



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS**



CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN BIODIVERSIDAD Y CONSERVACIÓN

**EFFECTO DEL RUIDO ANTROPOGÉNICO EN LOS PULSOS DE ECOLOCACIÓN Y
EVALUACIÓN DE CONCENTRACIONES DE CORTISOL EN MURCIÉLAGOS
INSECTÍVOROS**

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRO EN BIOLOGÍA INTEGRATIVA DE LA BIODIVERSIDAD Y LA
CONSERVACIÓN**

PRESENTA

BIÓL. ANA CRISTEL LARA NUÑEZ

DIRECTOR

DR. JOSÉ ANTONIO GUERRERO ENRÍQUEZ

CUERNAVACA, MORELOS

JUNIO, 2018



¿Crees que la obscuridad es tu aliada? Pero tú solamente la adoptaste. Yo nací en ella. Dejé que me moldeara. Yo no vi la luz hasta que ya era un hombre y entonces ¡para mí no fue más que ceguera!

Las sombras te traicionan porque me pertenecen.

TDKR, 2012

AGRADECIMIENTOS

A CONACYT por la beca otorgada (número 740769) para la realización de este proyecto.

A mi papá por su apoyo económico, a mi mamá por su entusiasmo y alegría puestos en cada salida a campo. A mi hermano por su colaboración en el trabajo de campo.

Al Dr. José Antonio Guerrero por el tiempo dedicado a la dirección del proyecto, así como por su paciencia y valiosos consejos.

A los miembros de mi comité sinodal la Dra. Areli Rizo y la Dra. Carolina Valdespino quienes siempre estuvieron pendientes de la revisión del manuscrito y por sus importantes aportaciones.

Al Dr. Arturo Salame por el tiempo dedicado a la revisión final del documento y sus valiosas contribuciones, sobre todo por el apoyo en el trabajo de laboratorio. A la M. en C. Lorena Orozco por la revisión final del documento y sus importantes contribuciones que ayudaron a enriquecerlo.

A Emery por su apoyo incondicional en todos los aspectos, por sus consejos y por todo lo que juntos hemos compartido.

A Fabrizio, Geovanni, Emery Josué, Isabel, Kike, Male (y el pequeño Nico), Juan, Luisa, Mariana, Andy y Carmona por su ayuda y entusiasmo para el trabajo de campo por los momentos divertidos que pasamos en la lluvia, en las minas e infestados de pinolillos.

A don Goyo, don Lucas y don Amado por estar al pendiente de nuestra estancia en la estación de Quilamula.

A la administración del parque Alameda “Luis Donaldo Colosio Murrieta” por permitir el acceso para realizar los muestreos. A la Secretaria de Cultura de Estado de Morelos por otorgar el permiso y poder muestrear en el Jardín Borda.

A la Facultad de Ciencias Biológicas por prestarme el material necesario para el muestreo.

A Omar, Ale y Jorge por formar parte de mi vida. De las mil cosas que no tenemos en común al menos coincidimos que estar juntos es la que importa.

ÍNDICE

I. INTRODUCCIÓN GENERAL	1
1.1 Orden Chiroptera	1
1.1.2 Ecolocación	1
1.2 Estrés fisiológico	4
CAPÍTULO I	7
1. INTRODUCCIÓN	8
1.1 Efectos de la urbanización	8
1.2 Ruido antropogénico	8
2. ANTECEDENTES	10
2.1 Variación en los pulsos de ecolocación	10
2.2 Efecto del ruido antropogénico en murciélagos	11
3. HIPÓTESIS	13
4. OBJETIVOS	13
5. MATERIALES Y MÉTODOS	14
5.1 Especies de estudio	14
5.2 Áreas y sitios de estudio	16
5.3 Muestreo acústico y medición del ruido ambiental	18
5.4 Análisis de los pulsos	19
5.5 Análisis estadísticos	21
6. RESULTADOS	23
6.1 Muestreo acústico	23
6.2 Medición del ruido	24
6.3 <i>Molossus sinaloae</i>	24
6.3.1 Análisis estadísticos	25
6.4 <i>Mormoops megalophylla</i>	30
6.4.1 Análisis estadísticos	30
8. DISCUSIÓN	33
9. CONCLUSIONES	38
10. LITERATURA CITADA	39
CAPITULO II	48
1. INTRODUCCIÓN	49
1.1 Mecanismo fisiológico del estrés	49

1.2 Efectos de los glucocorticoides	50
1.3 Fisiología de la conservación	51
1.4 Las heces fecales como método no invasivo	53
1.5 Valoración del cortisol	54
2. ANTECEDENTES	55
2.1 Murciélagos como grupo de estudio	55
3. OBJETIVO	56
4. MATERIALES Y MÉTODOS	57
4.1 Sitios de colecta	57
4.2 Colecta de los individuos	59
4.3 Obtención de las muestras	60
4.4 Proceso de extracción del cortisol	60
4.5 Análisis estadísticos	61
5. RESULTADOS	63
5.1 Colecta de las especies	63
5.2 Análisis estadísticos	64
6. DISCUSIÓN	66
6.1 Factores biológicos que afectan la secreción de glucocorticoides	68
7. CONCLUSIONES	71
8. LITERATURA CITADA	72
ANEXO I	78

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Componentes de un pulso de ecolocación de *Pteronotus parnellii*: frecuencia constante (FC), frecuencia modulada (FM), frecuencia cuasi constante (FQC). **3**

CAPÍTULO I

Figura 2. Espectrograma de una secuencia en fase de navegación de *M. sinaloae* (A) y *M. megaliphylla* (B) grabados en Cuernavaca. **16**

Figura 3. Ubicación de los sitios de estudio dentro de la zona urbana de Cuernavaca y la REBIOSH. **18**

Figura 4. Parámetros medidos en los pulsos de ecolocación de *M. sinaloae*. a) Frecuencia inicial (FI), b) frecuencia final (FF), c) frecuencia a mitad del pulso ($F \frac{1}{2}$ PUL), d) frecuencia de máxima amplitud (FMA), e) intervalo (INTV), f) duración (DUR). **21**

Figura 5. Componentes de frecuencia de los pulsos bajos de ecolocación de *M. sinaloae* contrastados en los dos tipos de hábitats: natural (N) a una intensidad del sonido a 45 dB y urbano (U) con una intensidad de sonido a 75 dB. (a) frecuencia inicial, (b) frecuencia final, (c) ancho de banda, (d) frecuencia a mitad del pulso, (e) frecuencia de máxima amplitud, (f) duración, (g) intervalo. Las barras representan las medias y las líneas de dispersión son los intervalos de confianza al 95%. Los cinco componentes de frecuencia y la duración muestran diferencias significativas ($P < 0.05$). El intervalo de tiempo no es significativo ($P > 0.05$). **26**

Figura 6. Componentes de frecuencia de los pulsos altos de ecolocación de *M. sinaloae* contrastados en los dos tipos de hábitats: natural (N) a una intensidad del sonido a 45 dB y urbano (U) con una intensidad de sonido a 75 dB. (a) frecuencia inicial, (b) frecuencia final, (c) ancho de banda, (d) frecuencia a mitad del pulso, (e) frecuencia de máxima amplitud, (f) duración, (g) intervalo. Las barras representan las medias y las líneas de dispersión son los intervalos de confianza al 95%. Cuatro componentes de frecuencia, duración e intervalo muestran diferencias significativas ($P < 0.05$). El ancho de banda no es significativo ($P > 0.05$). **27**

Figura 7. Diferencia de la frecuencia inicial entre pulsos bajos y altos medidos en los dos tipos de hábitats: natural (N) bajo una intensidad del sonido a 45 dB y urbano (U) bajo una intensidad del sonido a 75 dB. Las barras representan las medias y las líneas de dispersión son los intervalos de confianza al 95%. **28**

Figura 8. Análisis discriminante para los pulsos bajos de *M. sinaloae*. Las barras azules representan los datos correspondientes al hábitat urbano y las barras rosas los correspondientes al hábitat natural. **29**

Figura 9. Análisis discriminante para los pulsos altos de *M. sinaloae*. Las barras azules corresponden a los datos asignados al hábitat urbano y las rosas al hábitat natural **29**

Figura 10. Componentes de frecuencia de los pulsos de ecolocación de *M. megalophylla* contrastados en los dos tipos de hábitats: natural (N) a una intensidad del sonido a 45 dB y urbano (U) con una intensidad de sonido a 75 dB. (a) frecuencia inicial, (b) frecuencia final, (c) ancho de banda, (d) frecuencia a mitad del pulso, (e) frecuencia de máxima amplitud, (f) duración, (g) intervalo. Las barras representan las medias y las líneas de dispersión son los intervalos de confianza al 95%. Sólo la frecuencia inicial, final y a mitad del pulso mostraron diferencias significativas ($P < 0.05$). **31**

Figura 11. Análisis discriminante para los pulsos de *M. megalophylla*. Las barras azules asignados al área urbana y rosas al natural, el solapamiento representa las no clasificadas. **32**

CAPÍTULO II

Figura 12. Mecanismo fisiológico de estrés (modificado de Ellis *et al.*, 2012). Durante la primera fase de estrés agudo, la respuesta inmediata a la percepción del estímulo es la secreción de catecolaminas por parte del sistema nervioso simpático, lo que genera una respuesta de afrontamiento o huida. Durante la segunda fase del estrés agudo, la activación del eje hipotalámico-hipofisario-adrenal liberará hormonas glucocorticoides que ayudaran a la supervivencia del individuo. La exposición crónica de glucocorticoides o estrés crónico provocará efectos deletéreos en los individuos. **52**

Figura 13. Ubicación de los sitios de muestreo. **59**

Figura 14. Valores de la concentración de cortisol entre las nueve especies de murciélagos insectívoros. (promedio \pm error estándar). No existen diferencias significativas entre las especies ($P > 0.05$). **64**

Figura 15. Concentración de cortisol 39 individuos inactivos reproductivamente, 12 hembras y 27 machos de nueve especies de murciélagos insectívoros (promedio \pm error estándar). No existen diferencias significativas entre sexos ($P > 0.05$). **65**

Figura 16. Valores de la concentración de cortisol entre las cinco familias de murciélagos insectívoros (promedio \pm error estándar). No existen diferencias significativas entre las familias ($P > 0.05$). **65**

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Número de secuencias y pulsos grabados para cada especie por sitio y área de muestreo. Acapantzingo (Ac), Palmas (Pal), plaza Galerías (Gal), Centro (Cen), Amatlán (Ama), REBIOSH (REB). **23**

Tabla 2. Promedio y desviación estándar de cada componente medido en los pulsos de ecolocación de *M. sinaloae* en los dos ambientes de muestreo. **24**

Tabla 3. Promedio y desviación estándar de cada componente medido en los pulsos de ecolocación de *M. megalophylla* en los dos ambientes de muestreo. **30**

Tabla 4. Estadísticos descriptivos de los valores de cortisol por especie. **63**

RESUMEN

Capítulo 1. Se evaluó el efecto del ruido antropogénico en los pulsos de ecolocación de los murciélagos insectívoros aéreos *Molossus sinaloae* y *Mormoops megalophylla* dentro de un hábitat urbano y uno natural. Para ello se realizaron grabaciones acústicas de ambas especies usando detectores de ultrasonidos en cuatro diferentes puntos de la ciudad de Cuernavaca y en la Reserva de la Biósfera Sierra de Huautla. De manera simultánea a las grabaciones se midió la intensidad del ruido ambiental en dB utilizando un sonómetro (BENETECH, GM 1351). Las secuencias de ecolocación grabadas se analizaron con el software BatSound 4.2 (Pettersson Elektronik), midiendo en cada pulso cuatro parámetros de frecuencia (kHz) y dos de tiempo (ms). Los resultados mostraron que, bajo el ruido de fondo a una intensidad de 75 dB en el ambiente urbano, *M. sinaloae* incrementó las frecuencias de sus pulsos de ecolocación, tanto bajos como altos, en 5.8 kHz en promedio. Para *M. megalophylla*, solo se observaron cambios estadísticamente significativos en las frecuencias de inicio y final de los pulsos, así como a la mitad de estos. El incremento de la frecuencia de máxima amplitud para *M. sinaloae*, podría ser una respuesta al efecto Lombard, que es el incremento en la amplitud vocal en respuesta al aumento del ruido de fondo. Este trabajo presenta las primeras pruebas del efecto del ruido antropogénico como un factor de variación en las señales ecolocación.

Capítulo 2. La medición de las concentraciones de cortisol representa una fuente de información para estudiar el estrés animal. En este capítulo se usó un método menos invasivo que el que implica una toma de muestra sanguínea para cuantificar y comparar las concentraciones de cortisol en especies, sexos y familias de murciélagos insectívoros. La colecta de individuos se efectuó por medio de redes de niebla, las cuales se colocaron atravesando cuerpos de agua y en las proximidades a la salida de refugios cavernícolas en tres diferentes sitios del estado de

Morelos. Cada individuo capturado se colocó dentro de un saco de manta por un periodo máximo de dos horas, para obtener sus heces fecales, las cuales fueron colocadas en tubos Eppendorf con etanol al 70%, y almacenadas en refrigeración a 4° C hasta su procesamiento. La cuantificación de cortisol se realizó por medio de un análisis inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA, enzyme-linked immunosorbent assay), utilizando un kit DGR Cortisol (DGR Instruments GmbH, Alemania). Los resultados de los análisis estadísticos no mostraron diferencias significativas en las concentraciones de cortisol entre especies, sexos y familias, no obstante, las concentraciones de cortisol pueden variar dependiendo del sexo, edad, estado reproductivo, ritmos circadianos y tipo de alimentación de los individuos. Si bien para este trabajo los resultados no permitieron asociar las concentraciones de cortisol como respuesta al estrés fisiológico, este estudio muestra que es factible el uso de una técnica de muestreo no invasiva para la obtención de muestras biológicas y que los resultados no son reflejo del estrés causado por la captura. Los resultados servirán para tener valores de referencia de cortisol para diferentes especies de murciélagos insectívoros y aportar información para futuros proyectos de conservación.

I. INTRODUCCIÓN GENERAL

1.1 Orden Chiroptera

El orden Chiroptera está conformado por 1240 especies a nivel mundial (Sánchez *et al.*, 2015), 139 en México (Ramírez-Pulido *et al.*, 2014) y 56 en el estado de Morelos (Lara-Núñez, 2015). Adaptaciones morfológicas, fisiológicas y sensoriales les ha permitido colonizar casi todos los hábitats conocidos (Hutson *et al.*, 2001; Schnitzler y Kalko, 2001). Su alimentación es variada, abarca frutos, polen, néctar, pequeños vertebrados, artrópodos, insectos y sangre (Schnitzler y Kalko, 2001). Debido a la diversidad en su dieta desempeñan importantes servicios ecosistémicos, contribuyen en la dispersión de semillas y polinización de las plantas, son controladores de plagas agrícolas y consumidores de insectos responsables de transmitir patógenos a los humanos (Kunz *et al.*, 2011).

1.1.2 Ecolocación

La ecolocación es la emisión de sonidos de alta frecuencia que tiene como propósito el análisis del eco para crear una imagen acústica, a través de este sistema, los murciélagos perciben formas, tamaños y texturas del entorno que les rodea (Neuweiler, 2000). Este sistema comprende dos componentes principales, la transmisión de los sonidos a través de la laringe y la recepción de los ecos por medio de los oídos asociados al sistema neural (Neuweiler, 2000).

El sonido se produce con el paso del aire a través de las cuerdas vocales, haciendo que estas vibren, las contracciones de los músculos de la laringe tensan las cuerdas vocales cambiando la frecuencia del sonido (Altringham, 1996). La perfecta sincronía de la apertura y cierre de la



glotis, por medio de los músculos internos de la laringe, controla el inicio y final del pulso de ecolocación, así como su frecuencia y forma (Metzner y Müller, 2016).

El pabellón auricular es el receptor del sonido el sonido viaja a lo largo del canal del oído externo hacia la membrana timpánica, transmitiendo vibraciones a los huesecillos del oído medio y posteriormente a la ventana oval (Altringham, 1996). A lo largo del canal de espiral de la cóclea se transmiten las vibraciones provenientes de la ventana oval, en su interior las células ciliadas del órgano de Corti transforman las ondas sonoras en impulsos nerviosos hacia el cerebro (Neuweiler 1980; 2000).

Los pulsos de ecolocación son de corta duración ya que abarcan una fracción de un segundo, generalmente están a una frecuencia por encima de los 20 kHz (que es el rango de audición humana), hasta 200 kHz (Fenton, 2002). Su diseño depende de la especie que los emite, el hábitat y la estrategia de forrajeo, así como del tipo de presa (Schnitzler, *et al.*, 2003). Los principales componentes (Figura 1) de cada pulso de ecolocación son la frecuencia modulada (FM) y la frecuencia constante (FC). Los pulsos FM son de banda ancha debido a los cambios de frecuencia presentes en la estructura de la señal, de corta duración (2-5 milisegundos). Las especies que utilizan este tipo de señal forrajean cerca de los bordes, del sustrato y entre la vegetación por lo que la emisión de estos pulsos les permite diferenciar los ecos de la configuración del fondo y su alimento (Schnitzler y Kalko, 2001). La señal de banda estrecha es característica de los pulsos FC, se presentan pocos cambios de frecuencia en la estructura de la señal, son de mayor duración que los pulsos FM (6-60 milisegundos; Neuweiler, 2000). Los murciélagos que en sus pulsos tienen como componente principal la FC vuelan y cazan en espacios abiertos (Schnitzler y Kalko, 2001). Debido a que los pulsos FM son utilizados principalmente para la localización de un objetivo y los FC para la detección, especies diferentes de murciélagos utilizan una combinación



de ambos componentes (Altringham, 1996; Schnitzler y Kalko, 2001). Al no haber una clara diferencia entre los componentes FM y FC se presenta una Frecuencia *Quasi* Constante (FQC), los cambios en la frecuencia son de pocos kHz entre el inicio y final del pulso (Schnitzler y Kalko, 2001).

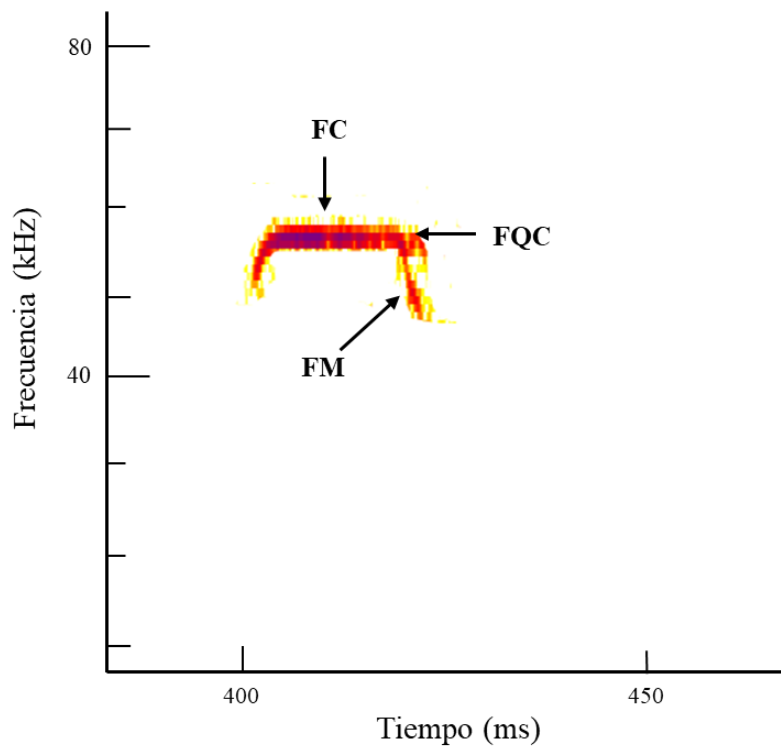


Figura 1. Componentes de un pulso de ecolocación de *Pteronotus parnellii*: frecuencia constante (FC), frecuencia modulada (FM), frecuencia cuasi constante (FQC).

Durante el proceso de forrajeo los murciélagos emiten en promedio de 4 a 12 pulsos de ecolocación por segundo, con intervalos de larga duración. Algunas señales de búsqueda dependiendo de la especie comúnmente tienen una duración mayor a 10 ms. Al detectar una presa, la tasa de emisión de los pulsos es alta y los intervalos comienzan a decrecer, una vez que

el murciélago comienza la persecución de la presa, la tasa de emisión de los pulsos incrementa y antes de la captura el murciélago emite un “buzz”, que consiste en una secuencia con pulsos de ecolocación de menor duración que los anteriores y cortos intervalos de tiempo (Neuweiler, 2000).

Algunos murciélagos insectívoros escuchan los sonidos generados por sus presas, para su ubicación y posterior captura sobre alguna superficie (Denzinger y Schnitzler, 2013). Los murciélagos insectívoros aéreos que capturan a sus presas durante el vuelo utilizan la ecolocación como parte de este proceso. Al momento del forrajeo la información recibida les permite localizar, identificar y capturar a sus presas (Schnitzler y Kalko, 2001). El uso de la ecolocación no es propio de los murciélagos, los sonidos de alta frecuencia o ultrasonidos también son utilizados por ballenas, delfines, musarañas y algunos roedores (Altringham, 1996).

1.2 Estrés fisiológico

El estrés es la respuesta fisiológica de los individuos a factores bióticos y abióticos para adaptarse al hábitat en un determinado tiempo (Wingfield *et al.*, 1997; Romero, 2004; Wingfield y Romero, 2011).

Durante el periodo de estrés se consideran tres fases: fase de alarma, resistencia y colapso. En la primera se percibe el estímulo, posteriormente viene la fase de resistencia, donde el sistema fisiológico del organismo actúa para que el individuo supere o se adapte a la amenaza. Es durante la fase de agotamiento o colapso que el organismo está respondiendo constantemente al estímulo, por lo que pierde su capacidad de adaptación o resistencia (De Camargo, 2004).



Los factores de estimulación pueden ser de corta duración, como huir de un depredador o pueden ser prolongados, cuyos efectos se acumularán por horas o días, tales como los periodos largos de sequía (Wingfield y Romero, 2011). La sobreestimulación de las respuestas de afrontamiento por un periodo largo de tiempo se conoce como estrés crónico, por lo que los individuos podrían sufrir efectos deletéreos en sus distintas funciones biológicas (Romero, 2004).

McEwen y Wingfield (2003), definen como alostasis al mantener la homeostasis (estabilidad fisiológica de los sistemas) a través del cambio; como carga alostática, los requerimientos energéticos que necesitan los individuos para realizar sus funciones diarias, y como sobrecarga alostática, a la demanda extra de energía que sobrepasa las capacidades de los individuos para generarla. De acuerdo con esta definición el término estrés sería utilizado sólo para la respuesta fisiológica inmediata que permitirá la supervivencia de los individuos (Wingfield, 2003; Romero, 2004).

Segundos después de percibir un estímulo estresor, el sistema nervioso simpático libera catecolaminas de la médula suprarrenal (adrenalina y noradrenalina; Figura 12), seguido de la respuesta del eje hipotálamo-hipófisis-adrenales el cual secreta la hormona liberadora de corticotropina (CRH por sus siglas en inglés). La CRH estimulará a la adenohipófisis para que se libere adrenocorticotropina (ACTH) induciendo la secreción de glucocorticoides de la corteza adrenal (cortisol y corticosterona). Los glucocorticoides proveen al organismo una conversión de proteínas y lípidos en carbohidratos utilizados como energía (Wingfield *et al.*, 1997; Sapolsky *et al.*, 2000; Hernández-Jáuregui *et al.*, 2005; Mitrovic, 2005).

La secreción de glucocorticoides durante un periodo de tiempo corto (horas o días) o estrés agudo provocará en el organismo cambios conductuales que tienen como único propósito



asegurar la supervivencia (Wingfield *et al.*, 1997; Wingfield, 2003). Por el contrario, si el organismo es expuesto por un largo periodo de tiempo (por ejemplo: semanas) a un estrés crónico y por tanto la secreción de glucocorticoides es constante, se presentarán efectos negativos como la supresión del sistema reproductivo e inmune, la pérdida de proteínas, la muerte celular neuronal, así como la inhibición del crecimiento (Wingfield, 2003; Wingfield y Romero, 2011; Figura 12).

El presente trabajo se divide en dos capítulos independientes.

El capítulo uno analiza el efecto del ruido referido al tráfico vehicular en parámetros específicos de frecuencia y tiempo de los pulsos de ecolocación de *Molossus sinaloae* y *Moormops megalophylla*. Los resultados aportarán información sobre el ruido de alta intensidad como un posible factor de variación en los pulsos de ecolocación.

En el capítulo dos se determinaron concentraciones de cortisol para diferentes especies de murciélagos insectívoros. Para ello se utilizaron heces fecales como muestra biológica, el uso de este método es menos invasivo que la colecta de muestras de sangre actualmente utilizado en diferentes estudios con murciélagos. Los resultados servirán para tener valores de referencia de las concentraciones de cortisol, información que aún es escasa para murciélagos y cómo estos pueden ayudar en proyectos de conservación.



CAPÍTULO I

Efecto del ruido antropogénico en los pulsos de ecolocación de *Molossus sinaloae* y *Mormoops megalophylla*.



1. INTRODUCCIÓN

1.1 Efectos de la urbanización

Dentro de las actividades antropogénicas, la urbanización es causa de importantes daños al hábitat natural, sus efectos son la deforestación, la construcción de edificaciones y de caminos asfaltados, generan alteraciones perceptibles dentro de las comunidades naturales, no solo en términos de composición de las especies, sino también en abundancia, riqueza y uniformidad (McKinney, 2006; Faeth *et al.*, 2001).

Como consecuencia de los efectos antropogénicos en la vida silvestre, diferentes especies presentan cambios conductuales en los patrones de actividad, alimentación y ciclos reproductivos (Ditchkoff *et al.*, 2006). Uno de los factores más notorios es el incremento en las tasas de mortalidad, ya que en las ciudades la producción de contaminantes y propagación de enfermedades entre la fauna silvestre, se magnifica por las carreteras y depredación por animales domésticos (Ditchkoff *et al.*, 2006).

Los efectos de la urbanización no son totalmente nocivos para todas las especies, diversos grupos de animales son considerados sinurbicos o explotadores urbanos, es decir, logran sobrevivir aprovechando los recursos que les ofrece la ciudad (Luniak, 2004; Mckinney, 2002).

1.2 Ruido antropogénico

Se puede definir al ruido como un sonido fuerte, desagradable, inesperado e indeseado (Hendriks *et al.*, 2013). La creciente demanda hacia los servicios de transporte y otras actividades antropogénicas provocan que el ruido en las ciudades sea cada vez más intenso y constante que el



de las fuentes naturales (Kight y Swaddle, 2011). El ruido ambiental inhibe las señales acústicas emitidas y detectadas por diferentes especies animales, un efecto llamado enmascaramiento acústico (Barber *et al.*, 2009). Los ajustes vocales para sobrepasar el ruido ambiental a menudo pueden tener efectos directos o indirectos en la adecuación de las especies (Read *et al.*, 2014). Por ejemplo, las aves que logran ajustar la frecuencia de sus cantos a los entornos urbanos incrementan su éxito reproductivo, contrario a lo que sucede con los individuos que carecen de la plasticidad a este ajuste vocal (Salabbekoorn y Peet, 2003). Las respuestas conductuales al ruido se pueden observar en los cambios de los patrones de actividad y el sueño, en la distribución espacial, el tiempo invertido en la vigilancia antidepredatoria y en los cambios de las señales acústicas utilizadas para la defensa del territorio (Francis y Barber, 2013).



2. ANTECEDENTES

2.1 Variación en los pulsos de ecolocación

Existen diferentes factores por los que los pulsos de ecolocación varían respecto a su frecuencia y duración más allá de los que se presentan de acuerdo con el modo de forrajeo y hábitat de forrajeo (Schnitzler y Kalko, 2001).

Estas variaciones pueden ser debidas al aislamiento geográfico, se han observado diferencias de 5-10 kHz en los pulsos de ecolocación de una misma especie entre distancias de 100 a 1000 km (Jiang *et al.*, 2015). A nivel de interacciones sociales, también se ha observado que los pulsos de *Noctilio albiventris* mostraron frecuencias más altas al ser utilizados como una forma de comunicación entre conespecíficos (Voigt-Heukce *et al.*, 2010). La época reproductiva y el sexo de las especies también son factores de variación, en individuos de *Eptesicus fuscus* se observó que los machos emiten pulsos de mayor duración durante la época de apareamiento (Grillot *et al.*, 2014). La altura de vuelo es un factor de variación en los pulsos de ecolocación. Guillam *et al.*, (2009) observaron que a distancias cortas (30 m) del suelo las frecuencias de los pulsos de *T. brasiliensis* son más altas y la duración es menor, conforme van tomando altura va aumentando (> 500 m) la duración de los pulsos y disminuyendo las frecuencias. También se han observado variaciones en los pulsos de ecolocación durante el desarrollo posnatal, observándose un patrón en el aumento en el uso de las frecuencias y una reducción en la duración de los pulsos (Moss *et al.*, 1997; Liu *et al.*, 2007; Varela-Boydo, 2017).



2.2 Efecto del ruido antropogénico en murciélagos

Los pulsos de ecolocación de los murciélagos son susceptibles a diferentes estímulos acústicos que potencialmente podrían interferir con la recepción del eco (Guillam y Montero, 2016), desde los sonidos naturales hasta los causados por actividades antropogénicas (Guillam y Montero, 2016). El ruido ambiental producido por factores antropogénicos puede enmascarar los sonidos producidos por las presas, así como, los componentes de baja frecuencia en los pulsos de ecolocación emitidos por ciertas especies de murciélagos (Altringham y Kerth, 2016). A una distancia aproximada de 15 metros de un camino o carretera la intensidad del ruido se aproxima a los 30 dB, por lo que potencialmente podría sobrelaparse con los ecos recibidos para las especies que emiten pulsos de ecolocación en un rango frecuencias de 30 kHz (Luo *et al.*, 2015).

Se ha evaluado los efectos de la interferencia del ruido antropogénico en los murciélagos que utilizan principalmente el sonido emitido por sus presas durante el forrajeo y los que usan la ecolocación durante la alimentación y navegación.

Los murciélagos insectívoros *Myotis myotis*, y *Antrozous pallidus* sometidos a grabaciones de tráfico vehicular disminuyeron su actividad con una intensidad del ruido > 60 dB (Schaub *et al.*, 2011; Bunkley y Barber 2015). Luo y colaboradores (2015) observaron que bajo condiciones controladas al reproducir pistas de audio con grabaciones del tráfico vehicular a través de altavoces (> 75 dB) disminuye la eficiencia de forrajeo de *M. daubentonii* aun cuando el ruido no enmascara el ruido generado por sus presas.

En otro estudio se constató que los niveles de actividad de *Tadarida brasiliensis* disminuyen en sitios con el ruido producido por compresoras de gas, además se observó que la duración de sus pulsos de ecolocación fue más larga al compararlos con los emitidos en sitios sin las



compresoras (Bunkley *et al.*, 2015). En los pulsos de *Rhinolophus ferrumequinum* se observó un incremento en la amplitud al estar expuestos a un ruido intenso (Hage *et al.*, 2012), los investigadores asociaron el incremento de la amplitud como una respuesta al efecto Lombard descrito como el incremento en la amplitud vocal en respuesta al aumento del ruido de fondo (Zollinger y Brumm, 2011).

Recientemente se realizó un trabajo en la ciudad de Cuernavaca, México, donde se grabaron los ultrasonidos emitidos por 12 especies de murciélagos insectívoros aéreos (Lara-Núñez, 2015). Las grabaciones se realizaron en parques caracterizados por densa cobertura vegetal y cuerpos de agua, en zonas residenciales con extensas áreas de jardín y albercas y zonas con alta densidad de viviendas donde la cobertura vegetal es escasa y tiene una densidad mayor a 400 habitantes por hectárea. Aunque en dicho trabajo no se cuantificó parámetros de los pulsos de todas las especies, la revisión de los espectrogramas permitió observar que las frecuencias de los pulsos de ecolocación de solo dos especies *Molossus sinaloae* (grabados en todos los sitios de muestreo) y *Mormoops megalophylla* (grabado en los parques y dentro de un sitio en la zona residencial) eran más altas que las reportadas para sitios no urbanos dentro del estado de Morelos (Rizo-Aguilar, 2008; Orozco-Lugo, 2013).

Debido a lo anterior, en este trabajo se analizó si el ruido antropogénico es un posible factor de variación en los cambios de frecuencia de los pulsos de ecolocación de *M. sinaloae* y *M. megalophylla*.

3. HIPÓTESIS

El ruido antropogénico se puede sobreponer a las señales acústicas emitidas por los murciélagos que utilizan la ecolocación, por lo que la intensidad del ruido ambiental afectará los componentes de los pulsos de ecolocación de las especies *Molossus sinaloae* y *Mormoops megalophylla*. Los componentes de frecuencia de los pulsos de ecolocación incrementarán como respuesta a la superposición del ruido, mientras que los componentes de tiempo no se verán modificados.

4. OBJETIVOS

Analizar el efecto del ruido antropogénico en los componentes de los pulsos de ecolocación de los murciélagos *Molossus sinaloae* y *Mormoops megalophylla*.

Comparar los cambios de frecuencia y duración en los pulsos de ambas especies entre el hábitat urbano y natural.



5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Especies de estudio

Molossus sinaloae. Pertenece a la familia Molossidae y dentro del género es la segunda especie de mayor tamaño (14-28 gr). Se alimenta de insectos de cuerpo blando que caza en el aire, habita en el bosque tropical caducifolio y bosque templado. Es una especie tolerante a diferentes perturbaciones del hábitat (Santos, 2014). *M. sinaloae* forrajea en espacios abiertos usualmente por encima de las copas de los árboles (Schnitzler y Kalko, 2001), emitiendo pulsos de baja frecuencia, banda estrecha, larga duración y una alternancia de frecuencias visualizándose en el espectrograma en forma escalonada (Figura 2; O'Farrel 1999) además de presentar alta plasticidad en los parámetros de sus pulsos de ecolocación (Jung *et al.*, 2014). Anteriormente se ha grabado a esta especie en vuelo libre en el estado de Morelos, en Cuernavaca, sus pulsos de ecolocación presentan una frecuencia inicial de 49.8 kHz, frecuencia final de 46.4 kHz y una duración de 5.7 ms (Lara-Núñez, 2015). Dentro de la Reserva de la Biósfera Sierra de Huautla (REBIOSH); sus pulsos presentan una frecuencia inicial 32.9 kHz, frecuencia final alrededor de los 30 kHz y una duración de 12 ms (Orozco-Lugo, 2007; Rizo-Aguilar, 2008).

Mormoops megalophylla. Murciélago de tamaño medio (10-20 gr) perteneciente a la familia Mormoopidae. Sus refugios son principalmente cuevas con una humedad relativamente alta, se puede encontrar en bosque tropical caducifolio, bosques templados, bosque lluvioso, así como, en regiones áridas y semiáridas (Iñiguez-Dávalos, 2014). *M. megalophylla* forrajea en los bordes de bosques y claros de la vegetación (Schnitzler y Kalko, 2001), sus pulsos de ecolocación son fácilmente reconocibles, formados principalmente por un segmento de FC al inicio del pulso finalizando con una curva descendente de FM, presentan tres armónicos en los que el primero o



señal fundamental es de baja intensidad mientras que el segundo y tercero suelen ser de alta intensidad (Figura 2; Rydell *et al.*, 2002). En Cuernavaca se grabaron secuencias de individuos en vuelo libre, la frecuencia inicial y final tienen valores altos 71.9 y 68.6 kHz y una duración de 5.9 ms. En la REBIOSH los pulsos registrados presentan una frecuencia inicial y final de 54 y 44 kHz respectivamente, con una duración de 7 ms (Orozco-Lugo, 2007). Como parte del proyecto SONOZOTZ-AMMAC (datos no publicados) se capturó y grabó a individuos de *M. megalophylla* después de ser liberados de la mano, las frecuencias del segundo armónico fueron altas, frecuencia inicial 80.9 kHz y final 70.5 kHz.



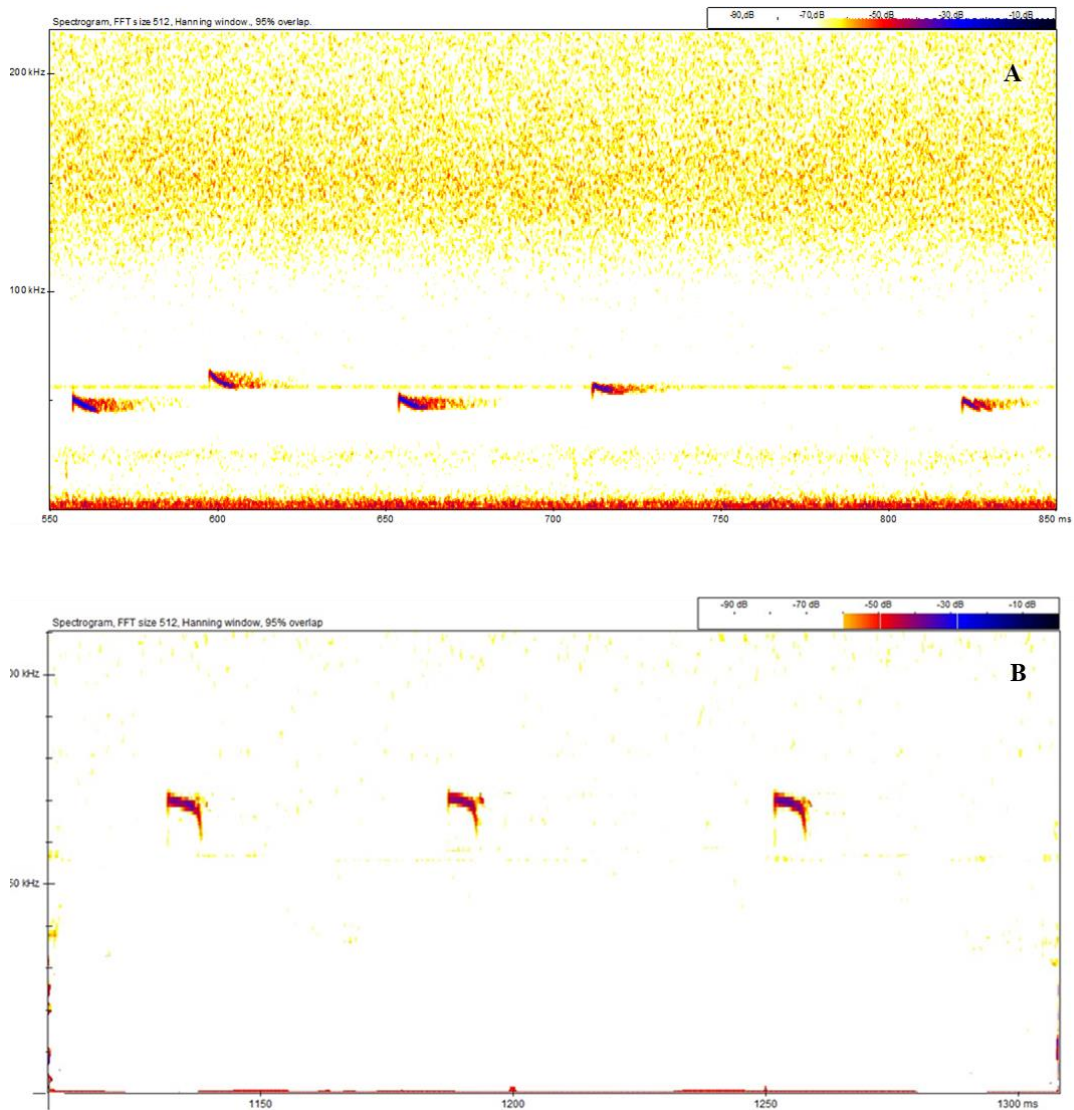


Figura 2. Espectrograma de una secuencia en fase de navegación de *M. sinaloae* (A) y *M. megalophylla* (B) grabados en vuelo libre para este proyecto en Cuernavaca.

5.2 Áreas y sitios de estudio

Con el objetivo de hacer una comparación de los niveles de ruido ambiental y su efecto en los componentes en los pulsos de ecolocación, se seleccionaron dos áreas de estudio, una urbana y por lo tanto con ruido de origen antropogénico, y otra natural, sin ruido antropogénico.



Como área urbana se seleccionó la ciudad de Cuernavaca, capital del estado de Morelos (Figura 3), la cual cuenta con una superficie de 151.2 km², posee 366321 habitantes (INEGI, 2015). Su rango altitudinal oscila de los 1100 en la zona sur a 1800 m. s. n. m en la zona norte (INEGI, 2009). El principal tipo de vegetación es la selva baja caducifolia en la zona sur, limitando al norte con el bosque de pino y encino (Dorado *et al.*, 2015). Cuernavaca se encuentra dentro de la cuenca de río Amacuzac y subcuenca del río Apatlaco (CONAGUA, 2012).

Como área natural se seleccionó la Reserva de la Biosfera Sierra de Huautla (REBIOSH), la cual se ubica al sur del estado de Morelos (Figura 3), cuenta con una superficie de 59,030 ha, su rango altitudinal es de 700 a 2000 m. s. n. m (Dorado *et al.*, 2005). El principal tipo de vegetación es la selva baja caducifolia. No obstante, existen algunas áreas de selva mediana subcaducifolia, bosque de encino y de pino (Dorado, *et al.*, 2005).

En Cuernavaca se establecieron cuatro sitios de muestreo para la realización de las grabaciones con base en la concentración de tráfico vehicular y en mediciones preliminares de ruido ambiental utilizando un sonómetro. Estos sitios fueron las colonias Acapantzingo (18°54'08.19" N, 99°13'11.28" O), Centro (18°55'19.18" N, 99°14'01.46" O), Palmas (18°54'24.25" N, 99°13'55.24" O) y plaza comercial Galerías Cuernavaca (18°56'10.74" N, 99°11'36.81" O). En la REBIOSH las grabaciones se realizaron sobre el camino a la comunidad de El Limón (18°32'16.5" N, 98°55'57.9" O) y dentro de la Estación Biológica, y en el arroyo que atraviesa el poblado de Quilamula (18°30'52.17" N, 99°00'47.25" O).



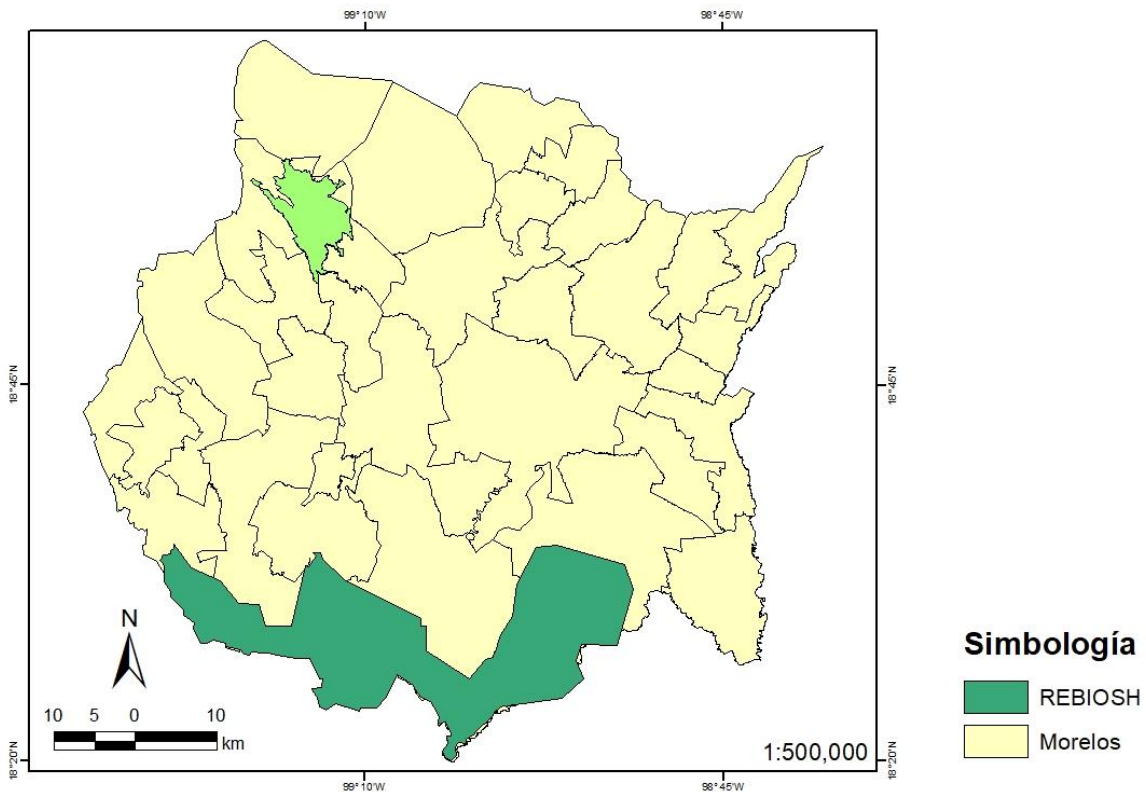


Figura 3. Ubicación de los sitios de estudio dentro de la zona urbana de Cuernavaca y la REBIOSH.

5.3 Muestreo acústico y medición del ruido ambiental

El muestreo acústico se realizó en los meses de mayo, junio, octubre, noviembre y diciembre del 2016. En cada uno de los sitios de muestreo (área urbana y área natural) se establecieron puntos fijos, donde se realizaron grabaciones por un periodo de tiempo continuo de hora y media a partir de la puesta de sol indicada por un GPS. El periodo de tiempo de grabación se designó por la seguridad de trabajar en los sitios urbanos. Las grabaciones se hicieron en tiempo real utilizando un detector de ultrasonidos Echo Meter 3+ y SM4BAT FS. Ambos detectores trabajan bajo los mismos parámetros de grabación ya que son fabricados por la misma compañía (Wildlife

Acoustics). Las grabaciones por sitio de muestro se realizaron una vez por mes, en un orden aleatorio, pero evitando los periodos de luna llena.

La medición del ruido ambiental se realizó a la par de las grabaciones de los ultrasonidos en intervalos de 10 minutos usando un sonómetro (BENETECH, GM 1351), instrumento que mide la intensidad del sonido en decibeles (dB, unidad de medida). Estas mediciones se realizaron en todos los sitios, tanto del área natural como urbana para obtener una medida promedio del nivel de ruido ambiental al que están sometidas las especies.

5.4 Análisis de los pulsos

Las secuencias de ecolocación obtenidas por las grabaciones fueron analizadas con el software BatSound 4.2 (Pettersson Elektronik), de acuerdo con el protocolo propuesto por Rizo-Aguilar (2008). Se eligieron solo las secuencias de navegación para el análisis ya que durante la fase de búsqueda los pulsos son más uniformes en su estructura, condiciones que no se presentan durante la fase de aproximación y captura. El espectrograma se visualizó a una resolución de 16 bits, con una velocidad de muestreo por segundo de 44 100 kHz, a una expansión de tiempo de 10x, transformaciones de furier FFT 512 muestras, en una ventana tipo Hanning a 95% de superposición. Se midieron parámetros de frecuencia y tiempo en cada pulso de ecolocación (Figura 4), los cuales se describen a continuación. De acuerdo con Rydell *et al.*, (2002), para *M. megalophylla* se midió el segundo armónico debido a que fue el que presentó mayor intensidad, mientras que el fundamental fue muy débil y en la mayor parte de las secuencias imperceptible.



- a) **Frecuencia inicial (FI):** valor que tiene la frecuencia en kilo hertzios (kHz) emitida al inicio del pulso.
- b) **Frecuencia Final (FF):** valor que tiene la frecuencia en kHz emitida al final del pulso.
- c) **Frecuencia a mitad del pulso (F1/2 PUL):** valor de la frecuencia en kHz a la mitad del recorrido del pulso.
- d) **Ancho de banda (ANDB):** diferencia entre la frecuencia inicial y la frecuencia final. Son todas las frecuencias recorridas desde el inicio hasta el final del pulso.
- e) **Frecuencia de Máxima Amplitud (FMA):** valor de la frecuencia en kHz emitida en el punto con mayor energía en el pulso.
- f) **Duración (DUR):** tiempo en milisegundos (ms) que transcurre desde el inicio hasta el final del pulso.
- g) **Intervalo (INTV):** tiempo en ms transcurrido entre el inicio de un pulso y el inicio del siguiente.



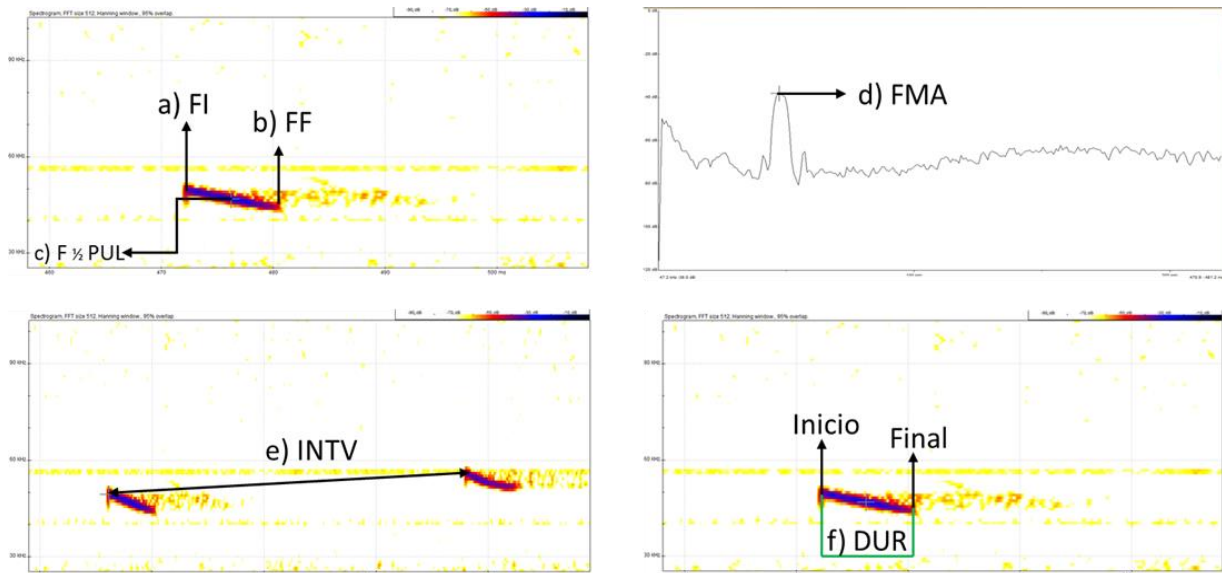


Figura 4. Parámetros medidos en los pulsos de ecolocación de *M. sinaloae*. a) Frecuencia inicial (FI), b) frecuencia final (FF), c) frecuencia a mitad del pulso ($F \frac{1}{2} \text{ PUL}$), d) frecuencia de máxima amplitud (FMA), e) intervalo (INTV), f) duración (DUR).

5.5 Análisis estadísticos

Para los análisis estadísticos se obtuvo la media de los datos de cada parámetro. Antes de realizar el análisis multivariado de varianza, los datos originales se transformaron a logaritmo natural con el objetivo de ajustar las varianzas. Debido a que *M. sinaloae* en la fase de navegación presenta alternancia de pulsos, para los análisis estadísticos se trabajó por separado los pulsos bajos y los pulsos altos.

Para cada uno de los siete componentes medidos en los pulsos de ecolocación se utilizó un Análisis de Varianza de una vía, con el fin de evaluar el efecto del ruido antropogénico en dichos

parámetros. Se consideró como factor el tipo de hábitat, con dos niveles urbano y natural. Estos análisis estadísticos se realizaron en el programa STATISTICA 7, considerando un α de =0.05.

Además, se empleó un análisis multivariado de varianza para analizar las diferencias entre los grupos urbano y natural de acuerdo con los promedios de todos los componentes de los pulsos, seguido de un análisis discriminante para ilustrar las diferencias y para probar la clasificación *a priori* de los grupos por tipo de hábitat. Este análisis permite clasificar variables independientes con características exclusivas mutuas en algún grupo establecido a priori a partir de una variable dependiente.



6. RESULTADOS

6.1 Muestreo acústico

En 1530 minutos de grabación realizados durante los meses de muestreo se identificaron 795 secuencias de *M. sinaloae* y *M. megalophylla* (Tabla 1). Se seleccionaron 60 secuencias, ya que en ellas la visualización de los pulsos en el espectrograma fue más clara. En total se midieron 550 pulsos de ecolocación para las dos especies

Los parámetros de cada pulso de ecolocación se almacenaron en una base de datos, separados por especie y tipo de área dentro del que se realizaron las grabaciones. Se obtuvo un promedio por grabación para cada parámetro por sitio de muestreo dentro de Cuernavaca y REBIOSH.

Tabla 1. Número de secuencias y pulsos grabados para cada especie por sitio y área de muestreo. Acapantzingo (Ac), Palmas (Pal), plaza Galerías (Gal), Centro (Cen), REBIOSH (REB).

Especie		Pulsos por sitios					Total por área		Tot.
		Ac	Pal	Gal	Cen	REB	Urb	Nat	
<i>M. sinaloae</i>	Secuencias	6	7	4	8	8	25	8	33
	Pulsos	39	61	30	48	99	178	99	277
<i>M. megalophylla</i>	Secuencias	9	7	1	0	10	17	10	27
	Pulsos	92	58	10	0	120	160	120	280



6.2 Medición del ruido

Los datos obtenidos a partir de las lecturas de ruido realizadas con el sonómetro cada noche de muestreo se promediaron para obtener una sola lectura por noche. Posteriormente las mediciones de todas las noches de muestreo se promediaron para obtener una medición final, de ruido para cada área. Los resultados obtenidos fueron 75 (± 4.2) dB para el área urbana y 45 (± 1.4) dB para el área natural.

6.3 *Molossus sinaloae*

Dentro del hábitat urbano se grabó a *M. sinaloae* en los cuatro sitios de muestreo. Para esta especie se analizaron 277 pulsos de ecolocación en 33 secuencias. Dentro del área urbana los parámetros de frecuencia y tiempo mostraron valores mayores a los obtenidos en el área natural (Tabla 2).

Tabla 2. Promedio y desviación estándar de cada componente medido en los pulsos de ecolocación de *M. sinaloae* en los dos ambientes de muestreo.

Ambiente	Tipo de Pulsos	FI (kHz)	FF (kHz)	ANDB (kHz)	F 1/2 P (kHz)	FMA (kHz)	DUR (ms)	INTV (ms)
Urbano	Bajos	52.8 ± 3.7	49.4 ± 3.5	3.3 ± 0.7	51.7 ± 3.5	52.6 ± 4.2	5.8 ± 0.9	84.2 ± 38.1
	Altos	60.1 ± 3.6	57 ± 3.2	3 ± 1	59 ± 3.4	59.8 ± 3.4	5.9 ± 0.9	87.9 ± 23.2
Natural	Bajos	47.7 ± 2	44.9 ± 2	2.7 ± 0.6	47.1 ± 2.1	48.4 ± 2.2	7.2 ± 0.4	111.4 ± 30.1
	altos	53 ± 3	50.5 ± 2.3	2.5 ± 0.9	52.2 ± 2.6	53.2 ± 2.8	7.4 ± 1.1	117.4 ± 29.5

6.3.1 Análisis estadísticos

Las variables medidas en los pulsos bajos de ecolocación de *M. sinaloae* se contrastaron entre los dos diferentes tipos de hábitat, urbano (75 dB) y natural (45 dB). Los análisis de varianza mostraron que los cinco componentes de frecuencia: frecuencia inicial (FI), frecuencia final (FF), ancho de banda (ANDB), frecuencia a la mitad del pulso ($F \frac{1}{2} P$) y frecuencia de máxima amplitud (FMA) presentaron diferencias significativas ($P < 0.05$). En todos los casos se observaron mayores frecuencias en el hábitat urbano bajo la intensidad del sonido de 75 dB (Figura 5 a - e). La duración del pulso (DUR) fue significativamente menor dentro del hábitat urbano ($F = 15.02$, $P < 0.05$), para el intervalo de tiempo entre la emisión de cada pulso no se observaron diferencias significativas ($F = 3.38$, $P > 0.05$; Figura 5 f-g).

Valores similares se presentaron para los pulsos altos, donde cuatro componentes de frecuencia: frecuencia inicial ($F = 28.9$; $P < 0.05$), frecuencia final ($F = 33.9$; $P < 0.05$), frecuencia a mitad del pulso ($F = 30.8$; $P < 0.05$) y frecuencia de máxima amplitud ($F = 29$; $P < 0.05$) son mayores dentro del hábitat urbano (Figura 6 a, b, d y e). La duración de los pulsos altos fue menor dentro del hábitat urbano al igual que el intervalo, por lo que se observaron diferencias significativas entre los dos tipos de hábitats ($F = 13.49$, $P > 0.05$; $F = 8.67$, $P < 0.05$; Figura 6 f-g).

La diferencia de la frecuencia inicial (FI) entre los pulsos de ecolocación bajos y altos de *M. sinaloae* también presentó diferencias significativas ($F = 7.52$, $P = .0074$). En el hábitat urbano la diferencia entre los pulsos bajos y altos es de 7.2 kHz, mientras que para el hábitat natural la diferencia entre ambos pulsos es de 5.7 kHz (Figura 7).



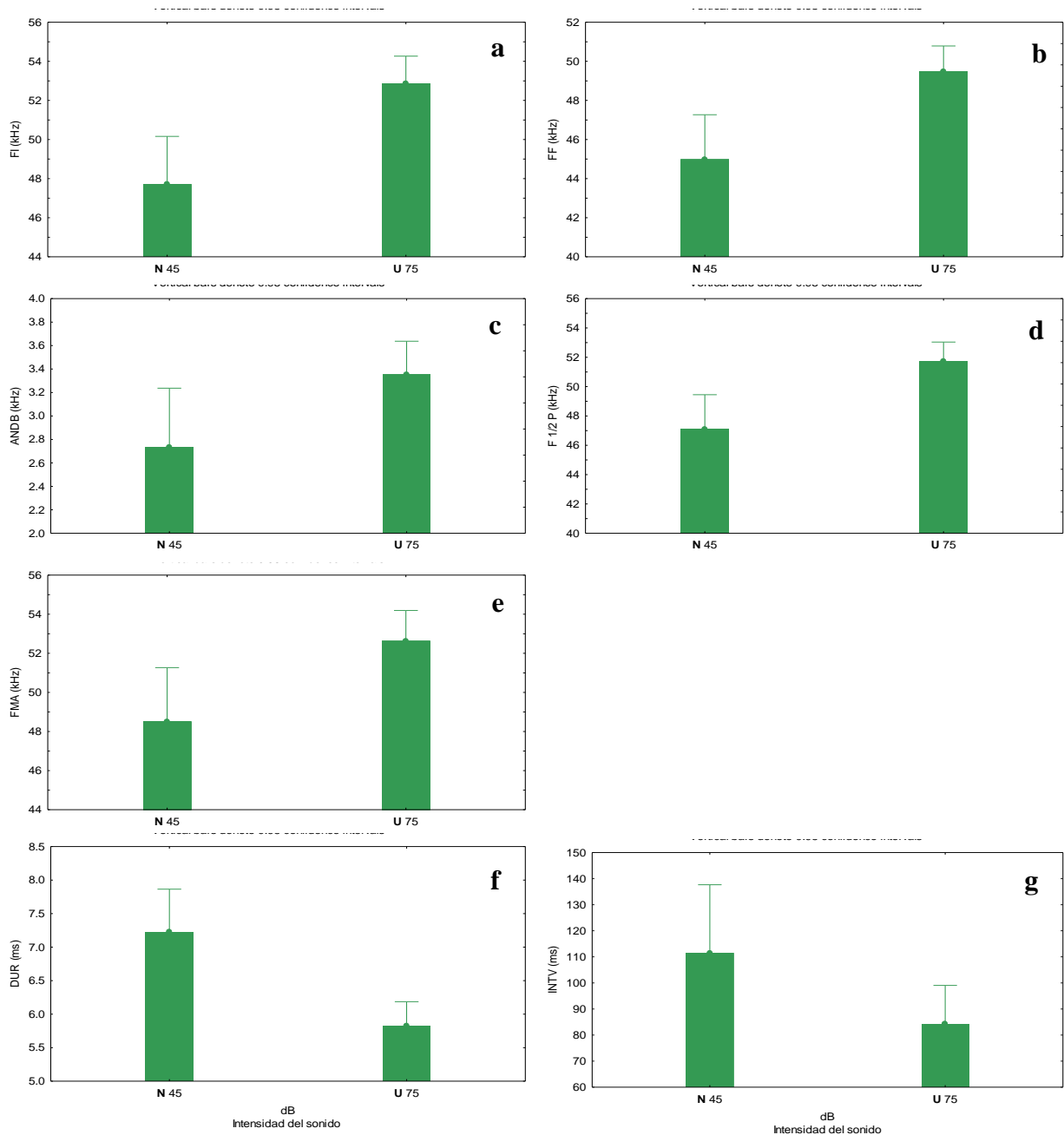


Figura 5. Componentes de frecuencia de los pulsos bajos de ecolocación de *M. sinaloae* contrastados en los dos tipos de hábitat: natural (N) a una intensidad del sonido a 45 dB y urbano (U) con una intensidad de sonido a 75 dB. (a) frecuencia inicial, (b) frecuencia final, (c) ancho de banda, (d) frecuencia a mitad del pulso, (e) frecuencia de máxima amplitud, (f) duración, (g) intervalo. Las barras representan las medias y las líneas de dispersión son los intervalos de confianza al 95%. Los cinco componentes de frecuencia y la duración muestran diferencias significativas ($P < 0.05$). El intervalo de tiempo no es significativo ($P > 0.05$).

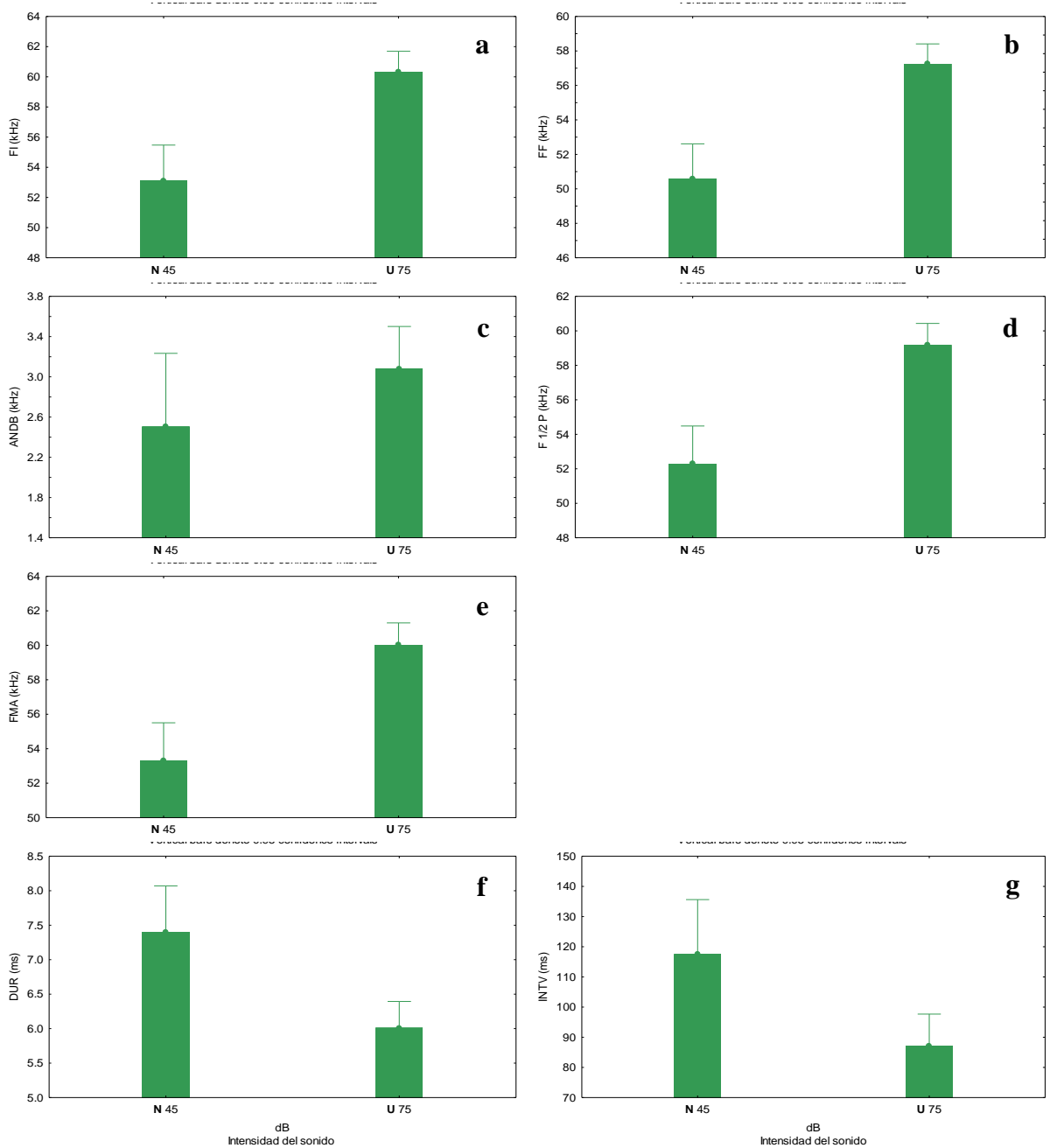


Figura 6. Componentes de frecuencia de los pulsos altos de ecolocación de *M. sinaloae* contrastados en los dos tipos de hábitats: natural (N) a una intensidad del sonido a 45 dB y urbano (U) con una intensidad de sonido a 75 dB. (a) frecuencia inicial, (b) frecuencia final, (c) ancho de banda, (d) frecuencia a mitad del pulso, (e) frecuencia de máxima amplitud, (f) duración, (g) intervalo. Las barras representan las medias y las líneas de dispersión son los intervalos de confianza al 95%. Cuatro componentes de frecuencia, duración e intervalo muestran diferencias significativas ($P < 0.05$). El ancho de banda no es significativo ($P > 0.05$).

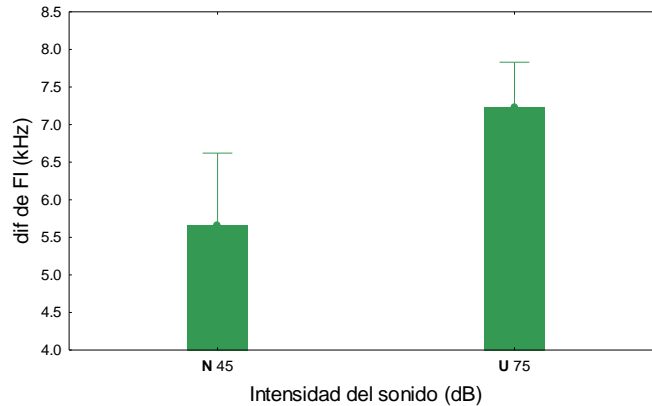


Figura 7. Diferencia de la frecuencia inicial entre pulsos bajos y altos medidos en los dos tipos de hábitats: natural (N) bajo una intensidad del sonido a 45 dB y urbano (U) bajo una intensidad del sonido a 75 dB. Las barras representan las medias y las líneas de dispersión son los intervalos de confianza al 95%.

El análisis discriminante para los pulsos bajos de *M. sinaloae* mostró una diferenciación significativa entre los grupos (λ de Wilks =0.45; P =0.0028), del 100% de los datos correspondientes al hábitat urbano el 84% fueron asignados correctamente, de los datos correspondientes al hábitat natural el 100% se asignó correctamente (Figura8). La diferenciación fue significativa para los pulsos altos (λ de Wilks =0.32; P <0.05), el 92% de los datos correspondientes para el hábitat urbano se asignó correctamente y solo el 8% fue clasificado para el hábitat natural. La asignación de los datos correspondientes al hábitat natural clasificó al 86% correctamente (Figura 9).

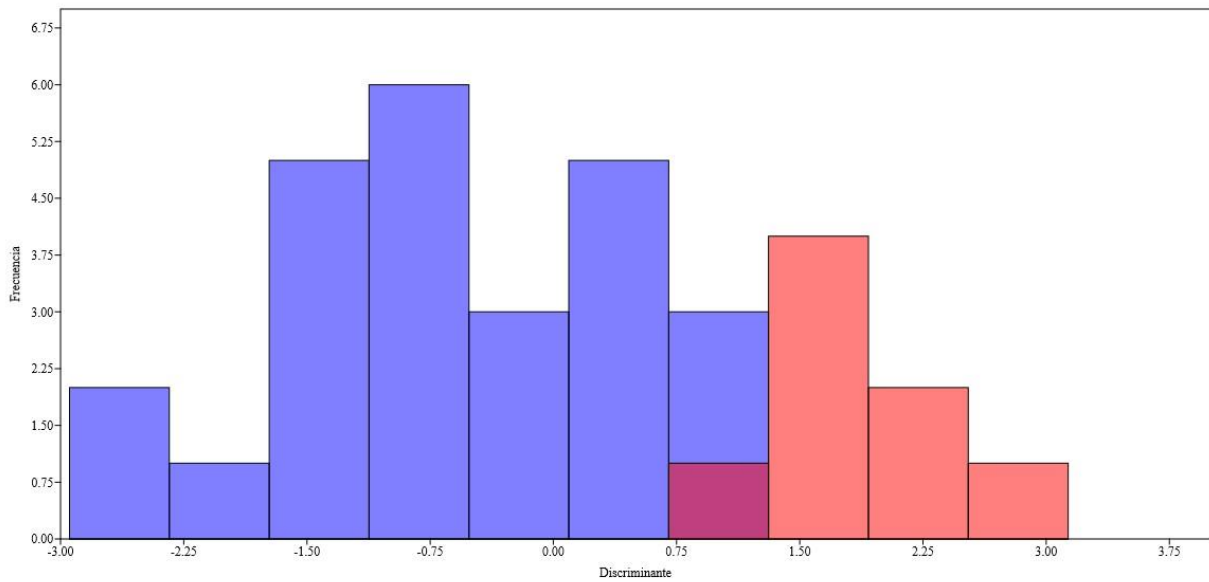


Figura 8. Análisis discriminante para los pulsos bajos de *M. sinaloae*. Las barras azules representan los datos correspondientes al hábitat urbano y las barras rosas los correspondientes al hábitat natural.

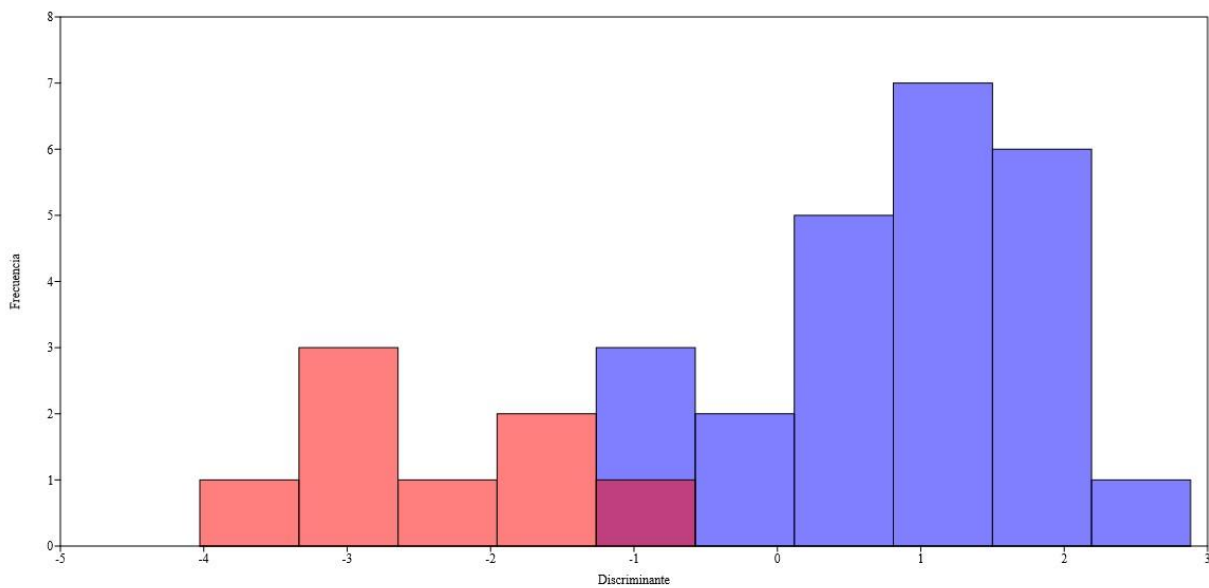


Figura 9. Análisis discriminante para los pulsos altos de *M. sinaloae*. Las barras azules corresponden a los datos asignados al hábitat urbano y las rosas al hábitat natural.

6.4 *Mormoops megalophylla*

Para *M. megalophylla* se analizaron 280 pulsos de ecolocación en 27 secuencias, dentro de Cuernavaca se obtuvieron grabaciones en los sitios Acapantzingo, Galerías y Palmas, además de las obtenidas en la REBIOSH. Los componentes de tiempo y frecuencia de los pulsos no mostraron valores similares entre los dos tipos de hábitats urbano y natural (Tabla 3).

Tabla 3. Promedio y desviación estándar de cada componente medido en los pulsos de ecolocación de *M. megalophylla* en las dos áreas de muestreo.

Ambiente	FI (kHz)	FF (kHz)	ANDB (kHz)	F 1/2 P (kHz)	FMA (kHz)	DUR (ms)	INTV (ms)
Urbano	69.5 ± 1.9	65 ± 2.8	4.4 ± 2.7	68.8 ± 1.8	69 ± 2.5	6.1 ± 0.7	81 ± 20
Natural	67.4 ± 0.8	62.7 ± 0.9	4.7 ± 0.3	67 ± 0.8	67.7 ± 0.8	6.4 ± 0.5	70.4 ± 12.3

6.4.1 Análisis estadísticos

Los resultados del ANOVA entre los componentes de los pulsos y el hábitat urbano (75 dB) y natural (45 dB) mostraron diferencias significativas sólo en la frecuencia inicial ($F = 9$; $P < 0.05$), frecuencia final ($F = 5.5$; $P < 0.05$) y frecuencia a mitad del pulso ($F = 7.4$; $P < 0.05$), siendo mayores dentro de Cuernavaca (Figura 10a, b y d). El ancho de banda ($F = 0.107$; $P = 0.74$), frecuencia de máxima amplitud ($F = 2.5$; $P = 0.12$) y los componentes de tiempo como duración del pulso ($F = 1.3$; $P = 0.27$) e intervalo ($F = 2.1$; $P = 0.16$) no mostraron diferencias significativas entre los dos hábitats (Figura 10c, e, f, y g).



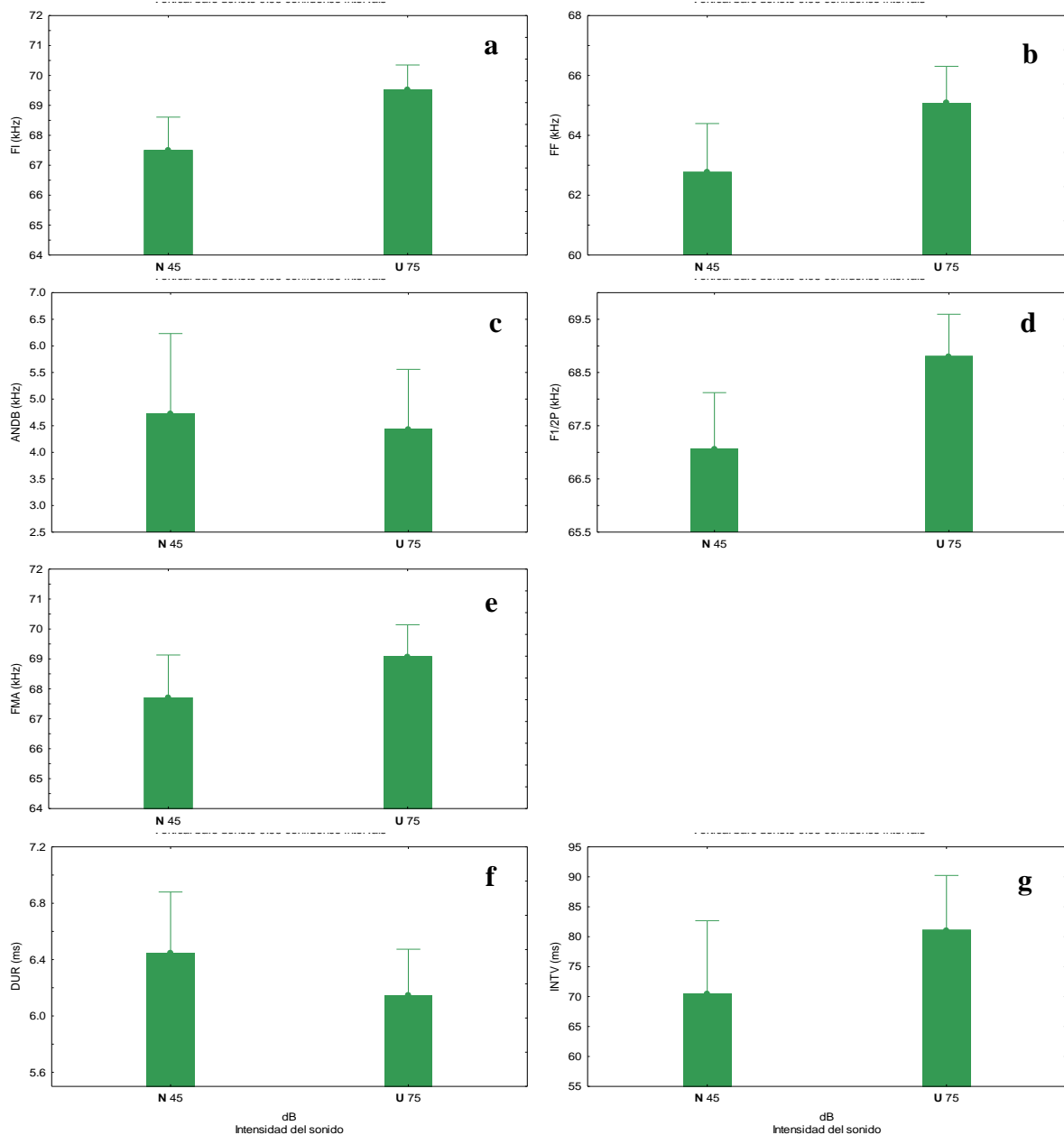


Figura 10. Componentes de frecuencia de los pulsos de ecolocación de *M. megalophylla* contrastados en los dos tipos de hábitats: natural (N) a una intensidad del sonido a 45 dB y urbano (U) con una intensidad de sonido a 75 dB. (a) frecuencia inicial, (b) frecuencia final, (c) ancho de banda, (d) frecuencia a mitad del pulso, (e) frecuencia de máxima amplitud, (f) duración, (g) intervalo. Las barras representan las medias y las líneas de dispersión son los intervalos de confianza al 95%. Sólo la frecuencia inicial, final y a mitad del pulso mostraron diferencias significativas ($P < 0.05$).

El análisis discriminante para los pulsos de *M. megalophylla* no mostró una diferenciación significativa entre los grupos (λ de Wilks =0.53; P =0.104), (Figura 11). El 81% del total de los datos asignados al hábitat urbano fue clasificado correctamente, para los datos del hábitat natural 87% correspondió a una clasificación correcta.

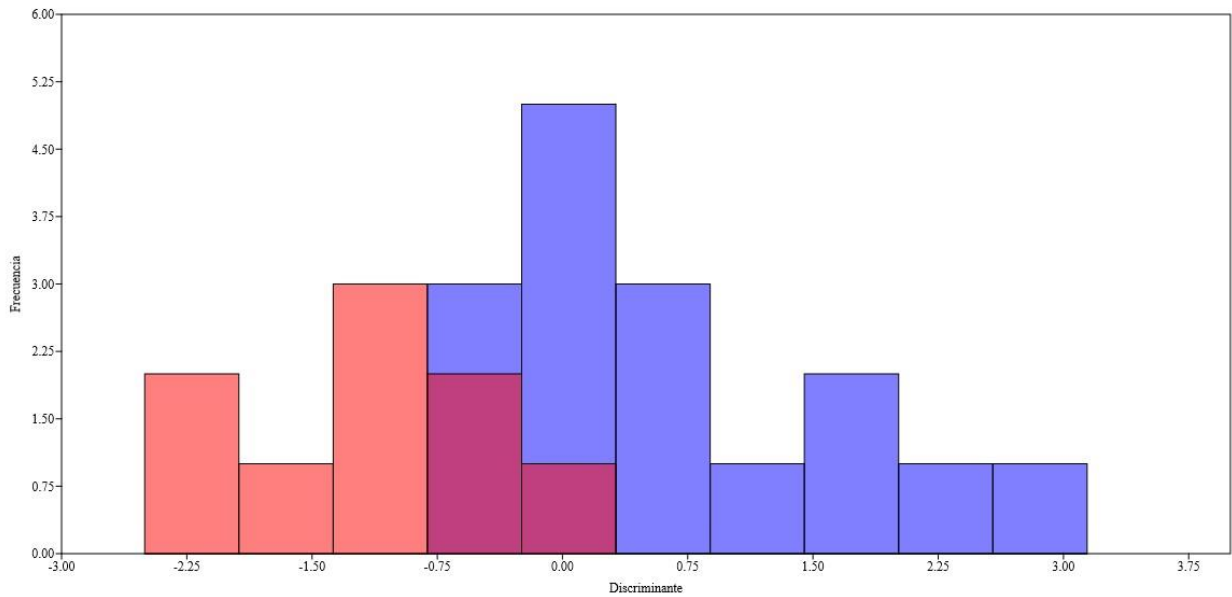


Figura 11. Análisis discriminante para los pulsos de *M. megalophylla*. Las barras azules asignados al hábitat urbano y rosas al natural, el solapamiento representa las no clasificadas

8. DISCUSIÓN

La plasticidad de la señal es la capacidad que presentan los individuos a realizar ajustes fenotípicos de sus señales acústicas en respuesta a cambios ambientales (Ord *et al.*, 2010). Tales ajustes se han observado en aves, anfibios y reptiles (Slabbekoorn y Peet, 2003; Nemeth *et al.*, 2013; Shen y Xu, 2016; Brumm y Zollinger, 2017; Zaffaroni-Caorsi *et al.*, 2017), los cuales son capaces de presentar cambios en la estructura de la señal como respuesta a la interferencia del ruido. Para los murciélagos que utilizan la ecolocación es poco probable que el ruido enmascare sus pulsos (Luo *et al.*, 2015), sin embargo, esto podría ocurrir si la intensidad del ruido es alta y por lo tanto interferir con la recepción de los ecos de las llamadas de baja frecuencia (West, 2016).

Los resultados mostraron que, bajo el ruido de fondo a una intensidad de 75 dB en el ambiente urbano, *M. sinaloae* incrementó las frecuencias de sus pulsos de ecolocación, tanto bajos como altos, en 5.8 kHz en promedio, mientras la duración y el intervalo de estos disminuyó en promedio 1.4 y 28.3 ms respectivamente. Los resultados no fueron los mismos para *M. megalophylla*, ya que solo se observaron cambios estadísticamente significativos en las frecuencias de inicio y final de los pulsos, así como a la mitad de estos.

Se ha documentado que los murciélagos de la familia Molossidae presentan una plasticidad en el diseño de sus pulsos en la fase de navegación, observándose cambios de frecuencia y alternancia en la modulación de estos, y que dos factores que se asocian a la variación en los pulsos de ecolocación son la geografía y la altitud a la que vuelan los individuos (Gillam *et al* 2009; Jung *et al.*, 2014). Sin embargo, en ninguno de los casos hasta ahora documentados, los valores de frecuencias inicial, final y de máxima amplitud exceden 5 kHz entre localidades



alejadas en más de 100 km o en altitudes que van de los 30 m a los 800 m. En lugar de eso consideramos que, de acuerdo con lo planteado en la hipótesis, el ruido antropogénico enmascararía las señales de la ecolocación afectando significativamente los componentes de los pulsos para *M. sinaloe* que en respuesta a la interferencia del ruido se incrementarían los componentes de frecuencia.

El incremento de los componentes de frecuencia en los pulsos de *M. sinaloe* principalmente de la frecuencia de máxima amplitud, que es donde se concentra la máxima energía del pulso, podría ser una respuesta al efecto Lombard, Este tipo de respuestas se ha observado en las ranas macho de orejas cóncavas (*Odorrana tormota*) con el incremento de las frecuencias fundamentales y amplitud de las vocalizaciones cuando la intensidad del ruido incrementó 10 dB (Shen y Xu, 2016). En aves, el carbonero común (*Parus major*) incrementa la frecuencia mínima de sus cantos al aumentar el ruido de fondo (Slabbekoorn y Peet, 2003). La ballena Beluga (*Delphinapterus leucas*) incremento la frecuencia de sus llamadas y el ancho de banda cuando el ruido de fondo llego a ser 17 dB más intenso (Au *et al.*, 1985). Si bien el gecko tokay (*Gekko gecko*) no responde al efecto Lombard ya que no incrementa la amplitud de sus llamadas, lo compensa con la emisión de un mayor número de sílabas de alta intensidad ante el solapamiento del ruido, además de ser de mayor duración (Brumm y Zollinger, 2017).

Como forrajeadores de espacios abiertos, los molosidos presentan pulsos de baja frecuencia, larga duración, banda estrecha y largos intervalos de pulsos (Schnitzler y Kalko, 2001). Posiblemente para *M. sinaloe* el ruido de fondo sea el equivalente a volar en un espacio cerrado, donde el incremento en el ancho de banda y acortamiento de la duración de los pulsos facilitarían la detección de las presas (Schnitzler y Kalko, 2001). Sin embargo, esto no fue observado por Bunkley y colaboradores (2015) para *Tadarida brasiliensis*, ya que bajo el ruido de las



compresoras de gas mayor a 65 dB los individuos incrementaron la duración de sus pulsos y disminuyó el ancho de banda. No obstante, en otro estudio con la misma especie la amplitud, duración y ancho de banda de los pulsos de ecolocación aumentaron cuando los individuos estuvieron expuestos a ruido generado digitalmente a 85 dB (Tressler y Smotherman, 2009). Estas diferencias podrían deberse al método experimental de los muestreos. El ruido limita la detección de la señal reduciendo el alcance de la ecolocación (Tayack y Janik, 2013), la distancia para la detección de las presas sería menor en el espacio con ruido de fondo, por lo que el incremento en las frecuencias y reducción de la duración en los pulsos responde a la detección de los objetivos a menor distancia.

Bajo el supuesto de que el ruido de fondo actúa como un espacio cerrado de vuelo para *M. sinaloe*, el no encontrar diferencias significativas en los pulsos de ecolocación de *M. megalophylla* en porque esta especie forrajea cerca de los bordes de la vegetación por lo que sus pulsos están hechos para la detección de sus presas y separarlas de los ecos del fondo y al mismo tiempo evitar colisiones (Schnitzler y Kalko, 2001).

Además del efecto en los pulsos de ecolocación de los murciélagos, el ruido antropogénico actúa como un estímulo aversivo que causa una respuesta de evitar el forrajeo en lugar ruidosos, porque la eficiencia de la búsqueda de alimento se ve afectada negativamente por el ruido, lo que resulta en niveles de actividad bajos o nulos en ambientes con ruido antropogénico (Lou *et al* 2015; Bunkley *et al* 2015). Es posible que esto es lo que esté ocurriendo en el caso de *M. megalophylla*, que el ruido antropogénico en la ciudad esté funcionando como un filtro para la especie, ocasionando que no haya podido ser detectada acústicamente o colectada con redes de niebla en trabajos realizados en años recientes en la ciudad (Ocampo-Ramírez 2015; Hernández-

Vila, 2015), o bien que su actividad se restrinja principalmente a parques urbanos (Lara-Núñez, 2015).

Gillam y McCracken (2007) observaron que las hembras lactantes de *T. brasiliensis* incrementaron la frecuencia de sus pulsos debido al posible cambio en la dieta (insectos más pequeños) ya que los requerimientos energéticos para la producción de leche son mayores. Así mismo las frecuencias más altas confieren una disminución en la distancia de detección, sin embargo, permite la identificación de presas más pequeñas (Jung *et al.*, 2014). En este estudio no se determinó la composición de la dieta para ninguna de las dos especies (*M. sinaloae* y *M. megalophylla*). Actualmente se está realizando un trabajo acerca de la composición de la dieta de *M. sinaloae* que incluye las etapas reproductivas en la ciudad de Cuernavaca (Hernández-Vila *et al* 2017). No obstante, aún no es posible identificar el sexo de los individuos a través de los pulsos de ecolocación.

Nuestros resultados no asocian el incremento de frecuencias en los pulsos de *M. megalophylla* con el ruido, no obstante, los valores registrados en Cuernavaca son similares a los registrados dentro de la REBIOSH donde no está el factor ruido. Sin embargo, la duración de los pulsos grabados en la Reserva (6.4 ± 0.5 ms) es similar a lo reportado por Orozco-Lugo (2013) 6.9 ms en la REBIOSH y por Briones-Salas (2013) en el estado de Oaxaca 5.55 ± 2.19 ms. La medición de cada componente aunado a la morfología característica de los pulsos de ecolocación (Rydell *et al.*, 2002) permitió la identificación correcta de la especie.

Una posible explicación a la variación en las frecuencias probablemente está asociada a los armónicos. Los armónicos son múltiplos enteros del armónico más bajo o señal fundamental (Jones y Teeling, 2006). En los pulsos de ecolocación de la familia Mormoopidae comúnmente se



emite un armónico fundamental con frecuencias alrededor de 30 kHz seguidos de otros tres armónicos que van de los 60 a 120 kHz (Griffiths, 1978), estructuras especializadas en la laringe de los mormoópidos amplifican el segundo armónico (60 kHz) pudiendo suprimir la señal fundamental (Griffiths, 1978).

Para este trabajo se midió el segundo armónico ya que en el espectrograma el armónico fundamental o primer armónico fue imperceptible visualmente. Esto se observó en las secuencias grabadas para Cuernavaca en los sitios de Acapantzingo, Palmas y Galerías así como en las grabaciones hechas sobre el camino a la comunidad de El Limón.

La incidencia en la emisión de armónicos depende del tipo de ambiente de forrajeo y del posicionamiento del micrófono ultrasónico hacia el murciélago (Fenton *et al.*, 2011). En espacio abierto algunas especies pueden emitir señales multiarmónicas de banda estrecha, usualmente están dominadas por armónicos que no son los fundamentales (Jones y Teeling, 2006). *Eptesicus fuscus* mostró tres armónicos superiores del fundamental cuando fue grabado en espacios cerrados (Fenton *et al.*, 2011), en las grabaciones hechas dentro de la estación biológica se observó la presencia de dos armónicos por encima del fundamental para *M. megalophylla*, mientras que en las grabaciones hechas en espacio abierto solo se observó la presencia del segundo armónico. Al forrajear en espacio abierto *E. fuscus* cambió la emisión de sus armónicos ya que solo se observó un armónico superior a la señal fundamental (Fenton *et al.*, 2011).

Es importante la realización de estudios que permitan determinar las diferencias en las frecuencias de los pulsos de *M. megalophylla*, incluso presentes en el hábitat no urbano. Análisis a nivel genético han demostrado que la variación intraespecífica en los pulsos de ecolocación es debido a la existencia de especies crípticas (Barratt *et al.*, 1997).



9. CONCLUSIONES

El incremento en la amplitud de los pulsos implica un mayor gasto energético.

El consumo de energía extra podría reducir el tiempo invertido en el forrajeo, lo que implicaría una alimentación deficiente provocando una disminución en la masa corporal de los individuos haciéndolos susceptibles, por ejemplo, a enfermedades.

Este trabajo presenta las primeras pruebas del efecto del ruido antropogénico como un factor de variación en los pulsos de ecolocación. Sería importante la realización de más estudios como éste abarcando a otras especies, principalmente las que presentan pulsos de ecolocación de baja frecuencia y ver cómo éstas están respondiendo ante el ruido antropogénico cada vez más intenso y creciente como resultado de la expansión urbana.

Es importante un cambio en los hábitos de transporte en las ciudades, la reducción en el uso de vehículos particulares no solo disminuiría la carga vehicular y por ende la intensidad del ruido ambiental, también contribuiría con la reducción de contaminantes. No obstante, una ciudad como Cuernavaca no cuenta con las políticas necesarias para el uso adecuado de otro tipo de transportes.

Si bien para este estudio se trabajó principalmente con el ruido generado por el tráfico vehicular, sin embargo, no es el único sonido dentro de las ciudades por ejemplo están los referentes a tráfico aéreo, vocalizaciones de otros animales, música, sirenas, y máquinas de construcción. El poder obtener medidas más específicas sobre la intensidad del ruido antropogénico en su conjunto ayudaría a obtener resultados precisos sobre el efecto del ruido no solo en murciélagos, sino para otras especies.



10. LITERATURA CITADA

- Altringham JD. 1996.** Echolocation. Altringham, J. D, ed. *Bats Biology and Behaviour*. Oxford University Press, New York, E.U: 79-113.
- Altringham JD, Kerth G. 2016.** Bats and Roads. En: Voigt CC, Kingston T, eds. *Bats in the Anthropocene: Conservation of Bats in a Changing World*. Springer Cham Heidelberg New York Dordrecht London: 35-62.
- Au WWL, Carder DA, Panner RH, Scronce BL. 1985.** Demonstration of adaptation in beluga whale echolocation signals. *J Acoustic Soc. Am.* **77**: 726-730.
- Ávila-Flores R, Fenton MB. 2005.** Use of spatial features by foraging insectivorous bats in large urban landscape. *Journal of Mammalogy* **86**: 1193-1204.
- Barber JR, Crooks KR, Fristrup KM. 2009.** The costs of chronic noise exposure for terrestrial organisms. *Trends in Ecology and Evolution* **25**: 180-189.
- Barratt EM, Deaville R, Burland TM et al. 1997.** DNA answers the call of pipistrelle bat species. *Nature* **387**: 138-139.
- Briones-Salas M, Peralta-Pérez M, García-Luis M. 2013.** Acoustic characterization of new species of bats for the State of Oaxaca, Mexico. *THERYA* **4**: 15-32.
- Brumm H, Zollinger SA. 2017.** Vocal plasticity in a reptile. *Pro. R Soc. B* **284**: 1-6.
- Bunkley JP, Barber JR. 2015.** Noise Reduces Foraging Efficiency in Pallid Bats (*Antrozous pallidus*). *Ethology* **121**: 1116-1121.



- Bunkley JP, McClure CJW, Kleist NJ, Francis CD, Barber JR. 2015.** Anthropogenic noise alters bat activity levels and echolocation calls. *Global Ecology and Conservation* **3**: 62-71.
- Comisión Nacional del Agua (CONAGUA). 2012.** Programa hídrico regional visión 2030. Región hidrológico-administrativa VI Río Bravo. SEMARNAT. México.
- De Camargo, B. 2004.** Estrés, Síndrome General de Adaptación o Reacción General de Alarma. *Revista Médico Científica* **17**: 78-86.
- Denzinger A, Schnitzler HU. 2013.** Bat guilds, a concept to classify the highly diverse foraging and echolocation behaviors of microchiropteran bats. *Frontiers in Physiology* **4**: 1-15.
- Ditchkoff SS, Saalfeld ST, Gibson CJ. 2006.** Animal behavior in urban ecosystems: Modifications due to human-induced stress. *Urban Ecosystem* **9**: 5-12.
- Dorado O, Flores-Castorena A, Jesús-Almonte JM, Arias DM, Martínez-Alvarado D. 2012.** *Arboles de Cuernavaca nativos y exóticos* 1.er ed. Trópico Seco Ediciones: Universidad Autónoma del Estado de Morelos.
- Faeth SH, Bang C, Saari S. 2001.** Urban biodiversity: patterns and mechanisms. *Annals of the New York Academy of Sciences* **1223**: 69-81.
- Fenton MB. 2002.** Bat natural history and echolocation. En: Brigman, RM, Kalko EKV, G. Jones, Parsons S, Limpens HJGA, eds. *Bat Echolocation in Research tools, techniques and analysis* Austin Texas, E.U: 6-9.
- Fenton MB, Skowronski MD, McGuire LP, Faure PA. 2011.** Variation in the use of Harmonics in the Calls of Laryngeally Echolocating Bats. *Acta Chiroptologica* **13**: 169-178.



- Gillam EH, McCracken GF. 2007.** Variability in the echolocation of *Tadarida brasiliensis*: effects of geography and local acoustic environment. *Animal Behavior* **74**: 277-286.
- Gillam EH, McCracken GF, Westbrook JK, Lee Y, Jensen ML, Basley BB. 2009.** Bats aloft: variability in echolocation call structure at high altitudes. *Behav Ecol Socobiol* **64**: 69-79.
- Griffiths TA. 1978.** Modification of M. cricothyroideus and the Larynx in the Mormoopidae, with Reference to Amplification of High-Frequency Pulses. *Journal of Mammalogy* **59**: 724-730.
- Grimm NB, Faeth SH, Golubiewski NE, Redman CL, Wu J, Bai X, Briggs JM. 2008.** Global Change and the Ecology of Cities. *Science* **319**: 756-760.
- Grilliot ME, Burnett SC, Mendonca MT. 2014.** Sex and season differences in the echolocation pulses of big brown bats (*Eptesicus fuscus*) and their relation to mating activity. *Acta Chiropterologica* **16**: 379-386.
- Hendriks R, Rymer B, Bueheler D, Andrews J. 2013.** Technical Noise Supplement: to the Traffic Noise Protocol. California, E.U.
- Hernández- Jáuregui DMA, Galindo-Maldonado F, Valdez-Pérez R, Romano-Pardo M, Schuneman de Aluja A. 2005.** Cortisol en saliva, orina y heces: evaluación no invasiva en mamíferos silvestres. *Vet. Méx* **36**: 325-337.
- Hernández-Vila HR. 2015.** *Diversidad de murciélagos en áreas verdes urbanas en la ciudad de Cuernavaca Morelos.* Tesis, Universidad Autónoma del Estado de Morelos.
- Hernández-Vila HR, Orozco-Lugo CL, Guillén AS. 2017.** Dieta de *Molossus sinaloae* (CHIROPTERA: MOLOSSIDAE) en un ambiente urbano, variación entre sexos, estados



reproductivos y estaciones. II Congreso Latinoamericano y del Caribe de Murciélagos, Libro de resúmenes.

Instituto Nacional de Estadística y Geografía (INEGI). 2009. Prontuario de información geográfica municipal de los Estados Unidos Mexicanos. Cuernavaca, Morelos, México.

Instituto Nacional de Estadística y Geografía (INEGI). 2015. Panorama sociodemográfico de Morelos. <<http://cuentame.inegi.org.mx>>. Fecha de consulta, junio 03 del 2017.

Iñiguez-Dávalos LI. 2014. *Mormoops megalophylla*. En: Ceballos, G, ed. *Mammals of Mexico*. Johns Hopkins University Press: 744-745.

Jiang T, Wu H, Feng J.2015. Patterns and causes of geographic variation in bat echolocation pulses. *Integrative Zoology* **10**: 241-256.

Jones G, Teeling EC. 2006. The evolution of echolocation in bats. *TRENDS in Ecology and Evolution* **21**: 150-156.

Jung K, Molinari J, Kalko EKV. 2014. Driving Factors for the Evolution of Species-Specific Echolocation Call Design in New World Free-Tailed Bats (Molossidae). *PLoS ONE* **9**:1-9.

Kight CR, Swaddle JP. 2011. How and why environmental noise impacts animals: an integrative, mechanistic review. *Ecology Letters* **14**:1052-1061.

Kunz TH, Lumsden L F. 2003. Ecology of Cavity and Foliage Roosting Bats. En: Kunz, T. H, Fenton MB, eds. *Bat Ecology*. University of Chicago Press, Chicago: 3-69.

Kunz TH, Braun de Torrez E, Bauer D, Lobova T, Fleming TH. 2011. Ecosystem services provided by bats. *Annals of the New York Academy of Sciences* **23**: 1-38.



- Lara-Núñez, A. C. 2015.** *Patrones de actividad y riqueza de especies de murciélagos insectívoros aéreos en el paisaje urbano de Cuernavaca.* Tesis, Universidad Autónoma del Estado de Morelos.
- Luniak, M. 2004.** Synurbization – adaptation of animal wildlife to urban development En: Shaw WW, Harris LK, VanDruff L, eds. Proceedings 4th International Urban Wildlife in Symposium. University of Arizona: 50–55.
- Luo JB, Siemers M, Koselj K. 2015.** How anthropogenic noise affects foraging. *Global Change Biology* **21**: 3278-3289.
- McEwen BS, Wingfield JC. 2003.** The concept of allostasis in biology and biomedicine. *Hormones and Behavior* **43**: 2-15.
- Mckinney ML. 2002.** Urbanization, Biodiversity, and Conservation. *BioScience* **52**: 883-890.
- McKinney ML. 2006.** Urbanization as a major cause of biotic homogenization. *Biological Conservation* **127**:247-260.
- Metzner W, Müller R. 2016.** Ultrasound production, Emission and Reception. En: Fenton MB, Grinell AD, Popper AN, Fay RR, eds. *Bat Bioacoustics*, Spriger: New York, 55-91.
- Mitrovic, IMD. 2005.** Introduction to the Hypothalamo-Pituitary-Adrenal (HPA) Axis. Lecture. University of California.
- Moss CF, Redish D, Gouden C, Kunz TH.1997.** Ontogeny of vocal signals in the little brown bat, *Myotis lucifugus*. *Animal Behaviour* **54**: 131-141.



- Nemeth E, Pieretti N, Zollinger SA, Geberzahn N, Partecke J, Miranda AC, Brumm H. 2013.** Bird song and anthropogenic noise: vocal constraints may explain why birds sing higher frequency songs in cities. *Proc. R Soc. B* **280**: 1-7.
- Neuweiler G. 1980.** How bats detect flying insects. *Physics Today*, doi: 10.1063/1.2914210.
- Neuweiler G. 2000.** Echolocation. En: Neuweiler G, ed. *The biology of bats*. Oxford University Press. Oxford & NY, 140-206.
- Ocampo-Ramírez CM. 2015.** *Efecto de la cobertura urbana sobre la actividad de murciélagos insectívoros aéreos en las barrancas de Cuernavaca*. Tesis, Centro de Investigación en Biodiversidad y Conservación.
- Ord TJ, Stamps JA, Losos JB. 2010.** Adaptation and plasticity of animal communication in fluctuating environments. *Evolution* **64**: 3134-3148.
- Orozco-Lugo CL. 2007.** *Efecto de la perturbación del hábitat en la comunidad de murciélagos insectívoros de selva baja caducifolia*. Tesis, Universidad Nacional Autónoma de México.
- Orozco-Lugo L, Guillén-Servet A, Valenzuela-Galván D, Arita HT. 2013.** Descripción de los pulsos de ecolocalización de once especies de murciélagos insectívoros aéreos de una selva baja caducifolia en Morelos, México. *THERYA* **4**: 33-46.
- Ramírez-Pulido J, González-Ruiz N, Gardner AL, Arroyo-Cabrales J. 2014.** List of Recent Land Mammals of Mexico, 2014. Museum of Texas Tech University.
- Read J, Jones G, Radford AN. 2014.** Fitness costs as well as benefits are important when considering responses to anthropogenic noise. *Behavioral Ecology* **25**:4-7.

- Rizo-Aguilar A. 2008.** *Descripción y análisis de los pulsos de ecolocación de 14 especies de murciélagos insectívoros aéreos del estado de Morelos.* Tesis, Instituto de Ecología.
- Romero LM. 2004.** Physiological stress in ecology: lessons from biomedical research. *TRENDS in Ecology and Evolution* **19**: 249-255.
- Rydell J, Arita HT, Santos M, Granados J. 2002.** Acoustic identification of insectivorous bats (order Chiroptera) of Yucatan, Mexico. *J. Zool., Lond* **257**: 27-36.
- Sánchez O, Pineda MA, H. Benítez, Berlanga H, Rivera-Téllez E. 2015.** Guía de identificación para las aves y mamíferos silvestres de mayor comercio en México protegidos por la CITES, 2a. Edición, Volumen II: MAMÍFEROS. Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales (SEMARNAT) - Comisión Nacional Para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad (CONABIO), México, D. F.
- Santos GM. 2014.** *Molossus sinaloae*. En: Ceballos Gd, ed. *Mammals of Mexico* Johns Hopkins University Press: 770-771.
- Sapolsky RM, Romero ML, Munck AU. 2000.** How Do Glucocorticoids Influence Stress Responses? Integrating Permissive, Suppressive, Stimulatory, and Preparative Actions. *Endocrine Reviews* **21**:55-89.
- Schaub A, Ostwald J, Siemers BM. 2011.** Foraging bats avoid noise. *The Journal of Biology* **211**: 3174-3180.
- Schnitzler HU, Kalko EKV. 2001.** Echolocation by Insect-Eating Bats. *BioScience* **51**: 557-569.
- Schnitzler HU, Moss CF, Denzinger A. 2003.** From spatial orientation to food acquisition in echolocating bats. *Trends Ecology &Evolution* **18**: 386-394.



- Shen JX, Xu ZM. 2016.** The Lombard effect in male ultrasonic frogs: Regulating antiphonal signal frequency and amplitude in noise. *Nature* **6**: 1-8.
- Slabbekoorn H, Peet M. 2003.** Birds sing at a higher pitch in urban noise. *Nature* **424**: 267.
- Threlfall CG, Law B, Banks PB. 2012.** Sensitivity of insectivorous bats to urbanization: Implications for suburban conservation planning. *Biological Conservation* **146**: 41-52.
- Tressler J, Smotherman MS. 2009.** Context-dependent effects of noise on echolocation pulse characteristics in free-tailed bats. *J Comp Physiol A* **195**: 923-934.
- Tyack PL, Janik VM. 2013.** Effects of noise on acoustic signal production in marine mammals. En: Brumm H, ed. *Animal communication and noise*. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg: 251-271.
- Varela-Boydo F. 2017.** *Descripción de los sonidos de ecolocación de Myotis velifer (Chiroptera: Vespertilionidae) durante el crecimiento posnatal*. Tesis, Universidad Autónoma del Estado de Morelos.
- Voigt-Heucke SL, Taborsky M, Dechmann DKN. 2010.** A dual function of echolocation: bats use echolocation calls to identify familiar and unfamiliar individuals. *Animal Behaviour* doi:10.1016/j.anbehav.2010.03.025.
- West EW. 2016.** Technical Guidance for Assessment and Mitigation of the Effects of Traffic Noise and Road Construction Noise on Bats. California, E.U.
- Wingfield JC, Hunt K, Breuner C, et al. 1997.** Environmental stress, field endocrinology, and conservation biology. En: Clemmons JR, Buchhoiz R, eds. *Behavioral Approaches to Conservation in the Wild*. London: Cambridge University Press, 95-131.



Wingfield JC. 2003. Control of behavioural strategies for capricious environments. *Animal Behaviour* **66**: 807-816.

Wingfield JC, Romero LM. 2011. Adrenocortical responses to stress and their modulation in free-living vertebrates. En: *Coping with the Environment: Neural and Endocrine Mechanisms* New York: Oxford Univ. Press: 211-234.

Zaffaroni VC, Both C, Cechin S, Antunes R, Borges-Martinis M. 2017. Effects of traffic noise on the calling behavior of two Neotropical hylid frogs. *PLoS ONE* **12**: 1-14.



CAPITULO II

Evaluación de las concentraciones de cortisol en murciélagos insectívoros mediante la colecta de excretas como un método no invasivo



1. INTRODUCCIÓN

Los organismos de vida libre constantemente enfrentan perturbaciones en su entorno, compuestas por eventos rápidos como el ataque de depredadores o eventos de mayor tiempo como la falta de alimento. Por ello han desarrollado estrategias conductuales y fisiológicas que les ayudan a responder efectivamente ante estos cambios (Wingfield, 2003). A nivel fisiológico, esta respuesta puede ser medida por las concentraciones de hormonas glucocorticoides, lo que ayuda a determinar el efecto de los factores perturbantes (también llamados estresores) en los organismos (Romero, 2004; Wingfield *et al.*, 1997).

1.1 Mecanismo fisiológico del estrés

Hormonas glucocorticoides

Dentro del sistema endócrino se integran diversas glándulas y tejidos que secretan hormonas, las cuales cumplen el papel de mensajeros químicos que regulan diferentes funciones en el organismo. Las hormonas viajan a través del torrente sanguíneo actuando sobre un órgano específico o blanco provocando cambios fisiológicos en el metabolismo, desarrollo, crecimiento, reproducción, así como en la conducta de los individuos (Reeder y Widmaier, 2009).

La corteza suprarrenal secreta hormonas esteroides las cuales derivan del colesterol estas incluyen a los glucocorticoides: cortisol y corticosterona que actúan sobre el metabolismo de la glucosa (Spolsky 1999; Mitrovic, 2005).



Eje Hipotálamo-Hipófisis-Adrenales

En conjunto el sistema endocrino, el sistema nervioso central (SNC) y el sistema circulatorio, mantienen las correctas funciones del cuerpo. La síntesis y liberación de hormonas está directamente relacionada con el SNC. El sistema circulatorio tiene la importante función de transportar las hormonas, ya que viajan a través de la sangre para actuar sobre el órgano blanco. El vínculo principal entre el SNC y el sistema endócrino es el hipotálamo encargado de controlar la función de las glándulas endocrinas (Mitrovic, 2005).

1.2 Efectos de los glucocorticoides

Los glucocorticoides (GC) tienen un importante papel en la movilización de fuentes energéticas, en la respuesta inmunitaria e inflamatoria de los tejidos. Se considera al cortisol como una hormona esencial ya que ejerce acciones permisivas, la presencia de la hormona permite el actuar de otras. Además, el cortisol libre también actúa como inhibidor de ACTH a través de la retroalimentación negativa (Mitrovic, 2005).

La síntesis, secreción y excreción de los GC está ligada a las hormonas sexuales de hembras y machos que modifican la respuesta del eje hipotálamo-hipófisis-adrenal al estrés (vonderOhe y Servheen, 2002). Por ejemplo, el estrógeno altera el metabolismo hepático e intestinal de los GC interfiriendo con sus concentraciones (vonderOhe y Servheen, 2002). La testosterona interviene con el incremento de la sensibilidad adrenal a ATCH por lo que se incrementa la liberación de GC (Colby y Kitay, 1972)



La mayor parte del cortisol circulante en el organismo es transportada gracias a la unión con la proteína transcortina, la cual se produce en el hígado por estimulación de los estrógenos aumentando sus niveles plasmáticos durante el periodo de gestación. El aumento de transcortina provoca la unión de más cortisol aumentando la secreción de ACTH, dando como resultado concentraciones elevadas de cortisol en hembras preñadas, pero no relacionadas como una respuesta a estrés crónico (Mitrovic, 2005).

Finalmente, cuando un organismo percibe un estímulo (estresor) dado por factores internos o externos, bióticos o abióticos, ocurren cambios a nivel fisiológico y conductual que ayudaran al individuo a hacer frente a estos estímulos, estos cambios son consecuencia de la liberación de las hormonas glucocorticoides (Romero, 2004).

1.3 Fisiología de la conservación

La fisiología de la conservación se define como el estudio de las respuestas fisiológicas de los organismos a la alteración humana del medio ambiente (Wikelski y Cooke, 2006). A través de estudios neuroendocrinos se puede evaluar y cuantificar la secreción de glucocorticoides, como respuesta de los organismos al estrés agudo o crónico, principalmente vinculados a factores antropogénicos y como éstos determinarán la supervivencia de los individuos. Se espera que este conocimiento permita el desarrollo de estrategias para minimizar el impacto de los factores antropogénicos (Wikelski y Cooke, 2006).



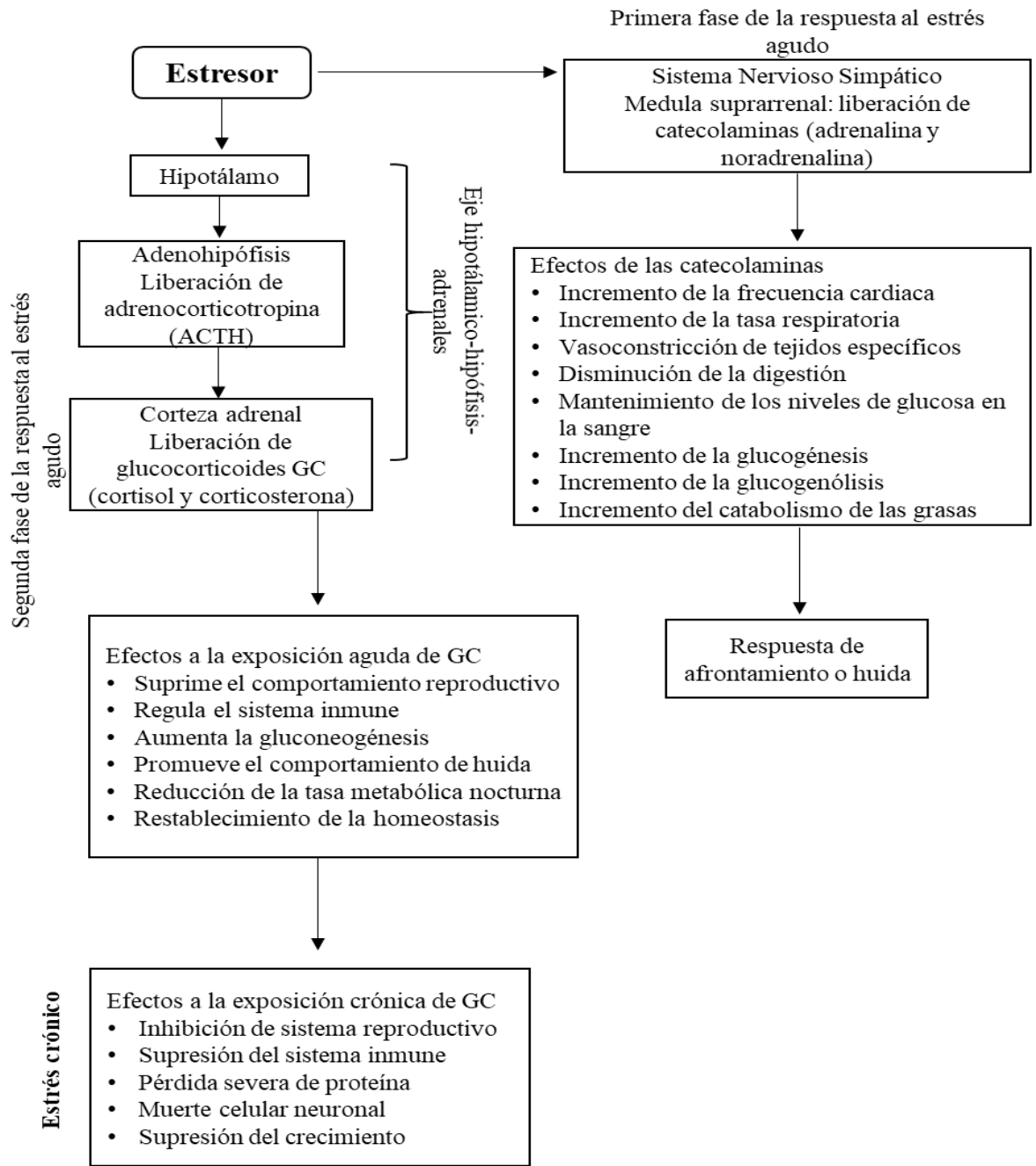


Figura 12. Mecanismo fisiológico de estrés (modificado de Ellis *et al.*, 2012). Durante la primera fase de estrés agudo, la respuesta inmediata a la percepción del estímulo es la secreción de catecolaminas por parte del sistema nervioso simpático, lo que genera una respuesta de afrontamiento o huida. Durante la segunda fase del estrés agudo, la activación del eje hipotalámico-hipofisiario-adrenal liberará hormonas glucocorticoides que ayudaran a la supervivencia del individuo. La exposición crónica de glucocorticoides o estrés crónico provocará efectos deletéreos en los individuos.



1.4 Las heces fecales como método no invasivo

La cuantificación de hormonas glucocorticoides permite conocer el estado del estrés fisiológico de los individuos (Valdespino, 2011). En la mayor parte de las especies de mamíferos y peces la hormona liberada es el cortisol, mientras que en aves, reptiles, anfibios y roedores liberan corticosterona (Romero, 2004).

Para determinar las concentraciones de glucocorticoides se utilizan distintos tipos de material biológico, históricamente ha sido preferente el uso de sangre (Reeder y Widmaier, 2009), sin embargo, el uso de muestras de sangre es considerado un método invasivo, por lo que los individuos responderán a la manipulación con la secreción de glucocorticoides alterando los resultados (Romero y Reed, 2005). La obtención de muestras que implican un manejo menos invasivo de los organismos como pelo, orina, y excretas ha comenzado a utilizarse más ampliamente (Reeder y Widmaier, 2009; Sheriff *et al.*, 2011; Brearley *et al.*, 2012). El nivel hormonal concentrado en este tipo de muestras es el que previamente ha circulado en el organismo y no en respuesta al estímulo percibido al momento de la captura (Reeder y Widmaier, 2009; Sheriff *et al.*, 2010). La colecta de excretas confiere la ventaja de evitar la captura de los individuos, principalmente los que no son fácilmente observables (Valdespino *et al.*, 2007; Valdespino, 2011).

Los trabajos donde se emplea excretas como muestras biológicas para determinar las concentraciones de las hormonas del estrés en organismos de vida libre, por métodos no invasivos, hasta la fecha son las más frecuentes; (Martínez-Mota *et al.*, 2007; Creel *et al.*, 2002; Rizo-Aguilar *et al.*, 2014).



1.5 Valoración del cortisol

La valoración de hormonas esteroideas como lo son los glucocorticoides pueden ser realizadas utilizando, por ejemplo, el radioinmunoensayo (RIA), el enzimoimmunoanálisis (EIA; Sheriff *et al.*, 2011) o el quimioimmunoanálisis (CLIA). En el primero se requiere un isótopo radioactivo el cual genera una señal radiactiva para cuantificar los niveles de glucocorticoides. Para los EIA se requieren enzimas que actuarán como catalizadores, esto quiere decir que acelerarán la reacción química para generar una señal colorimétrica para la cuantificación de los niveles de glucocorticoides (Sheriff *et al.*, 2011). El CLIA está basado en el principio de quimioluminiscencia, análogo a los radioinmunoensayos de fase sólida (Wood *et al.*, 1984), en donde la reacción produce una señal luminosa medida por un fotomultiplicador que indicará la concentración de determinados anticuerpos.



2. ANTECEDENTES

2.1 Murciélagos como grupo de estudio

Los murciélagos son considerados como indicadores ecológicos de la calidad del hábitat, son sensibles a factores de perturbación antropogénica tales como la urbanización, la agricultura, la deforestación (Jones *et al.*, 2009). La pérdida, fragmentación y degradación de los hábitats someten a los organismos (no solo a los murciélagos) a estresores como la limitación de recursos alimenticios, el incremento en la demanda energética para su búsqueda, muerte de los individuos jóvenes y cambios conductuales (Ellis *et al.*, 2012).

Se han realizado estudios en murciélagos donde a través del uso de hormonas glucocorticoides se evalúa la respuesta fisiológica a factores de reproducción (Reeder *et al.*, 2004), a la perturbación de refugios en hábitats urbanos (Allen *et al.*, 2011), a los efectos causados por enfermedades (Davy *et al.*, 2016) y a la fragmentación del hábitat; (Seltmann *et al.*, 2017). En la mayor parte de estos estudios se ha utilizado la sangre como muestra biológica. Sin embargo, para obtener una muestra de sangre que no refleje el estrés inmediato causado por la manipulación de los individuos se recomienda que sea tomada en un tiempo menor a 3 minutos (Romero y Reed, 2005).

Debido a los hábitos nocturnos los murciélagos es muy difícil obtener muestras de excretas por simple observación o seguimiento de los individuos (Valdespino, 2011), además la obtención de las excretas directamente del refugio es poco recomendable por la cantidad de individuos y especies diferentes que en el habitan. En este trabajo se propuso obtener excretas como muestra biológica para determinar la concentración de cortisol de diferentes especies de murciélagos



insectívoros, a través de un método menos invasivo que el que implica una toma de muestra sanguínea.

Si bien nuestra propuesta implica la captura del individuo se trató de que la manipulación fuese en el menor tiempo posible. Debido a la escasa información reportada acerca del estrés fisiológico en murciélagos, los resultados servirán para tener valores de referencia de cortisol para diferentes especies de murciélagos insectívoros y éstos sean un soporte de información para futuros estudios.

3. OBJETIVO

Cuantificar y comparar las concentraciones de cortisol metabólico en especies, sexos y familias de murciélagos insectívoros.



4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 Sitios de colecta

Cuernavaca

Cuernavaca, capital del estado de Morelos (Figura 13), cuenta con una superficie de 151.2 km², y posee 366 321 habitantes (INEGI, 2015). El clima dominante es cálido subhúmedo con una temperatura media anual de 21.1°C, en las partes altas del municipio a 2500 m.s.n.m el clima es semifrío (IMTA, 2014). La ciudad se caracteriza por la transición entre sus principales tipos de vegetación, el bosque templado del norte de pino y encino y la selva baja caducifolia, además de las barrancas que atraviesan la ciudad (Dorado *et al.*, 2012).

La colecta de las especies se realizó en la ciudad de Cuernavaca, dentro de dos parques urbanos, el Jardín Borda, ubicado en el centro de la ciudad, con una superficie de 29343.2 m² (18°55'19.29'' N, 99°14'17.30'' O) y el Parque Alameda Luis Donaldo Colosio Murrieta, con una superficie de 67000 m², ubicado en el límite de Cuernavaca y el municipio de Jiutepec (18°55'07.28'' N, 99°11'30.83'' O).

Reserva de la Biosfera Sierra de Huautla (REBIOSH)

La REBIOSH se ubica al sur del estado de Morelos (Figura 13), cuenta con una superficie total de 59, 030 ha, y está dividida en dos unidades operativas Sierra de Huautla y Cerro Frío. Su rango altitudinal va de los 700 a 2,200 m.s.n.m. El principal tipo de vegetación es la selva baja caducifolia o bosque tropical caducifolio (Rzedowski, 1978). Presenta una marcada estacionalidad climática donde la época seca se puede prolongar hasta siete meses, la temperatura promedio anual es de 20 a 29 °C (Dorado *et al.*, 2005).



En la REBIOSH destaca la presencia de minas, ahora abandonadas las cuales sirven de refugios para diversas especies de animales (Dorado *et al*, 2005).

Para la elección de los sitios de colecta en el hábitat natural se tomó como referencia el trabajo de Ávila-TorresAgatón realizado en la REBIOSH (2008) quien reportó diferentes especies de murciélagos insectívoros aéreos que utilizan las minas como refugio. Se seleccionaron tres minas Mina La Pinta (18°27'46.7" N, 99°00'53.0" O), Mina El Clarín (18°27'03.8" N, 99°00'55.4" O), Mina Pájaro Verde (18°26'31.4" N, 99°02'48.1" O) y una cueva, Agua Fría (18°32'32.7" N, 98°59'56.9" O) ubicadas dentro de la subunidad Sierra de Huautla.

El Texcal

El parque Estatal El Texcal se encuentra ubicado en tierras comunales dentro del municipio de Jiutepec, Morelos (Figura13). Cuenta con una superficie de 258,93 ha, con un rango altitudinal de 1350 a 1450 m.s.n.m. Presenta una temperatura promedio anual de 20.8 ° C, el tipo de clima es semicálido, subhúmedo. La vegetación dominante es el bosque tropical caducifolio. A pesar de que el Parque es colindante con empresas químicas, carreteras, zonas urbanas y unidades habitacionales funge como corredor biológico por la conexión con dos importantes áreas naturales protegidas del estado, El Parque Nacional El Tepozteco y la Reserva Estatal Sierra Monte Negro. La colecta se realizó dentro del área del balneario (18°53'57.62" N, 99°08'53.99" O).



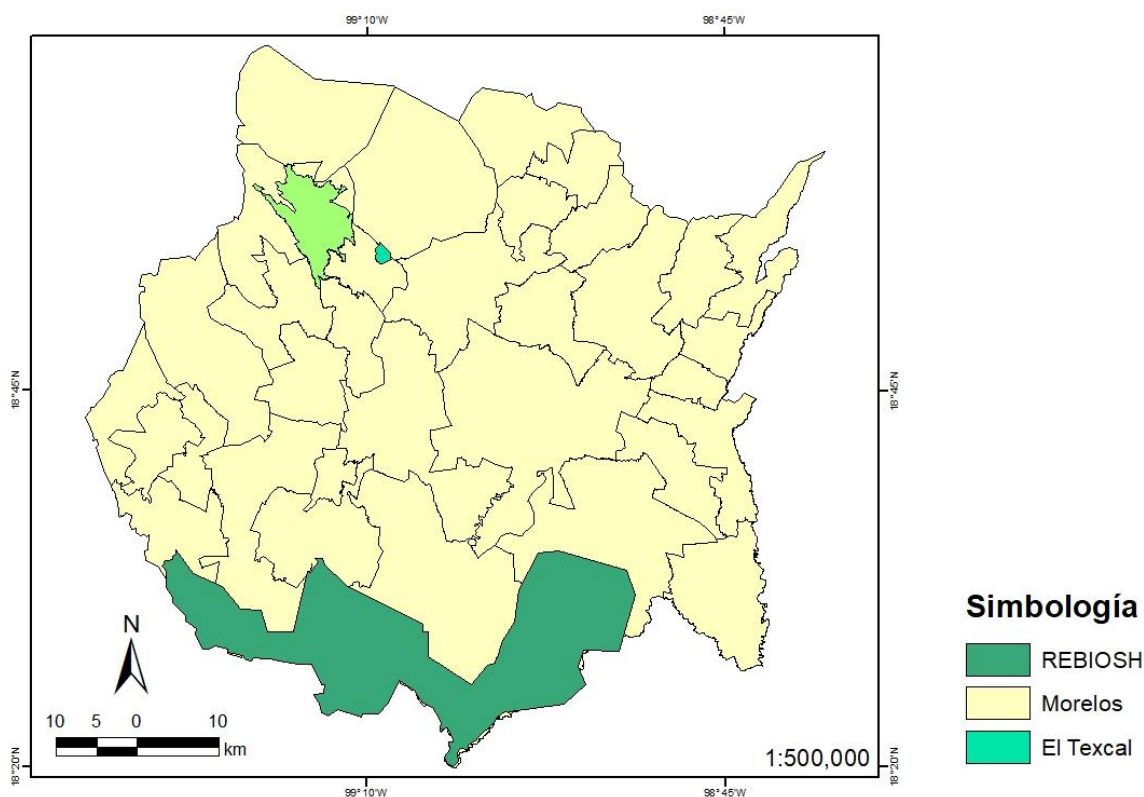


Figura 13. Ubicación de los sitios de muestreo.

4.2 Colecta de los individuos

La colecta de los individuos se efectuó una vez por mes a lo largo de un año de octubre 2016 a octubre 2017, por medio de redes de niebla de 6 y 12 metros, las cuales se colocaron atravesando cuerpos de agua dentro de los parques y en las proximidades a la salida de refugios cavernícolas. Los individuos se identificaron a nivel de especie utilizando la clave de campo de Medellín *et al.* (2007). Se registraron datos sobre el sexo, condición reproductiva y edad. Para la condición reproductiva en hembras se observó si estaban o no preñadas, lactantes o no lactantes por medio de la observación de las mamas. Para los machos fue por medio de la observación de los

testículos inguinales o en el escroto. La edad de los individuos fue determinada por el grado de mineralización ósea de las placas epifisiarias de las falanges de la mano (Brunet-Rossinni y Wilkinson, 2009).

4.3 Obtención de las muestras

Cada individuo capturado se colocó dentro de un saco de manta por un periodo máximo de dos horas con el fin de no incrementar el estrés causado por la captura. Durante ese periodo los sacos eran revisados cada 30 minutos para comprobar si había excretas. En caso de obtener las excretas antes de las dos horas los individuos eran liberados. Las muestras obtenidas fueron colocadas en tubos Eppendorf con etanol al 70%, independientemente del número de pellets obtenidos por individuo del cual no se obtuvo un número constante. Al igual que los sacos, éstos fueron identificados con un código especificando el sexo, condición reproductiva y edad de los individuos. Posteriormente las muestras fueron almacenadas en refrigeración a 4° C hasta su procesamiento.

4.4 Proceso de extracción del cortisol

De cada una de las muestras se extrajo el líquido homogenizado que se transfirió a tubos Eppendorf vacíos, etiquetados con el mismo código de la muestra original. Los tubos con la parte sólida de las muestras se dejaron hasta la evaporación total del líquido disolvente para obtener el peso seco. Se usó la técnica modificada para la cuantificación del cortisol descrita en Soto *et al.*, (2004), se realizó por medio de un análisis inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA, enzyme-



linkedimmunosorbentassay), una técnica de enzimoimmunoanálisis. Se usó un kit DGR Cortisol (DGR Instruments GmbH, Alemania), siguiendo las instrucciones del manual. El kit DGR Cortisol ELISA es un ensayo de fase sólida de inmunoadsorción unido a enzimas basado en el principio de unión competitiva. Los pocillos de la placa están recubiertos con un anticuerpo monoclonal dirigido contra en la molécula cortisol.

Para determinar la concentración de la hormona se utilizó un lector de microplacas calibrado. Los resultados de la tira dados por el lector (ng/mL) se dividieron entre el peso seco de las excretas y éste entre 1000 para obtener $\mu\text{g}/\text{gr}$ de cortisol.

Los análisis se realizaron en el Laboratorio de Ecofisiología Animal del Área de Investigación en Reproducción Animal Asistida del Departamento de Biología de la reproducción de la División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa.

4.5 Análisis estadísticos

Para el análisis estadístico solo se utilizaron las concentraciones de cortisol de los individuos inactivos reproductivamente, ya que el tamaño de muestra para los individuos activos fue reducido.

Los valores de las concentraciones de cortisol por individuo se reportaron como peso seco ($\mu\text{g}/\text{gr}$). A partir de los valores de cortisol de cada individuo, se calcularon estadísticos descriptivos (promedio, mediana y desviación estándar) para cada especie. Previo a los análisis estadísticos inferenciales, se utilizó una prueba de Kolmogorov-Smirnov para evaluar la



normalidad de los datos. Debido a que esta prueba indicó que los datos no tenían una distribución normal, se utilizó la prueba no paramétrica Kruskal-Wallis para evaluar las diferencias en las concentraciones de cortisol entre los sexos, especies y familias de los murciélagos insectívoros aéreos, considerando un alfa de 0.05. estos análisis estadísticos se realizaron en el programa Statistica 7.

5. RESULTADOS

5.1 Colecta de las especies

Se identificaron 13 especies pertenecientes a seis familias. En total se colectaron 83 individuos, de los cuales 32 fueron hembras y 51 machos; siendo 75 individuos adultos. Once de los individuos adultos se encontraron reproductivamente activos, incluyendo a seis hembras preñadas, el resto no presentaron una condición reproductiva activa.

Después de permanecer un máximo de 2 hrs en los sacos, únicamente 43 individuos proporcionaron muestras para análisis, correspondientes a los meses de septiembre, octubre y diciembre del 2016 y enero, febrero y abril del 2017. Las muestras analizadas pertenecen a nueve especies de murciélagos insectívoros aéreos (ver anexo 1). En la Tabla 4 se muestran los estadísticos descriptivos promedio, mediana y desviación estándar para los valores de cortisol de las 43 muestras.

Tabla 4. Estadísticos descriptivos de los valores de cortisol por especie.

Especie	No. Individuos		\bar{X} y desvest cortisol µg/gr	Mediana cortisol µg/gr
	Hembras	Machos		
<i>Balantiopteryx plicata</i>	4	1	573± 792.7	35.1
<i>Tadarida brasiliensis</i>	0	1	13.3	13.3
<i>Molossus sinaloae</i>	6	9	32.2± 63.69	12.3
<i>Myotis californicus</i>	0	1	33.6	33.6
<i>Myotis fortidens</i>	0	1	66.5	66.5
<i>Eptesicus fuscus</i>	1	0	24.3	24.3
<i>Rhogeessa parvula</i>	0	1	1045	1045
<i>Pteronotus davyi</i>	1	9	71.8± 60.8	48.2
<i>Pteronotus parnelli</i>	3	4	81.6± 94.8	26.5
<i>Natalus mexicanus</i>	0	1	5.2	5.2

5.2 Análisis estadísticos

No se encontraron diferencias significativas en las concentraciones del cortisol entre los sexos ($H= 0.323$; $P=0.56$; Figura 13), las familias ($H= 9$; $P= 0.06$; Figura 14) y las especies ($H= 10$; $P= 0.27$; Figura 15).

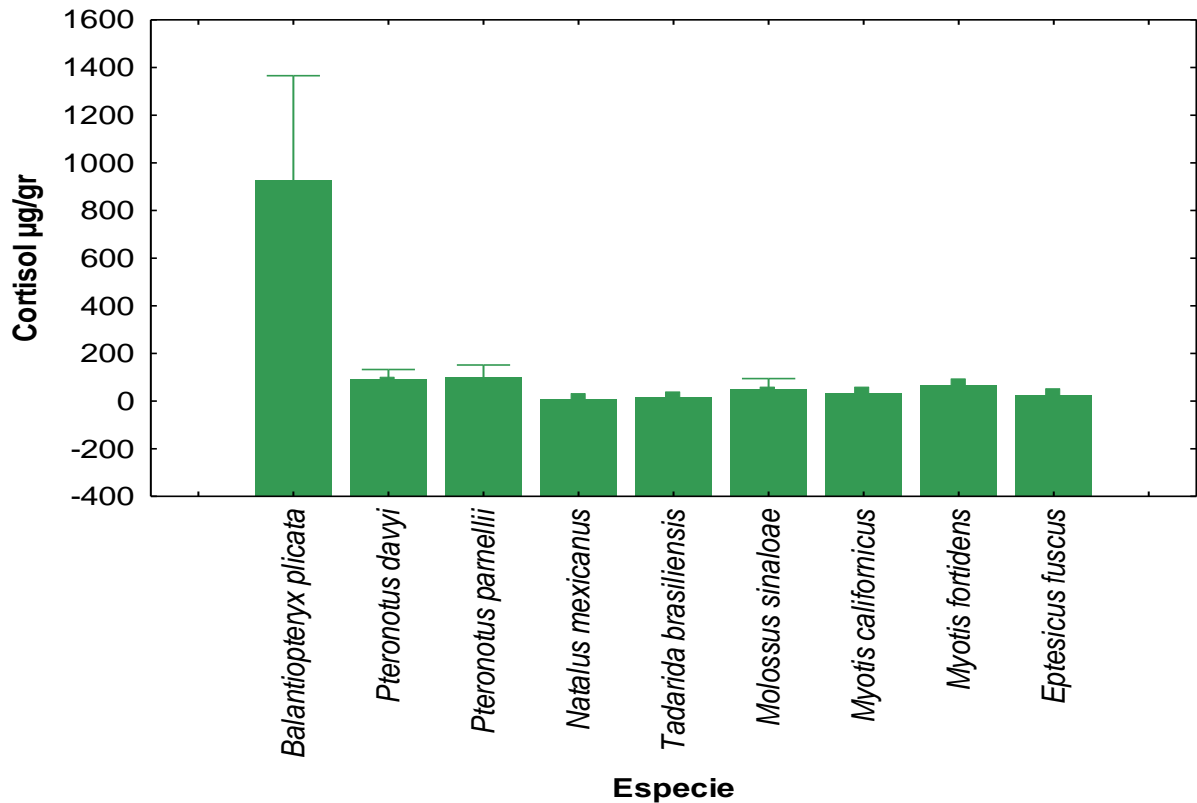


Figura 14. Concentración de cortisol de las nueve especies de murciélagos insectívoros. (promedio \pm error estándar). No existen diferencias significativas entre las especies ($P > 0.05$).

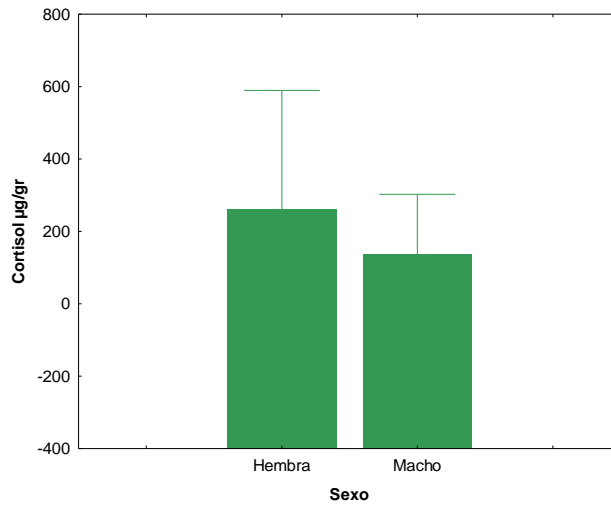


Figura 15. Concentración de cortisol 39 individuos inactivos reproductivamente, 12 hembras y 27 machos de nueve especies de murciélagos insectívoros (promedio \pm error estándar). No existen diferencias significativas entre sexos ($P > 0.05$).

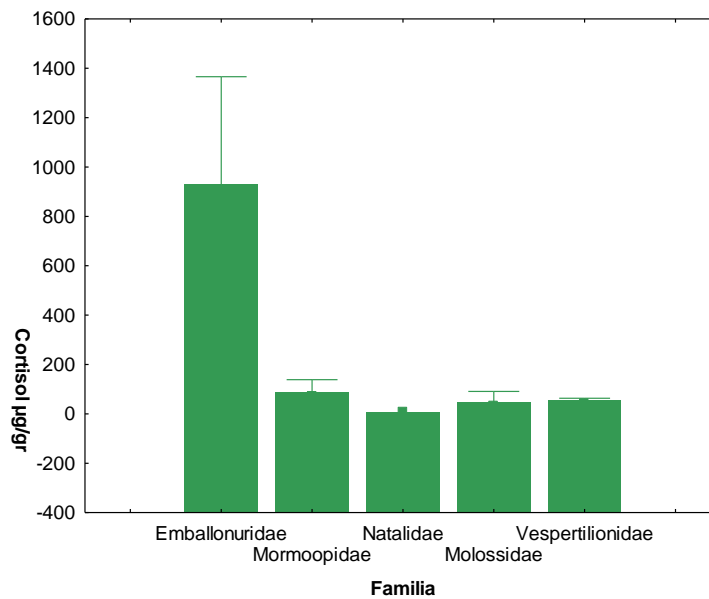


Figura 16. Valores de la concentración de cortisol entre las cinco familias de murciélagos insectívoros (promedio \pm error estándar). No existen diferencias significativas entre las familias ($P > 0.05$).

6. DISCUSIÓN

Este estudio demuestra que es factible el uso de una técnica de muestreo no invasiva para la obtención de muestras biológicas y que no existen diferencias en las concentraciones de cortisol medidas entre sexos, especies y familias de las comunidades de murciélagos estudiadas.

Si bien para este trabajo se requirió capturar a los individuos, lo que descarta un método totalmente no invasivo, las características biológicas del grupo de estudio impiden que se haga seguimiento para coleccionar las excretas sin una manipulación directa. No obstante, el tener capturas también nos permitió tomar datos de edad, sexo y condición reproductiva. y probar el efecto de estos factores sobre las concentraciones de cortisol.

La edad, sexo y estado reproductivo de los individuos también es determinante para la evaluación de las concentraciones de GC (Millsbaugh y Washburn, 2004). En ratones *Mus musculus* los machos presentaron mayores concentraciones de corticosterona en heces que las presentadas por las hembras (Touma *et al.*, 2003). Las ardillas de pino (*Tamias amoenus*) mostraron que durante la lactancia aumentan las concentraciones de GC (Kenagy y Place 2000). En el murciélago *Myotis lucifugus* las concentraciones de GC fueron más altas para las hembras en el periodo reproductivo que para los machos (Reeder *et al.*, 2004). En este trabajo los resultados de la prueba estadística no mostraron diferencias significativas entre sexos además solo se utilizaron las muestras de individuos reproductivamente inactivos por el tamaño de muestra.



Los sitios de estudio en la REBIOSH sirven como refugios multiespecíficos (Ávila-TorresAgatón, 2008), la captura de los individuos se realizó por medio de redes de niebla al momento de la emergencia por lo que fue frecuente capturar a más de un individuo en la red. Esto pudo complicar la obtención de una muestra de sangre en un tiempo menor a tres minutos principalmente cuando no se contaba con el personal suficiente para la manipulación de los individuos. En trabajos anteriores donde se obtuvo muestras de sangre los individuos fueron colectados directamente y al momento de emergencia del refugio habitado por solo la especie de estudio (Reeder *et al.*, 2003; Allen *et al.*, 2011).

En vida libre los animales están expuestos a diferentes estímulos que pueden incrementar las concentraciones de GC, como traumatismos, miedo, cambios de temperatura intensos, choque eléctrico, manejo, contención, anestesia, cirugía, transporte, enfermedades, gestación, modificación del hábitat, exceso de ruido, separación de madre-cría (Hernández-Jáuregui *et al.*, 2005). Previos estudios han demostrado por medio del uso de GC fecales la manera en que diferentes especies responden a agentes estresantes (Creel *et al.*, 2002; Martínez-Mota *et al.*, 2007; Rizo-Aguilar *et al.*, 2014).

En este trabajo los resultados estadísticos no mostraron diferencias significativas en las concentraciones de cortisol entre los sexos, las especies y las familias. A diferencia de estudios anteriores que han evaluado estrés en ubicaciones contrastantes, en este trabajo no pudimos obtener muestras de las mismas especies en los diferentes sitios de muestreo por lo que las comparaciones de concentraciones en una misma especie entre hábitats no fueron posibles. Los resultados no nos permiten asumir que las especies estén respondiendo al estrés dado por los estímulos que puedan estar presentes en los tres sitios de muestreo.



En las ciudades los murciélagos pueden estar sometidos al ruido, luz artificial, vibraciones, contacto con los humanos, destrucción de refugios, contacto con animales domésticos, falta de cuerpos de agua (Allen *et al.*, 2011; Russo y Ancillotto, 2015). En la REBIOSH los refugios existentes están sujetos a perturbación, un factor que observamos fue la presencia de sacos con guano por lo que existe colecta por parte de los pobladores, aunque se desconoce la frecuencia de ocurrencia.

6.1 Factores biológicos que afectan la secreción de glucocorticoides

Las concentraciones de GC en el organismo no solo están determinadas como una respuesta al estrés, si no que existen diferentes factores biológicos que podrían interferir con los resultados (Millsaugh y Washburn, 2004).

Los GC están regulados por sus propios ritmos circadianos, por lo que se presentan variaciones diarias dependiendo de la hora del día (Millsaugh y Washburn, 2004). Estos patrones de ritmicidad están presentes en diferentes especies, los titíes comunes adultos (*Callithrix jacchus*), mostraron variaciones en las concentraciones de cortisol fecal siendo más altas durante la noche que en la mañana (Ferreira- Raminelli *et al.*, 2001). También se presentan ritmos en ciclos anuales con variaciones en la concentración de CG ligados a la estacionalidad incrementando las concentraciones durante la época reproductiva en algunas especies de reptiles, anfibios, aves y mamíferos (Romero 2002). En los murciélagos *Myotis lucifugus* y *Myotis vivesi* se han observado estas variaciones (Reeder *et al.*, 2004; Hernández-Arciga *et al.*, 2018).

Las diferencias diarias en las concentraciones de GC también se asocian al tiempo de excreción, en las especies pequeñas con metabolismos rápidos existe mayor probabilidad de



detectar estos cambios diarios que en especies grandes con menor frecuencia de defecación (Millsbaugh y Washburn, 2004). Para este trabajo las muestras se colectaron durante el horario nocturno al momento de la emergencia del refugio, por lo que no se pudo realizar una comparación de la excreción de cortisol a lo largo del día. Aun cuando el muestreo se realizó a lo largo del año, las muestras obtenidas mensualmente no siempre fueron constantes, lo que no permitió obtener datos suficientes para realizar el análisis entre estaciones del año.

La dieta para la gran mayoría de las especies de vida libre cambia de acuerdo con la estacionalidad y estos cambios pueden estar ligados a las concentraciones de GC (Millsbaugh y Washburn, 2004). Se ha constatado que murciélagos insectívoros pueden tener cambios en su dieta de acuerdo con la época del año, incrementando su diversidad principalmente durante la época seca (Clare *et al.*, 2014; Salinas-Ramos *et al.*, 2015). Por lo tanto, el contenido proteico del alimento puede afectar las concentraciones de glucocorticoides, aunado al tránsito intestinal (vonderOhe y Servheen, 2002).

El comportamiento de los individuos capturados difirió de forma intraespecífica e interespecífica. *Molossus sinaloae* cayó en la red después de la primera hora de muestreo, al momento de su captura se pudo observar que los individuos ya se habían alimentado por lo que la obtención de las excretas fue de 20 a 40 minutos después de su captura con muestras mayor a 5 pellets.

Debido a que *Pteronotus parnelli* se capturó al momento de la emergencia del refugio los individuos no habían forrajeado, se intentó alimentarlos con larvas de *Tenebrio sp.* La mayoría de los individuos no mostró interés en el alimento, la supresión del apetito es característica de la respuesta al estrés agudo ya que fisiológicamente el organismo está preparado para la huida y así



asegurar su supervivencia (Wingfield *et al.*, 1997; Wingfield, 2003). Cuando sí se obtuvieron excretas sin ser alimentados manualmente la muestra fue menor a 5 pellets.

Mormoops megalophylla mostró un comportamiento errático dentro de saco lo que le provocó lesiones en los pulgares. Esto se observó en más de un individuo por lo que se desistió de trabajar con ellos.

A diferencia de muestras sanguíneas el uso de excretas como muestra biológica permitió asegurarnos que los valores obtenidos de las concentraciones de cortisol no fuesen dados por la respuesta al estrés al momento de la captura. Los riesgos para una toma de muestra de sangre están presentes principalmente con los murciélagos, por ser especies de tamaño pequeño si no se cuenta con la práctica suficiente se corre el riesgo de lastimar las venas al momento de tomar la muestra generando impedimento para volar. Las muestras con excretas permiten una manipulación mínima de los individuos, además este método es útil cuando se pretende evaluar cómo responden las especies a determinados factores bióticos y/o abióticos que puedan causar estrés a través del tiempo.



7. CONCLUSIONES

Es importante tomar en cuenta factores biológicos: ritmos circadianos, sexo, condición reproductiva, alimentación que puedan interferir con la concentración de GC cortisol y/o corticosterona alterando los resultados. En este sentido, se pudo constatar que el comportamiento de cada individuo, aun siendo de la misma especie, fue diferente al momento de la captura. Estas observaciones permiten inferir desde el punto de vista fisiológico que la respuesta a estresores puede diferir entre individuos, hecho importante a ser considerado en futuros proyectos.

Aun cuando los resultados obtenidos en este estudio de las concentraciones de cortisol en las heces de las especies analizadas no mostraron diferencias significativas entre sexos, especies y familias., así como, no haber constatado de manera fehaciente con un enfoque endocrino el impacto de las actividades antropogénicas sobre la biología de murciélagos insectívoros, si permiten ser utilizadas como referencia para futuras investigaciones donde se evalúen los GC como indicadores espacio-temporal del estrés fisiológico de algunas especies aquí evaluadas. También permitirá que aun cuando no se tenga suficiente material biológico en algunos meses, los resultados ya obtenidos podrán ser usados para completar y así evaluar de manera estacional o por épocas del año el impacto antropogénico y/o natural sobre la biología de las especies de los murciélagos en estudio.

Los estudios endocrinos aportan información fisiológica básica a los proyectos de conservación deben ser cada vez más utilizados para coadyuvar al conocimiento integral de las especies.



8. LITERATURA CITADA

- Allen LC, Turmelle AS, Widmaier EP, Hristov NI, McCracken GF, Kunz TH. 2011.** Variation in Physiological Stress between Bridge- and Cave-Roosting Brazilian Free-Tailed Bats. *Conservation Biology* **25**: 374-381.
- Ávila-Torres Agatón LG. 2008.** *Estimación mediante un Sistema audiovisual de las poblaciones de 4 especies de murciélagos en 5 refugios cavernícolas de la Reserva de la Biosfera Sierra de Huautla, Estado de Morelos.* Tesis, Universidad Autónoma del Estado de Morelos.
- Brearley G, McAlpine C, Bell S, Bradley A. 2012.** Influence of urban edges on stress in an arboreal mammal case study of squirrel gliders in southeast Queensland, Australia. *Landscape Ecology* **27**: 1407-1419.
- Brunet-Rossinni AK, Wilkinson GS. 2009.** Methods for age estimation and the study of senescence in bats. En: Kunz, TH, ed. *Ecological and Behavioral Methods for the Study of Bats*. Johns Hopkins University Press: 315-325.
- Clare EL, Symondson WOC, Fenton MB. 2014.** An inordinate fondness for beetles? Variation in seasonal dietary preferences of night-roosting big brown bats (*Eptesicus fuscus*). *Molecular Ecology* **23**: 3633-3647.
- Colby HD, Kitay JI. 1972.** Effects of Gonadal Hormones on Adrenocortical Secretion of 5 α -Reduced Metabolites of Corticosterone in the Rat. *Endocrinology* **91**: 1523-1527.
- Creel S, Fox JE, Hardy A, Sands J, Garrott B, Peterson RO. 2002.** Snowmobile Activity and Glucocorticoid Stress Responses in Wolves and Elk. *Conservation Biology* **16**: 809-814.



- Creel S, Winnie JA, Christianson D. 2009.** Glucocorticoid stress hormones and the effect of predation risk on elk reproduction. *PNAS* **106**: 12388-12393.
- Davy CM, Mastromonaco GF, Riley JL, Baxter-Guilbert JH, Mayberry H, Willis CKR. 2017.** Conservation implications of physiological carry-over effects in bats recovering from white-nose syndrome. *Conservation Biology* **31**: 615-624.
- Dorado O, Flores-Castorena A, Jesús-Almonte JM, Arias DM, Martínez-Alvarado D. 2012.** *Arboles de Cuernavaca nativos y exóticos*, 1.er ed. Trópico Seco Ediciones: Universidad Autónoma del Estado de Morelos.
- Ellis RD, McWhorter TJ, Maron M. 2012.** Integrating landscape ecology and conservation physiology. *Landscape Ecology* **27**: 1-12.
- Hernández-Arciga U, Herrera LGM, Ibáñez-Contreras A, Miranda-Labra RU, Flores-Martínez JJ, Königsberg. 2018.** Baseline and post-stress seasonal changes in immunocompetence and redox state maintenance in the fishing bat *Myotis vivesi*. *PLoS ONE* doi.org/10.1371/journal.pone.0190047.
- Hernández- Jáuregui DMA, Galindo-Maldonado F, Valdez-Pérez R, Romano-Pardo M, Schuneman de Aluja A. 2005.** Cortisol en saliva, orina y heces: evaluación no invasiva en mamíferos silvestres. *Vet. Méx* **36**: 325-337.
- Instituto Mexicano de Tecnología del Agua (IMTA). 2014.** Programa de medidas preventivas de mitigación de la sequía. SEMARNAT. Cuernavaca, Morelos.
- Instituto Nacional de Estadística y Geografía (INEGI). 2009.** Prontuario de información geográfica municipal de los Estados Unidos Mexicanos. Cuernavaca, Morelos, México.



- Jones G, Jacobs DS, Kunz TH, Willing MR, Racey PA. 2009.** Carpe noctem: the importance of bats as bioindicators. *Endang Species Res* **8**: 93–115.
- Kenagy GJ, Place NJ. 2000.** Seasonal Changes in Plasma Glucocorticosteroids of Free-Living Female Yellow-Pine Chipmunks: Effects of Reproduction and Capture and Handling. *General and Comparative Endocrinology* **2**: 189-199.
- Martínez-Mota R, Valdespino C, Sánchez-Ramos MA, Serio-Silva JC. 2007.** Effects of forest fragmentation on the physiological stress response of black howler monkeys. *Animal Conservation* **10**: 374-379.
- Medellín RA, Arita HT, Sánchez O. 2007.** *Identificación de los murciélagos de México, clave de campo*, 2da ed. Ciudad de México: Instituto de Ecología, UNAM.
- Millspaugh JJ, Washburn BE. 2004.** Use of fecal glucocorticoid metabolite measures in conservation biology research: considerations for application and interpretation. *General and Comparative Endocrinology* **138**: 189-199.
- Mitrovic, IMD. 2005.** Introduction to the Hypothalamo-Pituitary-Adrenal (HPA) Axis. Lecture. University of California.
- Ferreira-Raminelli JL, Cordeiro MBS, Sousa MC, Veloso MFB. 2001.** Morning and Afternoon Patterns of Fecal Cortisol Excretion among Reproductive and Non-Reproductive Male and Female Common Marmosets, *Callithrix jacchus*. *Biological Rhythm Research* **32**: 159-167.
- Reeder DM, Kosteczko NS, Kunz TH, Widmaier EP. 2004.** Changes in baseline and stress-induced glucocorticoid levels during the active period in free-ranging male and female little



brown myotis, *Myotis lucifugus* (Chiroptera: Vespertilionidae). *General and Comparative Endocrinology* **2**: 260-269.

Reeder DM, Widmaier EP. 2009. Hormone Analysis in Bats. En: Kunz TH, Parsons S, eds. *Ecological and Behavioral for the Study of Bats*. The Johns Hopkins University Press: 554-563.

Rizo-Aguilar A, Guerrero JA, Montoya-Lara AMP, Valdespino C. 2014. Physiological stress in volcano rabbit *Romerolagus diazi* populations inhabiting contrasting zones at the Corredor Biologico Chichinautzin, Mexico. *Mammalian Biology* **79**: 357-361.

Romero LM. 2002. Seasonal changes in plasma glucocorticoid concentrations in free-living vertebrates. *General and Comparative Endocrinology* **128**: 1-24.

Romero LM. 2004. Physiological stress in ecology: lessons from biomedical research. *TRENDS in Ecology and Evolution* **19**: 249-255.

Romero LM, Reed JM. 2005. Collecting baseline corticosterone samples in the field: is under 3 min good enough? *Comparative Biochemistry and Physiology* **140**: 73-79.

Russo D, Ancillotto L. 2015. Sensitivity of bats to urbanization: A review. *Mammalian Biology* doi.org/10.1016/j.mambio.2014.10.003.

Salinas-Ramos VB, Montalvo LGH, León-Ragagnon V, Arrizabalaga-Escudero A, Clare EL. 2015. Dietary overlap and seasonality in three species of mormoopid bats from a tropical dry forest. *Molecular Ecology* **24**: 5296-5307.



- Sapolsky RM, Romero ML, Munck AU. 2000.** How Do Glucocorticoids Influence Stress Responses? Integrating Permissive, Suppressive, Stimulatory, and Preparative Actions. *Endocrine Reviews* **21**:55-89.
- Seltmann A, Czirják GA, Courtiol A, Bernard H, Struebig MJ, Voigt CC. 2017.** Habitat disturbance results in chronic stress and impaired health status in forest-dwelling paleotropical bats. *Conservation Physiology*: doi:10.1093/conphys/cox020.
- Sih A, Ferrari MCO, Harris DJ. 2011.** Evolution and behavioral responses to human-induced rapid environmental change. *Evol. Appl* **4**: 367–387.
- Soto MA, Salame-Méndez A, Ramírez-Pulido J, Yañez L, Armella MA. 2004.** Valoración de hormonas esteroides en heces de una pareja de lobo mexicano (*Canis lupus baileyi*) en cautiverio. *Acta Zoológica Mexicana* **20**: 187-196.
- Sheriff MJ, Dantzer B, Delehanty B, Palme R, Boonstra R. 2011.** Measuring stress in wildlife: techniques for quantifying glucocorticoids. *Oecologia* **166**: 869-887.
- Touma C, Sachser N, Möstl E, Palme R. 2003.** Effects of sex and time of day on metabolism and excretion of corticosterone in urine and feces of mice. *General and Comparative Endocrinology* **130**: 267–278.
- Valdespino C, Martínez-Mota R, García -Feria LM, Martínez-Romero LE. 2007.** Evaluación de eventos reproductivos y estrés fisiológico en vertebrados silvestres a partir de sus excretas: evolución de una metodología no invasiva. *Acta Zoológica Mexicana* **23**: 151-180.

- Valdespino C. 2011.** Cuantificación de hormonas para determinación de estrés fisiológico y estado reproductivo en vertebrados silvestres. En: Gallina-Tessaro S, López-González CA, eds. *Manual de técnicas para el estudio de la fauna*. Querétaro, México, 237-253.
- von der Ohe C, Servheen C. 2002.** Measuring Stress in Mammals Using Fecal Glucocorticoids: Opportunities and Challenges. *Wildlife Society Bulletin* **30**: 1215-1225.
- Wikelski M, Cooke SJ. 2006.** Conservation physiology. *TRENDS in Ecology and Evolution* **21**: 38-46.
- Wingfield JC, Hunt K, Breuner C, et al. 1997.** Environmental stress, field endocrinology, and conservation biology. En: Clemmons JR, Buchhoiz R, eds. *Behavioral Approaches to Conservation in the Wild*. London: Cambridge University Press, 95-131.
- Wingfield JC. 2003.** Control of behavioural strategies for capricious environments. *Animal Behaviour* **66**: 807-816.
- Wood WG, Fricke H, Haritz J, et al. 1984.** An Evaluation of Four Different Luminescence Immunoassay Systems: CELIA (chemiluminescent immunoassay), SPALT (solid-phase antigen luminescence technique), ILMA (immunoluminometric assay) and ILSA (immunoluminometric labelled second antibody) A critical study of macro solid phases for use in immunoassay Systems, Part III1). *J. Clin. Chem. Clin. Biochem* **22**: 349-356.

ANEXO I

Tabla 1. Valores de concentración de cortisol de los 43 individuos analizados por, especie, sexo y familia. Condición reproductiva de los individuos: inactivos (In), activos (A):

Sitios de muestreo	Familia	Especie	Sexo	Cond. Rep.	Edad	Valor de cortisol $\mu\text{g/gr}$
El Texcal	Emballonuridae	<i>Balantiopteryx plicata</i>	H	In	juvenil	1.8
El Texcal	Emballonuridae	<i>Balantiopteryx plicata</i>	M	In	adulto	1046.0
El Texcal	Emballonuridae	<i>Balantiopteryx plicata</i>	H	In	adulto	1749.0
El Texcal	Emballonuridae	<i>Balantiopteryx plicata</i>	H	In	adulto	35.1
El Texcal	Emballonuridae	<i>Balantiopteryx plicata</i>	H	In	adulto	33.4
Cuernavaca	Molossidae	<i>Tadarida brasiliensis</i>	M	In	adulto	13.4
Cuernavaca	Molossidae	<i>Molossus sinaloae</i>	M	In	adulto	3.3
Cuernavaca	Molossidae	<i>Molossus sinaloae</i>	H	In	adulto	5.0
Cuernavaca	Molossidae	<i>Molossus sinaloae</i>	M	In	adulto	2.6
Cuernavaca	Molossidae	<i>Molossus sinaloae</i>	M	In	adulto	6.4
Cuernavaca	Molossidae	<i>Molossus sinaloae</i>	M	In	adulto	12.3
Cuernavaca	Molossidae	<i>Molossus sinaloae</i>	H	In	adulto	35.9
Cuernavaca	Molossidae	<i>Molossus sinaloae</i>	M	In	adulto	17.2
Cuernavaca	Molossidae	<i>Molossus sinaloae</i>	H	A	adulto	4.7
Cuernavaca	Molossidae	<i>Molossus sinaloae</i>	M	In	adulto	40.1
Cuernavaca	Molossidae	<i>Molossus sinaloae</i>	M	In	juvenil	8.6
Cuernavaca	Molossidae	<i>Molossus sinaloae</i>	H	In	adulto	39.0
Cuernavaca	Molossidae	<i>Molossus sinaloae</i>	M	In	juvenil	4.7
Cuernavaca	Molossidae	<i>Molossus sinaloae</i>	M	In	adulto	238.9
Cuernavaca	Molossidae	<i>Molossus sinaloae</i>	H	In	adulto	39.0
Cuernavaca	Molossidae	<i>Molossus sinaloae</i>	H	In	adulto	15.4
El Texcal	Vespertilionidae	<i>Myotis californicus</i>	M	In	adulto	33.6
El Texcal	Vespertilionidae	<i>Myotis fortidens</i>	M	In	adulto	66.1
El Texcal	Vespertilionidae	<i>Eptesicus fuscus</i>	H	In	adulto	24.3
El Texcal	Vespertilionidae	<i>Rhogeesa parvula</i>	M	In	adulto	1046.0
REBIOSH	Mormoopidae	<i>Pteronotus davyi</i>	H	In	adulto	14.2
REBIOSH	Mormoopidae	<i>Pteronotus davyi</i>	M	In	adulto	42.4
REBIOSH	Mormoopidae	<i>Pteronotus davyi</i>	M	In	adulto	41.8



REBIOSH	Mormoopidae	<i>Pteronotus davyi</i>	M	In	adulto	25.9
REBIOSH	Mormoopidae	<i>Pteronotus davyi</i>	M	In	adulto	72.8
REBIOSH	Mormoopidae	<i>Pteronotus davyi</i>	M	In	adulto	8.3
REBIOSH	Mormoopidae	<i>Pteronotus davyi</i>	M	In	adulto	181.7
REBIOSH	Mormoopidae	<i>Pteronotus davyi</i>	M	In	adulto	54.0
REBIOSH	Mormoopidae	<i>Pteronotus davyi</i>	M	In	adulto	120.3
REBIOSH	Mormoopidae	<i>Pteronotus davyi</i>	M	In	adulto	157.5
REBIOSH	Mormoopidae	<i>Pteronotus parnellii</i>	M	In	adulto	26.5
REBIOSH	Mormoopidae	<i>Pteronotus parnellii</i>	H	In	adulto	99.2
REBIOSH	Mormoopidae	<i>Pteronotus parnellii</i>	M	In	adulto	25.3
REBIOSH	Mormoopidae	<i>Pteronotus parnellii</i>	M	A	adulto	16.6
REBIOSH	Mormoopidae	<i>Pteronotus parnellii</i>	M	In	adulto	240.4
REBIOSH	Mormoopidae	<i>Pteronotus parnellii</i>	H	A	adulto	14.3
REBIOSH	Mormoopidae	<i>Pteronotus parnellii</i>	H	A	adulto	66.1
REBIOSH	Natalidae	<i>Natalus mexicanus</i>	M	In	adulto	5.2



