



## MATERIAL ANALIZADO

En la tabla 2 se ofrece una relación pormenorizada de los ejemplares de murciélagos utilizados en los análisis de contenidos de biocidas organoclorados. La información adicional sobre la estación del año de captura, en el caso de *Pipistrellus pipistrellus*, se encuentra en las tablas 5 a 8.

**TABLA 2.** Relación del material utilizado en los análisis de biocidas organoclorados. m=machos; h=hembras; j=joven; ad=adultos.

## MÉTODOS

Los murciélagos fueron capturados con los métodos tradicionales, en refugios y con redes japonesas. Después de sacrificarlos fracturándoles el cuello, fueron etiquetados, sexados, pesados con dinamómetros de 0'2 o 0'5 g de precisión, tomada la medida del antebrazo y datada la edad en base a el grado de fusión de las epífisis los metacarpos y falanges. Además les fueron extraídos los caninos superiores e inferiores, conservándolos en formalina tamponada al 10%, para estimar la edad por el número de anillos de dentina y cemento en cortes transversales. Los cuerpos fueron conservados congelados hasta el momento de su análisis.

En los primeros cortes de dientes realizados para estimar la edad con precisión, encontramos grandes dificultades para diferenciar y contar el número de anillos. Esta circunstancia unida a la dudosa validez del método, puesto de manifiesto para murciélagos por Phillips et al. (1982), hizo que se eligiera como método para estimar la edad, el grado de fusión de los metacarpos y falanges y el desgaste dentario. Estas técnicas ya han sido utilizados por otros autores para diferenciar clases de edad en estudios de contenidos de compuestos de este tipo en quirópteros (Clark y Prouty, 1977).

Al iniciar el estudio de los compuestos organoclorados existentes en la muestra, se procede a la disección del ejemplar, eliminando la cabeza y las extremidades superiores e inferiores; el resto, que la bibliografía al respecto denomina "carcasalo, se toma en su totalidad en las especies de tamaño menor, caso de *Pipistrellus Pipistrellus*, y la mitad, aproximadamente, en aquellas especies de tamaño mayor, como son *Miniopterus schreibersi* y *Rhinolophus ferrumequinum*.

En cualquiera de los casos, la muestra seleccionada, una vez pesada se homogeneiza con arena de cuarzo calcinada y lavada al ácido y se desaca con sulfato sódico anhidro antes de proceder a su extracción, proceso que se efectúa en una aparato Soxhlet, utilizando hexano como extractor, durante un período de 12 horas. El extracto obtenido, parcialmente evaporado, se somete a continuación a un proceso de purificación a fin de obtener un extracto carente de impurezas y que sólo contenga los compuestos organoclorados a determinar; el proceso de purificación se lleva a cabo, en primer lugar, mediante el reparto del extracto entre disolventes inmiscibles, concretamente entre hexano y acetonitrilo y, en segundo lugar, mediante cromatografía de adsorción sobre Florisil, utilizando hexano y éter etílico como eluyentes (Hernández et al., 1988, parcialmente modificado, ya que en este estudio sí se investiga la existencia de mirex y metoxicloro). Una alícuota del extracto purificado y conteniendo sólo los compuestos organoclorados a determinar es inyectada en un cromatógrafo gas-líquido Hewlett Packard, modelo 5890, provisto de detector de captura electrónica y columna semicapilar de 30 m impregnada con BP-5. Las condiciones cromatográficas fueron: temperatura del horno, 250°C; del inyector, 300°C; y del detector, 28°C. Las señales cromatográficas correspondientes a los compuestos estudiados se identifican mediante los tiempos de retención facilitados por el integrador, con un margen de tolerancia de  $\pm 0,05$  m. Las áreas de las señales son calculadas mediante las cuentas dadas por el mismo integrador, despreciando las señales inferiores a 500 cuentas. Los PCBs son identificados, mediante comparación del perfil cromatográfico de las muestras con el de un patrón de Aroclor 1260. El límite de detección de los compuestos estudiados se fija en 0,001 ppm ( $\mu$  g/g) y la recuperabilidad del proceso analítico oscila entre el 85% y el 105%, según el compuesto de que se trate; los resultados que se reflejan en las tablas no están corregidos según estas recuperabilidades. En las tablas todos los niveles de expresan en ppm ( $\mu$  g/g), referidos a peso fresco, excepto cuando puntualmente se especifique otro criterio. Para las muestras en que algún compuesto no sea detectado y, exclusivamente con fines estadísticos, se asigna un valor que es la mitad del valor límite de detección en los cálculos de medias geométricas. En las tablas la denominación N.D., corresponde a compuestos cuya existencia se ha investigado, pero que no han sido detectados.

Inicialmente se contempló el analizar el contenido de 12 biocidas organofosforados, pero en los primeros análisis hubo que incrementar este número con dos más,  $\beta$ -HCH y  $\delta$ -HC, ya que aparecieron de forma sistemática. De este modo se ha investigado la presencia de los siguientes 14 plaguicidas (o metabolitos):  $\alpha$ -HCH,  $\beta$ -HCH,  $\gamma$ -HCH,  $\delta$ -HCH, aldrín, dieldrín, heptacloro, heptacloro epóxido, mirex, metoxicloro, diclorobenzofenona (DBF), p, p'-DDE, p, p'-TDE y p, p'-DDT. A estos hay que añadir los compuestos bifenilos policlorados (PCBs) de origen industrial y con composición y efectos similares a los anteriores.

En algunas ocasiones los resultados se ofrecen agrupando los compuestos atendiendo a la afinidad de su estructura química, así bajo la denominación  $\Sigma$  HCH se reúnen los niveles de  $\alpha$ -HCH,  $\beta$ -HCH,  $\gamma$ -HCH y  $\delta$ -HCH; bajo el epígrafe  $\Sigma$  CD se agrupan las cantidades detectadas de dieldrín y heptacloro epóxido; y bajo el rubro de  $\Sigma$  DDT se compendian los niveles de DBF, DDE, TDE y DDT.

## RESULTADOS

### General

De los 15 compuestos organoclorados analizados, dos de ellos, mirex y metoxicloro no han sido detectados en muestra alguna. Otros dos, aldrín y heptacloro, aparecieron en una frecuencia muy escasa y con niveles exiguos, por lo que no han sido utilizados en análisis posteriores.

En las tablas 3 a 8 se recogen los resultados pormenorizados, obtenidos en la determinación de los 10 insecticidas organoclorados mejor representados y de los PCBs. Como se puede apreciar la frecuencia de aparición y los niveles son muy variables de unos a otros. Así, p, p'-DDE y PCBs han sido detectados en los 120 ejemplares analizados (100% de los casos), con un intervalo de 0,002 a 35,368 ppm para DDE y 0,067 a 7,264 ppm para los PCBs; heptacloro epóxido en 117 (97,5%, intervalo 0,001-1,944 ppm);  $\delta$ -HCH en 116 (96,6%, 0,006-0,303 ppm);  $\beta$ -HCH en 100 (83,3%, 0,001-2,859 ppm); dieldrín en 92 (76,7%, 0,001-0,220 ppm);  $\gamma$ -HCH en 87 (72,5%, 0,001-0,035 ppm);  $\alpha$ -HCH en 82 (68,3%, 0,001-0,104 ppm); DBF en 73 (60,8%, 0,001-0,220 ppm); p, p'-TDE en 56 (46,7%, 0,001-0,202 ppm); p, p'-DDT en 37 (30,8%, 0,001-0,580 ppm); aldrín en 7 (5,8%, 0,001-0,019 ppm); heptacloro en 1 (0,8%, 0,001 ppm).

En la tabla 9 se agrupan la totalidad de los resultados obtenidos y recogidos en las tablas 3 a 8, según las afinidades estructurales. Esta agregación se hace para cada especie, en cada localidad y, en el caso de *Pipistrellus*, además, para cada estación en que fueron recogidos, y, en el caso de los muestreados en verano, se establece la distinción de si son ejemplares adultos o jóvenes. Todos los resultados se refieren a medias geométricas.

### TABLA 3

### TABLA 4

### TABLA 5

### TABLA 6

### TABLA 7

### TABLA 8

**TABLA 9**.- Medias geométricas, expresadas en  $\mu$  g/g (ppm), de insecticidas organoclorados (agrupados según la afinidad de su estructura química) y de bifenilos policlorados, detectados en murciélagos muestreados en cuatro puntos de nuestra geografía.

### Variación Específica

Las medias geométricas de los diferentes grupos de insecticidas y PCBs correspondientes a todos los ejemplares de cada especie de murciélago sin tener en cuenta la procedencia son las siguientes:

$\Sigma$  HCH  $\Sigma$  CD  $\Sigma$  DDT PCBs

*Miniopterus schreibersi* (N=21) 0,10 0,20 3,33 0,63

*Rhinolophus ferrumequinum* (N=19) 0,07 0,05 0,06 0,32

*Pipistrellus pipistrellus* (N=81) 0,07 0,01 0,38 0,65

Como se puede constatar existe una preponderancia clara de los niveles de biocidas organoclorados detectados en *Miniopterus schreibersi* respecto a las otras dos especies, dado que en los tres grupos de insecticidas que se comparan, dichos niveles son superiores. En lo que atañe al cotejo entre las cantidades existentes en *Rhinolophus* y *Pipistrellus*, no existe un predominio claro de una especie sobre otra, dado que, si bien los niveles de EHCH y ECD son superiores en *Rhinolophus*, los de EDDT lo son en *Pipistrellus*. En lo que concierne a la dinámica de acumulación de los PCBS, se comprueba una similitud de niveles entre *Miniopterus* y *Pipistrellus*, mientras que los mismos son sensiblemente menores en el caso de *Rhinolophus*.

Para tratar de evaluar la significación de estas diferencias se ha realizado un análisis de varianza para el total de los ejemplares clasificados por especies. Los resultados se ofrecen en la tabla 10. Existen diferencias intraespecíficas significativas en 6 compuestos. En tres casos (dieldrín, DBF y DDE) *Miniopterus* tiene valores claramente superiores y diferentes del resto. En los otros tres (heptacloro epóxido, TDE y DDT) es también esta especie la que alcanza valores más altos, con el primero de ellos no se diferencia de *Rhinolophus* pero sí de *Pipistrellus* y en los otros dos, las tres especies forman un grupo homogéneo.

### Variación específica por localidades.

Se han realizado análisis de varianza para cada una de las localidades consideradas para ver si existe un patrón general de niveles en las distintas especies.

- Sierra de Cameros (La Rioja). Hay diferencias significativas en 5 biocidas (tabla 11). En dos casos (dieldrín y DDE) los valores mayores corresponden a *Miniopterus* de forma diferenciada. En uno a *Rhinolophus* ( $\alpha$ -HCH), aunque con niveles pequeños. En los otros dos respectivamente a *Rhinolophus* (heptacloro epóxido) y *Miniopterus* (TDE), pero sólo se diferencian con *Pipistrellus* y no entre ellos.

- Sierras de Cádiz y Málaga. Hay diferencias significativas en 10 compuestos organoclorados (tabla 12). *Miniopterus* es la especie con mayores niveles generales. En 7 casos es claramente mayor que el resto ( $\beta$ -HCH, heptacloro epóxido, dieldrín, DBF, DDE, TDE y DDT), destacando la concentración de DDE. En -HCH se puede diferenciar de *Pipistrellus* pero no de *Rhinolophus*. Con el  $\delta$ -HCH ocurre lo contrario, se diferencia de *Rhinolophus* pero no de *Pipistrellus*. Por último,  $\alpha$ -HCH, forma un sólo grupo homogéneo.

- Mollina (Málaga). En esta localidad sólo hay diferencias significativas en tres biocidas (tabla 13). De nuevo *Miniopterus* destaca claramente del resto en dieldrín y DBF y sólo de *Pipistrellus* en heptacloro epóxido.

**Tabla 10.** Análisis de varianza del contenido de organoclorados en las distintas especies para el conjunto de localidades. Arriba media aritmética, abajo intervalos de confianza del 95%, g.d.l. 119. Los grupos homogéneos resultantes de un análisis de rangos múltiples de intervalos de confianza están identificados por las líneas horizontales.

- Aranjuez (Madrid). Aparecen diferencias significativas en 7 productos (tabla 14). *Miniopterus* contiene más heptacloro epóxido, DBF, TDE y DDT que *Pipistrellus* aunque no de forma diferenciable con *Rhinolophus*. Esta última especie tiene más  $\alpha$ -HCH que *Pipistrellus* aunque en este caso no se diferencia de *Miniopterus*. *Pipistrellus* tiene los niveles más altos y distintos en PCBs. Por último el dieldrín forma un grupo homogéneo entre las tres especies.

Estos resultados por localidades confirman, de forma generalizada, los mayores niveles de contaminación de *Miniopterus* y ponen de manifiesto algunas peculiaridades específicas locales.

**Tabla 11.** Análisis de varianza del contenido de organoclorados de las distintas especies en la Sierra de Cameros (La Rioja). Arriba media aritmética, abajo intervalos de confianza del 95%, g.d.l. 29. Los grupos homogéneos resultantes de un análisis de rangos múltiples de intervalos de confianza están identificados por las líneas horizontales.

**Tabla 12.** Análisis de varianza del contenido de organoclorados en la Sierra de Cádiz-Málaga para las distintas especies. Arriba media aritmética, abajo intervalos de confianza del 95%, g.d.l. 29. Los grupos homogéneos resultantes de un análisis de rangos múltiples de intervalos de confianza están identificados por las líneas horizontales.

**Tabla 13.** Análisis de varianza del contenido de organoclorados en Mollina (Málaga) para las distintas especies. Arriba media aritmética, abajo intervalos de confianza del 95%, g.d.l. 32. Los grupos homogéneos resultantes de un análisis de rangos múltiples de intervalos de confianza están identificados por las líneas horizontales.

**Tabla 14.** Análisis de varianza del contenido de organoclorados en Aranjuez (Madrid) para las distintas especies. Arriba media aritmética, abajo intervalos de confianza del 95%, g.d.l. 26. Los grupos homogéneos resultantes de un análisis de rangos múltiples de intervalos de confianza están identificados por las líneas horizontales.

### Variación Geográfica

En un primer análisis de varianza general entre las cuatro localidades para el conjunto de especies, existen diferencias significativas en seis de los 11 biocidas considerados (tabla 15). Para cuatro de estos ( $\alpha$ -HCH,  $\beta$ -HCH, DDE y TDE) es en Mollina (cultivos extensivos) donde se alcanzan los valores más altos y diferenciables del resto (excepto  $\alpha$ -HCH con Aranjuez y TDE con Cameros). Los dos restantes (dieldrín y PCBs) tienen concentraciones separables y mayores en Aranjuez (cultivos intensivos de huerta).

A nivel global hay una mayor incidencia de los biocidas organoclorados en las zonas agrícolas que forestales. No existen diferencias significativas entre las dos forestales. Entre las dos agrícolas consideradas aquí, en general, hay más contaminación en la de cultivo extensivo aunque con casos particulares.

### Variación geográfica por especies.

Son muy pocos los ejemplares de *Miniopterus* y *Rhinolophus* de cada localidad como para hacer una comparación estadística rigurosa. A pesar de ello al realizar sendos análisis de varianza, se aprecian algunas diferencias significativas que conviene reseñar.

- *Miniopterus schreibersi*. Sólo aparece una diferencia significativa y con  $p < 0,05$  en el caso del DDT (tabla 16). Los murciélagos de las Sierras de Cádiz y Málaga tienen la mayor concentración y los de la Sierra de Cameros la menor, las otras dos localidades son intermedias e indiferenciables de las primeras. Hay que resaltar que a pesar de la falta de significación (en parte debida a la pequeña muestra), en varios casos son los *Miniopterus* de las Sierras de Cádiz y Málaga los que tienen valores más elevados, contrastando con la tónica general de ser una localidad muy poco contaminada.

- *Rhinolophus ferrumequinum*. Hay diferencias significativas en dos biocidas y también con escasa probabilidad (tabla 17). El  $\beta$ -HCH la concentración es máxima en Mollina y sólo se diferencia de la de las Sierras de Cádiz y Málaga. Los PCBs tienen valores más altos en Aranjuez y Cameros y diferentes de las otras dos localidades.

- *Pipistrellus pipistrellus*. Con esta especie si hay material más abundante que permite hacer un análisis más fiable. Hay diferencias significativas en 8 de los 11 biocidas (tabla 18). En cuatro casos la concentración es claramente mayor en Mollina ( $\beta$ -HCH, heptacloro epóxido, DDE, y TDE). En otros dos (dieldrín y PCBs), la localidad con valores más altos es Aranjuez. En el caso del DBF la escasa significación no permite romper el grupo homogéneo formado por las cuatro localidades.

Estos resultados por especies son muy similares a los señalados inicialmente de forma general.

**Tabla 15.** Análisis de varianza del contenido de organoclorados por localidades para el conjunto de especies. Arriba media aritmética, abajo intervalos de confianza del 95%, g.d.l. 119. Significación \*,  $p < 0,05$ ; \*\*,  $p < 0,01$ ; \*\*\*,  $p < 0,001$ . Los grupos homogéneos resultantes de un análisis de rangos múltiples de intervalos de confianza están identificados por las líneas horizontales.

**Tabla 16.** Análisis de varianza del contenido de organoclorados en *Miniopterus schreibersi* para las distintas localidades. Arriba media aritmética, abajo intervalos de confianza del 95%, g.d.l. 19. Los grupos homogéneos resultantes de un análisis de rangos múltiples de intervalos de confianza están identificados por las líneas horizontales.

**Tabla 17.** Análisis de varianza del contenido de organoclorados en *Phinolophus ferrumequinum* para las distintas localidades. Arriba media aritmética, abajo intervalos de confianza del 95%, g.d.1. 18. Los grupos homogéneos resultantes de un análisis de rangos múltiples de intervalos de confianza están identificados por las líneas horizontales.

### Variación con la edad

Para establecer las diferencias en contenidos de biocidas debidas a la edad se han utilizado unicamente la información de *Pipistrellus*, ya que es la única especie de la que existe suficientes muestras. Las medias geométricas de los insecticidas organoclorados, agrupados según la afinidad de su estructura, y de los PCBs, detectados en esta especie, con independencia de su procedencia y separadas por edad, son las siguientes :

Σ HCH Σ CD Σ DDT PCBs

Adultos 0,05 0,02 0,36 0,60

Jóvenes 0,05 0,03 0,70 1,45

Como se puede comprobar es clara la existencia de una mayor intensidad del proceso de acumulación en los jóvenes que en los adultos en los distintos grupos considerados.

No existe suficiente material como para estudiar la diferencia de contenidos según la edad, al margen de otras posibles fuentes de variación. Sin embargo la tendencia general, puesta de manifiesto anteriormente, se mantiene cuando se considera una sola localidad y estación. Los ejemplares de verano de Mollina (Málaga), jóvenes y adultos, pertenecen todos a una misma colonia y se capturaron el mismo día. En las tablas 5, 6 y 9 se observa que los valores de los jóvenes (de aproximadamente un mes de edad) son claramente superiores a los de los adultos, a pesar de que el tamaño de la muestra y el rango de valores no dan significación estadística en la mayoría de los casos. Como ejemplo representativo, por ser el de niveles de contenido más elevado, y en el que sí hay significación ( $F=19,20$ ; 9 gdl;  $p=0,002$ ), está el del DDE. Los jóvenes tienen la media aritmética 10 veces mayor que los adultos (23,04 por 2,38) y 12 en el caso de la media geométrica.

### Variación Estacional

A continuación se expresan las medias geométricas de los insecticidas organoclorados, agrupados según la afinidad de su estructura, y de los PCBs, detectados en ejemplares adultos de *Pipistrellus* muestreados en tres estaciones del año diferentes, con independencia del lugar donde fueron recogidos.

Σ HCH Σ CD Σ DDT PCBs

PRIMAVERA 0,07 0,01 0,20 0,31

VERANO 0,05 0,02 0,36 0,60

OTOÑO 0,10 0,02 0,40 0,65

Como se puede constatar, existe un proceso de acumulación de los compuestos organoclorados a lo largo del año, de forma y manera que, al salir de la hibernación, en primavera, los niveles, en general, son los mínimos del año; dichos niveles se van incrementando con el discurrir de las estaciones, hasta que poco antes de entrar de nuevo en hibernación, en otoño, alcanzan los máximos anuales.

**Tabla 18.** Análisis de varianza del contenido de organoclorados en *Pipistrellus pipistrellus* para las distintas localidades. Arriba media aritmética, abajo intervalos de confianza del 95%, g.d.1. 80. Los grupos homogéneos resultantes de un análisis de rangos múltiples de intervalos de confianza están identificados por las líneas horizontales.

## DISCUSION

### General

Del escrutinio global de los valores individuales se deduce la existencia de un vasto proceso contaminante por compuestos organoclorados, que se manifiesta por el gran número de biocidas clorados encontrados en las carcasas de los murciélagos analizados. Este amplio espectro de contaminantes, importante desde un punto de vista cualitativo, no, se ve, afortunadamente, acompañado por la misma relevancia desde el punto de vista cuantitativo, ya que buena parte de los insecticidas han sido detectados en concentraciones no muy lejanas al límite de detección propuesto en el estudio. De esta afirmación es necesario exceptuar a los PCBs y al DDE que, además de estar presentes en el 100% de las muestras, lo hacen a niveles que son, con mucho, los más elevados del conjunto de compuestos cuantificados.

El vasto proceso contaminante mencionado anteriormente cabe situarlo, temporalmente, en momentos alejados de la actualidad. Dos razones abonan esta afirmación; la primera de ellas es la parvedad de niveles de los insecticidas utilizados fitosanitariamente como tales, caso del  $\gamma$ -HCH (lindano), aldrín, heptacloro y DDT; la segunda, es la mayor importancia cualitativa de los metabolitos que se forman a partir de los principios activos mencionados,  $\alpha$ -HCH,  $\beta$ -HCH,  $\delta$ -HCH (metabolitos o subproductos en la fabricación del  $\gamma$ -HCH), dieldrín y heptacloro epóxido (del aldrín y heptacloro, respectivamente) y DDE, TDE y DBF (del DDT).

Ambas razones apoyan la conclusión de que en años anteriores, que cabe situarlos en la década de los setenta y hasta los primeros años de los ochenta, hubo, al menos en alguna de las zonas estudiadas, un uso indiscriminado de insecticidas organoclorados que en la actualidad se puede considerar interrumpido. Parece, pues, deducirse una apropiada observación de las restricciones en el uso de estos insecticidas, dada la escasa significación de los niveles de los compuestos utilizados por sus cualidades biocidas, al mismo tiempo que se pone de manifiesto la elevada persistencia de este tipo de productos, toda vez que sus metabolitos o subproductos de fabricación, aún aparecen y, en algunos casos, en cantidades muy estimables, años después de que haya cesado su empleo.

### Variación Específica y Geográfica

Las diferencias encontradas en los procesos de acumulación de compuestos organoclorados según las distintas especies y localidades deberían poder justificarse con los razonamientos expuestos en el diseño del trabajo si las hipótesis allí consideradas fueran correctas.

La mayor capacidad de desplazamiento de *Miniopterus*, que le permite acceder a lugares lejanos a las localidades donde ha sido capturado, puede justificar los más altos niveles globales de contaminación en las zonas supuestamente sometidas a menos tratamientos fitosanitarios. No ocurre lo mismo con las localidades que han estado bajo el uso intensivo de estos productos, en donde estas diferencias con otras especies se mantiene, aunque con un nivel menor. Parte de explicación puede ser debida al tipo de comportamiento de búsqueda de alimento, que dado su gregarismo y su capacidad de vuelo, puede ser de localización de grandes y esporádicas concentraciones o parches de insectos, que son más frecuentes en lugares actualmente ocupados por cultivos.

En cuanto a la variación geográfica general se aprecian dos grupos bien definidos con diferentes niveles de contaminación, los forestales y los agrícolas. Dentro de cada uno de ellos resulta difícil hacer separaciones nítidas, aunque parece que entre las agrícolas hay mayor concentración en la de cultivos extensivos que en la de intensivos. Esto puede ser debido a que la supuesta mayor utilización de biocidas en esta última zona no compensa la extensa superficie próxima sin actividades agrícolas, y por lo tanto sin tratamientos. En cualquier caso las diferencias encontradas son menores que las esperadas a priori, y pueden justificarse de manera general por el período de tiempo transcurrido desde el cese del uso masivo, que ha jugado a favor de una homogeneización en la distribución espacial dada la propensión de estos compuestos a ocupar zonas enormemente alejadas de su punto de aplicación.

En cuanto a casos concretos merece la pena resaltar un buen número de ellos cuya discusión es interesante y que pueden ayudar a mejorar el diseño de trabajos posteriores.

En los *Miniopterus* de las Sierras de Cádiz y Málaga existen unos niveles de organoclorados que aún tratándose de esta especie son anormalmente altos, sobre todo teniendo en cuenta que esta es en muchos aspectos la localidad más 'limpia'. En muchos compuestos los valores máximos, para esta especie, se dan en esta localidad, aunque sólo uno es significativo. Como una posible explicación habría que tener en cuenta la posibilidad de la existencia de desplazamientos de *Miniopterus*, a través de Gibraltar, a Marruecos, donde se han utilizado estos biocidas hasta épocas más recientes. En cualquier caso no hay ninguna información que corrobore este desplazamiento que habría que demostrar. Con objeto de aportar alguna idea de la capacidad de desplazamiento de esta especie en la zona, habría que señalar el reciente control dentro del área de estudio de dos individuos anillados en el sur de Portugal.

Respecto a *Rhinolophus* y *Pipistrellus*, existe una gran homogeneidad entre ellos. Las escasas veces en que hay diferencias significativas suelen indicar mayores niveles en *Rhinolophus*, tanto de forma global como por localidades. Estas diferencias podrían justificarse por la distinta longevidad de las especies. Aunque no hay información de vida media, teniendo en cuenta la edad máxima conocida, *Pipistrellus* llega a vivir 16,5 años mientras que *Rhinolophus* puede alcanzar los 29 (Schober y Grimmer, 1989). Según esto, y teniendo en cuenta que ya ha transcurrido al menos una década desde la caída en desuso de estos insecticidas, es lógico pensar que haya habido una renovación mayor de las poblaciones de *Pipistrellus* y por lo tanto una mayor pérdida de la acumulación de organoclorados.

Otro caso curioso es el de los *Rhinolophus* de Cameros. Mientras que en las otras dos especies los valores encontrados para la generalidad de organoclorados son de los menores, en *Rhinolophus* son relativamente altos. En esta Sierra no se conoce actualmente ninguna colonia de cría, estas se encuentran ubicadas en la parte baja, próximas al valle del Ebro. De acuerdo con estas circunstancias los individuos generalmente aislados que viven en esta localidad deben proceder de zonas en las que existen importantes zonas de cultivos y la contaminación que tienen la han podido traer de sus lugares de origen.

Para finalizar este apartado hay que destacar las especiales características de los PCBs. Todavía existe un aporte importante al medio y son emitidos desde áreas industriales. Como era de esperar los valores máximos, y de forma significativa, se encuentran en Aranjuez, sin duda por su proximidad geográfica al área industrial y urbana de Madrid. Son los únicos compuestos que alcanzan, a nivel global, los mayores valores en *Pipistrellus* siendo significativos en Aranjuez. Con toda seguridad esto es debido a sus hábitos en cuanto a selección de refugios que incluyen de forma muy importante las construcciones humanas, lo que le da un carácter de comensal del hombre.

### **Variación con la Edad**

Como ya se ha puesto de manifiesto en la introducción, es sobradamente conocida la transferencia de compuestos organoclorados de la madre a las crías en mamíferos por vía placentaria y a través de la lactancia. Disser y Nagel (1989) estiman que, en el caso de *Pipistrellus pipistrellus*, el 91% del contenido de PCBs en las crías es transferido por las madres mediante los mecanismos reseñados. Nagel y Disser (1987) estiman que este desplazamiento es más intenso en los PCBs que en el DDT y sus metabolitos. Clark et al. (1978) corroboran la existencia del proceso en *Myotis lucifugus*.

Esta circunstancia supone que las hembras se descontaminan en cada ciclo reproductivo. En condiciones de altas concentraciones en el medio de biocidas organoclorados, es una ventaja de gran importancia porque evita, o al menos retrasa, que la acumulación pueda llegar a ser letal. Por el contrario los machos no tienen esta posibilidad por lo que están más expuestos, al menos teóricamente, a sufrir los efectos de estos productos. De hecho en Suecia se ha encontrado una mayor concentración de PCBs en machos y también una menor esperanza de vida aunque no se ha podido establecer una relación causa-efecto cierta (Gerell y Lundberg, 1989). En el presente estudio el número de ejemplares es insuficiente como para poner de manifiesto la existencia de variaciones debidas al sexo.

### **Variación Estacional**

Los resultados obtenidos, que indican el mínimo de incidencia en primavera y el máximo en otoño, se oponen frontalmente a los encontrados por Clark y Prouty (1976) en diferentes especies de murciélagos americanos. La dinámica de diferentes insecticidas en murciélagos a lo largo del año encontrada por estos autores se basa en la variación estacional del volumen de los depósitos de grasa. Al salir de la hibernación en primavera las reservas de grasa son mínimas al igual que la masa del murciélago. En este período no han podido eliminar residuos por lo que la concentración se vuelve máxima. Las diferencias encontradas en el presente caso puede ser debida a diferencias en las estrategias de hibernación. En gran parte de España la duración de la inactividad invernal es muy reducida y discontinua, y por lo tanto la acumulación de reservas grasas y las variaciones de masa deben ser menores. En cualquier caso la información disponible es insuficiente como para explicar las diferencias encontradas.

### **Implicaciones Toxicológicas de los Compuestos Organoclorados**

La evaluación toxicológica de los residuos de compuestos organoclorados presentes en animales de vida libre se hace, generalmente, mediante comparación con los niveles encontrados en diferentes órganos y tejidos de animales envenenados experimentalmente. Esta valoración se ve dificultada por la carencia de estudios existentes respecto a los niveles de buena parte de insecticidas organoclorados que se pueden revelar letales para mamíferos, en general, y quirópteros, en particular. Afortunadamente, existen suficientes investigaciones acerca de las implicaciones

toxicológicas sobre los quirópteros de dieldrín, DDE, DDT y PCBs, compuestos éstos que son los que con mayor frecuencia y en mayores cantidades aparecen en las muestras biáticas, en general, y en murciélagos, en particular.

La mayor parte de los estudios toxicológicos en quirópteros se han llevado a cabo evaluando los niveles de insecticidas existentes en cerebro, pero hoy existe otra buena parte que lo hace valorando los niveles que se detectan en carcasa, refiriendo dichos niveles tanto al contenido graso de la misma como a su peso húmedo. En este último tipo de muestra se apoya la comparación que se efectúa a continuación en orden a discernir la posible influencia de los insecticidas analizados en la población de quirópteros españoles. En la tabla 19 se recogen los niveles en carcasa de diferentes compuestos organoclorados que distintos autores consideran letales para diversas especies de quirópteros.

Como se puede comprobar, ninguno de los valores individuales que se recogen en las tablas 3 a 8 se aproxima, ni aún ligeramente, a los niveles letales que quedan recogidos en la tabla 19 (para efectuar la valoración en el caso del DDE y los PCBs es preciso tomar los niveles descritos en las dos últimas columnas de dichas tablas que recogen los valores de dichos compuestos organoclorados referidos a peso graso). Por ello se puede afirmar que en las poblaciones de quirópteros que han sido examinadas en este estudio no es de esperar que se den mortalidades achacables a estos compuestos. Esta afirmación se hace aún teniendo en cuenta que tan sólo una especie *Pipistrellus pipistrellus*, puede ser objeto de evaluación fehaciente.

Tampoco se desconoce el hecho de que existen diferencias entre las especies de quirópteros en lo que concierne a su sensibilidad frente a los compuestos organoclorados; así Clark y Stafford (1981) estiman que *Tadarida brasiliensis* es un 16-18% más sensible al DDE que *Myotis lucifugus*. Asimismo, se sabe que la sensibilidad de los murciélagos jóvenes es mayor que la de los adultos (Clark et al., 1978). Esta aseveración se hace considerando niveles individuales de un determinado insecticida, pero no hay que desdeñar los fenómenos de potenciación y sinergismo que se puedan dar entre diferentes contaminantes, ninguno de los cuales se acerca a los niveles tenidos como letales.

**Tabla .19.** Nivel letal mínimo de diferentes compuestos organoclorados en carcasa de cuatro especies de quirópteros

<sup>a</sup> : Referido a peso graso. <sup>b</sup>: Referido a peso fresco. <sup>c</sup>: Suma de DDE y DDT. 1: Clark y Kroll (1977). 2: Clark y Stafford (1981). 3: Jefferies (1972). 4: Clark et al. (1978). 5: Clark (1981).

Así, pues, y, en resumen, los niveles de cada insecticida que se ha detectado no suponen riesgo cierto para las poblaciones de quirópteros españoles, pero la existencia de una amplia panoplia de insecticidas en cantidades inferiores a las letales es posible que estén incidiendo de forma solapada sobre la estabilidad de las poblaciones de murciélagos.

El tratar de evaluar el impacto que los biocidas han tenido en los momentos en los que los productos organoclorados fueron usados con mayor profusión es imposible. Sin duda, y a tenor de lo poco conocido para otros países, la incidencia ha debido ser de gran importancia.

### Comparación con Niveles Existentes en otros Países

Fundamentalmente, durante la década de los setenta y, en menor medida, durante la de los ochenta, se han llevado a cabo estudios en distintos países tendentes a determinar los niveles de insecticidas organoclorados y PCBs en diferentes especies de murciélagos en orden a valorar su grado de contaminación por estos compuestos a fin de determinar su implicación en el descenso de las poblaciones de quirópteros y/o en la mortalidad de los mismos.

Con objeto de evaluar los niveles aportados en este estudio, en la tabla 20 se comparan estos valores con los facilitados por diferentes autores. Haciendo abstracción de la heterogeneidad de las especies, dado que ninguna de las entresacadas de la bibliografía coincide con las que aquí se han investigado, del cotejo se desprende que los niveles en otros países, siendo del mismo orden de magnitud, generalmente, se revelan superiores a los detectados en las tres analizadas. Tan sólo el DDE existente en nuestros ejemplares de *Miniopterus schreibersi* (3,15 ppm) es superior al detectado en *Eptesicus fuscus* por Clark y Lamont (1976) (0,45-1,85 ppm), a los encontrados en *Lasiurus noctivagans* (0,61-2,18 ppm), *Eptesicus fuscus* (0,40-1,63 ppm) y *Myotis evotis* (0,14-0,16 ppm) por Henny et al. (1982), a los presentes en *Macrotus waterhousii* (1,80 ppm) y *Pipistrellus hesperus* (1,40 ppm) aportados por Reidinger (1976), a los detectados en *Scotophilus heathi* (0,114 ppm) y en *Hipposideros larvatus* (0,05-0,30 ppm) por Kruthanut (1986) y a los presentes en *Myotis myotis* (1,80 ppm), *Nyctalus noctula* (0,57 ppm)

y *Eptesicus nilssoni* (0,45 ppm) aportados por Braun (1986).

**TABLA 20.** Comparación entre los niveles de DDE, TDE, DDT, dieldrín y PCBs detectados en este estudio con los aportados por la bibliografía en distintas especies de murciélagos procedentes de diferentes países. Todos los niveles están expresados en ppm referidos a peso fresco.

Esta aparente buena situación de los quirópteros españoles respecto a los de otros países se ve adulterada por la disparidad existente entre las fechas en que están datados los resultados que se comparan, ya que buena parte de ellos corresponden a la década de los setenta, en la que las prohibiciones al uso de insecticidas organoclorados o bien no existían o eran muy recientes.

### Los Murciélagos como Bioindicadores

Después de caracterizar la situación actual de los niveles de contaminación de los murciélagos, queda por analizar si estos son unos animales apropiados para ser utilizados como bioindicadores del grado de contaminación del medio con biocidas organoclorados.

En principio y dada la capacidad de acumular compuestos de este tipo, parece que sí sería correcto el uso de los murciélagos con estos fines. La gran diversidad de organoclorados encontrados en las carcasas, así como la alta frecuencia en que aparecen, así lo confirman.

De los resultados y discusión expuestos anteriormente habría que extraer una serie de conclusiones que permitirían normalizar la toma de datos evitando posibles fuentes de variación que pueden enmascarar la situación real.

#### - Selección de especie.

Como ha quedado patente, los resultados varían con la capacidad de desplazamiento de la especie de murciélago considerada. Las especies muy móviles (en este caso *Miniopterus schreibersi*) dan una idea de los niveles de contaminación de manera muy general, sin que los resultados tengan que ser representativos de la zona concreta en que han sido tomadas las muestras. Parece que si el interés es acotar espacialmente los niveles de contaminación, es mejor elegir una especie con menos capacidad de desplazamiento. De las dos utilizadas aquí, *Pipistrellus pinistrellus*, tiene algunas ventajas que la convierten en la especie más adecuada para este tipo de estudios. Es mucho más abundante, por lo que la extracción de ejemplares de las poblaciones supone un impacto mucho menor que en *Rhinolophus ferrumequinum*, que es de las especies que, al menos en Europa, están sufriendo una regresión más profunda. Además existen colonias de cría en todo tipo de hábitats dentro de su extensa área de distribución, lo cual permite evitar posibles irregularidades como las detectadas en *Rhinolophus* en la Sierra de Cameros.

#### - Selección de la época del año y de la edad y sexo de los ejemplares.

Dadas las diferencias detectadas estacionalmente y con la edad, así como las señaladas en la bibliografía para el sexo, es conveniente que las muestras sean uniformes en todos los aspectos para evitar fuentes de variación ajenas a la que se quiere estimar, que es la espacial.

En principio da igual el modo en que se fijen estas variables. Podría recomendarse el recoger jóvenes de unos dos meses de edad. De esta manera se evita el factor estacional y de edad. El primero puede ser difícil de eliminar en otras circunstancias al existir posibles variaciones geográficas de los ciclos biológicos. Respecto al segundo, esta es la única manera de asegurar la edad con gran precisión de una forma tan simple como es ver el grado de fusión de las epífisis de los metacarpos y falanges, carácter fácil de apreciar con un poco de experiencia. Habría que realizar las capturas al terminar la lactancia para que la transferencia de biocidas maternos sea completa y antes de que sean indiferenciables de los adultos. La variación debida al sexo no debe existir a estas edades, ya que la única fuente de captación de contaminantes es la transferencia materna. Hay otras dos ventajas adicionales, por una parte los datos aportados en este estudio sobre jóvenes serían válidos y por otro las capturas cuando todavía están en la colonia de cría facilitarían el trabajo de toma de muestras.

#### -Selección de puntos de muestreo.

Como ha quedado patente, existen diferencias en las concentraciones de los insecticidas en función del tipo de uso o aprovechamiento agrícola-forestal de la zona, lo mismo ocurre con los PCBs, aunque en este caso relacionado con los niveles industrial y urbano del entorno. Sin embargo estas diferencias, sobre todo en el caso de los insecticidas,

son menos patentes que lo esperado, posiblemente debido a la homogeneización tras la caída en desuso de estos productos. Es conveniente seleccionar localidades enclavadas en grandes áreas homogéneas, o al menos sin cambios bruscos en el tipo de aprovechamiento, como al parecer ha ocurrido en este estudio en el caso de Aranjuez, en donde la posible alta concentración de biocidas por el tipo de cultivo intensivo puede haber quedado enmascarada por la existencia de extensos eriales en los alrededores.

### **-Periodicidad.**

No se dispone de información sobre la duración idónea del intervalo entre muestreos. En el caso de biocidas interesa constatar la progresiva disminución de la presencia y concentración a lo largo del tiempo, mientras que en los PCBs, al continuar la aportación al medio, se trata de controlar la evolución de los niveles. En cualquier caso parece razonable, al menos hasta que se detecte la magnitud de las tendencias, no dejar pasar más de cinco años sin repetir la experiencia actual, mejorada y concretada en los aspectos mencionados en este apartado.

## **RECOMENDACIONES**

- Biocidas organoclorados en aplicaciones fitosanitarias de carácter extensivo. Los resultados obtenidos sugieren que actualmente se está en un proceso generalizado de disminución de los niveles de contaminación por estos compuestos, debido a que ha transcurrido una década desde el abandono de su utilización masiva.

Los niveles encontrados están alejados de los considerados letales, por lo que los efectos, en la actualidad, sobre las poblaciones de murciélagos ibéricos no deben ser de notable importancia, a no ser que existan procesos de sinergismo que de momento se desconocen. Resulta imposible evaluar la incidencia que los biocidas organoclorados han tenido en épocas pasadas cuando su uso alcanzó el nivel máximo. Por la escasa bibliografía al respecto, es de suponer que el impacto fue de gran importancia. Para corroborar la tendencia a la disminución sería recomendable el hacer un seguimiento normalizado como el propuesto en el apartado anterior.

- PCBs de uso industrial. Hay todavía un aporte importante de estos productos al medio, por lo que sus efectos deben mantenerse dentro de los márgenes máximos que han podido darse desde el inicio de su utilización. Los objetivos iniciales estaban más orientados a estudiar la variación en medios naturales por lo tanto en la elección de las localidades no se tuvo muy en cuenta los factores de contaminación industrial. Es posible que en áreas fuertemente industrializadas, los niveles de concentración de PCBs sean lo suficientemente altos como para incidir en los procesos biológicos de los murciélagos, hecho ya constatado en otros mamíferos.

Sería recomendable estudiar con más detalle los efectos de estos productos organoclorados sobre los murciélagos, así como establecer la tendencia existente en la variación temporal de las concentraciones actuales.

- Aplicaciones concretas de biocidas organoclorados en refugios de murciélagos. Este aspecto no entra dentro de los objetivos del estudio, pero en la actualidad sus efectos pueden tener trascendencia aunque sólo sean actuaciones puntuales. En otros países como Gran Bretaña u Holanda se ha demostrado que los tratamientos realizados en edificios, para proteger las estructuras de madera contra insectos perforadores xilófagos, han sido la causa involuntaria de la desaparición de un importante número de colonias que incluyen especies muy seriamente amenazadas. En la introducción se ha ofrecido una información más detallada de esta problemática, así como algunas posibles soluciones como son la sustitución de los productos organoclorados por piretroides.

En cualquier caso sería muy recomendable el hacer una evaluación del impacto de este tipo de tratamientos en España.