

MUERTE DE UN LINCE IBÉRICO. ESTABLECIMIENTO DE LA CAUSA Y LA AUTORÍA**DEATH OF AN IBERIAN LYNX. DETERMINATION OF THE CAUSE AND THE CAUSATIVE**

Fernández Verón I
Ruiz Rubio C
Zorrilla Delgado I
Corona Bravo A
Del Boz Llamas L

Centro de Análisis y Diagnóstico de la Fauna Silvestre. Málaga. Agencia de Medio Ambiente y Agua de Andalucía.
Consejería de Medio Ambiente y Ordenación del Territorio. Junta de Andalucía, Málaga, España.

Correspondencia: ichufv@hotmail.com

Resumen: Las ciencias forenses se aplican desde hace poco tiempo como herramientas en las investigaciones de delitos contra el medio ambiente. En este trabajo se expone un caso pionero en cuanto a la utilización de estas técnicas en un caso de un delito contra la fauna silvestre. La investigación se inicia tras la aparición de un lince ibérico muerto en el interior de una finca, donde se encontraron también varios pollos supuestamente utilizados como cebos envenenados y otro cadáver, el de un zorro. El lince ibérico es uno de los mamíferos más amenazados del planeta. Se llevaron a cabo distintos análisis a partir de la necropsia de los cadáveres en el Centro de Análisis y Diagnóstico de la Fauna Silvestre (CAD), el laboratorio de referencia para la fauna silvestre perteneciente a la Junta de Andalucía. Los resultados fueron concluyentes, ambas muertes se produjeron como consecuencia de la ingestión de cebos envenenados con un plaguicida extremadamente tóxico, el aldicarb. También se encontró esta sustancia en los pollos recogidos en el interior de la finca. Con el fin de establecer la culpabilidad de los propietarios de la finca, que negaron tener nada que ver con las muertes y la colocación de los cebos, se utilizó una herramienta novedosa en este tipo de investigaciones, la genética forense. En base a los resultados se consiguió establecer una relación de parentesco entre los pollos utilizados como cebos envenenados y los pollos propiedad reconocida de los sospechosos, que permitió demostrar que todos tenían el mismo origen. Gracias al trabajo conjunto y coordinado durante toda la investigación y el informe pericial elaborado por el laboratorio del CAD, la Consejería de Medio Ambiente y Organización del Territorio de la Junta de Andalucía consiguió una sentencia ejemplar contra los envenenadores.

Palabras clave: Ciencia Forense, Investigación Forense en Fauna Silvestre, Genética Forense, Toxicología Forense, Identificación, Lince Ibérico, plaguicidas.

Abstract: The application of forensic science as a research tool to resolve crimes against the environment is relatively recent. To our knowledge this is the first instance in which the forensic genetic have been used as a definitive evidence to find out guilty in crimes against the wildlife. Our research starts when an Iberian lynx was found dead into a farm; very close to several chickens used as poisoned baits and a fox carcass. Iberian lynx is one of the most endangered mammals in the planet. A comprehensive investigation from the carcasses was performed in the Analysis and Diagnostic Center for Wildlife in Andalusia (CAD), the reference laboratory for wildlife of the Andalusian Government (Spain). The results determined that the deaths occurred as a result of ingestion of baits poisoned with an extremely toxic pesticide, aldicarb. This substance was also found in chickens gathered inside the farm. In order to establish the guilt of the owners of the farm, who refused to be related to the deaths and the placement of the baits, an innovative tool was used in this kind of research, the forensic genetic. Based on the results we got, we established a relationship between the chickens used as poisoned baits and the chickens from the farmer, all of them had the same origin. Thanks to the coordinated actuation during the complete investigation and the official report by the CAD laboratory used in the trial, the Ministry of Environmental and Territorial Organization got an exemplary sentence against the poisoners.

Key words: Forensic Science, Forensic Wildlife Investigation, Forensic Genetics, Forensic Toxicology, Iberian Lynx, pesticides.

INTRODUCCIÓN

El lince ibérico (*Lynx pardinus*) es una especie de mamífero carnívoro de la familia de los félidos, endémico de la península ibérica.

Durante el siglo XX las poblaciones de lince ibérico sufrieron un severo descenso del número de individuos, lo que condujo a considerarlo como el felino más amenazado del planeta, siendo el único catalogado “en peligro crítico” por la Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza (UICN).



Andalucía ha sido el único territorio de Europa capaz de conservar poblaciones de este felino². A principios del siglo XXI quedaban dos núcleos de población muy distanciados entre sí, uno de ellos en Jaén, en la sierra de Andújar, y el otro en Huelva, en el Parque Nacional de Doñana. Tanto el Gobierno Andaluz como la Unión Europea comenzaron ya entonces a colaborar de forma oficial en las estrategias para la

conservación y recuperación de las poblaciones de Lince ibérico en la península, desarrollándolas en el marco de los proyectos Life. El primero de ellos tenía como el objetivo estabilizar e incrementar las poblaciones de los dos núcleos mencionados, mientras que el segundo, aún en desarrollo, trata de consolidar las poblaciones existentes y de recuperar su área de distribución histórica en Andalucía mediante la reintroducción en Guadalmellato (Córdoba) y Guarrizas (Jaén). Además, actualmente se han establecido dos nuevos centros de cría en cautividad en Portugal y Extremadura, con el objetivo de reintroducir la especie también en estos territorios en un futuro cercano.

La Comunidad Autónoma de Andalucía, mediante la ley 8/2003 de 28 de octubre, de la flora y fauna silvestres³, estableció una normativa que pretendía preservar el medio natural y la biodiversidad, buscando un equilibrio con las actividades humanas. Para la elaboración de esta ley se tomó como referencia la normativa europea al respecto: Directivas del Consejo 79/409 CEE, relativa a la conservación de las aves silvestres, y 92/43 CEE, relativa a conservación de los hábitats naturales y de la flora y fauna silvestres, y la Ley 4/1989, de 27 de marzo, de Conservación de los Espacios Naturales y de la Flora y Fauna Silvestres.

A continuación se procede a incluir ciertos párrafos de la ley 8/2003 para comprender la situación legal del lince ibérico y la gravedad del delito que llevó a la muerte de este ejemplar objeto del estudio.

Dentro del Título preliminar, disposiciones generales, se encuentran dos artículos importantes:

“Artículo 1. Objeto y ámbito de aplicación: Es objeto de la presente Ley la ordenación de la protección, conservación y recuperación de la flora y la fauna silvestres y sus hábitat, así como la regulación y fomento de la caza y la pesca para la consecución de fines de carácter social, económico, científico, cultural y deportivo”

“Artículo 4. Principios de actuación: Velar de manera coordinada por el mantenimiento de la biodiversidad y por la conservación de las especies silvestres y sus hábitats “

Nos detenemos en el artículo 7 del Título I, sobre el Régimen General de protección:

“1. Las especies silvestres, especialmente las amenazadas y sus hábitats, se protegerán conforme a las limitaciones y prohibiciones dispuestas en esta Ley y normas que la desarrollen, frente a cualquier tipo de actuaciones o agresiones susceptibles de alterar su dinámica ecológica.

2. Queda prohibido, en el marco de los objetivos de esta Ley y sin perjuicio de las previsiones contenidas en el Título II con respecto a la caza, la pesca y otros aprovechamientos, así como en la normativa específica en materia forestal y de pesca marítima en aguas interiores, marisqueo y acuicultura marina:

a) Dar muerte, capturar en vivo, dañar, perseguir, molestar o inquietar intencionadamente a los animales silvestres sea cual fuere el método empleado, en particular durante el periodo de reproducción, crianza, hibernación y migración, recolectar sus larvas o crías, alterar o destruir sus hábitat, así como sus lugares de reproducción y descanso”

En el Artículo 8 se enumeran los medios prohibidos:

“1. Quedan prohibidas, con las salvedades que se derivan del artículo siguiente, la tenencia, utilización o comercialización de todo tipo de instrumentos o artes de captura o muerte de animales masiva o no selectiva, así como el uso de procedimientos que pudieran causar localmente la desaparición de una especie o alterar gravemente las condiciones de vida de sus poblaciones. En particular queda prohibido el empleo de los instrumentos o artes de captura masiva o no selectiva.”

Es importante también mencionar el Artículo 17 sobre Medidas de prevención de daños a la agricultura y la ganadería, teniendo en cuenta que la muerte del lince ibérico se produjo por una motivación de tipo ganadero:

“1. En el marco de lo establecido por la presente Ley, los titulares de explotaciones agrícolas y ganaderas podrán adoptar las prácticas preventivas de carácter disuasorio adecuadas y proporcionadas para evitar los daños que sobre sus respectivos cultivos y ganados pudieran ocasionar ejemplares de especies de fauna silvestre, debiendo solicitar a tal efecto las autorizaciones excepcionales previstas en el artículo 9. La Administración fomentará soluciones alternativas para los supuestos de habitualidad de dichos daños.

2. Cuando una especie amenazada pueda causar daños a las producciones agrícolas o ganaderas y no se considere recomendable adoptar medidas excepcionales de control de dichos daños, la Consejería competente en materia de medio ambiente podrá establecer un marco de participación voluntaria de los titulares de las explotaciones en la conservación de la especie, con las correspondientes compensaciones por los efectos que se deriven sobre sus cultivos o ganados”

En los artículos 25 y 26 del Capítulo II, Régimen especial de protección de la flora y la fauna silvestres amenazadas, se hace referencia al Catálogo Andaluz de Especies Amenazadas, en el que se incluyen las especies, subespecies, razas o poblaciones de flora y la fauna silvestre que requieren especiales medidas de protección. Dentro de las especies amenazadas se establece una clasificación según su grado de amenaza, incluyendo al lince ibérico dentro de la categoría «En peligro de extinción», cuya supervivencia resulta poco probable si los factores causales de su actual situación siguen actuando.

El título IV se refiere a las infracciones y sanciones en materia de conservación, clasificando dentro de las “muy graves” la colocación de venenos o cebos envenenados así como el uso de sustancias tóxicas prohibidas por la legislación vigente.

En el Anexo I de la ley se incluyen como medios de captura prohibidos para las especies terrestres “Todo tipo de cebos, humos, gases o sustancias venenosas, paralizantes, atrayentes, repelentes o que creen rastro, así como los explosivos”.

Por otra parte, además de incurrir en delito por la colocación de los cebos envenenados, hay que destacar que en ellos se usó un plaguicida muy tóxico cuya utilización se encontraba prohibida.

El Aldicarb (2-Metil-2-(metiltio)propionaldehído-o-(metilcarbamoil)oxima) es un compuesto químico perteneciente al grupo de los carbamatos que se ha utilizado en agricultura por su capacidad insecticida, acaricida y nematocida

La única presentación comercial existente estaba destinada en agricultura a ser utilizada como insecticida/acaricida/nematocida, por lo que aparecía como micro gránulos de color negro para aplicación en suelo y contenían un 10 % de su peso en el producto activo Aldicarb, existiendo una única formulación comercial autorizada denominada "Temik 10 G" y era fabricada por la multinacional AVENTIS (BAYER) CROPS SCIENCE.

El Aldicarb es altamente tóxico⁴⁻¹⁴ para animales terrestres (Hoffman y cols., 20037) y también para peces (Johnson y cols., 19808). Los residuos del Aldicarb y sus subproductos (principalmente aldicarb-sulfoxido y sulfona) se han detectado en aguas continentales y productos de granja hasta un año después de su aplicación (Hoffman y cols., 20037).

De toda la legislación sobre el Aldicarb¹⁵, la más relevante para el caso es la Directiva 91/414/CEE, de 15 de junio de 1991, relativa a la autorización, comercialización, utilización y control de los productos fitosanitarios. Actualmente esta Directiva ha sido trasladada al Reglamento (CE) Nº 1107/2009, pero nos referiremos a ella en este trabajo al producirse los hechos cuando aún estaba vigente.

En el Anexo I de la Directiva 91/414/CEE se encuentra la lista de sustancias activas incluidas, excluidas y en evaluación comunitaria. Este anexo ha ido modificándose con el tiempo, cambiando en algunos casos la clasificación de determinadas sustancias en función de los diferentes informes que se iban presentando tanto a favor como en contra. Una sustancia activa se puede usar en la UE para fabricar un producto fitosanitario si está incluida en el Anexo I de la Directiva.

En el caso del Aldicarb, la sustancia tóxica que produjo la muerte del lince ibérico, se encuentra excluida del Anexo I a partir de la Decisión del Consejo de 18 de marzo de 2003, relativa a la no inclusión del Aldicarb en el anexo I de la Directiva 91/414/CEE y a la retirada de las autorizaciones de los productos fitosanitarios que contengan esta sustancia activa. La información solicitada a los fabricantes para evaluar la inocuidad de esta sustancia en las condiciones propuestas para su uso como fitosanitario no satisfizo al Consejo, por lo que se decidió no incluirla en el Anexo I. Aunque en esta decisión no se descartó que posteriormente pudiera volver a evaluarse la utilización de esta sustancia, lo cierto es que no lo ha hecho, probablemente por su alta toxicidad además de la incorporación al mercado de otras sustancias menos dañinas y más específicas.

Como resultado de esta Decisión se indica a los estados miembros que las autorizaciones de los productos fitosanitarios que contengan esta sustancia se deben retirar antes del 18 de septiembre de 2003 y que a partir del 18 de marzo del 2003 no se conceda ni se renueve ninguna autorización.

En el Anexo de esta Decisión del Consejo se incluyen algunos de los usos para los que se mantienen las autorizaciones de los productos fitosanitarios que contengan Aldicarb hasta el 30 de junio de 2007, siempre que:

- Se garantice la renovación del etiquetado para indicar las condiciones de uso restringidas
- Se establezcan las medidas para minimizar los riesgos para garantizar la protección de la salud humana y animal y del medio ambiente
- Se tomen en cuenta métodos alternativos más seguros

En el caso de España se podían mantener las autorizaciones hasta el 30 de junio de 2007 solo de los productos con la sustancia activa Aldicarb utilizados en los cultivos de algodón, cítricos (plantaciones jóvenes) y viveros de plantas leñosas.

En la Decisión indica también que se pueden establecer prórrogas, siempre que expiren como muy tarde el 31 de diciembre de 2007.

El Aldicarb está clasificada como sustancia "la" (extremadamente tóxica) (OMS, 200614) tanto para el hombre como para los animales. La dosis letal varía en función de la especie animal y otros factores como el estado sanitario (Milton y cols., 199910). En el perro se ha señalado que oscila entre 5 a 10 mg/kg, en aves entre 1,8 a 15,5 mg/kg (Hoffman y cols, 19958; www.inchem.org) y en ratas 0,93 mg/kg. De hecho, es la sustancia más tóxica dentro del grupo de insecticidas carbamatos y una de las más tóxicas de todos los plaguicidas que se han utilizado en agricultura (Soler y cols., 200413).

Según nuestra experiencia y la de otros laboratorios de análisis toxicológico, el Aldicarb es una de las sustancias que se han utilizando y se usan con mayor profusión para la fabricación de cebos envenenados, por la eficacia y la facilidad de manejo, se suelen hacer mezclando restos cárnicos o de otros alimentos con micro gránulos del producto comercial Temik 10G. Teniendo en cuenta su alta toxicidad, un perro de 20 kg va a morir tras la ingestión de un cebo que contenga solamente 2 gramos de micro gránulos (Soler y cols, 200413), un ave de 5 kg moriría por ingestión de menos de 1g de aldicarb.

En cuanto a los vertebrados, las aves parecen ser más sensibles que otros animales al efecto tóxico del aldicarb, unos pocos gránulos pueden ser letales para ellas. Además, la forma granular es especialmente atractiva para las aves, parece ser que por la similitud con el grit, arena o piedras pequeñas que ingieren como ayuda para la digestión (Best. 19924; Mineau, P.; 200211). Además del consumo o contacto directo, hay que tener en cuenta que las rapaces y otras especies de aves son víctimas por envenenamiento secundario cuando se alimentan de animales muertos envenenados por pesticidas o cuando se alimentan de animales vivos o invertebrados que no pueden escapar al ataque debido a la intoxicación por plaguicidas.

Tras la ingestión, el Aldicarb se absorbe rápidamente por vía digestiva, ejerciendo su acción tóxica mediante una inhibición de las enzimas colinesterasas del organismo animal provocando normalmente la muerte de los animales en un corto periodo de tiempo, entre 10-30 minutos, por alteración en la transmisión del impulso nervioso y muerte por parálisis cardíaca e incapacidad respiratoria. Los síntomas se caracterizan por su aparición cronológica comenzando normalmente por vómitos, temblores, fasciculaciones musculares (es frecuente que se inicien en la cabeza, avanzado luego hacia el resto del organismo), convulsiones y terminando con una muerte rápida, lo que se observa especialmente en animales tras la ingestión de cebos envenenados con cantidades altas de aldicarb (Mosha, 199312; Buronfosse y Buronfosse, 19956). La aparición de aves con convulsiones, letargia, parálisis, temblores u otros síntomas neurológicos hace sospechar de intoxicación por aldicarb (Mineau, 199111). Las aves que mueren rápidamente con síntomas neurológicos severos pueden dejar evidencias postmortem de su agonía, como el hallazgo de restos del sustrato y vegetación entre las garras. Al no tener tiempo para dispersarse antes de la muerte, pueden aparecer cadáveres agrupados de varias especies de aves en la zona del envenenamiento.



Este repaso por el estatus del lince ibérico como especie, la sustancia tóxica utilizada en los cebos envenenados que le produjeron la muerte, y la legislación aplicable, permite comprender la ilegalidad de los hechos y la necesidad de utilizar todas las herramientas a nuestro alcance para evitar que los culpables pudieran quedar impunes.

Para finalizar la introducción me parece importante comentar la labor de los Agentes de la Autoridad Ambiental (AAA)^{16,17}, entre los que se incluyen Agentes de Medio Ambiente y de la Guardia Civil-SEPRONA, que llevaron a cabo las inspecciones oculares y la recogida de las muestras en el lugar de los hechos.

El uso de cebos envenenados es una práctica extendida por todo el territorio español que supone una mortal amenaza para las especies silvestres. En Andalucía resulta especialmente grave dado que es una de las regiones con mayor diversidad de fauna en Europa, albergando áreas claves para la conservación de especies amenazadas como el águila imperial ibérica (*Aquila adalberti*), el quebrantahuesos (*Gypaetus barbatus*), el buitre negro (*Aegypius monachus*), el alimoche (*Neophron percnopterus*) y por supuesto el lince ibérico (*Lynx pardinus*).

El Gobierno Andaluz considera la lucha contra el veneno como una prioridad, y lleva trabajando en ello desde hace tiempo, a través de la Estrategia Andaluza contra el Veneno (EAV).

Una gran parte del trabajo realizado dentro del marco de la EAV la llevan a cabo los AAA. La especialización de estos Agentes resulta muy importante en la lucha contra el veneno, por ello se han creado las primeras Brigadas de Investigación de Envenenamiento de Fauna (BIEF), entre cuyas funciones destacan la realización de inspecciones técnico oculares, inspecciones caninas, coordinación con el SEPRONA e investigación policial, levantamiento de muestras biológicas y de indicios de delito, cadena de custodia, elaboración de informes técnicos, complementarios y diligencias para su incorporación en los expedientes administrativos y atestados, etc.



El personal que integra estas unidades recibe periódicamente cursos de formación especializada que también persiguen la coordinación, colaboración y comunicación para mejorar el sistema de actuaciones de prevención, levantamiento y envío de muestras al Centro de Análisis y Diagnóstico y al laboratorio de Policía Científica para la investigación de las causas, esclarecimiento y detención de los presuntos autores del delito, así como para la tramitación de los expedientes en la vía administrativa y penal.

Las unidades caninas especializadas en detección de venenos se crearon en 2004 en Andalucía para complementar la inspección ocular de los AAA, mejorando la capacidad de

localización de los cebos o cadáveres envenenados. Las unidades acuden a petición de los AAA en inspecciones urgentes (como lo fue la de este caso) o bien periódicamente en inspecciones preventivas. Actualmente además la presencia de las unidades caninas produce un efecto preventivo y disuasorio sobre el uso de cebos envenenados.



También en el marco de la EAV trabaja el Centro de Análisis y Diagnóstico (CAD)18, donde se realizan los análisis de las muestras levantadas por los AAA. Las funciones de este laboratorio, único en Andalucía y con sede en Málaga, se resumen a continuación:

- Estudio de causa de muerte: Esclarecimiento de la causa de muerte de los ejemplares de fauna silvestre que aparecen muertos en toda la comunidad andaluza, y en determinados casos valorar la posible transmisión de los agentes infecciosos a otros ejemplares del entorno.

- Estudio clínico/sanitario: Realización de análisis (hematológicos, bioquímicos, toxicológicos, moleculares, microbiológicos, de anatomía patológica, parasitológicos, inmunoserológicos), sobre muestras procedentes de ejemplares de especies amenazadas (centros de cría de lince ibérico, quebrantahuesos, águila imperial, centros de recuperación de especies de toda Andalucía). Valoración de alteraciones individuales (clínico) y/o poblacionales (sanitario).

- Estudio genético /diagnóstico molecular: Determinación a nivel molecular de características individuales y/o poblacionales de diferentes especies, así como la identificación de agentes infecciosos por métodos moleculares (PCR) (especies de fauna silvestre de especies amenazadas y cinegéticas).

- Estudio de animales y cebos envenenados: Aplicación de técnicas forenses y toxicológicas para determinar la presencia de compuestos tóxicos asociados a casos de envenenamiento en fauna silvestre.

- Realización de informes técnicos y participación como peritos en procesos judiciales: Principalmente en casos de delitos contra la fauna por uso ilegal de venenos, también en otros ámbitos como el tráfico ilegal de especies amenazadas, expolio de nidos, etc.

Actualmente el laboratorio, además de realizar todas estas funciones en el ámbito de la comunidad andaluza, está colaborando con otras administraciones nacionales e internacionales.

HIPÓTESIS DE TRABAJO

Las ciencias forenses tienen como objetivo esclarecer los hechos en una investigación de un delito. Como ya se ha mencionado anteriormente, diversas técnicas forenses se usan habitualmente para la investigación y resolución de los delitos contra las personas, pero aún no es frecuente su aplicación a los delitos contra la fauna.

Los análisis toxicológicos realizados sobre las muestras obtenidas de los cadáveres y los cebos dieron como resultado la presencia del carbamato aldicarb. En el caso de los cadáveres, para establecer con seguridad que la causa de la muerte había sido el envenenamiento por este compuesto podía haberse realizado un estudio de actividad

colinesterasa en cerebro¹⁹. La presencia del tóxico en el contenido digestivo indica que el animal ha ingerido como mínimo esa cantidad del compuesto, pero no se puede asegurar cuanta cantidad se ha absorbido, y si ha resultado suficiente para provocarle la muerte. Los estudios de la actividad colinesterasa en cerebro son muy útiles para establecer con seguridad qué cantidad de tóxico ha sido absorbida, y por tanto permite asegurar si la muerte ha sido provocada por sus efectos. Para realizar este ensayo es muy importante que las muestras se analicen lo antes posible, ya que el tejido encefálico se degrada mucho más rápidamente que el resto, y esto puede alterar los resultados del ensayo. El análisis consiste en realizar un macerado del tejido encefálico con solución fisiológica y realizar una medida de la cantidad de acetilcolinesterasa presente. Posteriormente se añaden diferentes soluciones que son capaces de reactivar la enzima inhibida, y se realiza otra medida. Si la inhibición es mayor del 25% se puede concluir que es significativa, y que la muerte se ha producido como consecuencia de la ingestión del tóxico anticolinesterásico.

En este caso no se realizó este estudio ya que los cadáveres llegaron con un grado de autólisis leve/moderado, y probablemente el estudio no permitiría llegar a una conclusión definitiva. Por tanto, el diagnóstico de la causa de la muerte de los dos animales se basó en la presencia de lesiones orgánicas compatibles con un proceso de envenenamiento, la presencia del tóxico en el contenido digestivo, y la ausencia de otros hallazgos que pudieran indicar otra causa de muerte, como enfermedades sistémicas o traumatismos.

Tras analizar las muestras recogidas y establecer que la muerte del lince ibérico y del zorro se había producido como consecuencia de la ingestión de cebos envenenados con el carbamato aldicarb, se buscó la forma de vincular a los sospechosos, propietarios de la finca, con los cebos envenenados, ya que ellos negaron siempre tener algo que ver con los hechos.

Dado que se trataba de una finca vallada, en la que los propietarios no residían de forma habitual, uno de los argumentos que utilizaron en su defensa era que cualquiera podía haber saltado al interior del recinto y haber colocado los cebos envenenados y la jaula trampa.

Durante el registro de la finca no se logró encontrar el producto utilizado para envenenar los cebos, lo que hubiera podido establecer una posible vinculación con los sospechosos. Tampoco fue posible la toma de huellas en la zona del gallinero, ya que alteraron la escena antes de que los agentes se acercaran a esa zona, según declaraciones reflejadas en el auto judicial. Por tanto hubo que pensar en otras alternativas que pudieran establecer una relación clara entre los sospechosos y el delito.

En el transcurso de las inspecciones, una vez que uno de los propietarios estuvo presente, mientras hablaba con los AAA que estaban levantando las muestras y negaba la propiedad de los restos de pollo supuestamente envenenados, comentó que otro de los pollos que allí estaban sí era suyo. Fue entonces cuando los agentes decidieron levantar también ese pollo como muestra, pensando que quizá pudiera establecerse algún tipo de relación genética con los cebos envenenados. En otra inspección realizada unos días más tarde, levantaron otro pollo que había aparecido muerto, y que igualmente el propietario de la finca reconoció como suyo.

Una vez remitidas las muestras y toda la información al laboratorio del CAD, los técnicos del área de genética se pusieron a investigar sobre la mejor manera de realizar el análisis y qué técnica sería la apropiada para obtener la información deseada.

La determinación de los marcadores microsatélites ofrece la posibilidad de estimar los niveles de variabilidad genética dentro de las poblaciones y resultan muy útiles a la hora de realizar estimaciones de la consanguinidad. Para el estudio se seleccionó un grupo de microsatélites distribuidos por todo el genoma de gallina con la ayuda de un mapa cromosómico publicado.

Con los resultados obtenidos de todas las muestras analizadas se calcularon las distancias genéticas y se establecieron las relaciones filogenéticas, llegando a la conclusión de que si bien los dos pollos que el sospechoso había reconocido como suyos no se encontraban muy relacionados entre sí, mostraban una cercanía genética evidente con varios de los cebos envenenados, incluidos los restos encontrados en el estómago del lince ibérico y del zorro fallecidos.

MATERIAL Y MÉTODOS

La primera parte del caso, como en cualquier investigación, se refiere a la inspección ocular y la toma de muestras en el lugar de los hechos. En este caso hay que hacer referencia al Protocolo andaluz de levantamiento y custodia de cebos y/o cadáveres, elaborado por la Consejería de Medio Ambiente de la Junta de Andalucía²⁰. Tanto las BIEF como las patrullas del SEPRONA cuentan con material para el levantamiento de las muestras: actas de toma y envío de muestras, cámara fotográfica, testigos métricos, GPS, guantes, rotuladores indelebles para la identificación de las muestras, recipientes para la recogida, precintos y otro material complementario.

Al llegar al lugar de los hechos se debe reflejar en el acta los datos de localización, la fecha y hora y los datos del personal que participa en la inspección. El recorrido por la zona debe hacerse de forma ordenada, dividiéndola en cuadrículas. En este caso participó un considerable número de agentes, por lo que resultó muy importante la organización y división de funciones a fin de obtener el máximo rendimiento y minimizar la contaminación del escenario. A medida que se iban realizando los hallazgos de las muestras se fotografiaban con el conjunto y en detalle, con un testigo métrico y numérico para la identificación, y se iba rellenando toda la información en las actas de levantamiento.

Una vez realizada la primera inspección, se procedió al envasado de las muestras en bolsas de plástico precintadas, anotando también el número de precinto en el acta y los datos en las bolsas.

Cuando llegó uno de los propietarios de la finca, los Agentes del Seprona procedieron a la anotación de la información que este proporcionó de forma libre y espontánea, por lo que no fue considerada una declaración y en ningún momento fueron vulnerados sus derechos. Se anotó igualmente el permiso que concedió para continuar con la inspección, aunque posteriormente lo retiró y los Agentes tuvieron que salir de la propiedad.

Todas las muestras fueron remitidas por mensajería urgente al laboratorio del CAD, junto con las actas de levantamiento y precintado y la cadena de custodia, y con la información recogida los Agentes comenzaron a elaborar un informe complementario para la fiscalía, en espera de los resultados analíticos.

Recepción y registro de las muestras en el laboratorio del CAD

Las muestras a analizar en el laboratorio del CAD son dos cadáveres, el lince ibérico y el zorro, y varias muestras de pollo. A su llegada al laboratorio se procedió al sellado de la cadena de custodia y al registro de las muestras, este último según lo descrito en el procedimiento interno para la gestión de muestras.

En este procedimiento se indica que a la recepción en el CAD se debe comprobar que las muestras están convenientemente identificadas, incluyendo la siguiente información:

- Entidad y Persona de contacto. Según el caso deben incluirse otros datos, como proyecto o centro de costes asociado.
- Localización (término municipal, UTM's, etc)
- Fecha en la que se ha realizado la toma de muestras.
- Fecha de remisión de muestras
- Identificación externa

- Historial mínimo del caso (antecedentes, observaciones en campo, etc). Si se han realizado determinaciones analíticas “in situ”, indicar en el historial
- Temperatura durante el transporte (temperatura ambiente, en nevera refrigerada, etc.)
- Completar la tabla descriptiva de la naturaleza de las muestras y análisis solicitados.
- Caso de requerir algún tipo de análisis especial, debe describirse, evitando ambigüedades.
- En el apartado de “Observaciones” podrán indicarse las mismas y la urgencia del análisis si procede.
- Fecha y sello de Registro en el CAD.

Las muestras que no se remitan con la información necesaria o aquellas que sean recepcionadas en malas condiciones pueden ser rechazadas por el laboratorio^{21,22}. Cualquier anomalía en la muestra aceptada que pueda afectar al resultado final del ensayo deberá quedar registrada en la Base de Datos del CAD y en los informes de ensayo, siendo trazable con el formato “Hoja de Remisión de muestras biológicas”.

Una vez aceptadas, se proporciona a cada muestra una identificación interna del laboratorio, cuyo formato incluye las iniciales de la provincia de origen de la muestra, un número de orden del caso, las últimas dos cifras del año en curso y un número de orden de las muestras incluidas en el caso, en este caso por ejemplo el cadáver de lince ibérico se identificó como JA/3689/08/001. Una vez asignada la identificación de las muestras, se procede a la introducción de todos los datos en la base de datos del CAD, y a continuación son llevadas al laboratorio de análisis que proceda para su estudio.

En este caso en primer lugar a los cadáveres se les realizó la necropsia y a las muestras de pollo un examen macroscópico, y en ambos casos se procedió a la toma de muestras para los posteriores análisis.

Necropsia del lince ibérico

El protocolo de necropsia resulta algo diferente en el caso del lince ibérico, ya que al tratarse de una especie protegida y en peligro de extinción existen proyectos de colaboración con varios organismos (Estación Biológica de Doñana, Museo Nacional de Ciencias Naturales de Madrid, Universidad Miguel Hernández de Alicante, Universidad Complutense de Madrid), que llevan a cabo estudios complementarios que no tienen que ver con la causa de la muerte (investigación en cultivos celulares, almacenamiento de células germinales, colecciones zoológicas, etc). Durante la necropsia de cualquier lince ibérico, independientemente de las circunstancias de su muerte, se toman muestras para todos estos proyectos. Ante la complejidad que esto implica resultó necesario estandarizar los procedimientos a seguir, por lo que el Grupo Asesor de Aspectos Sanitarios del Lince Ibérico, un equipo integrado por técnicos, veterinarios e investigadores de los diferentes proyectos, se encargó de elaborar el “Manual de necropsias de lince ibérico”²³.

Según el manual, los objetivos de la necropsia de un lince ibérico son:

- Obtener la información para determinar la causa y las circunstancias de la muerte.
- La recolección de muestras para estudios genéticos, de agentes infecciosos y bancos de recursos biológicos (BRB).
- La conservación de los restos del cadáver (piel y esqueleto).

Para conseguir estos objetivos la necropsia es especialmente laboriosa, y se necesitan un mínimo de 4 personas para que se realice de forma adecuada, dos veterinarios para la necropsia en sí, una persona para la toma de muestras y otra para tomar notas.

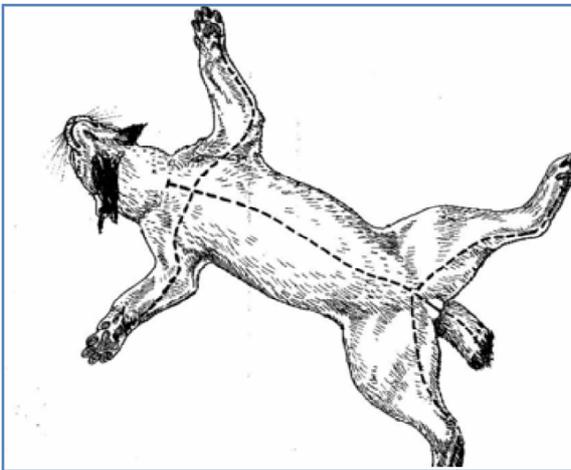
En primer lugar se llevó a cabo la lectura de las actas de levantamiento para hacerse una idea de las circunstancias en las que se ha encontrado el cadáver, y se recabó información de los técnicos de seguimiento sobre el

momento de la muerte (cuando el collar emisor comenzó a emitir señal de muerte). Se fotografió la bolsa y el precinto, comprobando que coincidía con la información del acta, y se desprecintó.

Antes de comenzar se preparó el material necesario, incluido en el Anexo I del manual de necropsias: instrumental (bisturí, tijeras, pinzas, sierra, etc), material fungible (equipos de protección individual, gasas, hilo de sutura, recipientes para la toma de muestras con diferentes medios de conservación, etc) y otro material imprescindible como una cámara fotográfica, testigos métricos, lector de microchip y los formatos a rellenar.

A continuación se procedió a la inspección externa del cadáver: pesaje, medidas de morfometría, presencia/ausencia de lesiones externas, ectoparásitos, condición corporal, otros hallazgos como salida de sangre por orificios naturales, presencia de entomofauna, etc. Se realizaron fotografías del cadáver completo y en detalle de los hallazgos reseñables.

Después se retiró completamente la piel, lo que permitió observar la ausencia de hematomas y la presencia de gran cantidad de grasa subcutánea.



Dado que se trataba de un macho adulto, con los testículos ya descendidos, se procedió entonces a la extracción de los mismos.

Para la posterior apertura de cavidades, colocado en cadáver en decúbito lateral derecho, se abdujo totalmente el miembro anterior y posterior izquierdo, cortando las uniones musculares y ligamentosas. En ese momento también se inspeccionó el interior de la articulación coxofemoral, sin alteraciones. Para abrir la cavidad abdominal se realizó una sección de la musculatura desde el apéndice xifoides del

esternón, siguiendo la línea de las costillas por un lado y la línea alba por el otro, y continuando paralelamente a la columna vertebral. Una vez hecho esto se valoró la integridad del diafragma, la colocación de las vísceras y la presencia de abundante grasa perivisceral de consistencia líquida y gas.

A continuación se procedió a la apertura de la cavidad torácica, cortando las costillas en sus extremos y el tejido blando adyacente para retirar la pared costal completa.

Una vez abiertas ambas cavidades internas, se seccionó de tejido en la zona intermandibular para la extracción de la lengua, laringe y la valoración de las tonsilas. Se independizaron esófago y tráquea, tiroides/paratiroides y se continuó distalmente para extraer en conjunto pulmones y corazón.

Por otro lado se independizó en cavidad abdominal el bazo, el hígado y el paquete gastrointestinal, teniendo especial cuidado en no perforar la pared para evitar contaminaciones.

En la cavidad abdominal aún quedaban las glándulas adrenales, los riñones, uréteres y vejiga de la orina, que se extrajeron a continuación.

También se extrajeron los ganglios linfáticos localizados, así como el nervio ciático.

Por último se realizaron cortes en el tejido óseo del cráneo para la extracción del encéfalo, se examinó la médula espinal en varias localizaciones, y se seccionó un hueso largo (fémur) para el examen de la médula ósea.

A medida que se fueron independizando los diferentes órganos se realizaron fotografías, valoración de la forma, tamaño y posibles lesiones, y toma de muestras para los diferentes análisis en el laboratorio y para los proyectos asociados.

En el caso del contenido digestivo, especialmente relevante en casos con sospecha de envenenamiento, se pesó el contenido gástrico, examinándolo con detalle, y se tomaron las muestras para toxicología y genética.

Tras la toma de muestras para los diferentes análisis y proyectos, el resto de tejidos se embolsó para su conservación en congelación.

Toda la información, desde las condiciones en que se remitió la muestra (bolsa de plástico precintada) hasta la valoración de cada uno de los órganos y tejidos examinados, se reflejó en el correspondiente formato de necropsia. La toma de las muestras también se reflejó por escrito en debida forma.

Necropsia del zorro

La necropsia del zorro en cuanto a su realización es similar a la explicada en el caso del lince, si bien en este caso no es necesario retirar la piel completa y la toma de muestras se limita a las destinadas al estudio toxicológico. En el laboratorio del CAD este protocolo se encuentra reflejado en la instrucción técnica interna “Necropsia de mamíferos”. El material necesario en cuanto a instrumental y accesorios (cámara fotográfica, testigos métricos, etc) es el mismo que en el caso del lince, mientras que en lo que respecta a fungibles se reduce a los equipos de protección individual y los recipientes para la toma de muestras de análisis toxicológicos, sin medio de conservación, y genéticos, con etanol 70°.

En primer lugar se fotografió la bolsa y el precinto, comprobándolo con el acta de toma de muestras y se desprecintó. Para la exploración externa se procedió del mismo modo, evaluando posibles heridas o fracturas, la condición corporal, el grado de descomposición, la presencia/ausencia de entomofauna, el peso, etc.

La piel solo se retiró en algunas zonas para descartar la presencia de hematomas.

La apertura de cavidades y el examen de los órganos internos siguieron el mismo protocolo, solo que en este caso la atención se centró en el contenido gástrico y en el reconocimiento de las lesiones típicas de envenenamiento, junto con la ausencia de otros hallazgos que pudieran indicar otra causa de muerte.

Se tomaron muestras para el análisis toxicológico y el análisis genético y el resto se almacenó en congelación.

Todo el proceso se acompañó de fotografías.

Igualmente toda la información desde las condiciones de remisión hasta la valoración de los órganos y la toma de las muestras, se reflejó por escrito en el formato correspondiente.

Examen macroscópico de los restos de pollo

El protocolo a seguir para la realización del examen macroscópico de cebos supuestamente envenenados se encuentra descrito en la instrucción técnica interna correspondiente. El material necesario es similar al de la necropsia del zorro.

Al igual que en el caso de los cadáveres, en el formato correspondiente se reflejaron las condiciones en las que se remitieron cada una de las muestras, fotografiando las bolsas y los precintos antes de abrirlos.

Las muestras se fotografiaron junto a un testigo métrico, se procedió a su pesaje y al examen de su naturaleza y de la posible impregnación con sustancias tóxicas, siendo en este caso visible en varios de los cebos la presencia de granulado negro.

Por último se tomaron muestras para los análisis toxicológicos y genéticos y para su conservación.

Análisis toxicológico de las muestras obtenidas de los cadáveres y los cebos

Las muestras tomadas de los cadáveres y los cebos para su análisis toxicológico se detallan en la siguiente tabla:

<u>REFERENCIA</u>	<u>MUESTRA Y PESO</u>	<u>ANÁLISIS</u>
Cadáver de lince ibérico (<i>Lynx pardinus</i>) BORNIZO	Granulado negro de contenido gástrico (0.04g)	Plaguicidas
Cadáver de zorro (<i>Vulpes vulpes</i>)	Granulado negro de contenido gástrico (0,04g)	Plaguicidas
Cebo supuestamente envenenado	Granulado negro (0,02g)	Plaguicidas
Cebo supuestamente envenenado	Cebo (5.01g)	Plaguicidas
Cebo supuestamente envenenado	Plumas (5.12g)	Plaguicidas
Bolsa de plástico	Granulado negro (0.03g)	Plaguicidas
Cebo supuestamente envenenado	Granulado negro (0.11g)	Plaguicidas
Cebo supuestamente envenenado	Cebo (7.30g)	Plaguicidas
Cebo supuestamente envenenado	Granulado negro (0.09g)	Plaguicidas
Cebo supuestamente envenenado	Cebo (5.32g)	Plaguicidas
Cebo supuestamente envenenado	Plumas (5.03g)	Plaguicidas

El protocolo de análisis toxicológicos se describe en la instrucción técnica interna “Extracción y análisis de compuestos organofosforados y carbamatos”. La apariencia del tóxico presente en el contenido gástrico de los cadáveres y en los cebos supuestamente envenenados se corresponde con la forma comercial del carbamato Aldicarb, un potente carbamato, por lo que el estudio toxicológico se inicia con este análisis. En caso de que el resultado hubiera sido negativo, el protocolo establecido indica que se procedería a realizar otros análisis en busca de otro tipo de compuestos, rodenticidas, organoclorados, etc.

La extracción y análisis de organofosforados y carbamatos realizada en el laboratorio del CAD se basa en un protocolo publicado en 1989 por P.E.F. Zoun y Th. J. Spierenburg²⁴.

Como ya se ha indicado en la tabla de muestras a analizar, se parte de dos tipos, unas en las que se tiene el supuesto tóxico (extracción directa) y otras en las que no (extracción normal). En estas últimas el protocolo indica que se debe partir de un peso aproximado de 5 gramos para que la extracción se realice adecuadamente.

Extracción normal:

Se parte de un peso de muestra (líquida o sólida) de aproximadamente de 5 g en un vaso de precipitado de 250 ml.

Añadir directamente en el vaso de precipitado unos 10 g de sulfato sódico anhidro (no es necesario paso previo por estufa) y aproximadamente 60 ml de diclorometano. Colocar el recipiente con un imán en el agitador magnético y agitar la muestra durante unos 10 min, posteriormente dejar reposar alrededor de 5 min.

Filtrar a través de un embudo de rama corta con un filtro Whatman nº 1 en un matraz redondo de rotavapor.

Encender el baño de refrigeración, la bomba de vacío y el rotavapor. Introducir el matraz redondo en el rotavapor cuando la temperatura del baño de refrigeración llegue hasta unos 8°C. Rotavaporar hasta sequedad, no superando los 40 °C y entre 250-300 mbar de presión aproximadamente (bajar la presión hasta que empiece a destilar).

Disolver el residuo seco añadiendo en el matraz 6 ml de etanol absoluto, agitando suavemente. En aquellas muestras donde se observe grasa, calentar la muestra al baño maría para disolver dicho residuo.

Colocar lana de vidrio en un embudo y añadir sobre esta una cantidad suficiente de sulfato sódico anhidro (sin paso previo por estufa) para cubrir totalmente la lana de vidrio. Filtrar la muestra a través de este sistema.

Colocar las agujas desechables y sobre ellas las columnas de extracción C-18 en el sistema de extracción. Dejar tapadas las posiciones que no se vayan a usar para que haga el vacío correctamente. Encender la bomba de vacío.

Añadir 3 ml de metanol y posteriormente 3 ml de agua destilada con pipeta Pasteur, sin permitir que la columna se seque. A continuación añadir la muestra con una pipeta Pasteur.

Dejar reposar la columna durante 10 – 15 min para facilitar su secado. Colocar un tubo de ensayo de vidrio en el interior del sistema de bomba de vacío, en el soporte dedicado a este fin, y aplicar vacío. Una vez seca la columna Añadir unos 4 ml de diclorometano y recogerlos en el tubo de vidrio; posteriormente trasvasar la muestra a dos viales un vial de vidrio de 2 ml con tapón de teflón con ayuda de una pipeta automática. Rotular con la identificación de la muestra cada uno de los recipientes usados en la extracción, así como el vial de conservación.

Extracción directa:

En estos casos la muestra del tóxico se remite en un vial de vidrio con tapón de teflón en el que se ha pesado previamente la sustancia. Se le añaden directamente 3 ml de diclorometano usando una pipeta automática, agitándolo para facilitar la extracción.

Análisis de organofosforados y carbamatos por cromatografía en capa fina:

Ante la gran cantidad de muestras remitidas al laboratorio del CAD, y el encarecimiento que supondría analizarlas todas mediante técnicas más sensibles como la cromatografía de gases y/o líquidos, se realiza un primer screening mediante cromatografía en capa fina, un método más sencillo, rápido y barato.

Partiendo de un cromatofolio de silica gel se cortan las placas en función de los patrones y muestras a pinchar. La altura de la placa es de aproximadamente 10 cm. Se traza una línea paralela a aproximadamente 1,5 centímetros del borde basal de la placa, con un lápiz. Sobre esta línea se marcan puntos que equidistan entre ellos aproximadamente 1,3cm, sobre los que irán las muestras en estudio, previamente rotuladas con un lápiz. Antes de pinchar los extractos de las muestras se debe realizar un lavado de las placas. Para ello introducir en la cubeta de revelado la fase móvil a utilizar (methyl isobutyl ketone), en un volumen suficiente para permitir 1cm de profundidad, tapar y dejar reposar unos cinco minutos para que los vapores de la solución se distribuyan por toda la cubeta. Introducir la placa verticalmente, asegurándose que la base entre en contacto con la fase móvil, y dejar que ascienda por capilaridad hasta el borde superior de la placa, rebasándola. A continuación, sacar la placa de la cubeta y dejarla secar sobre el calentador de placas, a unos 40°C. Este procedimiento puede realizarse inmediatamente antes de pinchar la placa, o en otro momento, dejándola ya preparada.

La aplicación de los extractos sobre la placa puede realizarse de forma manual o mediante un aplicador automático. En este caso, ante la urgencia de conocer los resultados, se prefirió hacerlo manualmente. Para ello colocar la placa sobre el calentador de placas, que debe estar a una temperatura de entre 35-40°C. Aplicar las muestras en un volumen de aproximadamente 40 µl con una pipeta automática. Además de las muestras, como parte del plan de control de calidad de la técnica, se pincha un blanco y tres patrones. El volumen de muestra dispensado será fijo para todas las muestras a excepción de aquellas muestras en las que se toma el plaguicida directamente (patrones o extracciones directas), que se dispensará alrededor de un volumen de 10 µl. Para la aplicación de las muestras, colocar la pipeta sobre el cromatofolio y por capilaridad la placa va absorbiendo el disolvente.

Una vez aplicadas las muestras, la placa se introduce en la cubeta con la fase móvil (methyl isobutyl ketone). Se debe añadir suficiente fase móvil para permitir 1cm de profundidad, y es importante tapar y dejar reposar unos cinco minutos antes de introducir la placa, para que los vapores de la solución se distribuyan por toda la cubeta. Una vez la placa en el interior de la cubeta, con su base en contacto con la fase móvil, ésta por capilaridad irá ascendiendo hacia el borde superior de la placa, sin que llegue a rebasarlo (dejar en torno a 5 mm de distancia entre el frente de la fase móvil y el final de la placa). Al retirar la placa de la cubeta se deposita sobre el calentador de placas y se deja secar a temperatura ambiente.

Para el revelado de la placa se utiliza una solución de colinesterasa y un revelador, que reaccionará con la enzima dando una coloración morada excepto donde haya inhibición, provocada por el tóxico presente en las muestras analizadas.

Reactivos necesarios para el revelado

- Tampón de pH 8 con una disolución de fosfato 0,05 M: Para ello disolver 1,679 g de Na₂HPO₄ y 0,0936 g de KH₂PO₄ (pesados en la balanza de precisión) en un matraz aforado de 250ml, enrasando con agua destilada.

- Solución de colinesterasa (ChE): Disolver aproximadamente 105 mg de butiril colinesterasa en 80 ml (o proporción equivalente) de tampón fosfato pH 8 0,05 M en una probeta. Disolver con ayuda del agitador magnético.

Se preparan alícuotas de unos 5 ml en tubos de plástico de 10 ml con tapón, conservándose mientras no se use en congelación. Cuando se vaya a usar, se debe descongelar en oscuridad, utilizar inmediatamente y desechar el resto.

- Solución α -naftil acetato: Disolver 62,5 mg de α -naphthyl acetate (pesados en la balanza de precisión) con etanol absoluto enrasando en un matraz aforado de 25ml. Hacer alícuotas de aproximadamente 0,5 ml introduciéndolas en tubos de plástico de 1,5 ml y conservar en congelación. Igualmente, en el momento del uso se descongelará previamente en oscuridad.

- Solución de Fast-blue salt: Disolver 39 mg de Fast blue RR salt (pesados en la balanza de precisión) en un matraz aforado de 25ml enrasando con agua destilada (o proporción equivalente). Preparar tantas alícuotas como sea posible tomando unos 2 ml de la disolución e introduciéndolas en tubos de plástico 10 ml con tapón. Se conservará en congelación hasta el momento del uso, cuando se descongelará en oscuridad.

Revelado de las placas:

Pulverizar la placa con la solución de colinesterasa, previamente descongelada, con ayuda del atomizador, sin que quede demasiado empapada. Incubar la placa en posición horizontal, durante unos 30 minutos, a una temperatura ente 35-40°C, en el baño termostático con tapadera. La placa se coloca sobre un soporte para que no esté en contacto con el agua. Se debe conseguir un ambiente saturado de humedad y oscuridad. La enzima será inhibida en los lugares donde se encuentra el plaguicida.

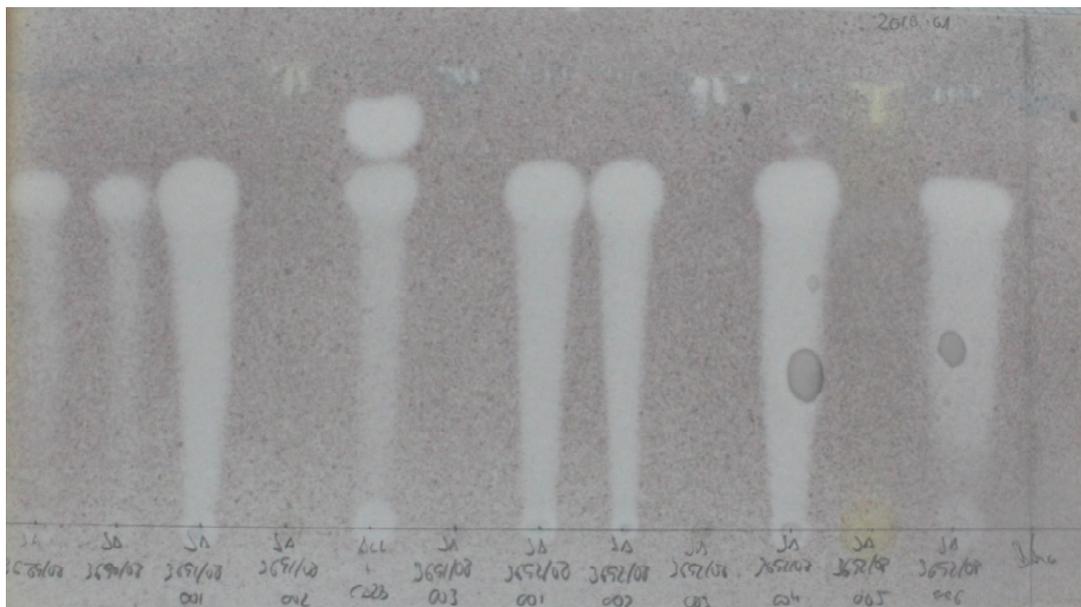
Sacar la placa de incubación y pulverizarla con una mezcla, preparada en el momento de usarla, añadiendo una alícuota de 0,5 ml de la solución α -naftil acetato en el tubo de plástico que contiene los 2 ml de solución Fast-blue SALT, previamente descongelada. Mezclar invirtiendo suavemente el tubo varias veces y pulverizar con el atomizador. Volver a incubar la placa en horizontal durante unos 10 minutos, a una temperatura entre 35-40°C, en el baño termostático RAYPA con tapadera. La placa se coloca sobre un soporte para que no esté en contacto con el agua. Se debe conseguir un ambiente saturado de humedad y oscuridad.

Sacar la placa y secar sobre el calentador de placa durante unos 5 minutos, entre 35 y 40 °C. El acetato de alfa naftil es sustrato de la enzima y liberará naftol. Luego el naftol se copula con el Fast Blue dando color lila donde la enzima es activa.

En los casos positivos, donde la enzima es inhibida por el plaguicida, no se produce la reacción y se revelan en blanco con el revelado de la colinesterasa. La placa adquiere un color morado y los compuestos organofosforados y carbamatos permanecen de color blanco.

Una vez revelada la placa se puede establecer un coeficiente de relación entre la distancia alcanzada por el frente y la distancia alcanzada por una sustancia específica, a esta relación se conoce con el nombre de Rf ($R_f = \text{distancia de la sustancia}/\text{frente de la fase móvil}$). Esto permite intentar identificar el compuesto presente en la muestra, mediante el estudio comparativo del Rf entre el patrón y la muestra (se compara a qué altura se revela la muestra y con qué patrones podría coincidir, ya que cada uno tiene su propio Rf).

En el caso que nos ocupa, todas las muestras positivas presentaron inhibición a la misma altura que el aldicarb aplicado como patrón, como puede verse en la imagen siguiente:



Confirmación y cuantificación de los resultados

Una vez obtenidos los resultados del screening en capa fina, se procede a analizar los extractos mediante cromatografía de líquidos (UPLC-MS/MS) y gases (GC-MS).

Se determinarán por la técnica de cromatografía de gases acoplada a detector de espectrometría de masas en tandem (GC-MS/MS) y por la técnica de cromatografía líquida de ultrapresión acoplada a espectrometría de masas en tándem de tipo triple cuadrupolo (UPLC-MS/MS).

El equipo utilizado es un cromatógrafo de gases Varian CD3800, con detector de espectrometría de masas en tándem MS Saturn 2200 y detector de purga y trampa, que consta de un analizador de trampa de iones, GCMS/MS-ITD, que trabaja por técnicas de barrido.

El cromatógrafo de líquidos es un equipo de marca Waters de ultrapresión (UPLC), con detector de espectrometría de masas en tándem de tipo triple cuadrupolo marca Micromass.

Ambos cumplen los requisitos de los métodos de análisis según la normativa de referencia (DV75/440, RD 927/1988, RD 1541/1994, DV76/464, RD 849/1988 y RD 995/2000).

Análisis genético de las muestras obtenidas de los cadáveres y los cebos

Las muestras a analizar se incluyen en la siguiente tabla:

Descripción de la muestra	Precinto
Pata de pollo del contenido estomacal del lince BORNIZO	0005472
Músculo de pollo unido a la muestra anterior	0005472
Pata de pollo del contenido estomacal	0005859
Pata de pollo del cebo supuestamente envenenado	0005474
Pata de pollo del cebo supuestamente envenenado	0005474
Pluma de pollo del cebo supuestamente envenenado	0005474
Pluma de pollo del cebo supuestamente envenenado	0005474
Pata de pollo del cebo supuestamente envenenado	0005824
Pata de pollo del cebo supuestamente envenenado	0005824
Pata de pollo del cebo supuestamente envenenado	0005824
Pata de pollo del cebo supuestamente envenenado	0005824
Pluma de pollo del cebo supuestamente envenenado	0005824
Músculo	0005828

Para el análisis genético de las muestras, en primer lugar se realizó una búsqueda bibliográfica de artículos científicos sobre marcadores microsatélites de gallina²⁵⁻²⁹. Este tipo de marcador ofrece la posibilidad de estimar los niveles de variabilidad genética dentro de las poblaciones y son de gran importancia para realizar estimaciones de la consanguinidad.

El siguiente paso consistió en la extracción del ADN de las muestras por medio de un kit comercial, y posteriormente con un protocolo clásico.

Extracción de ADN:

Se realizó por medio del kit comercial KIT DNeasy BLOOD AND TISSUE (QIAGEN)³⁰, según el protocolo descrito en la instrucción técnica interna correspondiente.

Los kits comerciales suelen emplear un sistema de columnas con membranas de sílice, en las que se lleva a cabo un proceso de varios filtrados de la muestra, con la ayuda de la centrifugación, que la van purificando hasta obtener finalmente los ácidos nucleicos.

El sistema de diferentes buffers, junto con la proteinasa K, permite la lisis directa de las células seguida de la unión selectiva del DNA a la membrana de la columna. Después de la lisis celular, el proceso de centrifugación retira

los contaminantes e inhibidores de enzimas como proteínas y cationes divalentes, mientras que el DNA queda unido a la membrana. El DNA purificado se eluye de la columna en un buffer con bajo contenido en sales, o bien agua, y queda listo para su uso. Una vez extraído el DNA se puede cuantificar mediante espectrofotometría. El kit también se puede emplear para purificar ADN desde muy pequeñas cantidades de material.

El procedimiento es el siguiente:

1. Con la ayuda de las pinzas colocar el tejido en una bandeja de pesada. Con el bisturí cortamos un trozo de tejido de aproximadamente 6 mm³ (se recomienda un máximo de 25 mg para que la extracción funcione). Pasarlo a un tubo de 1.5 mL y añadir 180 µL de buffer ATL.
2. Añadir 20 µL de proteinasa K, mezclar por vórtex e incubar a 56°C, 550 rpm de agitación, en el termobloque, hasta que el tejido esté lisado (normalmente mínimo 3-4 horas).
3. Agitar en el vórtex y centrifugar unos segundos. Añadir 200 µL de buffer AL y mezclar por vórtex. Inmediatamente añadir 200 µL de etanol 96% y mezclar por vórtex hasta homogenizar. Puede aparecer un precipitado blanco tras la mezcla que no interfiere en el proceso.
4. Montar la columna sobre un tubo de 2 mL. Cargar la toda la mezcla en la columna (incluyendo los precipitados si los hubiera) con la ayuda de la micropipeta. Usar una punta nueva para cada muestra.
5. En la centrífuga de microtubos centrifugar la columna (montada en el tubo de colección) durante 1 minuto a 8000 rpm (6.000 x g). Retirar la columna (sin depositarla en ninguna superficie), tirar el líquido que queda en el tubo y volver a poner la columna en el tubo. Se puede desechar el tubo de colección y utilizar uno nuevo.
6. Con la micropipeta añadir 500 µL de buffer AW1 (con etanol añadido) a la columna. Repetir a continuación el paso 5.
7. Con la micropipeta añadir 500 µL de buffer AW2 (con etanol añadido) a la columna. Repetir el paso 5, pero durante 3 minutos a 13000 rpm.

Es importante que en este proceso se seque la membrana para que no queden restos de etanol que interfieran en posteriores reacciones. Si al retirar la columna contacta con los restos de la centrifugación del fondo del tubo, se ha de colocar la columna en un tubo nuevo y centrifugar a 13000 rpm durante 1 min, para retirar el etanol.

8. Tirar el tubo y colocar la columna sobre un tubo de 1.5 mL. Añadir 100 µl de tampón AE directamente sobre la membrana. Incubar 1 minuto a temperatura ambiente.
9. Centrifugar a 8000 rpm durante 1 min. Retirar la columna y guardarla sobre un tubo de 2 mL en el frigorífico por si hiciera falta recuperar más ADN. Conservar el tubo con el ADN eluido en el frigorífico.
10. Si es necesario recuperar más ADN colocar la columna que hemos guardado sobre un tubo nuevo de 1.5 mL. Añadir 100 µl de tampón AE directamente sobre la membrana. Incubar 1 minuto a temperatura ambiente. Centrifugar a 8000 durante 1 min. Tirar la columna. Conservar el tubo con el ADN eluido en el frigorífico.

Posteriormente se consiguió mejorar el rendimiento de la extracción y la pureza del ADN obtenido por medio de un protocolo de extracción clásico más elaborado, descrito en la instrucción técnica interna correspondiente:

- Añadir 300 µL de tampón de lisis, 30 µL de proteinasa K (20 mg/mL) y 10 µL de DTT (1M). Agitar y centrifugar unos segundos.
- Incubar a +55°C (~65°C) agitando a +1000 (~1400) rpm, 2 horas o hasta que esté digerido. Centrifugar unos segundos y añadir 315 µL de LiCl 5M, e invertir manualmente durante 1 minuto.

- Centrifugar de nuevo. Añadir 630 μ L de la mezcla cloroformo-isoamílico. Agitar al máximo en el vórtex durante 1-2 minutos.
- Centrifugar durante 15 minutos a 13.000-14.000 rpm en una centrifuga refrigerada.
- Pasar el sobrenadante a un microtubo nuevo utilizando micropipeta, con cuidado de no arrastrar la fase inferior. Desechar el tubo con la fase inferior de la extracción. La cantidad mínima a traspasar son 500 μ L.
- Añadir etanol absoluto frío (1 mL ó hasta llenar el microtubo). Invertir el tubo manualmente y congelar unas 2 horas. Si se puede, dejar toda la noche. Para muestras degradadas añadir 5 μ L de glucógeno antes de congelar.
- Centrifugar durante 15 minutos a 13.000-14.000 rpm, temperatura refrigerada.
- Eliminar el sobrenadante volcando el tubo sobre un vaso de precipitados con cuidado de que el pellet no caiga. Se puede utilizar una pipeta para retirar todo el líquido. Tener localizado siempre donde se encuentra el pellet para no perderlo.
- Añadir 1 mL de etanol al 70 % frío e invertir el tubo de forma manual varias veces para limpiar la muestra de impurezas.
- Centrifugar durante 15 minutos a 13.000-14.000 rpm en centrífuga refrigerada.
- Eliminar el sobrenadante como se ha descrito anteriormente.
- Para secar el pellet dejar el tubo abierto dentro de la campana en funcionamiento. Una vez seco el pellet, resuspenderlo añadiendo tampón TLE 1X (también se puede utilizar agua grado reactivo).

Tras la extracción de ADN, el siguiente paso consistió en la selección de un grupo de microsatélites distribuidos por todo el genoma de gallina con la ayuda de un mapa cromosómico publicado, a fin de evitar marcadores ligados.

Se consiguieron los primers y se puso a punto la PCR en las muestras a estudiar. Primero se seleccionaron 19 microsatélites, distribuidos en 10 autosomas. Tras las primeras pruebas se decidió utilizar 14 de los 19 microsatélites, distribuidos en 9 autosomas. Se pidieron después los primers marcados con fluoróforos y se puso a punto el protocolo de PCR.

A continuación se amplificaron los fragmentos mediante PCR y se secuenciaron.

Se analizaron los resultados mediante un programa informático (Genemapper® Software v. 3.7.), asignando los alelos para cada marcador y calculando el parentesco entre las muestras. Se afinó aún más con el estudio de las distancias y parentesco mediante otro programa informático (Cervus v. 3.0.3., Molkin v.3.0., MEGA v.4.0.).

Una vez calculadas las distancias genéticas se establecen las relaciones filogenéticas entre las muestras obteniéndose el siguiente árbol, por el método de Neighbour Joining (NJ), basado en el criterio de mínima evolución según el cual el mejor árbol es el que minimiza la longitud de sus ramas internas. Se determina la pareja de secuencias más cercanas y se unen mediante un nodo interno, repitiéndose este proceso con todas las secuencias hasta que quedan todas unidas por nodos internos.

Con este método se obtiene un árbol no enraizado y aditivo, en el que la longitud de sus ramas indica cambio evolutivo. Las ramas presentan diferentes distancias al punto de origen porque no asume la existencia de un reloj molecular, y por lo tanto la tasa de cambio varía entre distintos linajes y secuencias.

RESULTADOS

Descripción de la entrega del material, condiciones de envío y precintado:

Desde la Delegación Provincial de Medio Ambiente de Jaén se hace entrega en el Centro de Análisis y Diagnóstico (Málaga), los días 18 y 25 de octubre de 2008, del siguiente material:

Muestra (identificación del CAD)	Tipo de muestra	Coordenada UTM este	Coordenada UTM norte	Precinto
JA/3689/08/001	Cadáver de lince ibérico (<i>Lynx pardinus</i>) BORNIZO	No remitida	No remitida	0005472
JA/3690/08/001	Cadáver de zorro (<i>Vulpes vulpes</i>)	No remitida	No remitida	0005859
JA/3691/08/001	Cebo supuestamente envenenado	No remitida	No remitida	0005474
JA/3691/08/002	Cebo supuestamente envenenado	No remitida	No remitida	0005474
JA/3691/08/003	Cebo supuestamente envenenado	No remitida	No remitida	0005474
JA/3691/08/004	Bolsa de plástico	No remitida	No remitida	0005474
JA/3692/08/001	Cebo supuestamente envenenado	No remitida	No remitida	0005824
JA/3692/08/002	Cebo supuestamente envenenado	No remitida	No remitida	0005824
JA/3692/08/003	Cebo supuestamente envenenado	No remitida	No remitida	0005824
JA/3692/08/004	Cebo supuestamente envenenado	No remitida	No remitida	0005824
JA/3692/08/005	Cebo supuestamente envenenado	No remitida	No remitida	0005824
JA/3692/08/006	Cebo supuestamente envenenado	No remitida	No remitida	0005824
JA/3855/08/001	Cadáver de pollo	No remitida	No remitida	0005828

HECHOS A DESTACAR:

Según la información reflejada en el acta de levantamiento y envío de muestras, el cadáver de lince ibérico (muestra JA/3689/08/001) se corresponde con “Bornizo”, macho de la cohorte 2003, de fenotipo “mota fina” y vida libre. Identificado con el microchip nº 941000002464814. Procede de Andújar.

Con ayuda del equipo canino se han tomado muestras en un radio de 100 metros cuadrados. Todas las muestras se han recogido alrededor de un gallinero rodeado por un cercado de protección, en cuyo interior se ha encontrado el cadáver del lince Bornizo, localizado por la señal del collar emisor.

Así mismo se indica que se remite junto con el resto de las muestras un ejemplar de gallina (muestra JA/3855/08/001) que “sí se puede verificar como propiedad del imputado de los hechos, debe servir como referencia en las comparativas genéticas que se realicen con el resto de cadáveres de pollos que se remiten como muestras en relación con el citado expediente (JA 41/08)”.

ESTUDIOS REALIZADOS:**NECROPSIA:****CÓDIGO MUESTRA JA/3689/08/001 Cadáver de lince ibérico**

Material remitido en una bolsa de plástico de la Consejería de Medio ambiente, con precinto CMA nº 0005472, que contiene un ejemplar de lince ibérico (*Lynx pardinus*).



Morfometría: Ejemplar de lince ibérico, macho, adulto, de 14 kg de peso. Su condición corporal es de 5 (obeso); la longitud corporal es 87 cm, el perímetro torácico son 51 cm, la longitud de la cola (del stop a la base de la cola) 14 cm, la longitud del tarso 17,5 cm, su altura a la cruz son 47 cm y la longitud de la oreja son 8 cm.

Condición general: Buena condición física. Presenta collar radioemisor. Abdomen distendido, lleno de gas. Presenta moderada autólisis.

Piel: Se observa herida de incisión en el escroto (extirpación de ambos testículos).

Mucosas, aperturas nasales y oídos: Mucosas congestivas, al igual que la lengua. Epistaxis. Se observan áreas de lividez en las encías. En el oído interno se aprecia presencia de cerumen negruzco.

Sistema músculo-esquelético: Leve cúmulo de sangre en el tejido subcutáneo en la zona ventral del cuello. Se observa coloración verdosa de la piel, áreas de livideces, hipostasis y enfisema subcutáneo generalizado, compatible con los procesos de autólisis.

Cavidades corporales:

Cavidad oral: Presencia de restos de sangre.



Cavidad torácica: Congestión severa generalizada.



Cavidad abdominal: Congestión generalizada. Presencia de abundante grasa peritoneal. Se observan signos de autólisis en todos los órganos. Gran cantidad de grasa en estado líquido en toda la cavidad.



Hemolinfático:

Bazo: Pesa 38.48 gramos. Coloración ennegrecida y consistencia friable, compatible con autólisis.



Sistema respiratorio:

Cavidad nasal: Glotis y epiglotis muy congestivas.

Tráquea: Leve congestión, con presencia de una pequeña cantidad de líquido sanguinolento en la luz.



Ganglios linfáticos regionales: Signos de autolisis.

Pulmones: Extremadamente congestivos. Autolisis. Diafragma congestivo.



Sistema cardiovascular:

Pericardio: Cúmulo de gas en pericardio. Gruesa capa de grasa sobre el pericardio, de 0,5 cm de espesor.

Corazón: Autólisis de la musculatura cardíaca. Se observan áreas ennegrecidas en el epicardio.



Sistema digestivo:

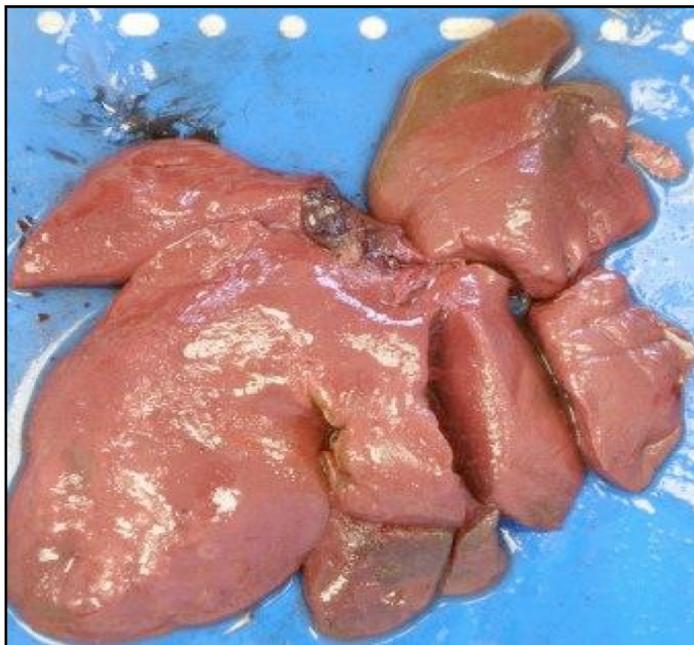
Esófago: Se observa una pequeña cantidad de granulado negro disperso.

Estómago: El contenido, de 119 gramos de peso, está constituido por restos de ave, semillas (similares a las del melón y otras de trigo) y granulado negro difuso.

Intestino delgado: Congestión de los vasos mesentéricos. Áreas de coloración heterogénea, con acumulación de gas, compatible con autólisis.



Hígado: presenta un peso de 267.17 gramos. Consistencia friable, coloración pálida. Vesícula biliar con coloración anaranjada.



Sistema urinario:

Riñones: Buena cobertura grasa. Consistencia friable y coloración pálida. Pérdida del patrón trabecular. Coloración negruzca de la pelvis renal.



Peso (riñón D+grasa) 74.40 gr

Peso (riñón I+grasa) 67.56 gr

Peso (riñón D) 47.40 gr

Peso (riñón I) 44.67 gr

Sistema endocrino:

Glándulas perianales: glándula derecha presenta un contenido denso de color verdoso y granuloso.

Sistema nervioso:

Encéfalo y cerebelo: Autolisis, no valorable.

Médula espinal: Autolisis, pérdida de estructura, consistencia casi líquida.

CÓDIGO MUESTRA: JA/3690/08/001 Cadáver de zorro

Material remitido en una bolsa de plástico de la Consejería de Medio ambiente, con precinto CMA nº 0005859, que contiene un ejemplar de zorro (*Vulpes vulpes*).

Ejemplar de zorro, macho adulto de 6,94 kg de peso, en estado de moderada autolisis.

Exploración externa: Se observa salida de sangre por nariz y boca, además de presión lingual.

Exploración interna: Congestión generalizada de todos los órganos internos, con presencia de hemoperitoneo y hemotórax. Presenta varias formaciones redondeadas, de color blanquecino, de unos 2mm de diámetro, sobre las serosas, compatibles con formas enquistadas parasitarias.



El contenido estomacal, de 351,25 g de peso, está constituido por restos de cadáver de pollo impregnado con abundante granulado negro.





ANÁLISIS MACROSCÓPICO DE LOS SUPUESTOS CEBOS:

JA/3691/08/001

Material remitido en una bolsa de plástico de la Consejería de Medio ambiente, con precinto CMA nº 0005474, que contiene cuatro bolsas de autocierre rotuladas como muestras 1, 2, 3 y 5.

Bolsa de autocierre, rotulada como muestra nº1, que contiene un cebo supuestamente envenenado.

Se trata de restos de cadáver de pollo, de 113,58 g de peso, en estado de moderada autólisis, con las cavidades corporales expuestas y rellenas de abundante granulado negro. Se observa ausencia del tracto digestivo.





JA/3691/08/002

Material remitido en una bolsa de plástico de la Consejería de Medio ambiente, con precinto CMA nº 0005474, que contiene cuatro bolsas de autocierre rotuladas como muestras 1, 2, 3 y 5.

Bolsa de autocierre, rotulada como muestra nº2, que contiene un cebo supuestamente envenenado.

Se trata de restos de varios cadáveres de pollo, con un peso total de 130,58 g. Se observan varias alas desarticuladas, cuatro mollejas de ave y algunos restos de tejidos no identificables, en estado de moderada autólisis. En el contenido de las mollejas se observan semillas similares a las del melón.

No se observa impregnación visual con sustancias tóxicas.





JA/3691/08/003

Material remitido en una bolsa de plástico de la Consejería de Medio ambiente, con precinto CMA nº 0005474, que contiene cuatro bolsas de autocierre rotuladas como muestras 1, 2, 3 y 5.

Bolsa de autocierre, rotulada como muestra nº3, que contiene un cebo supuestamente envenenado.

Se trata de un conjunto de plumas, de 5,12 g de peso, sin impregnación visual con sustancias tóxicas.



JA/3691/08/004

Material remitido en una bolsa de plástico de la Consejería de Medio ambiente, con precinto CMA nº 0005474, que contiene cuatro bolsas de autocierre rotuladas como muestras 1, 2, 3 y 5.

Bolsa de autocierre, rotulada como muestra nº5, que contiene una bolsa de plástico, de 4 g de peso.

No se observa impregnación de ningún tipo de sustancia en su superficie.



JA/3692/08/001

Material remitido en una bolsa de plástico de la Consejería de Medio ambiente, con precinto CMA n° 0005824, que contiene seis bolsas de autocierre rotuladas como muestras 6, 7, 8, 9, 10 y 11.

Bolsa de autocierre, rotulada como muestra n°6, que contiene un cebo supuestamente envenenado.

Se trata de restos de cadáver de pollo, de 172,75 g de peso, en estado de moderada autólisis, con las cavidades corporales expuestas y rellenas de abundante granulado negro. Se observa ausencia del tracto digestivo.



JA/3692/08/002

Material remitido en una bolsa de plástico de la Consejería de Medio ambiente, con precinto CMA n° 0005824, que contiene seis bolsas de autocierre rotuladas como muestras 6, 7, 8, 9, 10 y 11.

Bolsa de autocierre, rotulada como muestra n°7, que contiene un cebo supuestamente envenenado.

Se trata de restos de cadáver de pollo, de 247,21 g de peso, en estado de moderada autólisis, con las cavidades corporales expuestas y rellenas de abundante granulado negro. Se observa ausencia del tracto digestivo.



JA/3692/08/003

Material remitido en una bolsa de plástico de la Consejería de Medio ambiente, con precinto CMA nº 0005824, que contiene seis bolsas de autocierre rotuladas como muestras 6, 7, 8, 9, 10 y 11.

Bolsa de autocierre, rotulada como muestra nº8, que contiene un cebo supuestamente envenenado.

Se trata de restos de cadáver de pollo, de 200,32 g de peso, en estado de moderada autólisis.

La superficie corporal se encuentra cubierta de larvas de necrófagos vivas. Aparentemente el cadáver no presenta ninguna lesión externa, ni tampoco se observa impregnación visual.



JA/3692/08/004

Material remitido en una bolsa de plástico de la Consejería de Medio ambiente, con precinto CMA nº 0005824, que contiene seis bolsas de autocierre rotuladas como muestras 6, 7, 8, 9, 10 y 11.

Bolsa de autocierre, rotulada como muestra nº9, que contiene un cebo supuestamente envenenado.

Se trata de restos de cadáver de pollo, de 187,36 g de peso, en estado de moderada autólisis, con las cavidades corporales expuestas y rellenas de abundante granulado negro. Se observa ausencia del tracto digestivo.



JA/3692/08/005

Material remitido en una bolsa de plástico de la Consejería de Medio ambiente, con precinto CMA nº 0005824, que contiene seis bolsas de autocierre rotuladas como muestras 6, 7, 8, 9, 10 y 11.

Bolsa de autocierre, rotulada como muestra nº10, que contiene un cebo supuestamente envenenado.

Se trata de restos de pescado y un trozo de grasa, de 47,32 g de peso, en estado de moderada autólisis.

No se observa impregnación visual con sustancias tóxicas.



JA/3692/08/006

Material remitido en una bolsa de plástico de la Consejería de Medio ambiente, con precinto CMA nº 0005824, que contiene seis bolsas de autocierre rotuladas como muestras 6, 7, 8, 9, 10 y 11.

Bolsa de autocierre, rotulada como muestra nº11, que contiene un cebo supuestamente envenenado.

Se trata de un conjunto de plumas, de 11,53 g de peso, sin impregnación visual.



JA/3855/08/001

Material remitido en una bolsa de plástico de la Consejería de Medio ambiente, con precinto CMA nº 0005829, dentro de un bidón de transporte con precinto CMA nº 0005828.

Bolsa de autocierre rotulada “Muestra Nº1. Cadáver de pollo” con la muestra envuelta en papel de aluminio.

Se trata de un cadáver de pollo, de 228.17 g de peso, en estado de avanzada autólisis, cubierto de larvas de necrófagos.

En el contenido de la molleja se observan semillas similares a las del trigo.





TOMA DE MUESTRAS Y TIPOS DE ANÁLISIS

A continuación se describe la muestra obtenida del caso JA/3689-3692,3855/08 y el tipo de análisis al cual se destina:

Muestra	Tipo de muestra	Submuestra	Tipo de submuestra	Análisis al que se destina
JA/3689/08/001	Cadáver de lince ibérico (<i>Lynx pardinus</i>) BORNIZO	JA/3689/08/001/01	Contenido estomacal	Plaguicidas
		JA/3689/08/001/01/01	Pata de pollo de contenido estomacal	Genética
		JA/3689/08/001/01/02	Músculo de pollo de contenido estomacal	Genética
JA/3690/08/001	Cadáver de zorro (<i>Vulpes vulpes</i>)	JA/3690/08/001/01	Contenido estomacal	Plaguicidas
		JA/3690/08/001/01	Pata de pollo del contenido estomacal	Genética
		JA/3690/08/001/02	Hígado	Conservación
JA/3691/08/001	Cebo supuestamente envenenado	JA/3691/08/001/01	Granulado negro	Plaguicidas
		JA/3691/08/001/02	Pata de pollo del cebo	Genética
JA/3691/08/002	Cebo supuestamente envenenado	JA/3691/08/002/01	Pata de pollo del cebo	Plaguicidas
		JA/3691/08/002/02	Pluma de pollo del cebo	Genética
JA/3691/08/003	Cebo supuestamente envenenado	JA/3691/08/003/01	Pluma de pollo del cebo	Plaguicidas
		JA/3691/08/003/02	Pluma de pollo del cebo	Genética
JA/3691/08/004	Bolsa de plástico	No procede	No procede	Conservación
JA/3692/08/001	Cebo supuestamente envenenado	JA/3692/08/001/01	Granulado negro	Plaguicidas
		JA/3692/08/001/02	Pata de pollo del cebo	Genética
JA/3692/08/002	Cebo supuestamente envenenado	JA/3692/08/002/01	Granulado negro	Plaguicidas
		JA/3692/08/002/02	Pata de pollo del cebo	Genética
JA/3692/08/003	Cebo supuestamente envenenado	JA/3692/08/003/01	Pata de pollo del cebo	Plaguicidas
		JA/3692/08/003/02	Pata de pollo del cebo	Genética
JA/3692/08/004	Cebo supuestamente envenenado	JA/3692/08/004/01	Granulado negro	Plaguicidas
		JA/3692/08/004/02	Pata de pollo del cebo	Genética
JA/3692/08/005	Cebo supuestamente envenenado	No procede	No procede	Plaguicidas
JA/3692/08/006	Cebo supuestamente envenenado	JA/3692/08/006/01	Pluma de pollo del cebo	Plaguicidas
		JA/3692/08/006/02	Pluma de pollo del cebo	Genética
JA/3855/08/001	Cadáver de pollo (<i>Gallus gallus</i>)	JA/3855/08/001/01	Músculo	Genética

RESULTADOS DEL ANÁLISIS TOXICOLÓGICO

Muestra	Tipo de muestra	Submuestra analizada	Resultado en capa fina (organofosforados y carbamatos)	Resultado y cuantificación-técnica	Precinto
JA/3689/08/001/01	Cadáver de lince ibérico BORNIZO	Contenido estomacal	Positivo	1.90 mg/L ALDICARB Cromatografía de líquidos (UPLC-MS/MS).	005472
JA/3690/08/001/01	Cadáver de zorro	Contenido estomacal	Positivo	2.73 mg/L ALDICARB Cromatografía de líquidos (UPLC-MS/MS).	005859
JA/3691/08/001/01	Cebo	Granulado negro	Positivo	437.70 mg/L ALDICARB Cromatografía de líquidos (UPLC-MS/MS).	0005474
JA/3691/08/002	Cebo	Pata de pollo	Negativo	Negativo	0005474
JA/3691/08/003	Cebo	Pluma de pollo	Negativo	Negativo	0005474
JA/3692/08/001/01	Cebo	Granulado negro	Positivo	123.20 mg/L ALDICARB Cromatografía de líquidos (UPLC-MS/MS).	0005824
JA/3692/08/002/01	Cebo	Granulado negro	Positivo	346.70 mg/L ALDICARB Cromatografía de líquidos (UPLC-MS/MS).	0005824
JA/3692/08/003	Cebo	Pata de pollo	Negativo	Negativo	0005824
JA/3692/08/004	Cebo	Granulado negro	Positivo	739.30 mg/L ALDICARB Cromatografía de líquidos (UPLC-MS/MS).	0005824
JA/3692/08/005	Cebo	Restos de pescado	Negativo	Negativo	0005824
JA/3692/08/006	Cebo	Pluma	Positivo	20.20 mg/L ALDICARB Cromatografía de líquidos (UPLC-MS/MS).	0005824

Extracción de ADN:

Por medio del kit comercial la extracción funcionó en todas las muestras salvo en la número 1, 2, 3 y 8. Posteriormente se consiguió mejorar el rendimiento de la extracción y la pureza del ADN obtenido por medio de un protocolo de extracción clásico más elaborado en las muestras 1, 2 y 3; no obstante, tras varios intentos la PCR en algunos marcadores no funcionaron, posiblemente porque las tres son muestras procedentes de contenido estomacal, estando parcialmente digeridas y con alto contenido en sales.

La muestra 8, a pesar de producir ADN de calidad y funcionar en el protocolo de sexado de aves siempre que se probó, funcionó sólo en uno de los 14 marcadores seleccionados, y se descartó del estudio genético posterior.

Selección de un grupo de microsatélites:

Con la ayuda de un mapa cromosómico publicado, primero se seleccionaron 19 microsatélites, distribuidos en 10 autosomas. Tras las primeras pruebas se decidió utilizar 14 de los 19 microsatélites, distribuidos en 9 autosomas.

Microsatélite	Cromosoma	N° alelos	Rango alélico	Protocolo	MgCl ₂	Tm
MCW0016	3	4	135-158	MG1	1.5 mM	60
ADL0136	9	10	121-175	MG5	1.5 mM	52
ADL0158	10	6	176-216	MG5	1.5 mM	52
MCW0145	1	8	164-217	MG5	1.5 mM	55
MCW0330	17	4	257-290	MG1	1.5 mM	60
ADL0210	11	9	110-132	MG5	1.0 mM	48
MCW0067	10	3	171-182	MG1	1.5 mM	60
LEI0094	4	4	260-283	MG1	1.5 mM	58
MCW0111	1	3	92-106	MG1	1.5 mM	58
MCW0037	3	4	151-159	MG1	1.5 mM	60
MCW0120	7	8	263-284	MG5	1.5 mM	55
ADL0176	2	9	174-201	MG5	1.5 mM	52
MCW0068	1	7	171-197	MG5	1.5 mM	55
MCW0134	9	9	257-284	MG5	1.5 mM	55

Los valores de los alelos de los marcadores se analizaron para estimar el nivel informativo que ofrecen para el estudio de parentesco realizado.

Locus	k	N	HObs	HExp	PIC
ADL0136	9	10	0.600	0.884	0.823
ADL0158	7	10	0.900	0.784	0.721
ADL0176	6	11	0.818	0.753	0.675
ADL0210	8	10	0.900	0.863	0.798
LEI0094	4	9	0.556	0.595	0.512
MCW0016	10	12	0.750	0.833	0.779
MCW0037	4	12	0.500	0.605	0.523
MCW0067	6	12	1.000	0.822	0.755
MCW0068	11	9	0.889	0.941	0.879
MCW0111	8	13	0.615	0.760	0.696
MCW0120	7	11	1.000	0.848	0.784
MCW0134	5	10	0.800	0.679	0.590
MCW0145	6	11	0.909	0.766	0.703
MCW0330	5	10	1.000	0.795	0.713

Número de individuos:	13
Número de loci:	14
Número medio de alelos por locus (k):	6.86
Heterocigosidad media esperada (HExp):	0.7807
Media del contenido de información polimórfica (PIC):	0.7107
Probabilidad combinada de exclusión:	0.99999728

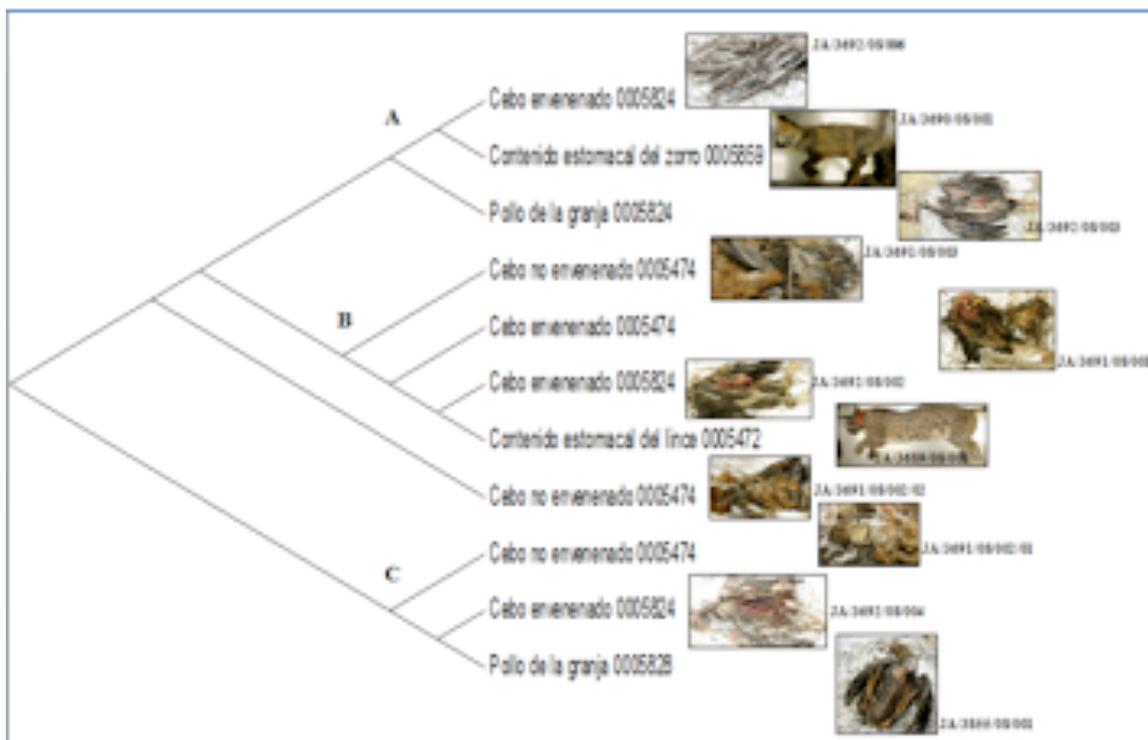
N se refiere al número de individuos donde funcionó del total de los 13 en los que se intentó.

El panel de marcadores seleccionados ha sido apropiado para el estudio de la población, ya que mostró un valor de información polimórfica muy alto (se establece sobre 1, por lo que los valores obtenidos son muy buenos). El número medio de alelos por locus también ha resultado satisfactorio (a partir de 4 se considera interesante).

La probabilidad combinada de exclusión que se obtiene con el uso de los 14 marcadores permite una seguridad en los resultados del 99.999728%. Este es un valor que ofrece gran confianza dado que en este tipo de estudios no se puede obtener el 100% de probabilidad.

Relaciones filogenéticas:

Se calculan las distancias genéticas y se establecen las relaciones filogenéticas entre las muestras obteniéndose el siguiente árbol, por el método de Neighbour Joining (NJ),



CONCLUSIONES DE LAS NECROPSIAS, ANÁLISIS MACROSCÓPICO DE LOS CEBOS Y EL ESTUDIO TOXICOLÓGICO

A raíz de los resultados obtenidos en los análisis toxicológicos del caso JA/3689-3692/08 podemos afirmar que:

En las muestras analizadas JA/3689/08/001/01 (contenido estomacal del lince), JA/3690/08/001/01 (contenido estomacal del zorro), JA/3691/08/001/01 (cebo), JA/3692/08/001/01 (cebo), JA/3692/08/002/01 (cebo), JA/3692/08/004/01 (cebo) y JA/3692/08/006 (cebo) se detecta la presencia del carbamato ALDICARB.

La cantidad de ALDICARB cuantificada mediante cromatografía de líquidos (ULPC-MS/MS) en las muestras analizadas es de:

- JA/3689/08/001/01 (contenido estomacal del lince): 1.90 mg/l
- JA/3690/08/001/01 (contenido estomacal del zorro): 2.73 mg/l
- JA/3691/08/001/01 (cebo): 437.70 mg/l

- JA/3692/08/001/01 (cebo): 123.20 mg/l
- JA/3692/08/002/01 (cebo): 346.70 mg/l
- JA/3692/08/004/01 (cebo): 739.30 mg/l
- JA/3692/08/006 (cebo): 20.20 mg/l

Estas cantidades pueden estar subestimadas, ya que el ALDICARB puede haberse degradado al haber estado expuesto tanto a los procesos de digestión y absorción, como a las condiciones ambientales.

En las muestras analizadas JA/3691/08/002 (resto de pollo), JA/3691/08/003 (pluma de pollo), JA/3692/08/003 (pata de pollo) y JA/3692/08/005 (restos de pescado), no se detecta la presencia de organofosforados ni carbamatos mediante la aplicación de cromatografía en capa fina.

El grado de descomposición de las muestras remitidas ha podido influir en la detección de estos compuestos, ya que los organofosforados y carbamatos son sustancias que se degradan rápidamente en el medio ambiente. Por tanto, no se descarta que las muestras hayan contenido algún inhibidor de la colinesterasa degradándose posteriormente como consecuencia de la acción ambiental.

Dependiendo de la naturaleza de los plaguicidas, estos presentan una persistencia diferente, la cual está determinada por procesos bióticos (biodegradación, metabolismo) y abióticos (hidrólisis y oxidación).

Los hallazgos de las necropsias realizadas tanto al ejemplar de zorro como al ejemplar de lince ibérico (Bornizo) son inespecíficos (congestión generalizada), y compatibles con envenenamiento por el carbamato ALDICARB.

La buena condición corporal y la ausencia de otras lesiones orgánicas descartan enfermedades crónicas/debilitantes como predisponentes/causantes de la muerte de estos ejemplares. Tampoco se han observado heridas, hematomas o fracturas, por lo que puede descartarse también una muerte de origen traumático.

CONCLUSIONES DEL ESTUDIO GENÉTICO

Del árbol obtenido se puede inferir lo siguiente:

- El árbol presenta 3 grupos (A, B, C), dos están más relacionados entre ellos (A, B) que con el tercero C.
- En estos grupos A, B, se encuentran las muestras obtenidas de los contenidos gástricos del lince (A) y del zorro (B).
- El contenido estomacal del zorro se agrupa con un cebo envenenado con Aldicarb y un pollo que el dueño de la granja reconoció como suyo, pero que no estaba envenenado.
- El contenido estomacal del lince se agrupa junto con tres cebos, dos de ellos envenenados con Aldicarb.
- El tercer grupo, C, reúne la muestra de un pollo de la granja que llegó una semana más tarde (JA/3855/08), junto con un cebo envenenado con Aldicarb y otro no envenenado. Estos últimos pertenecen a muestras recogidas en la primera inspección ocular.
- Los dos animales que el dueño de la finca reconoce como suyos (referidos como "Pollo de la granja") están poco emparentados entre ellos en relación con el resto de muestras analizadas. Siendo así se puede establecer que todos los cebos pertenecen a la misma granja, dado que hay más relación genética entre un pollo de la granja (JA/3692/08/003/01) y los cebos, que entre los dos pollos de la granja.

A MODO DE COLOFÓN

Las conclusiones que pudieron extraerse de los resultados obtenidos de los estudios toxicológico y genético permitieron iniciar y concluir con éxito el proceso penal contra los acusados.

Gracias al trabajo concienzudo de los Agentes de la Autoridad Ambiental durante el levantamiento de las muestras y las primeras entrevistas con los sospechosos se pudo encontrar una forma de intentar relacionarlos con el delito.

Tampoco hubiera sido posible conseguir esta condena, pionera y ejemplar en medio ambiente, sin el trabajo del departamento jurídico de la Consejería de Medio Ambiente, de la Fundación Gypaetus y de la Asociación WWF ESPAÑA ADENA, que se personaron como acusación particular y publicitaron el caso.

Respecto a la labor de la acusación, hay que destacar que como parte de la defensa los acusados pidieron la nulidad de las pruebas recogidas alegando que se había violado el domicilio (artículo 18 de la Constitución), y que la cadena de custodia no era válida al haberse tomado las muestras sin autorización judicial. Por tanto en primer lugar hubo que demostrar la necesidad de acceder a la propiedad sin esperar a los propietarios ni una orden judicial, en este caso alegando que la prioridad era encontrar al lince ibérico y comprobar si aún estaba con vida. Se tomó declaración durante el juicio a todo el personal que participó en la toma de muestras.

Otra de las estrategias que siguió la defensa fue intentar demostrar que la causa de la muerte del lince ibérico pudo ser otra distinta al envenenamiento. Para rebatir este punto, durante el juicio oral declaramos varios peritos expertos, tanto veterinarios clínicos del Proyecto Life como veterinarios forenses del laboratorio del CAD, que expusimos la ausencia de antecedentes de enfermedad y de lesiones postmortem que pudieran sugerir una causa de muerte distinta al envenenamiento.

La última parte del juicio consistió en explicar al tribunal los resultados de los análisis genéticos que permitían relacionar los pollos de la granja de los acusados con los cebos envenenados ingeridos por el lince ibérico y el zorro, causándoles la muerte. La genética forense no se había utilizado hasta ahora, por lo menos en Andalucía, para incriminar a unos acusados en un delito medioambiental. Este caso representó el punto de partida para una nueva línea de investigación forense en delitos medioambientales, que ya se está aplicando en otros casos. Respecto a este punto, como ya se ha comentado en la introducción, el juez consideró probado que los cebos envenenados pertenecían a los acusados.

La dinámica de trabajo en el laboratorio se expuso también durante el juicio, y no hubo en ella ningún resquicio que pudiera utilizar la defensa para invalidar los resultados analíticos. En un laboratorio forense es esencial ser metódico y seguir los procedimientos al pie de la letra, además de contar con personal experto en su campo que pueda ser capaz de explicar a un tribunal los resultados de su trabajo.

La sentencia impuesta fue ejemplar y ejemplarizante, principalmente en lo que se refiere a la muerte del lince ibérico. Para estimar su valor se tuvo en cuenta el informe redactado por los técnicos de la Consejería, en el que se indicaba que cuando murió, Bornizo tenía 4 años. La vida reproductora de esta especie comienza aproximadamente a los 3 años y finaliza a los 9, por lo que formaba parte de los ejemplares reproductores, siendo uno de los 30 machos adultos que había en ese momento en estado silvestre. Por tanto su valor se estimó en 115.428,84 €, tomando como referencia el presupuesto del Proyecto Life de 25.971.489 € y el censo para 2009 que indicaba un total de 225 lincees.

En el informe y la declaración de los técnicos también se documentó la situación de amenaza de esta especie, reconocida a nivel internacional, destacando que junto con el visón europeo es la única especie carnívora endémica en Europa, de ahí la responsabilidad en su conservación. Teniendo en cuenta que se destinan fondos europeos a la conservación del Lince ibérico, su valor debe establecerse teniendo en cuenta lo que se ha invertido en él hasta el momento de su muerte (chequeos sanitarios, adecuación del hábitat, etc) y su valor de reposición.

En concepto de responsabilidad civil, además de la indemnización a la Junta de Andalucía por el valor del lince envenenado, los acusados fueron condenados a abonar las costas del juicio e indemnizar al titular del coto por la muerte del zorro (su valor estimado fue de 95,75€).

Además se les declaró culpables de un delito contra la fauna del artículo 336 en concurso ideal con un delito del artículo 334 del Código Penal, con una condena de veinte meses de prisión “con la asesoría de inhabilitación especial para el ejercicio de derecho de sufragio pasivo durante el tiempo de condena e inhabilitación para el derecho de cazar y pescar por cuatro años”.

En resumen, el resultado es fruto de la estrecha colaboración de las distintas partes implicadas. En estos casos en los que los técnicos forenses del laboratorio no son los encargados de la toma de muestras es esencial la comunicación fluida con los Agentes, y a su vez a la hora de realizar los informes periciales y enfocarlos en una u otra dirección los forenses debemos mantener el contacto con el personal del departamento jurídico.

En este caso, una vez se combinaron los informes de unos y otros, se mantuvo una reunión previa al juicio para coordinar y unificar criterios, lo que supuso otra ventaja.

El proceso se extendió por más de 7 horas, y fuimos llamados a declarar absolutamente todos los que habíamos participado de alguna forma en la investigación. Las preguntas de la acusación, así como los testimonios de los peritos, fueron concisas y claras, lo que contribuyó a que el tribunal se interesara y fuera consciente de la gravedad de los delitos cometidos.

Es complicado hacerle entender a un juez que acaba de juzgar un asesinato o una violación que la muerte de un lince ibérico o cualquier otra especie de fauna silvestre, o simplemente la colocación de cebos envenenados, representa también un delito. Es por esta razón que muchos de los casos quedan desestimados, a los jueces en comparación les parecen delitos menores, sin importancia.

Ya en algunas provincias se está escuchando la posibilidad de crear tribunales especializados en delitos medioambientales, lo que beneficiaría en gran medida la valoración adecuada de los casos.

Es importante que este tipo de delitos no queden impunes, como estaba siendo habitual hasta estos últimos tiempos, y que las personas que atenten contra el medio ambiente sean conscientes de que también hay legislación al respecto, y que las penas pueden ser muy duras.

Para algunos puede resultar difícil de entender, ya que el lince ibérico y el zorro se estaban alimentando de las gallinas de los acusados, pero como se ha comentado anteriormente, la legislación dispone medidas compensatorias para este tipo de sucesos, más aún cuando se trata de una especie en peligro de extinción. Posiblemente estas compensaciones no se reciban pronto, y los trámites burocráticos pueden ser largos y complicados, pero no debemos olvidar que todo esto son excusas, que en ningún caso justifican cometer un delito.

En este caso la sentencia fue especialmente severa al verse afectado un ejemplar de lince ibérico, en peligro de extinción, y es por ello que se aprovechó para publicitar el caso ampliamente. Con suerte tendrá un efecto disuasorio que esperamos beneficie al medio natural y las especies silvestres.

BIBLIOGRAFÍA

1. <http://www.venenono.org/wp-content/uploads/2013/01/Sentencia-JP-n%C2%BA1-Ja%C3%A9n-diciembre-2012.pdf>
2. “Diez años de conservación del lince ibérico”. Consejería de Agricultura, Pesca y Medio Ambiente. Junta de Andalucía. 2012
3. <http://www.boe.es/boe/dias/2003/12/02/pdfs/A42808-42830.pdf>
4. Best L. B., American midland naturalist. 128: 126–138. 1992.
5. Blodgett D.J. Organophosphate and carbamate insecticides. En: Peterson ME, Talcott PA eds: Small Animal Toxicology. WB Saunders Company, Philadelphia: 640-652. 2001.
6. Buronfosse T., Buronfosse F. Intoxication des carnivores domestiques par les inhibiteurs des cholinestérasés. Recueil de Médecine Vétérinaire 171(2/3): 135-141. 1995.

7. Hoffman, D. J.; Barnett A. Rattner; G. Allen Burton, Jr.; John Cairns, Jr. Handbook of ecotoxicology. 2nd edition. Environmental toxicology. I. Hoffman, David J. (David John), 2002.
8. Johnson, W. W. and Finley, M. T., Handbook of Acute Toxicity of Chemicals to Fish and Aquatic
9. Invertebrates, U.S. Fish and Wildlife Service, Resour. Publ. 137, Washington, D.C., 1980.
10. Milton y cols. Field manual of wildlife diseases: general field procedures and diseases of birds / Biological Resources Division. Chapter 39 Organophosphorus and Carbamate Pesticides. 1999.
11. Mineau, P. Encyclopedia of Agrochemicals, 2003 John Wiley & Sons, Inc.. Avian species. 2002.
12. Mosha R.D. The toxicity of organophosphorus insecticides: a review. Veterinary Bulletin 63(11):1039-1050. 1993.
13. Soler, F.; J.P. García Cambero, A.L. Oropesa y M. Pérez-López. Intoxicación por plaguicidas inhibidores de la acetilcolinesterasa: organofosforados y carbamatos. Consulta de Difusión Veterinaria 12 (116): 33-40, 2004.
14. OMS-<http://www.pan-uk.org/Projects/Fairness/documents.html>. 2006
15. <http://eur-lex.europa.eu/homepage.html?locale=es>
16. <http://www.juntadeandalucia.es/medioambiente/site/porta/web/menuitem.7e1cf46ddf59bb227a9ebe205510e1ca/?vgnnextoid=1c124aab83137310VgnVCM2000000624e50aRCRD&vgnnextchannel=631cb2c42f207310VgnVCM2000000624e50aRCRD>
17. <http://www.juntadeandalucia.es/medioambiente/site/porta/web/menuitem.30d4b35a97db5c61716f2b105510e1ca/?vgnnextoid=5aee1232087fc310VgnVCM1000001325e50aRCRD&vgnnextchannel=2229b8f8606b8210VgnVCM10000055011eacRCRD>
18. <http://www.juntadeandalucia.es/medioambiente/site/porta/web/menuitem.7e1cf46ddf59bb227a9ebe205510e1ca/?vgnnextoid=02d7caf72d159110VgnVCM1000000624e50aRCRD&vgnnextchannel=c74666edf6e77310VgnVCM2000000624e50aRCRD>
19. http://www.intertox.sav.sk/ITX_pdf/04_03_2011/10102-Volume4_Issue_3-05_paper.pdf
20. “Manual de protección legal de la biodiversidad para agentes de la autoridad ambiental en Andalucía” Fajardo I. y Martín J. (coordinadores). 2009. Consejería de Medio Ambiente. Junta de Andalucía
21. Norma UNE-EN ISO/IEC 17025.
22. CGA-ENAC-LEC. “Criterios generales para la acreditación de laboratorios de ensayos y calibración según norma UNE EN-ISO 17025” Revisión vigente.
23. “Manual de Necropsias del Lince Ibérico. Programa de Conservación Ex Situ del Lince Ibérico” Martínez, F; Molina, I; Roldan, E; León, T; Pérez, M.J; López, G; Zorilla, I; Muñoz, A; Martínez, C y Peña, L. 2008. Ministerio de Medio Ambiente, 47 pp (www.lynxexsitu.es)
24. “Determination of cholinesterase-inhibiting pesticides and some of their metabolites in cases of animal poisoning using thin-layer chromatography”. P.E.F. Zoun, Th.J. Spierenburg, Journal of Chromatography, Volume 462, 1989, Pages 448–453
25. “Caracterización genética de una población autóctona: La gallina de Chulilla” Grimal et al. 2007
26. “A consensus linkage map of the chicken genome” Groenen et al. 2000
27. “Chicken microsatellite markers isolated from libraries enriched for simple tandem repeats” Gibbs et al. 1997
28. “Preliminary linkage map of the chicken (*Gallus domesticus*) genome based on microsatellite markers: 77 new markers mapped” Crooijmans et al. 1996
29. “Population Tester Kit” <http://poultry.mph.msu.edu/>
30. <http://www.qiagen.com/products/catalog/sample-technologies/dna-sample-technologies/genomic-dna/dneasy-blood-and-tissue-kit>

AGRADECIMIENTOS

Al resto del equipo del laboratorio del CAD (E.M. Alcaide, M.D. García, P. Simon, A. Marín, L. Narváez, I. Enríquez, R. Martínez) por su colaboración en la necropsia del lince fallecido. Al Proyecto LIFE “Conservación y Reintroducción del Lince Ibérico en Andalucía”, que gestionó el traslado del cadáver al CAD, así como al Servicio de Protección de la Naturaleza (SEPRONA) y la Brigada de Investigación de Envenenamiento de Fauna (BIEF) de Jaén, que realizaron el

levantamiento de las muestras. A la Consejería de Medio Ambiente y Ordenación del Territorio de la Junta de Andalucía por su apoyo.