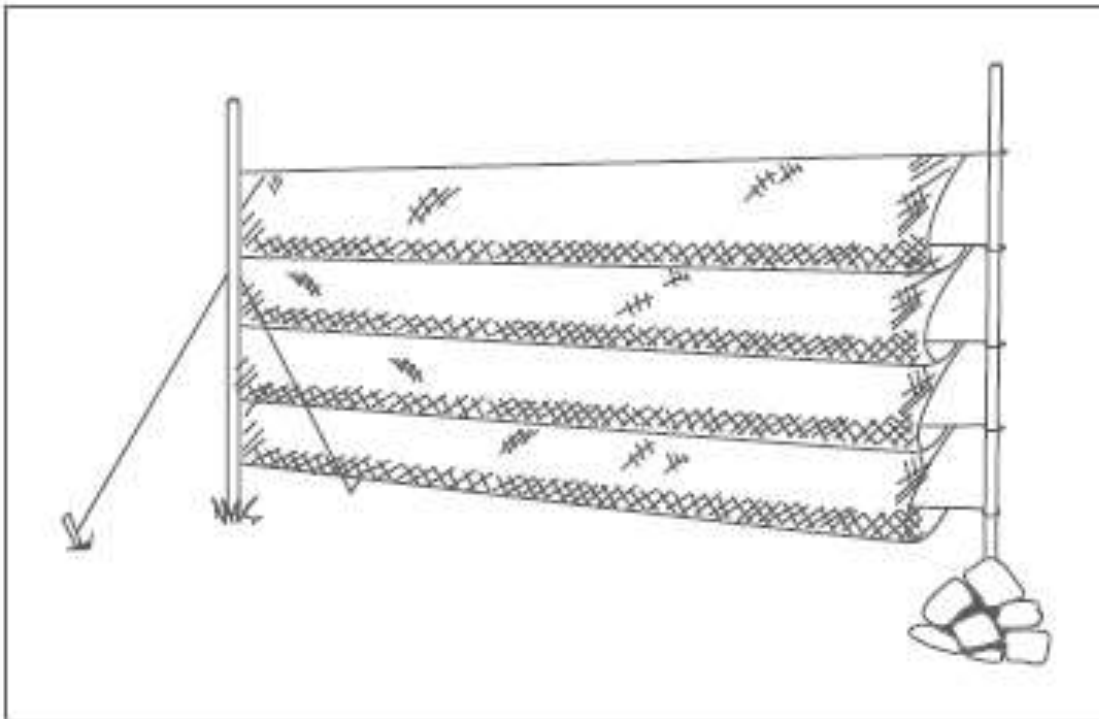


Fig. 2 Red de neblina instalada a nivel de sotobosque (Tomado de Nagorsen y Peterson, 1980)

b) Redes de neblina en dosel

En determinados ambientes, puede complementar las capturas con redes en sotobosque instalando redes en dosel (Fig. 3), puesto que existe diferencia de especies en estos dos estratos (Voss & Emmons, 1996 citado en MINAM, 2015). La colocación de redes a nivel de dosel se da en forma horizontal o vertical. En ambos casos, es necesario buscar un espacio libre (claros o árboles emergentes), para lanzar las cuerdas y suspender las redes. Las redes de dosel colocadas de forma horizontal requieren la ubicación de dos

ramas, con una distancia de separación mayor a la longitud de las redes para que estas se mantengan tensas durante el muestreo; mientras que las redes colocadas en forma vertical requieren el uso de solo una rama de árbol. La instalación de las redes en ambos casos se logra mediante un sistema de poleas (Hoffman et al., 2010 citado en Eymann et al., 2010 ; Kunz et al., 2009).

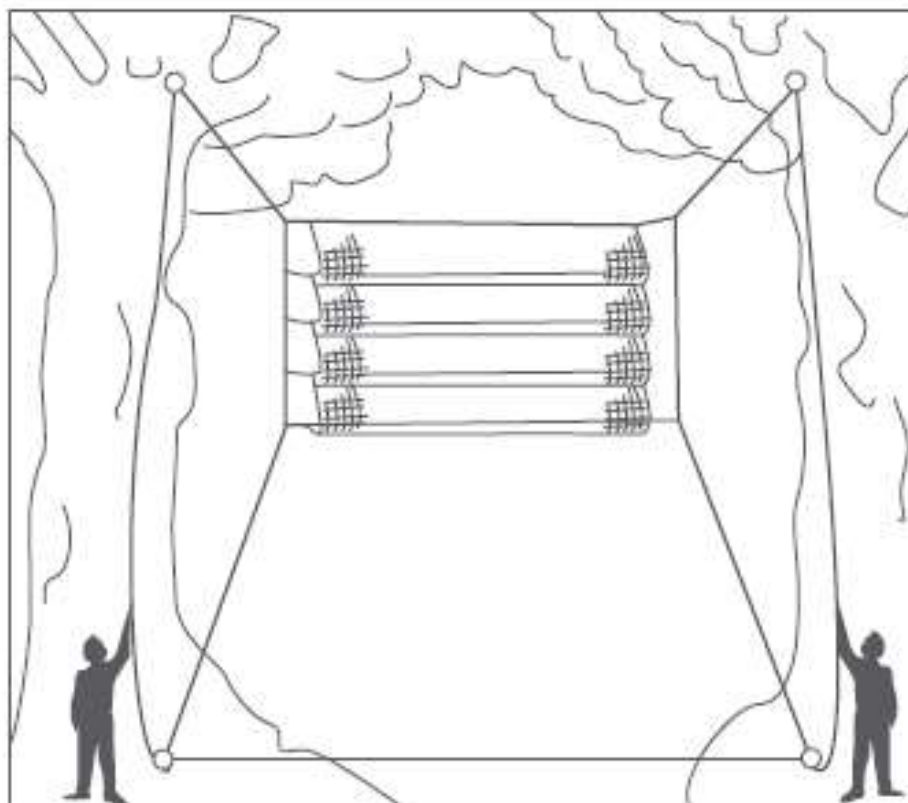


Fig. 3 Instalación de red de dosel (Tomado de Tirira, 1999)

4.2.3 Cerrado, retiro y almacenamiento

Cada día al finalizar la operación de las redes, debe limpiarlas recogiendo todas las ramas, hojas o algún objeto que pudiera quedar insertadas en la malla, debe ser cuidadoso con la limpieza, ya que, de cerrar la red sin limpiarla, puede almacenar humedad y dañarla.

Luego debe cerrarlas, para ello ubique todas las guías de la red al centro de cada parante, separar la primera guía que servirá como bolsa y empezar a girar las demás con un movimiento envolvente e ir bajando la primera guía para cerrar la red por completo.

Nota: Asegúrese que todas las redes se encuentren cerradas antes de dejar la zona de capturas.

Para retirar las redes del lugar, debe realizar la limpieza, el cerrado, luego tomar una bolsa con asas (de tela) e insertar un asa por el medio de las guías, pasar la mano por el asa, luego retire el parante e inicie el guardado introduciendo la red en la bolsa hasta llegar al otro extremo.

Antes del almacenamiento de las redes, procure secarlas al sol, esto ayudará a eliminar la humedad y evitará el deterioro.

¡IMPORTANTE!

Recuerde que en caso de existir un fenómeno climático no favorable como lluvias o tormentas debe cerrar las redes.

4.3 Operación de redes de neblina

Se recomienda establecer un total de horas de operación tomando al menos 6 horas por día, donde la cantidad de días dependerá del objetivo del estudio o del número de especies capturadas. En caso el clima se torne poco favorable para el trabajo (lluvias) deberá cerrar todas las redes para evitar afectar la seguridad de los individuos, además el agua sobre las redes las vuelve visibles y fáciles de detectar por los murciélagos (Carvalho et al., 2011 citado en Bracamonte, 2018).

La captura debe realizarse durante la actividad de forrajeo de los murciélagos (Jones et al., 1996), por ello, las redes deben ser abiertas entre las 17:30 y 18:00 horas para capturar aquellas especies que inician su actividad antes de la puesta de sol.

Las revisiones de las redes deben realizarse de forma periódica, con frecuencias entre 30 a 40 minutos (Kunz et al., 2009 citado en Eymann et al., 2010), y debe ser realizado por al menos dos personas para evitar el daño a las redes y el estrés en los animales agilizando el retirado de los murciélagos (Aguirre, 2007).

Para evitar el descenso de las redes colocadas a nivel de dosel durante cada revisión, estas deben ser revisadas utilizando linternas con una iluminación de gran alcance para visualizar a los murciélagos capturados en las partes altas del bosque. Debido a que las especies presentan picos de actividad en distintos horarios, se recomienda la apertura de la red hasta las 00:00 horas (Aguirre, 2007).

4.4 Extracción

Los individuos capturados en las redes deben ser removidos con mucho cuidado a fin de evitar dañarlos. Es importante usar guantes de cuero, dado que algunas especies de murciélagos son potenciales vectores de la rabia (Constantine, 2009 citado en Bracamonte, 2018) y como medida preventiva el equipo debe tener la vacuna antirrábica vigente antes del trabajo en campo.

Para la remoción del murciélago se recomienda la metodología descrita por Jones et al en 1996, esta consiste en identificar el lado de la red por el cual ingresó (estirando la red por ambos lados) y ejecutar la remoción por ese mismo lado. Debe iniciar por desenredar las patas y la cola, luego el cuerpo y, por último, la cabeza y las alas (Jones et al, 1996; Finnemore & Richardson, 2004 citado en Bracamonte, 2018). (Fig. 4)

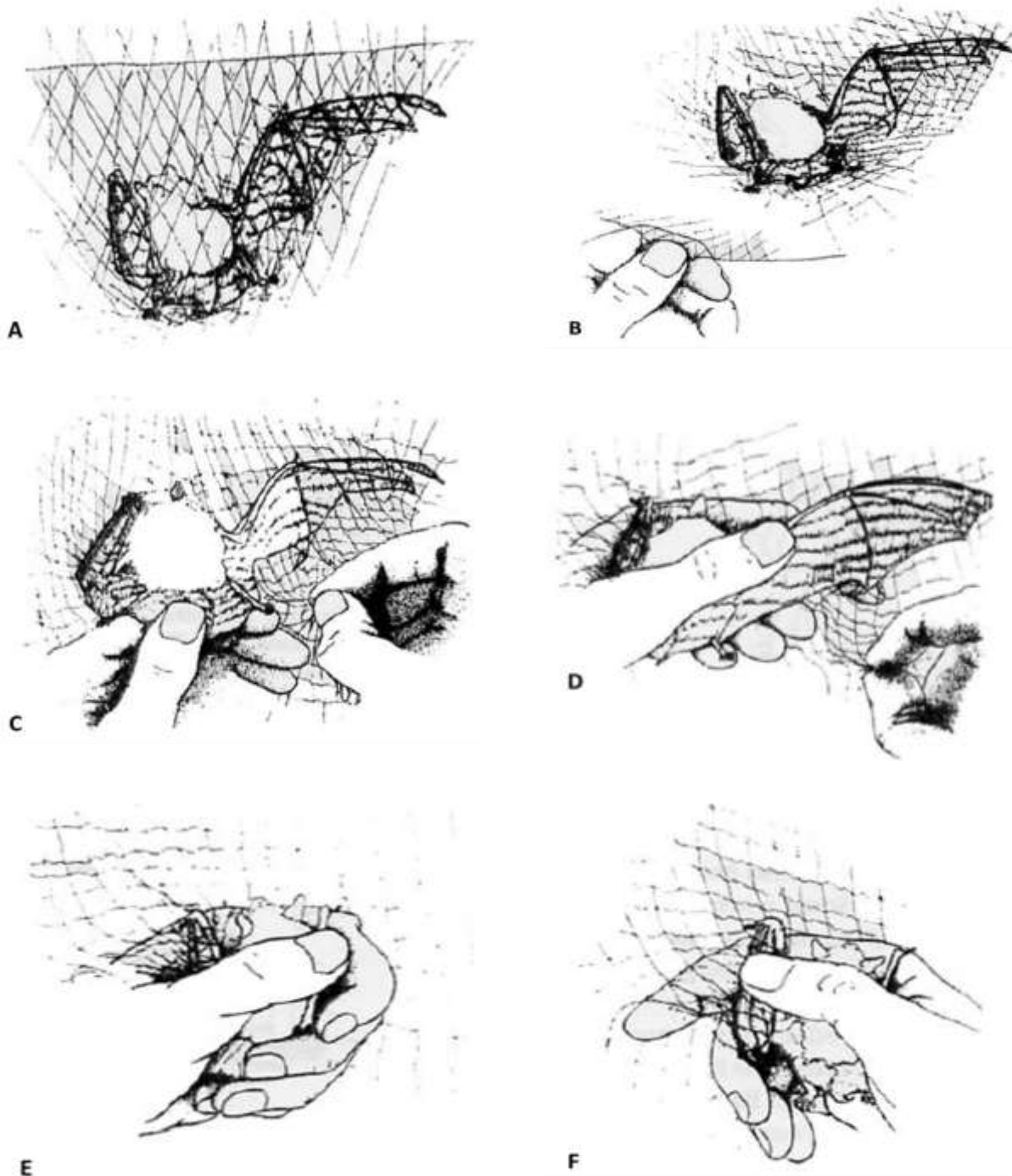


Fig. 4 Secuencia de extracción de un murciélago de la red. A) Murciélago atrapado en bolsa de niebla de neblina. B) Bolsa de la red abierta para exponer el murciélago capturado. C) Cola y patas traseras de murciélago despejadas de la red. D) Cuerpo de murciélago firmemente sostenido y red retirada de un ala extendida. E) Cuerpo de murciélago y un ala libre agarrada para evitar enredos. F) Ala restante removida de la red.

Nota: El dibujo muestra una mano sin guantes; sin embargo, siempre use guantes de cuero mientras manipula los murciélagos.

4.5 Procesamiento

En este punto explicaremos los pasos a seguir durante el procesamiento de toma de datos y muestras. Para el registro de los datos obtenidos utilizaremos la **Ficha de Toma de datos** ubicado en anexos (Anexo 01).

4.5.1 Identificación

Para identificar la especie capturada se debe usar una Guía de Murciélagos representativa de la región donde se quiere trabajar, para Sudamérica recomendamos usar la Clave de Identificación de Murciélagos de Sudamérica (Díaz et al., 2016). Recuerde que para la toma de datos debe tener un entrenamiento previo o estar acompañado de un especialista.

4.5.2 Colecta de pelos

Se recomienda realizar la colecta de pelos antes de la toma de datos complementarios, debido a que el individuo podría escapar mientras es evaluado, generando la pérdida de muestra.

Las muestras de pelo serán tomadas de la región dorsal media de los especímenes capturados utilizando tijeras de acero inoxidable desinfectadas con alcohol entre una muestra a otra para evitar contaminación cruzada (Syaripuddin et al., 2014) (Fig. 5).



Fig. 5 Zona dorsal media de un individuo de Chrotopterus auratus. Fotografía: Andrea Caicedo Luna

Puede coleccionar aproximadamente 1 g de muestra de pelos aproximadamente. La capacidad analítica del laboratorio donde serán analizadas las muestras, será de ayuda para definir la cantidad. La muestra de pelo a coleccionar debe ser cortada por encima de los 1 a 2 mm sobre la piel correspondiente a un área aproximada de 1 cm² (Carrasco-Rueda et al., 2020; Mina et al., 2019; Syaripuddin et al., 2014).

4.5.3 Almacenamiento de muestras

Luego de coleccionar la muestra, debe colocar los pelos cortados en sobres de papel pequeños, estos sobres deben tener el rotulado:

- Código de muestra
- Especie
- Fecha
- Lugar

También puede guardar las muestras en tubos Eppendorf, las muestras deben ser guardadas individualmente y se recomienda almacenarlos en bolsas Ziploc grandes con sílica gel.

Es importante recordar que cada sobre con contenido de pelos debe tener un código único de identificación.

4.5.4 Determinación de Edad y Sexo:

La determinación de edad y sexo se realizará en base a la presencia de genitales en machos (Racey, 1988). La condición reproductiva en los machos se puede evaluar por el tamaño de los testículos, estos tienden a agrandarse en individuos capaces de reproducirse. Para las hembras, la palpación del abdomen se usa para determinar si la hembra está preñada, el estado de lactancia puede ser reconocido por pezones agrandados rodeados de piel desnuda, que cuando son suavemente masajeados extraerá leche. Las hembras post-lactantes también tienen parches desnudos alrededor del pezón, pero la leche no se puede extraer (Racey, 1988).

Los individuos juveniles pueden distinguirse de los adultos por la presencia de placas epifisarias cartilaginosas en los huesos de los dedos (Anthony, 1988). Estos hacen que las articulaciones de los dedos en los juveniles aparezcan cónicas y menos nudosas que en los adultos, para la revisión puede utilizar una linterna que ayude a iluminar el cuarto dedo del dactilopatagio.

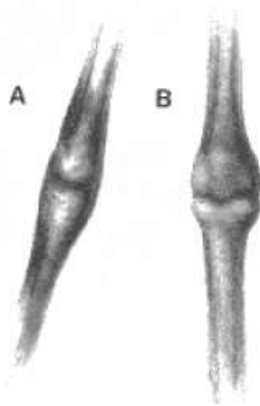


Fig. 4 Articulación del dedo. A) Placas juveniles (cónicas y epifisarias) y B) Adultos (opacos) (De Nagorsen y Brigham, 1993).

4.5.5 Medidas útiles:

Entre las medidas útiles a tomar se encuentran la longitud del antebrazo, esta medida es la principal a tomar ya que permitirá la identificación de la especie, seguido de la longitud de tibia y oreja (importante para algunas especies).

Todas las medidas deben ser tomadas teniendo el cuidado de no lastimar al animal durante el proceso.

4.6 Liberación

Una vez realizado el proceso de toma de datos y muestra, puede liberar al murciélago, para ello sujete al murciélago con una mano y coloque la otra mano como una base y retire la mano de sujeción, el murciélago volará.

En caso el murciélago no vuele inmediatamente, probablemente por estrés, puede percharlo en una rama hasta su recuperación, luego volará y se alejará del lugar.

Nota: Las bolsas de tela utilizadas deben ser lavadas con frecuencia utilizando agua, detergente y/o cloro, de esta forma evitar posible contaminación entre murciélagos y personal de campo.

5. Control de Calidad/Garantía de Calidad

Para la obtención de resultados válidos y de calidad se debe tener una serie de cuidados que minimicen errores en el proceso de colecta de muestras. Entre los controles de calidad más importantes tenemos:

1. Verificación de la lista de materiales antes de ir al campo, esta se encuentra al inicio de este manual, se recomienda llevar cantidades suficientes para la colecta (bolsas de tela, redes, sobres, etc) para poder aprovechar al máximo el campo.
2. Identificación o codificación de las muestras y datos colectados, asegurando que los códigos estén correctos (estos deben ser únicos), que los datos necesarios han sido tomados, para lo cual deberá seguir los formatos de toma de datos anexadas en el protocolo y verificados antes de liberar al animal.
3. Asegurarse que todos los miembros del equipo de campo, conozcan los procedimientos descritos en este protocolo, esto permitirá agilizar las actividades significando un menor tiempo de manipulación del murciélago y una efectiva toma de datos.

6. Bibliografía

- Aguirre, L. F. (2007). Aspectos generales de los murciélagos en Bolivia. En: Aguirre LF (ed.) Historia Natural, distribución y conservación de los murciélagos de Bolivia. Santa Cruz, Bolivia: Centro de Ecología y Difusión Simón I. Patiño.
- Bracamonte, J. C. (2018). Sampling protocol for the estimation of bat diversity with mist nets in ecological studies. *Ecologia Austral*, 28(2), 446–454. <https://doi.org/10.25260/EA.18.28.2.0.272>
- Carrasco-Rueda, F., Loiselle, B. A., & Frederick, P. C. (2020). Mercury bioaccumulation in tropical bats from a region of active artisanal and small-scale gold mining. *Ecotoxicology*. <https://doi.org/10.1007/s10646-020-02195-3>
- Eymann, J., Monje, J. C., Samyn, Y., & Vandenspiegel, D. (2010). Volume 8 - Manual on Field Recording Techniques and Protocols for All Taxa Biodiversity Inventories. *Techniques*, 8, 13–18.
- Mina, R., Alves, J., Alves da Silva, A., Natal-da-Luz, T., Cabral, J. A., Barros, P., Topping, C. J., & Sousa, J. P. (2019). Wing membrane and fur samples as reliable biological matrices to measure bioaccumulation of metals and metalloids in bats. *Environmental Pollution*, 253, 199–206. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2019.06.123>
- MINAM. (2015). Guía de inventario de la fauna silvestre. *Minam*, 83. <http://www.minam.gob.pe/patrimonio-natural/wp-content/uploads/sites/6/2013/10/GUÍA-A-DE-FAUNA-SILVESTRE.compressed.pdf>
- NPS Institutional Animal Care & Use Committee. (2016). *Standard Operating Procedure for the Study of Bats in the Field*. 1–36.
- Ralph, C. J., Geupel, G. R., Pyle, P., Martin, T. E., De sante, D. F., Milá, B., John, C., Geoffrey, R., Thomas, E., & David, F. (1996). Manual de métodos de campo para el monitoreo de aves terrestres. Gen. Tech. Rep. PSW-GTR159. Albany,CA. *Forest Service*, 46.
- Syaripuddin, K., Kumar, A., Sing, K. W., Halim, M. R. A., Nursyereen, M. N., & Wilson, J. J. (2014). Mercury accumulation in bats near hydroelectric reservoirs in Peninsular Malaysia. *Ecotoxicology*, 23(7), 1164–1171. <https://doi.org/10.1007/s10646-014-1258-y>
- Voss, R. S., & Emmons, L. H. (1996). Mammalian diversity in neotropical lowland rainforests: A preliminary assessment. *Bulletin of the American Museum of Natural History*, 230, 1–86.

