

ANÁLISIS MICROBIOLÓGICOS Y FÍSICO-QUÍMICOS COMO PRUEBAS NOVEDOSAS Y DETERMINANTES EN UN CASO DE ENVENENAMIENTO DE LA FAUNA SILVESTRE EN EL SUR DE ESPAÑA
MICROBIOLOGICAL AND PHYSICO-CHEMICAL ANALYSIS AS NOVEL AND DETERMINANT TESTS IN A CASE OF WILDLIFE POISONING IN THE SOUTH OF SPAIN

Zorrilla-Delgado I.
Fernández-Verón I
Centro de Análisis y Diagnóstico de la Fauna Silvestre.
Consejería de Medio Ambiente y Ordenación del Territorio.
Junta de Andalucía.
España.

Correspondencia: izorrilla@agenciamedioambienteyagua.es

Resumen: La caza furtiva de especies animales salvajes y la eliminación de depredadores en las reservas de caza no se consideran delitos *per se* en la legislación española. Además, de acuerdo con el Código Penal de España y la Constitución, cualquier duda sobre la culpabilidad de un sospechoso por falta de pruebas, conlleva su libertad sin cargos (*in dubio pro reo*). Por el contrario, el uso de una sustancia con la intención de envenenar a la fauna silvestre se considera un delito según la Ley de la Flora y la Fauna Silvestre de Andalucía (2003) y un delito según el Código Penal español. En este trabajo se expone un caso relacionado con la caza furtiva y con el uso de veneno en una reserva de caza en el sur de España, en el que se realizaron análisis atípicos en el laboratorio a partir de un único indicio recuperado durante una investigación. Los hallazgos fueron determinantes en la vinculación con otro indicio incautado al sospechoso, quedando demostrada la intención de envenenamiento, lo que finalmente llevó al cierre del coto y al reconocimiento de una herramienta analítica adicional para la resolución de casos similares en Andalucía. A nuestro entender este es el primer caso en el que la presencia de bacterias y los resultados de análisis físico-químicos han sido utilizados como pruebas en un caso de envenenamiento de la fauna.

Palabras clave: fauna silvestre, pesticidas, envenenamiento, microbiología, físico-químico, forense.

Abstract: poaching wildlife species and eradicating predators from game reserves are not considered crimes *per se* under Spanish legislation. Furthermore, in accordance with Spain's Penal Code and Constitution, any doubt regarding a suspect's guilt mandates a judge/crown prosecutor to rest a case without presenting charges. By contrast, the use of a substance with the intent to poison wildlife is deemed both an offense according to the Wildlife Act (2003) and a crime under the Spanish Penal Code. Here we report on the atypical analysis of a unique piece of evidence that was retrieved during an on-site investigation into allegations of wildlife poaching and poisoning on a game reserve in southern Spain. The findings proved critical in linking other recovered evidence to the suspect and, in particular, showing intent to poison, which ultimately led to the closure of the case and the addition of another tool in the growing coffer of approaches for resolving similar cases in Andalucía. To our knowledge this is the first instance in which the presence of bacteria and evaluation of physico-chemical parameters have been used as integral pieces of evidence in a wildlife poisoning case.

Keywords: wildlife, pesticide, poisoning, microbiology, physico-chemical, forensic

INTRODUCCIÓN

El uso de una sustancia con la intención de envenenar fauna silvestre se considera un delito por el Código Penal español y por la Ley de Vida Silvestre (2003).

A finales de los años 90 el dramático incremento en el uso de cebos envenenados en España llevó a la casi desaparición de especies salvajes tan emblemáticas como el Águila imperial ibérica (*Aquila adalberti*). Los últimos datos, según el informe realizado por WWF España y SEO/BirdLife son alarmantes: casi 200.000 animales murieron envenenados en los últimos 20 años (Cano y cols., 2016).

Con el objetivo de minimizar estos delitos contra la fauna silvestre, tanto a nivel nacional como autonómico, se crearon medidas dirigidas al procesamiento de los sospechosos y de culpabilidad demostrada en actos de envenenamiento o caza furtiva. En Andalucía, el Gobierno Autonómico puso en marcha un innovador programa (Estrategia Andaluza de Lucha Contra el Veneno), que resultó en el desarrollo de equipos altamente especializados en la investigación de presuntos

delitos contra la fauna silvestre (Ruiz y cols., 2010b; Fajardo y cols., 2011). Estas patrullas preventivas han reducido hasta en un 70% la incidencia de envenenamiento sobre la fauna silvestre en Andalucía en las áreas problemáticas o “puntos calientes” (Ruiz y cols., 2010a, 2010b).

Dicho programa conlleva unos protocolos bien definidos de trabajo y cadena de custodia de las muestras (Fajardo y Velasco, 2010). El CAD, como laboratorio de referencia en fauna silvestre de Andalucía, está incluido en estos protocolos. Una de las funciones del CAD es el análisis y diagnóstico de casos de envenenamiento de fauna silvestre. Analiza cadáveres de animales y otras muestras (por ejemplo cebos envenenados usados para atraer y eliminar animales), para localizar venenos y relacionarlos con la muerte. Con los resultados obtenidos se elaboran informes periciales utilizados posteriormente en los juicios pertinentes. De forma rutinaria dichos análisis incluyen necropsias y análisis toxicológicos para la detección de los plaguicidas y/o rodenticidas que se usan con mayor frecuencia. En el caso que nos ocupa estos análisis rutinarios no fueron suficientes para poder relacionar unas sardinas que contenían veneno con otras que el sospechoso conservaba en instalaciones del coto, por esta razón se realizaron otros análisis no usuales: microbiología y análisis físico-químicos.

ANTECEDENTES DE LA INVESTIGACIÓN

En la mañana del 3 de abril de 2012, una reserva de caza en Andalucía fue registrada como parte de una investigación basada en las sospechas de que el capataz de dicha reserva era el culpable de varios envenenamientos ocurridos anteriormente y caza furtiva. En un almacén se encontraron dos ejemplares de peces moderadamente degradados y restos de otros peces en el interior de una bolsa de plástico, pero ningún indicio claro de tenencia de veneno.

En paralelo, los Agentes de Medio Ambiente de la Junta de Andalucía, descubrieron varios tipos de cebos ya colocados en el campo, dentro del mismo coto, entre ellos cuatro peces, dos de los cuales contenían pequeños gránulos negros (imágenes 1 y 2). Estos gránulos negros son compatibles con aldicarb, un veneno mortal cuya venta y uso están completamente prohibidos (Reglamento 540/2011).



Imagen 1. Indicios encontrados durante la inspección en el coto de caza.



Imagen 2. Indicios encontrados durante la inspección en el coto de caza

Pese a las numerosas pruebas recopiladas, algunas de las cuales resultaban altamente sospechosas de envenenamiento en base a la experiencia (sardinias con granulado negro), delito contemplado tanto por la Ley de Fauna Silvestre de 2003 (Ley 8/2003, de 28 de octubre), como por el Código Penal español, no había una relación clara con el sospechoso, puesto que en el almacén se encontraron únicamente peces que, aunque eran similares a los posiblemente envenenados, no presentaban sustancias tóxicas visibles.

Todas las pruebas recuperadas durante las inspecciones se pusieron en conocimiento de la autoridad competente con vistas a la detención del sospechoso pero, de acuerdo con el Código Penal y la Constitución Española, ante la duda sobre la culpabilidad de un sospechoso, este quedará libre sin cargos (*in dubio pro reo*).

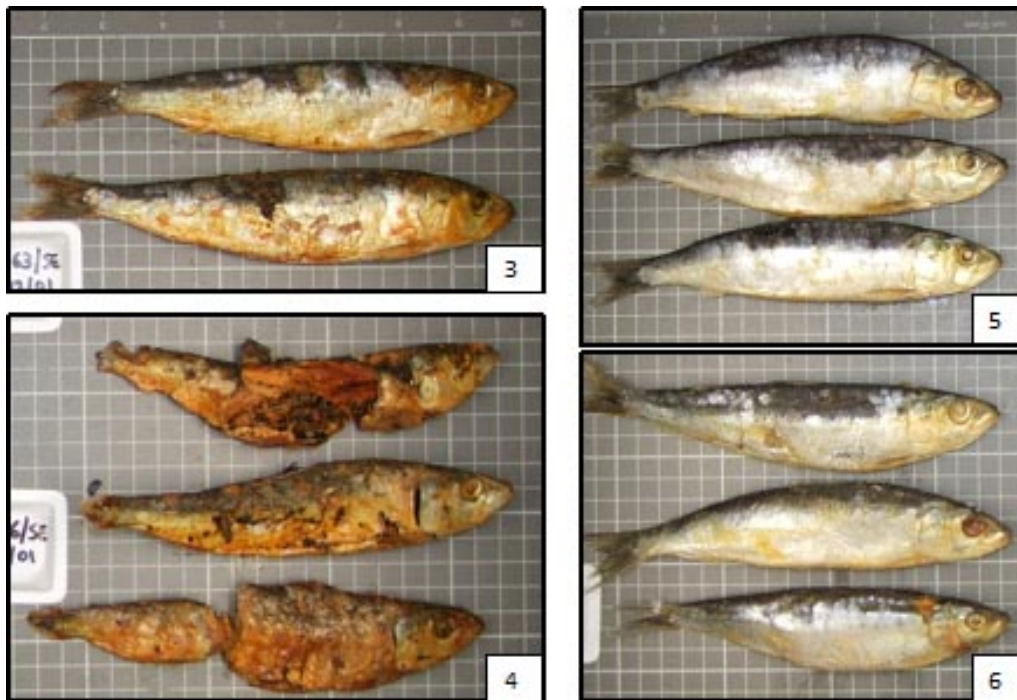
La única prueba irrefutable de intención de envenenamiento en este caso eran los peces encontrados en el almacén del coto, por lo que el juez solicitó evidencias de que ambos grupos de peces recuperados podrían tener el mismo origen como justificación para iniciar los trámites legales pertinentes. Se realizó una solicitud oficial al laboratorio del CAD para que realizara las investigaciones necesarias en el laboratorio con los dos grupos de peces para determinar si había o no relación entre ellos.

A partir de este momento, siempre conservando la cadena de custodia, todas las muestras recuperadas durante la investigación fueron transferidas al CAD para su análisis.

MÉTODOS Y ANÁLISIS

1.1. Identificación a nivel de especie y estudio biométrico de los peces.

Los peces recuperados en el campo y los localizados en el almacén, fueron meticulosamente examinados en el CAD. Para un estudio comparativo se adquirieron otras sardinias similares (conocidas como sardinias-arenques) en dos comercios distintos de la ciudad de Málaga.



Imágenes 3 y 4. Sardinas encontradas en el coto, en el almacén (arriba) y en el campo (abajo), estas últimas conteniendo gránulos negros. Grupos 1 y 2 respectivamente.

Imágenes 5 y 6. Sardinas adquiridas en dos comercios distintos y no relacionados entre ellos. Grupos control

En primer lugar se realizó un estudio macroscópico y biométrico, detallando el aspecto externo, el peso y la longitud tanto de las sardinas recuperadas en el coto (grupos 1 y 2, imágenes 3 y 4) como de las adquiridas como control (grupos a y b, imágenes 5 y 6).

1.2. Análisis toxicológico.

Las sardinas requisadas (grupos 1 y 2) fueron sometidas a análisis toxicológico siguiendo el protocolo descrito por Zoun y Spierenburg en 1989 que consiste en un proceso de homogeneización con sulfato sódico anhidro, extracción química con diclorometano y purificación en fase sólida (columnas C18). La detección de compuestos tóxicos se llevó a cabo mediante un primer screening por cromatografía en capa fina (TLC) y posterior confirmación y cuantificación mediante cromatografía de líquidos y gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS/MS; UPLC-MS/MS).

1.3. Análisis microbiológico y físico-químico de los peces

El hecho de que tanto las sardinas recuperadas durante la inspección en el coto como las requisadas en el almacén presentaran en su superficie una inusual cubierta de color anaranjado ya hacía sospechar una posible relación entre ellas (grupos 1 y 2). Aunque en un principio se consideró que esta sustancia anaranjada podría tratarse de algún tipo de conservante, esta hipótesis se descartó finalmente, asociándose a procesos de degradación debido a determinadas bacterias (halofílicas) que ocurren de forma natural en la conservación de sardinas (las conocidas sardinas-arenques). El crecimiento de algunos microorganismos halofílicos confiere una coloración roja-anaranjada derivada de los carotenoides que, además, está favorecida por concentraciones salinas elevadas (Gibbons 1974). Por tanto, la presencia y la concentración de bacterias halofílicas y otros parámetros organolépticos como el grado de humedad y la concentración de sodio deberían ser similares en los individuos de un mismo lote de sardinas (similar procesamiento), y distintos de los

procedentes de distintos lotes. Es posible determinar estos parámetros en el laboratorio, por lo que se seleccionaron para intentar determinar si las sardinas encontradas en el coto y las requisadas en el almacén formaban parte de un mismo envase o lote. Como controles se analizaron las sardinas adquiridas en dos comercios distintos de Málaga (grupos a y b). Para dar mayor solidez a las conclusiones se incluyeron otros análisis comunes en los controles de calidad de alimentos, concretamente la proporción de grasa y proteínas.

La totalidad de la piel de las sardinas fue homogenizada y se procesaron para cada uno de los siguientes análisis:

1.3.1. *Cuantificación de bacterias halofílicas.*

La presencia y concentración de bacterias halofílicas en la piel de las sardinas fue determinada mediante la técnica de recuento en placa. La muestra se disgregó en un diluyente primario (agua de peptona con un 3% de sal), se realizaron diluciones decimales con agua de peptona al 3% de sal hasta alcanzar la dilución 10^{-8} . Cada dilución se inoculó en placas que contenían el medio de cultivo agar tripticosa de soja (TSA) y entre el 0.5% y el 1% de NaCl adicional. Todos los cultivos fueron examinados tras cuatro días de incubación a 25°C en aerobiosis, realizándose un recuento de las colonias bacterianas crecidas. El resultado se notificó en unidades formadoras de colonias por gramo de muestra (ufc/g). Este ensayo se realizó por duplicado para mayor robustez del mismo.

1.3.2. *Contenido de cloruro sódico.*

La cuantificación de cloruro sódico se llevó a cabo mediante análisis por potenciometría sobre materia seca y valoración con un titrador automático. La muestra se dispersa en agua con ácido nítrico en exceso y se valora con nitrato de plata (AgNO_3) en el titador automático. La expresión sobre materia seca se obtiene tras descontar la humedad del producto.

1.3.3. *Cuantificación de proteínas*

La concentración de proteínas en las muestras se calculó mediante el método Kjeldahl (digestión en bloque) según las normas ISO 8968-3:2004 e IDF20-3:2004. Este método se basa en la hidrólisis de las muestras con ácido sulfúrico para descomponer toda la materia orgánica. Posteriormente se destila y se recupera el nitrógeno en forma amoniacal. Se añade ácido bórico y se realiza una valoración ácida del amoniaco total. Por cálculos se obtiene el nitrógeno total, que es la medida indirecta de concentración de proteínas en la muestra. Todo este proceso se lleva a cabo en un medio cerrado.

1.3.4. *Determinación del contenido graso.*

Para extraer el contenido graso de las muestras se empleó un método basado en una hidrólisis ácida de la muestra seguida de una extracción de la grasa mediante un extractor Soxhlet. La muestra se hidroliza con ácido clorhídrico en caliente. Se filtra la muestra y se realizan varios lavados con agua destilada hasta llevarla un pH de 4,5. Se seca el filtro con el residuo en estufa y se introduce en un cartucho del extractor Soxhlet. En este aparato se realiza una extracción con éter de petróleo y se evapora. Se seca hasta alcanzar un peso constante del filtro y se pesa. El resultado obtenido es la grasa total. La expresión sobre materia seca se obtiene por cálculos descontando la humedad del producto.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1.4. *Identificación y estudio biométrico de los peces*

La presencia de una aleta anal permitió identificar todos los peces como sardinas (*Sardina pilchardus*), diferenciándose de *Clupea arengus*, de apariencia similar.

No se observaron diferencias significativas en cuanto al peso y medidas entre los tres grupos de sardinas (campo del coto, almacén del coto y comerciales). (Tabla 1). Cabe destacar, sin embargo, el aspecto macroscópico similar de los dos grupos de sardinas del coto y diferentes a las adquiridas en los dos comercios de Málaga (grupos 1, 2, a y b; imágenes 3, 4, 5 y 6).

Tabla 1. Datos biométricos (peso y longitud) determinados en los dos grupos de sardinas recuperados en el coto de caza y las sardinas control adquiridas en dos comercios para este estudio.

Descripción de la muestra	Peso (g)	Longitud (cm) (aproximada sin cola)
Grupo 1: Sardinas del almacén	76,83	17
	60,64	17
Grupo 2: Sardinas cebos con aldicarb	45,33	16
	43,55	17,5
		16,5
Grupo a: Sardinas control	82,93	17
	59.90	18
	69.54	17
Grupo b: Sardinas control	71.91	17,5
	73.99	17,5
	59.10	16

1.5. Análisis toxicológico

Aunque se analizaron todas las sardinas encontradas en el coto (grupos 1 y 2), solamente las del grupo 2 que contenían el granulado negro, resultaron positivas a la detección de tóxicos, identificándose una mezcla de aldicarb (386,2 mg/kg), y sus productos de degradación, aldicarb sulfoxido (994,4 mg/kg), y aldicarb sulfona (131,5 mg/kg).

El aldicarb es un compuesto del grupo de los carbamatos de uso prohibido desde el año 2009 (Reglamento 540/2011 de la Comisión). Según la clasificación de la Organización Mundial de la Salud (OMS), el aldicarb está clasificado como “Ia”, extremadamente tóxico (WHO, 1990).

1.6. Análisis físico-químico de los peces

Las sardinas del grupo 1 (recuperadas en el almacén del coto), y del grupo 2 (con aldicarb, localizadas en el campo), tienen valores similares de contenido de proteína (44,1% y 40 %), materia grasa (28,4% y 28,6 %) y relación grasa/proteína (0,64 y 0,71). Estos valores son diferentes de las sardinas usadas como control (31,5% proteína, 35,7% de materia grasa y una relación grasa/proteína de 1,13) (Tabla 2).

La concentración de cloruro sódico y humedad encontrados en el grupo 2 (sardinas del campo con aldicarb) difieren de los demás grupos (grupo 1 del almacén y grupo control). Esto se explica porque las sardinas del campo pudieron sufrir un desalado parcial por la manipulación para incorporar el veneno (aldicarb), o bien por el posible desecado como consecuencia de su exposición al sol o ambiente seco (Tabla 2).

Tabla 2. Comparación entre parámetros determinados en los dos grupos de sardinas recuperados en el coto de caza y las sardinas control adquiridas en comercios para este estudio.

Descripción de la muestra	Contenido de proteínas (materia seca) %	Contenido graso (materia seca) %	Proporción grasa /proteína	Contenido en cloruro sódico (materia seca) %	Humedad %
Grupo 1 Sardinas, del almacén del coto	40,0	28,6	0,71	25,5	46,7
Grupo 2 Sardinas, del campo del coto, con aldicarb	44,1	28,4	0,64	16,9	37,3
Grupo a Sardinas, control	31,5	35,7	1,13	24,2	41,1

Nota: el grupo control b, no fue analizado al obtenerse datos concluyentes con el análisis de un grupo control.

1.7. Cuantificación de microorganismos halófilos

En ausencia de criterios microbiológicos actualizados para la valoración microbiológica de los alimentos (la orden del 2 de agosto de 1991 están actualmente en revisión), en este trabajo se ha empleado la Norma Microbiológica aceptada hasta la fecha en España que se aplica a productos de la pesca, seco-salados, salazones y desecados. Este criterio limita los niveles de microorganismos presentes en este tipo de alimentos a 10^6 ufc/g (10 millones de bacterias/g). Dicho criterio coincide con la experiencia del laboratorio, es a partir de esta concentración cuando se hace perceptible el deterioro del producto.

En los grupos 1 y 2 (sardinas del coto), se obtuvieron valores muy por encima del tomado como referencia (1 millón), en cambio, en el grupo control, el valor es muy inferior a dicho límite (Tabla 3).

Tabla 3. Recuento de microorganismos halofílicos en las muestras recogidas en el coto y las controles

Muestra	Resultados de los ensayos (valor medio de crecimiento en dos salinidades, 0,5% y 1% de cloruro sódico) (ufc/g)
Grupo 1: Sardinas del almacén del coto	15.5 millones ($1,5 \times 10^7$)
Grupo 2: Sardinas del campo con aldicarb	2.3 millones ($2,3 \times 10^6$)
Grupo a: Sardinas control	210.000 ($2,1 \times 10^5$)

Nota: el grupo control b, no fue analizado al obtenerse datos concluyentes con el análisis de un grupo control.

CONCLUSIONES

La Legislación Europea es cauta en cuanto a la imputación de daños contra la fauna silvestre para garantizar que los procedimientos y acusaciones contra una persona son sólidos y convincentes. Esto implica que las pruebas deben poder vincular claramente la evidencia con el sospechoso.

Si los agentes hubiesen encontrado muestras con aldicarb durante la búsqueda en el almacén, el análisis detallado de las sardinas no hubiese sido necesario. Sin embargo, en ausencia de estas pruebas, las sardinas adquirieron una importancia crítica para el caso. Los resultados obtenidos en el laboratorio del CAD, concretamente los niveles de bacterias halófilas y la concentración similar de grasas y proteínas, indican que las sardinas envenenadas por aldicarb y aquellas recogidas en el almacén fueron procesadas de la misma manera y compartían el mismo origen. La coloración naranja atípica (ver las imágenes 3 y 4) relacionan aún más estos dos grupos de muestras.

En base a la bibliografía consultada, es la primera vez que la presencia de bacterias y la evaluación de parámetros físico-químicos se han usado como evidencias para resolver un caso de envenenamiento en fauna silvestre. Considerando el conjunto de resultados, tenemos evidencias suficientes para implicar al sospechoso no sólo en el uso de cebos envenenados, sino también refleja intención de envenenamiento a la fauna silvestre en el coto.

Este delito puede suponer una pena de hasta 2 años de prisión, una sanción para cubrir los costes legales y una indemnización al organismo competente.

Este caso ha permitido añadir una herramienta más al conjunto de métodos, cada vez más numerosos (Fajardo y Zorrilla, 2016), para resolver casos similares en nuestra comunidad autónoma.

BIBLIOGRAFÍA

1. Cano, C.; De la Bodega, D.; Ayerza, P. y Mínguez, E. 2016. El veneno en España. Evolución del envenenamiento de fauna silvestre (1992-2013). Descargable en pdf: www.wwf.es y www.seo.org.
2. El *Código Penal*. Ley Orgánica 10/1995, de 23 de noviembre.
3. Fajardo I y Zorrilla I. 2016. Manual de Técnica Policial Ambiental. Identificación *in situ* de causas de muerte en fauna silvestre. ISBN 978-84-16591-00-8.
4. Fajardo I, Ruiz A, Zorrilla I, Valero A, Fernandez I, Saez E, Molino FM, Olivares J. 2011. Use of specialised canine units to detect poisoned baits and recover forensic evidence in Andalucía (southern Spain). Pages 147-155 in Richards NL, editor. Carbofuran and wildlife poisoning: global perspectives and forensic approaches. United Kingdom: John Wiley & Sons, Ltd
5. Fajardo I, Velasco F. 2010. Policía científica: búsqueda e identificación de pruebas (scientific police procedure: search techniques and identification of evidence). Pages 317-363 in Fajardo I and Martín J, editors. Manual de protección legal de la biodiversidad para los agentes de la autoridad ambiental en Andalucía. Sevilla: Consejería de Medio Ambiente, Junta de Andalucía.
6. Gibbons NE. 1974. Family V. Halobacteriaceae. Pages 269-273 in Buchanan RE and Gibbons NE. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. Baltimore: Williams & Wilkins.
7. IDF20-3:2004: Block-digestion method.
8. ISO 8968-3:2004: Determination of nitrogen content.
9. Ley de la Flora y la Fauna Silvestres de Andalucía. Ley 8/2003 de 28 de Octubre.
10. Reglamento 540/2011 de la Comisión. Decisión de la Comisión relativa a la no inclusión de determinadas sustancias activas en el anexo I de la Directiva 91/414/CEE del Consejo y a la retirada de las autorizaciones de los productos fitosanitarios que contengan estas sustancias.
11. Ruiz A, Ortega F, Valero A, Sáez E, Molino FM. 2010a. Caracterización y tendencias de veneno en Andalucía (Description of poisons and poisoning habits in Andalucía). Pages 149-180 in Fajardo I and Martín J, editors.

Manual de protección legal de la biodiversidad para los agentes de la autoridad ambiental en Andalucía. Sevilla: Consejería de Medio Ambiente, Junta de Andalucía.

12. Ruiz A, Valero A, Sáez E, Molino FM. 2010b. La unidad canina especializada en la detección de venenos (Canine unit specialised in poison detection). Pages 181-199 in Fajardo I and Martín J, editors. Manual de protección legal de la biodiversidad para los agentes de la autoridad ambiental en Andalucía. Sevilla: Consejería de Medio Ambiente, Junta de Andalucía.

13. Zoun, P. E. F. y Spierenburg, T. J. 1989. Determination of cholinesterase-inhibiting pesticides and some of their metabolites in cases of animal poisoning using thin-layer chromatography. *Journal of Chromatography*, 462: 448-453.

14. WHO/PCS/90.1. The WHO recommended classification of pesticides by hazard and guidelines to classification, 1990-1991. Organización Mundial de la Salud 1975. Ginebra 27, Suiza. ISBN 92 4 360223 3.