



Construcción a gran escala de una biblioteca acústica de referencia de murciélagos

Construction of a large-scale acoustic reference library of bats

Rafael Ávila-Flores¹, María Cristina Mac Swiney González², Jorge Ortega³, Veronica Zamora-Gutierrez⁴, Miguel Ángel Briones Salas⁵, Patricia Cortés Calva⁶, Jesús Carlo Cuevas González⁷, Melina Del Real-Monroy⁸, Julián Alberto Equihua Benítez⁹, Margarita García Luis¹⁰, Ángel García Rojas¹¹, José Antonio Guerrero¹², Antonio Guillén Servent¹³, Luis Ignacio Íñiguez Dávalos¹⁴, Celia López González¹¹, Fernando Javier Montiel Reyes¹¹, Carmen Lorena Orozco Lugo¹⁵, Juan Manuel Pech Canché¹⁶, Everardo Gustavo Robredo Esquivelzeta⁹, Celia I. Selém Salas¹⁷, Adriana Valera Bermejo⁹.

Construcción a gran escala de una biblioteca acústica de referencia de murciélagos

Construction of a large-scale acoustic reference library of bats

- 1.** División Académica de Ciencias Biológicas, Universidad Juárez Autónoma de Tabasco, Villahermosa, México. (rafaelavilaf@yahoo.com.mx)
- 2.** Centro de Investigaciones Tropicales, Universidad Veracruzana, Xalapa, México. (cmacsweeney@uv.mx).
- 3.** Departamento de Zoología, Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, Instituto Politécnico Nacional, Ciudad de México, México. (artibeus2@aol.com)
- 4.** CONACYT - Centro Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo Integral Regional Unidad Durango (CIIDIR), Instituto Politécnico Nacional, Durango, México. (zamora.gtz@gmail.com).
- 5.** Centro Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo Integral Regional, Unidad Oaxaca (CIIDIR), Instituto Politécnico Nacional, Oaxaca, México. (mbriones@ipn.mx).
- 6.** Programa de Planeación Ambiental y Conservación, Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C. La Paz, México. (pcortes04@cibnor.mx).
- 7.** Ingeniería en Recursos Naturales y Agropecuarios, Universidad de Guadalajara, Axtlán, México. (j.carlocuevas@gmail.com).
- 8.** Laboratorio de Genómica Evolutiva, Universidad Autónoma de Zacatecas, Zacatecas, México. (melir17@hotmail.com).
- 9.** Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad, Ciudad de México, México. (jequihua@conabio.gob.mx; erobredo@conabio.gob.mx; avalera@conabio.gob.mx).
- 10.** Instituto Tecnológico del Valle de Oaxaca, Xoxocotlán, Oaxaca, México. (margarita@garcialuis.net)
- 11.** Centro Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo Integral Regional Unidad Durango (CIIDIR), Instituto Politécnico Nacional, Durango, México. (gara940830@hotmail.com; celialg@prodigy.net.mx; fercho_mom@hotmail.com).
- 12.** Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Autónoma del Estado de Morelos, Cuernavaca, México. (aguerrero@uaem.mx).
- 13.** Instituto de Ecología A.C., Xalapa, Veracruz, México. (antonio.guillen@inecol.mx)
- 14.** Departamento de Ecología y Recursos Naturales, Universidad de Guadalajara, Axtlán, México. (murcimx@hotmail.com).
- 15.** Centro de Investigación en Biodiversidad y Conservación, Universidad Autónoma del Estado de Morelos, Cuernavaca, México. (zotz@uaem.mx).
- 16.** Facultad de Ciencias Biológicas y Agropecuarias, Universidad Veracruzana, Tuxpan, México. (jmpech@gmail.com).
- 17.** Campus de Ciencias Biológicas-Agropecuarias, Universidad Autónoma de Yucatán, Mérida, México. (ssalas@uady.mx).

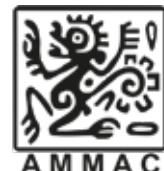
ASOCIACIÓN MEXICANA DE MASTOZOOLOGÍA A.C. (AMMAC)

Dr. Enrique Martínez Meyer
PRESIDENTE

Dra. María Cristina Mac Swiney González
VICEPRESIDENTE

M.en C. Alejandro González Bernal
SECRETARIO

M. en C. Zaira Yaneth González Saucedo
TESORERA



Primera edición, octubre de 2022

D.R. © 2022, Asociación Mexicana de Mastozoología, A.C. (AMMAC)
Hacienda Vista Hermosa 107, Colonia Villa Quietud, Alcaldía Coyoacán 04960, Ciudad de México
www.mastozoologiamexicana.com | www.mamiferosmexico.org
ISBN: 978-607-97373-4-4

COORDINACIÓN GENERAL

Rafael Avila-Flores, María Cristina Mac Swiney González, Jorge Ortega y Verónica Zamora

Gutiérrez (AMMAC)

Traductor/English translation: Keith MacMillan

Diseño y producción editorial: Ada Maruri

Diagramación: Ada Maruri

La reproducción total o parcial de los contenidos de este material está permitida, siempre y cuando sea sin fines de lucro y se cite la fuente.

Editado en México

ESPAÑOL

ÍNDICE |

- 4** | PREFACIO
- 6** | INTRODUCCIÓN
- 12** | ORGANIZACIÓN Y PLANEACIÓN DEL PROYECTO
- 16** | COLECTA DE DATOS
- 24** | GRABACIÓN DE LLAMADOS DE REFERENCIA
- 27** | MANEJO Y ETIQUETADO DE LOS DATOS
- 28** | **EL CASO DEL PROYECTO SONOZOTZ:**
BIBLIOTECA ACÚSTICA DE LOS MURCIÉLAGOS DE MÉXICO
- 35** | BIBLIOGRAFÍA RECOMENDADA

37 | ENGLISH

INDEX |

- 38** | *PREFACE*
- 40** | *INTRODUCTION*
- 46** | *ORGANIZATION AND PLANNING OF THE PROJECT*
- 50** | *DATA COLLECTION*
- 58** | *RECORDING OF REFERENCE CALLS*
- 61** | *DATA MANAGEMENT AND LABELING*
- 62** | ***THE CASE OF THE SONOZOTZ PROJECT:***
ACOUSTIC LIBRARY OF MEXICAN BATS
- 69** | *RECOMMENDED BIBLIOGRAPHY*



PREFACIO

La elaboración de un manual especializado requiere de lineamientos precisos que permitan al lector poner en práctica las instrucciones definidas en el texto. La información contenida en un manual debe ser detallada para que sea lo más explícita y entendible para el usuario, además de ser clara en la terminología utilizada para tener un amplio alcance entre lectores con diferentes niveles académicos y áreas de conocimiento. La estructura del manual debe involucrar diferentes niveles, desde procedimientos simples hasta categorías con cierta complejidad, pero que sean comprensibles en todo momento. El cumplimiento de estas características permite que un manual especializado tenga un amplio espectro de alcance y sirva de forma sucinta para ser tomado como referencia práctica por parte de los usuarios.

Realizar una biblioteca de sonidos de murciélagos es una tarea titánica para países megadiversos como México, debido a la complejidad de sus territorios en cuanto a extensión, orografía y diversidad de ecosistemas, lo que a su vez influye en la composición final de las especies. El presente manual está basado en una serie de procedimientos de campo que fueron definidos, estandarizados e implementados por un grupo de investigadores para el registro de los llamados de eco-localización de los murciélagos de México. Sin embargo, las generalidades de este

texto podrán ser aplicadas en otros países con características ecológicas similares.

Los llamados de ecolocalización se empezaron a comprender en los años 50's cuando se desarrolló la tecnología para poder registrar los sonidos ultrasónicos producidos por los murciélagos. Con el desarrollo de detectores de murciélagos altamente sensibles, se pudo refinar el registro de estos llamados de ecolocalización, hasta obtener firmas particulares para la mayor parte de las especies, lo cual ha permitido la identificación y discriminación de éstas sin necesidad de capturarlas. En la actualidad, los detectores ultrasónicos se han vuelto una herramienta popular y complementaria para caracterizar la quirópterofauna de una región. Sin embargo, el uso de detectores tiene limitaciones en su aplicabilidad, causada por la gran variabilidad intra e interespecífica en los llamados de ecolocalización, la sensibilidad de los micrófonos dependiente de las condiciones ambientales y la complejidad del hábitat a muestrear; de igual forma, no se pueden realizar censos poblacionales debido a la falta de discriminación entre los llamados producidos por cada individuo.

A la fecha, se han publicado diversas bibliotecas de llamados de ecolocalización de murciélagos para regiones o países con relativamente baja complejidad de



hábitats. Sin embargo, es todo un desafío obtener una adecuada compilación de ultrasonidos de murciélagos en países ecológicamente complejos, bajo metodologías estandarizadas, que logren generar una adecuada representatividad geográfica, territorial y taxonómica de la quirópterofauna a nivel nacional.

Nuestro trabajo comienza estableciendo un proyecto a nivel nacional denominado Sonozotz - AMMAC - CONABIO (desde este momento referido únicamente como Sonozotz), el cual fue financiado por la Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad (CONABIO) y fungiendo como entidad rectora la Asociación Mexicana de Mastozoología A. C. (AMMAC). El nombre Sonozotz fue creado utilizando los términos “Sono”, que hace alusión a los sonidos de ecolocalización emitidos por los murciélagos, y “Zotz”, que significa murciélago en lengua maya.

El proceso para la elaboración de una biblioteca de llamados de ecolocalización de gran escala involucra diferentes etapas que en su mayoría incluyen varios grupos de trabajo. Como primer paso, es recomendable reunir a un grupo de expertos en el campo de la detección acústica para compartir experiencias sobre las técnicas que mejor se adapten a las circunstancias, contexto y objetivos particulares del proyecto. Este paso es importante porque se

tiene que establecer un protocolo detallado para asegurar la toma adecuada y sistematizada de datos. Asimismo, se tiene que decidir sobre el detector o detectores con los cuales se harán las grabaciones, así como su programación, las técnicas de captura de los murciélagos, la identificación de las especies, la estrategia de grabación de los llamados ultrasónicos para cada ejemplar capturado, la toma de datos físicos del animal, y algunos datos adicionales que pudieran complementar el esfuerzo de campo.

Tener un protocolo detallado para la toma de datos es importante debido a que cada investigador o participante debe ser capaz de replicar de forma precisa esta metodología. Asimismo, se recomienda la implementación de talleres de capacitación para el seguimiento del protocolo dirigido a diferentes grupos de trabajo. Dependiendo de la magnitud del proyecto, es recomendable la regionalización del área de trabajo para concentrar los esfuerzos de cada grupo en una zona en particular, haciendo más eficiente el trabajo y el uso de los recursos disponibles. El presente manual presenta el consenso metodológico generado por un grupo de expertos para un país megadiverso, pero que se puede particularizar a escalas más pequeñas.



Introducción

Aplicaciones de la acústica de murciélagos

El estudio de la acústica de murciélagos requiere del uso de equipo especializado capaz de grabar a velocidades y frecuencias muy altas. En los últimos años se han realizado grandes avances tecnológicos que han permitido el desarrollo de esta herramienta, haciéndola accesible a un mayor número de personas interesadas en el estudio acústico de los murciélagos. El uso más generalizado de los detectores ultrasónicos ha permitido el avance de la acústica de murciélagos desde la simple detección de actividad y la identificación acústica de especies, hasta la investigación experimental.

Asimismo, los avances logrados en el manejo de datos y la automatización en el análisis de la información acústica han permitido el establecimiento de programas de monitoreo basados en la ciencia ciudadana a grandes escalas espacio-temporales. Uno de los mayores programas de monitoreo acústico de murciélagos es *iBats* (<http://www.ibats.co.uk>). Este programa de monitoreo se basa en voluntarios que recorren cierto número de transectos en vehículos a lo largo de Europa y otras partes del mundo, siguiendo un protocolo de grabación preestablecido. *iBats* ha generado una increíble cantidad de información a lo largo de casi una década que permitirá análisis detallados sobre los patrones espaciales y temporales de las comunidades de murciélagos de las zonas monitoreadas. Esta información se puede analizar desde un sinfín de ángulos diferentes, desde relacionar los patrones de actividad de especies con cambios ambientales, hasta generar datos detallados de la ocupación de especies asociadas a factores muy particulares de los hábitats, tanto naturales como antropizados. Otro programa, el *North American Bat Monitoring Program* (NABat), fue creado para monitorear murciélagos a lo largo de Norteamérica gracias a la contribución de voluntarios, naturalistas, investigadores y personas asociadas a diferentes agencias ambientales, incluidas Organizaciones No Gubernamentales (ONGs).



Foto:
Zuemy Vallado



Aunque la identificación acústica de especies es un campo que se ha explorado casi desde los inicios de la investigación acústica de murciélagos, sigue siendo un campo muy popular, útil y necesario en nuestros días. En países particularmente diversos, la exploración acústica ha arrojado el descubrimiento de potencialmente nuevas especies de murciélagos. La combinación entre las técnicas moleculares y de acústica ha permitido establecer complejos de especies crípticas que antes eran consideradas como una sola entidad taxonómica. Asimismo, las técnicas acústicas han permitido establecer diferencias en los llamados de ecolocalización en diferentes regiones del área de distribución de las especies, por lo que estos resultados abren la posibilidad de poder separar especies que antes se creía formaban parte de un mismo complejo taxonómico. Por ejemplo, los murciélagos de la familia Emballonuridae son difíciles de estudiar con las tradicionales redes de captura, ya que rara vez caen en ellas (a menos que se coloquen en un refugio). La posibilidad de instalar detectores acústicos en zonas remotas por largos períodos de tiempo ha permitido explorar las comunidades acústicas, revelando la existencia de posibles nuevas especies.

Tradicionalmente, los microquirópteros se han clasificado en dos grandes grupos que se basan en la intensidad de sus llamados: los murciélagos “ecolocalizadores” y los murciélagos “susurradores” (pertenecientes al gremio de los forrajeadores de sustrato). Aunque todos los microquirópteros producen llamados de ecolocalización, esta clasificación pretende enfatizar la idea de que ciertas especies de murciélagos emiten llamados de ecolocalización con muy poca energía (aproximadamente a 70 dB SPL medidos a 10 cm de la boca). Sin embargo, con el surgimiento de tecnología más accesible junto con micrófonos cada vez más sensibles, esta clasificación comienza a ser obsoleta ya que se ha demostrado que algunas especies de los llamados murciélagos “susurradores” pueden emitir llamados de muy alta energía.

Estos descubrimientos retan el paradigma de que los murciélagos forrajeadores de sustrato no son buenos candidatos para la investigación o monitoreo acústico. Cada vez son más las investigaciones enfocadas en explorar el potencial acústico de estas especies que hasta el momento han sido poco estudiadas, acústicamente hablando. Aunque los llamados de los forrajeadores de sustrato son muy similares entre especies, sus llamados son fácilmente distinguibles entre grupos definidos por atributos ecológicos y taxonómicos, lo que les confiere un buen potencial de estudio acústico a nivel de diversidad funcional o gremio. Por ello, son cada vez más los estudios que incluyen los llamados de especies de una gran variedad de gremios, para permitir que la exploración acústica continúe y se puedan llegar a hacer otros descubrimientos conforme avancen las técnicas matemáticas para análisis de sonidos ultrasónicos.

A pesar del gran avance logrado por la acústica de murciélagos, la identificación a nivel especie de algunos grupos sigue siendo un reto. Por ello, los investigadores han empezado a explorar otras opciones de identificación acústica que incluyen niveles taxonómicos superiores a especie (e. g. género, familia), niveles ecológicos (e. g. gremios tróficos) e inclusive unidades evolutivas. La información ecológica contenida en los llamados de ecolocalización de los murciélagos refleja la diversidad funcional de las comunidades a estudiar y puede generar información importante sobre los procesos ecológicos y los servicios ecosistémicos presentes en un área. La identificación de llamados con base en criterios ecológicos puede ser usada para hacer una caracterización rápida y efectiva de los ensamblajes tróficos de murciélagos, para generar asociaciones ecológicas con características ambientales, e incluso rastrear cambios en la estructura de comunidades. Estos niveles de organización han demostrado ser precisos e incluso podrían reducir el costo del monitoreo de comunidades de murciélagos en regiones altamente biodiversas.

Asimismo, los estudios y monitoreos acústicos nos han permitido entender los efectos de las actividades antropogénicas en la actividad y la diversidad de murciélagos. Con la ayuda de estos datos hemos mejorado nuestro entendimiento sobre importantes amenazas a este taxón a nivel mundial. Por ejemplo, los métodos acústicos han sido una herramienta novedosa e indispensable que ha permitido descubrir patrones y efectos antes ignorados de los parques eólicos. En estas instalaciones, el uso tradicional de redes de niebla para evaluar el nivel de riesgo de colisión no permitía tener datos confiables, ya que en estas zonas abiertas los murciélagos vuelan a grandes alturas y son imperceptibles con las redes. Cuando se comenzaron a hacer estudios acústicos, se entendió el verdadero daño y peligro que representan estos parques energéticos para los murciélagos. Los conocimientos sobre cómo las actividades humanas afectan la biodiversidad son un requisito crucial para el desarrollo y la aplicación de programas efectivos de conservación. Los murciélagos son indicadores importantes de las tendencias de la biodiversidad y los estudios acústicos son un método rentable y eficiente que ofrece la oportunidad de monitorear las comunidades de murciélagos consistentemente a través del tiempo, desde escalas regionales a globales.

Documentación de llamados de ecolocalización de murciélagos

El uso de los métodos acústicos ha avanzado a un ritmo mucho más acelerado que la descripción detallada y estandarizada de los llamados de ecolocalización de las especies de estudio. Los esfuerzos que se han hecho por documentar la gran variedad de llamados de ecolocalización de los murciélagos han sido en su mayoría esfuerzos aislados e individuales en los que se recopilan llamados de referencia con el fin de abordar preguntas de investigación específicas, y más aún, el material acústico recopilado no es de acceso abierto. Esto se traduce en una representación acústica limitada de especies y regiones geográficas. Teniendo en cuenta la gran variación de llamados que existen incluso dentro de la misma especie, esta escasez o falta de accesibilidad al material de referencia ha impedido la implementación de estudios acústicos de comunidades enteras de murciélagos o regiones geográficas extensas.

En el año 2012 se crea la primera biblioteca mundial de llamados de ecolocalización de murciélagos, la cual se conoce como *Echobank*. Este es un acervo invaluable que contiene un total de 53,488 llamados de 297 especies. Sin embargo, su mayor representatividad es para las especies europeas y zonas templadas, lo cual deja un gran vacío de información para zonas tropicales donde la composición, diversidad y complejidad de las comunidades es mayor. Asimismo, no es una biblioteca de uso libre y compartido, y su material proviene de muchas fuentes y metodologías no estandarizadas. No es sino hasta el año 2016 cuando surge Sonozotz, el primer gran esfuerzo a nivel de país para crear una biblioteca de referencia de llamados de murciélagos (incluyendo especies tropicales), que contiene material recopilado de manera estandarizada (Zamora-Gutierrez et al. 2020).

Hasta el momento en que escribimos estas líneas, Sonozotz alberga llamados de 1,664 individuos de 7 familias y 69 especies de murciélagos mexicanos y hay planes para expandir su acervo. Otra característica que hace diferente este repositorio es que el material es de uso totalmente libre a través del portal de la agencia gubernamental de la Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad (CONABIO).



La importancia de estos repositorios acústicos es enorme, ya que son el primer paso para abordar algunos de los mayores retos en la identificación acústica de murciélagos:

1. Similitud de llamados:

La ecolocalización de los murciélagos evolucionó con fines sensoriales y no comunicativos, por lo que los llamados no fueron diseñados para conferir una identidad específica a las especies. La ecolocalización permite a las especies explotar de manera eficiente el medio en el que habitan, por ello las especies que comparten un mismo hábitat y explotan los mismos recursos tienen, en muchas ocasiones, características de ecolocalización muy similares. Esto hace que las especies de algunos grupos sean casi imposibles de separar acústicamente (e. g. *Myotis* sp., forrajeadores de sustrato) (**Fig. 1**).

Aunque la disponibilidad de material de referencia adecuado no necesariamente resuelve este problema, sí es la clave para descubrir mejores formas para clasificar los llamados de los murciélagos de ciertos grupos, ya que existen diferentes niveles taxonómicos y ecológicos por los cuales se pueden agrupar las especies y ser identificadas efectivamente. Asimismo, solo teniendo material con una buena representatividad podremos asignar niveles de confianza a las identificaciones acústicas, o incluso definir cuáles especies realmente no tienen potencial de identificación acústica a nivel específico.

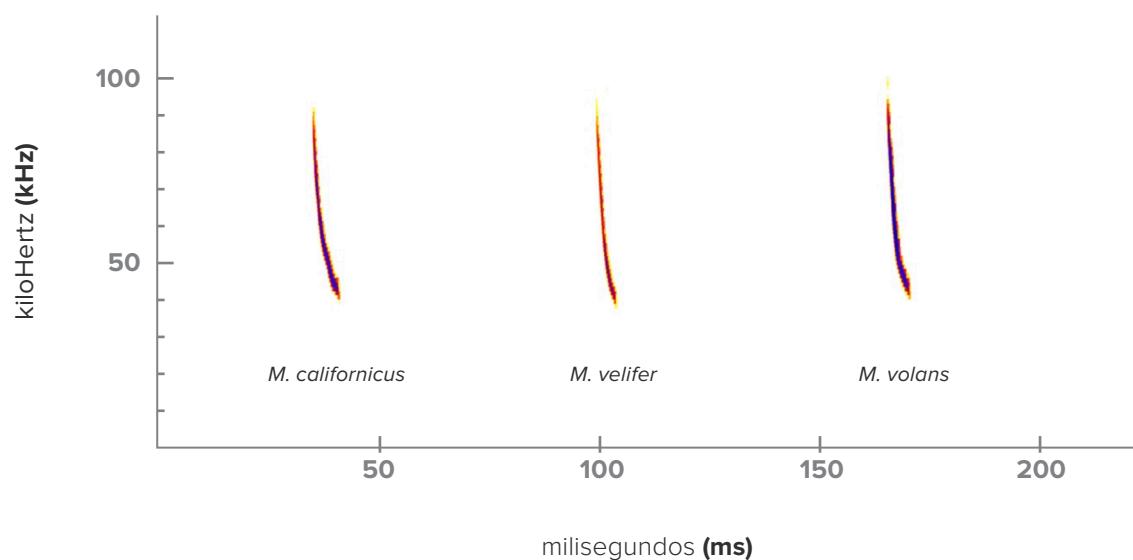


Figura 1. Comparación de los llamados de ecolocalización de tres especies de *Myotis*.
Fuente: Sonozotz.

2. Plasticidad y variación de llamados:

Los murciélagos suelen tener algunas firmas acústicas que los distinguen entre especies o entre grupos, pero también hay características de los llamados que son flexibles y los murciélagos se adaptan según las necesidades sensoriales de los individuos (**Fig. 2**). Esto hace que en algunas ocasiones llamados de gremios totalmente diferentes se lleguen a parecer mucho, si los individuos se encuentran volando o forrajeando (comiendo) bajo condiciones ambientales similares. Para lograr una correcta identificación de estas especies, se necesita un adecuado conocimiento ecológico y de su comportamiento ecolocalizador para discernir los tipos de llamados que pueden producir bajo situaciones determinadas.

Asimismo, resulta de mucha utilidad contar con una adecuada documentación de sus llamados bajo diferentes condiciones ambientales (naturales para la especie): volando en espacios abiertos, cerrados, forrajeando cerca o sobre cuerpos de agua, etc. Incluso se necesita tener referencia de los llamados de una misma especie a lo largo de su distribución geográfica, ya que se ha encontrado que algunas especies presentan “dialectos” locales o regionales. También es necesario tener llamados de los diferentes sexos y edades, ya que pueden presentarse ligeras diferencias en sus llamados. Es aquí donde una biblioteca acústica de referencia extensa, tanto en especies como en representatividad geográfica y ambiental, se hace indispensable para lograr entender las amplias variaciones del comportamiento ecolocalizador de las especies y así poder llegar a una correcta identificación acústica.

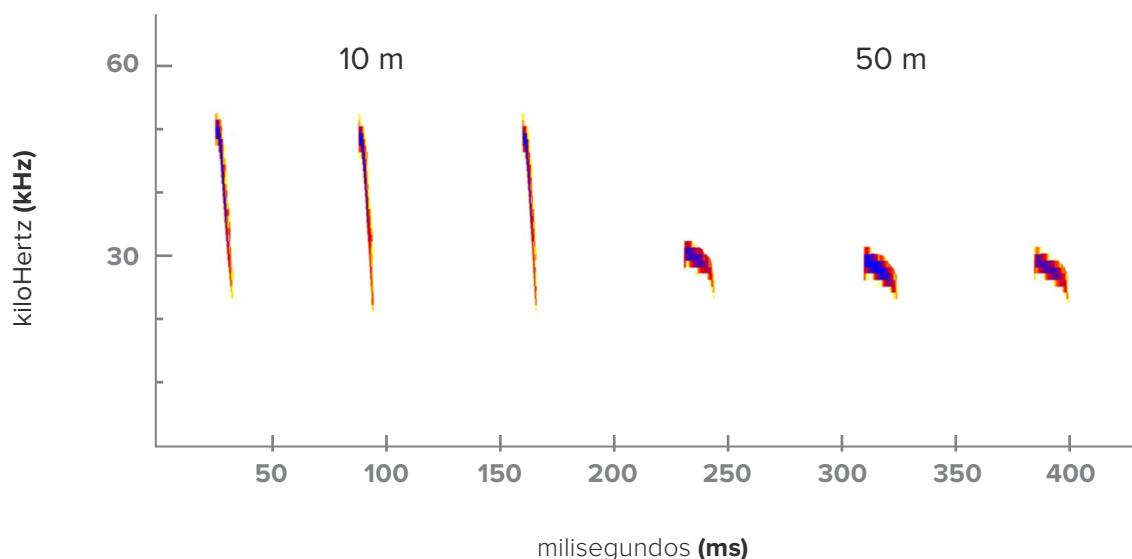


Figura 2.

Llamados de ecolocalización del mismo individuo de la especie *Molossus nigricans* al ser grabado a 10 metros (cerca de obstáculos) y a 50 metros (alejado de obstáculos) del punto de liberación, durante la misma secuencia de vuelo.

Fuente: Sonozotz



3. Metodologías para la caracterización acústica de especies:

Tradicionalmente, la identificación acústica de especies de murciélagos se ha hecho siguiendo tres pasos principales. Primero se extraen ciertos parámetros de los pulsos (e. g. frecuencia máxima, frecuencia mínima, duración del llamado), ya sea de manera manual al medirlos en un software de visualización, o utilizando software más especializados que extraen estos parámetros de manera semi-automatizada. Después, los parámetros se comparan con otros parámetros publicados en la literatura y es a criterio de la persona que los está analizando que se asignan a cierta especie o morfo-llamado. Finalmente, estos parámetros se analizan con estadística multivariada, como el análisis de funciones discriminantes, para asignar un grado de precisión de identificación a esas pre-asignaciones de especies. Este método se sigue utilizando porque es fácil de entender y de seguir, pero se ha demostrado que tiene serias limitaciones estadísticas para asignar a nivel especie llamados que son muy similares. Recientemente se ha reconocido a la familia de algoritmos de aprendizaje automatizado (*machine learning*) como la herramienta que debe popularizarse para clasificar acústicamente a los murciélagos. Con estos algoritmos se puede hacer incluso un análisis de la señal acústica completa sin tener que pasar por la extracción de parámetros. Pero esta familia de algoritmos necesita ser entrenada con muchos datos para que puedan ser precisos y eficientes, lo que ha limitado su uso hasta el momento. La reciente popularización y creación de bibliotecas acústicas de referencia abrirá paso a la aplicación de técnicas de análisis matemático más avanzadas para detectar diferencias sutiles entre llamados muy similares, y podrían ser estas técnicas la clave para poder distinguir entre especies acústicamente muy similares.

Objetivo de este manual

Este manual está basado en el protocolo de muestreo que se generó durante el proyecto Sonozotz. Su objetivo principal es orientar a las personas o grupos de trabajo que desean generar material de referencia para la identificación (o clasificación) acústica de las especies de murciélagos de una región o país. Las siguientes secciones describen cada una de las etapas que consideramos necesarias para generar una base de datos robusta, informativa y sistematizada, pero habrán de ser adaptadas a las condiciones y contextos de cada grupo de trabajo. Nuestras recomendaciones incluyen la colecta de algunos datos adicionales que no son estrictamente necesarios para construir la biblioteca de sonidos, pero que ofrecen la oportunidad de realizar análisis genéticos, ecológicos o ecomorfológicos complementarios.

Esperamos que este documento sirva de referencia para la creación de bibliotecas acústicas en diversas regiones del mundo, especialmente en países con amplia diversidad ambiental, ecosistémica, taxonómica y sociocultural, como es el caso de México. Contar con bibliotecas de referencia en diferentes países nos permitirá crear una red de colaboración, lo que a su vez facilitará la generación de material estandarizado que pueda ser usado y compartido de manera masiva.



Organización y planeación del proyecto

Formación del equipo de trabajo

Uno de los primeros pasos para elaborar exitosamente una biblioteca acústica en un país diverso es organizar equipos de trabajo. Es recomendable invitar a colegas que preferentemente ya hayan tenido experiencia en la grabación acústica de murciélagos y que estén familiarizados con la identificación taxonómica de las especies. Es deseable que estos colaboradores conozcan sitios de muestreo en sus regiones de trabajo y que puedan organizar equipos de trabajo a nivel regional para realizar la mayor cantidad de salidas de campo posible. Formar un equipo de trabajo con colegas de diferentes regiones del país, puede ayudar a tener una amplia cobertura geográfica y taxonómica de la biblioteca acústica.

Se aconseja llevar a cabo reuniones presenciales o virtuales con los colegas colaboradores para organizar las primeras etapas del proyecto, donde se discutan aspectos importantes como los roles que cumplirá cada uno de ellos, la decisión de cómo obtener financiamiento económico para cubrir los gastos del proyecto, potenciales localidades de muestreo, así como el equipo de grabación más adecuado, el cual debe considerar las condiciones ambientales y sociales del país. Un aspecto clave para el manejo de la información generada en el proyecto es la organización y accesibilidad remota de los datos. Por ello, se recomienda contar con colaboradores que puedan crear y/o manejar una plataforma que facilite subir e integrar la información generada por cada uno de los colegas que participen en la biblioteca.



Foto:
Cesar Guzmán

Asignación de roles

Determinar los roles de los participantes es un aspecto clave para el buen funcionamiento del equipo de trabajo. Se sugiere contar con un *coordinador general* del proyecto, el cual tendrá el papel fundamental de llevar la organización general del proyecto desde el punto de vista técnico y administrativo, además de ser el interlocutor entre el grupo de trabajo y los financiadores del proyecto. Designar un *coordinador administrativo* del proyecto puede ser muy útil para agilizar la disponibilidad de fondos para las salidas de campo y la comprobación de gastos. Asimismo, es altamente recomendable designar un *coordinador técnico* del proyecto, el cual estará



encargado de recibir la información organizada de cada uno de los *coordinadores regionales*, revisar la calidad de los llamados y coordinar que se suba toda la información a la plataforma designada para su almacenamiento. Los *coordinadores regionales* serán los encargados de encabezar las salidas de campo de su región, así como coordinar las salidas de otros colegas de la misma región y organizar la información generada para ser entregada a un *técnico del proyecto*, quién será el encargado de subir e incorporar toda la información de los grupos de trabajo a la plataforma.

Una vez definidos los roles de los participantes, se sugiere definir cómo será el flujo de la información y las responsabilidades puntuales de cada uno de los participantes para que la realización de las salidas de campo sea sencilla y la información generada se pueda subir de forma ágil y expedita a la plataforma que la almacene.



Foto:
Cesar Guzmán

Elección del detector adecuado, ajustes y software a utilizar

En la actualidad existen numerosas opciones de detectores ultrasónicos para la grabación de firmas vocales de murciélagos. La recomendación general es que el grupo de trabajo discuta sobre los pros y contras de los diferentes equipos y que el equipo seleccionado tenga un micrófono de buena calidad, aspecto indispensable para obtener llamados de referencia de alta calidad. Se recomienda adquirir detectores que permitan grabaciones de espectro completo (*full spectrum*) en tiempo real (*real time*). La portabilidad es otro aspecto que debe también considerarse en el momento de elegir un detector ultrasónico. Asimismo, el equipo debe ser robusto, es decir, debe resistir las condiciones extremas de humedad y temperatura, las cuales son comunes en el trabajo de campo nocturno con murciélagos. Los ajustes y especificaciones de grabación (*settings*) de los detectores deben establecerse *a priori* y tratar de que sean homogéneos para la mayoría de las especies y muestras. Esto evitará errores comunes cuando se tengan que realizar modificaciones en campo, dependiendo de la especie a grabar y las condiciones ambientales (e. g. ruido de fondo). El software de análisis de las grabaciones también se recomienda sea discutido por el equipo de trabajo, con base en la experiencia de los investigadores y su accesibilidad.



Equipo de grabación utilizado en el proyecto Sonozotz

Esta figura muestra las diferentes partes del detector Avisoft Bioacoustics modelo UltraSoundGate116 hn.



Obtención de fondos

El costo de los detectores ultrasónicos ha disminuido en los últimos años debido al enorme avance tecnológico y a la diversificación de las compañías fabricantes. Sin embargo, la adquisición de estos equipos acústicos para el registro de firmas vocales en diferentes regiones de un país será un gasto económico grande, por lo que obtener financiamiento es clave para garantizar el éxito del proyecto. Asimismo, la organización de uno o varios talleres de estandarización de métodos y las salidas a nivel regional para la captura y grabación de individuos demandan fondos que las solventen. La contratación del técnico del proyecto es otro aspecto para considerar en el presupuesto.



Foto:
Cesar Guzmán

Talleres de entrenamiento y estandarización

Una vez organizado el equipo de personas que llevarán a cabo la colecta de datos para la biblioteca, obtenido el financiamiento y adquirido el equipo de grabación, se recomienda realizar un taller de estandarización de las técnicas y métodos para la colecta de datos. En este taller es recomendable que asistan el coordinador general, el coordinador administrativo, el coordinador técnico del proyecto y los coordinadores regionales. Ahí se pondrán en práctica todas las metodologías previamente propuestas en las reuniones de organización del proyecto y se realizarán los ajustes necesarios. Asimismo, se sugiere hacer una revisión exhaustiva del detector y los ajustes, para que todos los participantes se familiaricen con el equipo y su funcionamiento, además de que se identifiquen errores de funcionamiento comunes y se determine cómo resolver estos errores en campo. Es importante que este taller se lleve a cabo en alguna localidad donde se puedan realizar capturas de murciélagos y grabaciones de individuos, para poner en práctica el protocolo del proyecto.

Una vez redactado y revisado el protocolo general en el taller de estandarización, se recomienda llevar a cabo talleres regionales, en donde participen todos los investigadores y estudiantes que colaborarán en las salidas de campo. La idea principal de estos talleres es hacer una réplica del protocolo, para que todos los participantes que generarán información para la biblioteca estén familiarizados con el protocolo general y, de ser necesario, se realicen los ajustes finales al mismo, antes de ponerlo en práctica en cada una de las regiones; por lo tanto, es importante realizar el taller de entrenamiento en localidades donde se puedan capturar murciélagos.



Colecta de datos

Diseño del muestreo

La creación de una biblioteca de sonidos de ecolocalización que incluya una proporción significativa (o cuando menos representativa) de la diversidad de especies de murciélagos presentes en un país, significa un enorme reto en términos de recursos humanos, técnicos, materiales y económicos. Esto es particularmente cierto cuando se trabaja con grupos de trabajo numerosos que generan sonidos de referencia a partir de protocolos estandarizados. El reto es todavía mayor cuando la meta es crear una biblioteca de sonidos para un país megadiverso o para un país con gran extensión territorial. Para que los sonidos almacenados en una biblioteca sean representativos de la diversidad taxonómica y ecológica del país, el primer paso debería ser la identificación de unidades espaciales (regiones) relativamente homogéneas caracterizadas por biotas y rasgos geográficos distintivos. Idealmente, esta regionalización debería basarse en clasificaciones preexistentes, como son los mapas de las ecorregiones o de las provincias fisiográficas presentes en el territorio nacional. Sin embargo, la regionalización final podría ser ajustada por criterios de tipo logístico, como son los límites geopolíticos (estados, provincias, departamentos, etc.), la disponibilidad de vías de comunicación (especialmente carreteras y caminos), la ocurrencia de conflictos sociales locales o la incidencia delictiva.



Foto:
Molossus sp.
Emmanuel Solis

Cada región deberá ser muestreada a partir de un conjunto de sitios y localidades de colecta, que en su conjunto ofrecerán una representación adecuada de la diversidad de sonidos presentes en el área de estudio. Un sitio corresponde a un área de dimensiones limitadas, como podría ser un área natural protegida, un parque nacional o una municipalidad, que podría ser muestreada en uno o varios días. Para hacer más eficiente el uso de los recursos disponibles, una alternativa sería definir *a priori* el número de sitios a muestrear dentro de cada una de las regiones identificadas. Este número podría ser asignado de manera proporcional a la superficie o a la riqueza quiropterológica esperada en cada región. Alternativamente, el número de sitios podría ser distribuido de manera equitativa entre todas las regiones.



En cada sitio, los colectores seleccionarán puntos específicos de muestreo (localidades) que maximicen el éxito de captura de murciélagos, como refugios, cuerpos de agua y rutas de vuelo (por ejemplo, corredores de vegetación). La captura puede realizarse mediante el uso de diferentes técnicas, como son las redes de niebla, redes de golpe, trampas de arpa u otras técnicas a discreción de los colectores. Se debe elegir el método según las características del lugar de captura y de los atributos de las especies esperadas, como son sus niveles de agregación en el refugio, sus patrones de vuelo y sus horarios de actividad. Por ejemplo, si se va a muestrear una cueva o un refugio con cientos, miles o millones de individuos, el uso de redes de niebla no es recomendable, y si se usa tiene que colocarse en algún lugar y en alguna posición que permitan la captura de sólo los individuos que pueden ser manejables sin llegar a causarles estrés o incluso causarles la muerte.

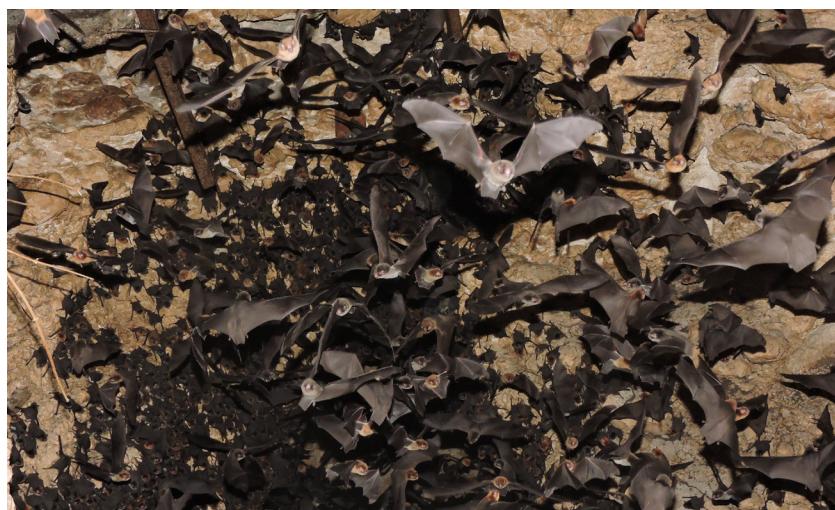


Foto:
Emmanuel Solis

Datos ambientales

Para los estudios que requieren el uso de métodos acústicos en murciélagos, el registro de las condiciones ambientales ofrece información muy valiosa debido a que estos parámetros definen en buena medida los patrones de actividad de las diferentes especies o grupos funcionales, y por lo tanto pueden determinar el éxito de captura del día. Incluso, si se llegan a obtener datos acústicos de alta calidad, esta información permitirá explorar cómo el ambiente físico influye en los componentes de los llamados de ecolocalización. Por ello, siempre se recomienda registrar cuando menos los datos de temperatura y humedad que se presenten durante el muestreo de los murciélagos. Hoy en día existen aparatos muy económicos y accesibles que miden estos parámetros de manera automatizada, como son los llamados USB Data Loggers.

Para llevar a cabo el registro de estos datos se recomienda que antes de iniciar la sesión de muestreo el dispositivo se programe para activarse en intervalos regulares por lo menos durante el tiempo que se lleven a cabo las actividades de captura y grabación de los murciélagos. En la medida de lo posible, los horarios de muestreo de murciélagos y el registro de datos ambientales deberán ser estandarizados para todas las localidades y equipos de trabajo (de preferencia utilizar la hora local de la salida y puesta del sol obtenida del GPS), especialmente si se quieren aprovechar los muestreos para obtener datos adicionales (ver anexo). El aparato se programará para tomar una medición de las variables ambientales cada cierto periodo de minutos y esto dependerá de cada aparato y las necesidades específicas de cada proyecto.



Identidad taxonómica y ecológica de los ensamblajes locales de murciélagos

Antes de salir a realizar colecta de datos de cualquier tipo es importante hacer una investigación previa del área de estudio. Para el caso concreto de estudios acústicos, es recomendable previo a las salidas de campo, preparar una lista de las especies potencialmente presentes en el área, gremios a los que pertenecen y leer sobre su ecología básica. Esto será de gran ayuda para determinar las mejores estrategias de captura y grabación (según sus hábitos de vuelo y forrajeo). Asimismo, antes de cada salida de campo se recomienda ubicar los grupos de especies de identificación problemática para poder tomar decisiones rápidas sobre su procesamiento (toma de tejidos o vouchers), si se llegaran a capturar. Finalmente, esta investigación previa también nos ayudará a identificar las guías de campo o los libros más adecuados para llevar a las salidas.



Foto:
Bauerus dubiaquercus
Mercedes Morelos



Foto:
Corynorhinus townsendii
Juan Cruzado Cortés



Foto:
Lasionycteris noctivagans
José Gabriel Martínez Fonseca

Captura e identificación de ejemplares

Una vez que se ha capturado al murciélagos y durante su procesamiento se deberá minimizar la manipulación y estrés de los ejemplares, por lo que inmediatamente después de su captura deberán ser colocados en bolsas de manta limpias (un individuo por saco para facilitar el etiquetado). Una recomendación muy útil es que cada bolsa sea etiquetada con cinta adhesiva con la hora, fecha de colecta y un número consecutivo único asignado. La adopción de esta técnica permitiría que el pedazo de cinta siga al murciélagos durante todo su procesamiento como se describe más abajo, para asegurar que el identificador único sea el correcto para toda la información del ejemplar. Al término del procesamiento se recomienda destruir la cinta o asociarla al ejemplar preparado cuando sea el caso.

Los murciélagos deben permanecer en las bolsas de manta mientras no se les necesite manipular y si se está grabando en lugares fríos, deberán de mantenerse en un lugar que le permita mantener su temperatura corporal (e. g. dentro de casas de campaña o algún refugio, bajo alguna manta o chamarra, etc.). Algunas especies de murciélagos son más frágiles que otras, pero de manera general se recomienda no tener a ningún individuo capturado por más de dos horas.



A cada murciélagos capturado se le deben tomar las medidas y datos estándar, como son el peso, el largo del antebrazo, la edad relativa (juvenil o subadulto, adulto), y la condición reproductiva. Para las hembras la designación estándar es inactivas, preñadas, lactantes y post lactantes, y para los machos se define de acuerdo con la posición de los testículos: abdominales, inguinales (sexualmente inactivos) o escrotados (activos). Una vez registrados estos datos se procede a la identificación. Si la identificación es hecha por alguien experimentado en las especies del área, no es estrictamente necesario consultar las guías de identificación locales (si es que las hay). Pero, si la identificación está a cargo de alguien en entrenamiento, sí se debe de contar con las guías de identificación adecuadas que deberán ser estudiadas y analizadas previo a la salida de campo. Asimismo, es muy aconsejable que esas identificaciones sean corroboradas *in situ* por un participante con experiencia. Para las especies de difícil identificación o especies crípticas, se recomienda colectar una muestra de tejido alar (ver sección de colecta de tejidos) para la corroboración de la especie por métodos moleculares.

El sacrificio de ejemplares debe ser exclusivamente bajo circunstancias muy especiales, como es la presencia de lesiones irreparables tales como la rasgadura completa del ala o la fractura de algún hueso derivada de su captura en la red o trampas. Si se sospecha que el individuo capturado sea el registro de una nueva especie para el país o una ampliación notable de su distribución nacional, se recomienda colectar el ejemplar para ser ingresado a una colección científica para su futura consulta. A cada ejemplar sacrificado se le deben tomar todas las medidas morfométricas y de ser posible obtener tejidos de los órganos internos (ver sección de colecta de tejidos).

Fotografías

Fotografías de evidencia:

Para respaldar la identificación taxonómica, es recomendable que a cada individuo capturado se le tome una foto del rostro de perfil, de ¾ o de frente con suficiente acercamiento para poder reconocer rasgos que permitan identificarlo y documentarlo. Se recomienda tomar varias fotografías para permitir escoger la mejor. Las fotografías deben ser guardadas sin editar siguiendo al menos las siguientes recomendaciones:

- Resolución mínima de 300 dpi.
- Formato JPG, TIFF, de preferencia en formato RAW.
- Buena nitidez, color e iluminación (ni oscura, ni quemada por exceso de luz).
- De preferencia con fondo oscuro.

Se necesitan mínimo dos personas para obtener fotos adecuadas, una encargada de manipular y preparar al murciélagos que se va a fotografiar y otra encargada de tomar las fotos. Las fotos deberán ser tanto funcionales (para visualizar características claves de las especies) como estéticas en la medida de lo posible. En caso de sujetar al murciélagos con la mano, no olvidar usar guantes. Se recomienda que la primera foto de cada ejemplar sea la de la cinta con el identificador único para evitar la confusión de individuos. Se sugiere también que una sola persona tome todas las fotografías con la misma cámara para evitar errores.

De manera opcional se podrán tomar las siguientes fotografías que apoyen a la identificación y documentación de las especies:



- Vista dorsal cuerpo completo.
- Vista ventral cuerpo completo.
- Uropatagio dorsal y ventral.
- Caracteres de importancia para la identificación como bandas de color en el pelaje, flecos de pelos, líneas dorsales, verrugas, sacos alares, etc.

Fotografías para análisis de morfología alar:

Dependiendo de la cantidad de trabajo e individuos capturados que se tengan por noche, existe la posibilidad de tomar fotos de las alas para análisis morfométricos. Para generar esta imagen se posiciona el murciélagos boca abajo sobre una hoja de papel milimétrico para establecer la escala (se recomienda forrar la hoja con una mica opaca, para evitar el reflejo por la luz del flash en la fotografía), como se muestra en la **Figura 3**.



Figura 3. Fotografía del ala derecha de un individuo de *Sturnira hondurensis*, ilustrando la posición del ala (línea punteada) y el ángulo entre el antebrazo y el húmero (líneas rojas).

Se recomienda tomar el ala derecha de todos los ejemplares para estandarizar las fotos, lo que a su vez permitirá hacer comparaciones con las fotografías tomadas por otros grupos de trabajo. Una vez posicionado el murciélagos, se debe asegurar que la membrana alar y el uropatagio estén completamente estirados, en una posición natural que no lastime al murciélagos y no se sobre-estire el ala. La punta del ala también tiene que estar completamente estirada. La imagen que se muestra en la Figura 3 se capturó ubicando la cámara perpendicularmente al plano de la imagen. Para lograr una captura uniforme de las imágenes, las alas se extendieron desde la punta, ubicando el polex a la altura de la cabeza y el antebrazo en ángulo recto con el húmero. Se sugiere colocar la cinta con el identificador único sobre la hoja milimétrica enmascarada como referencia para la fotografía (**Fig. 3**).



Si el murciélagos está muy inquieto, otra persona puede ayudar a mantener la pata del murciélagos hacia abajo o asentada sobre el papel para que el plagiopatagio quede adecuadamente estirado. Esa misma persona puede asegurar uno o dos puntos del ala del murciélagos para que quede correctamente asentada sobre el papel. Se debe tener cuidado de no cubrir ninguna de las articulaciones del ala. Deberán evitarse sombras en la imagen.

Colecta de tejidos

Se recomienda tomar muestras de tejido alar de aquellos individuos de los que se tenga duda de identificación o de aquellos ejemplares de interés particular (raros, de difícil captura, nuevos registros, etc.). Para tomar estas muestras se extenderá la membrana alar del ejemplar con la parte dorsal hacia arriba sobre una superficie plana previamente desinfectada con agua oxigenada, etanol o alcohol en gel. Se tomará una muestra de la parte más distal de cada ala utilizando un sacabocado (*biopsy punch*) o pinzas y tijeras finas. Las muestras no deberán ser mayores de 3 mm de diámetro o del diámetro de la aguja de biopsia. Cuando se extraiga tejido de las membranas del ala, las muestras deberán ser colectadas cerca del cuerpo (entre la pierna y el quinto dedo del ala), para minimizar el efecto potencial sobre el rendimiento del vuelo. El investigador deberá ser muy cuidadoso para evitar perforar cerca de vasos sanguíneos grandes o del borde de las alas para evitar desgarrarlas. Adicionalmente a fin de evitar infecciones, se puede aplicar violeta de genciana, agua oxigenada, topazone o algún otro antiséptico al sitio donde se tomó la muestra.

Después de cada corte se deberán limpiar las tijeras y/o sacabocado con alcohol para evitar contaminación. La aguja de biopsia se puede esterilizar con ayuda de la flama directa de un encendedor con la finalidad de eliminar todo residuo entre muestras, o bien se puede limpiar con toallitas desechables con cloro.

El tejido obtenido se guardará en tubos de 1.8 ml con tapa de rosca y/o empaque plástico o en tubos Eppendorf de 1.5 ml, conteniendo etanol al 96% o etanol absoluto grado molecular (en un volumen de ¾ partes del tubo). El tubo será previamente etiquetado con el identificador único del ejemplar, con ayuda de un rotulador indeleble al agua y alcohol o con lápiz; la etiqueta puede ir en la parte superior de la tapa y en el costado del tubo. Después de obtener la muestra, los tubos deben sellarse con Parafilm® para evitar que se desequen por la evaporación del alcohol. Las muestras se mantendrán a temperatura ambiente, evitando la luz directa y una vez en laboratorio, se deben de preservar a una temperatura de entre 4 y -10 °C hasta su análisis.

Colecta de vouchers de referencia

Si el espécimen se va a preparar como ejemplar para una colección científica (voucher), se recomienda que se haga tan pronto se termine de recolectar la información de los pasos anteriores. Si no es posible, se guardará vivo hasta el día siguiente para ser procesado. El método de sacrificio del ejemplar deberá ajustarse a los protocolos emitidos por las autoridades ambientales locales o por alguna comisión institucional de bioética. Se debe tomar en consideración el apropiado manejo de las sustancias anestésicas para evitar efectos indeseados a las personas que los están manejando.



Se procurará preparar todos los ejemplares como piel y cráneo estándar (siguiendo el procedimiento descrito en Hall, 1981, *Mammals of North America*, por ejemplo, o en cualquier manual de mastozoología, Fig. 4). Si no se cuenta con los medios para evitar la degradación del ejemplar, entonces deberán tomarse las muestras de tejido inmediatamente después de muerto y preservar (en alcohol) el resto del ejemplar. En este caso, se recomienda prepararlo como esqueleto completo si la temperatura y la humedad ambiental son muy elevadas. Los datos de preparación se incluirán en el catálogo correspondiente.



Figura 4. Ejemplar de murciélago preparado para museo.

Foto: Celia López G.

Tejido de órganos internos de ejemplares voucher de referencia

Recomendamos que los especímenes voucher sean aprovechados para generar la mayor cantidad de información posible, aunque ésta no esté directamente relacionada con la creación de una biblioteca de sonidos. Si el espécimen muere antes de procesarse, deberá extraerse una muestra de tejido muscular, para evitar la degradación del ADN. Una vez obtenida la muestra, el cuerpo puede guardarse en una bolsa de plástico bien cerrada y conservarse en hielo o refrigeración hasta procesarse. En ningún caso deberá congelarse antes de tomar la muestra de tejido.



Si el ejemplar es sacrificado, una persona con experiencia en la disección e identificación de tejidos deberá colectar algunas muestras con ayuda de pinzas, tijeras y navajas de disección previamente desinfectadas. Los tejidos se pueden preservar en dos sustancias:

A) Etanol:

Una vez sacrificado el ejemplar, se hace una incisión torácica-abdominal para obtener muestras de tejido muscular (pectoral, corazón), hígado, riñón, bazo y páncreas. Este proceso deberá ser inmediato a la muerte del animal para evitar la degradación del material genético. El tamaño del tejido (3 x 3 mm) no deberá ser mayor a una 1/3 parte del tubo que lo contendrá (1.8/1.5 ml); en conjunto, etanol y muestra, tendrán un volumen final de ¾ partes del tubo, esto para evitar el derrame del etanol. El tejido obtenido se guardará en tubos de 1.8 ml con tapa de rosca y/o empaque plástico, o en tubos Eppendorf de 1.5 ml, con etanol al 96% o etanol absoluto grado molecular (en un volumen de ¾ partes del tubo). El tubo será previamente etiquetado con el identificador único del ejemplar, con ayuda de un rotulador indeleble al agua y alcohol o con lápiz (la etiqueta irá en la parte superior de la tapa y en el costado del tubo). A las muestras preservadas en alcohol se le agregará una 'A' en la etiqueta, por ejemplo, para saber que la muestra está contenida en este líquido. Después de obtener la muestra, los tubos se sellarán con papel Parafilm®. Las muestras se mantendrán a temperatura ambiente, evitando la luz directa. Una vez en laboratorio, se preservarán a una temperatura de entre 4 y -10° C hasta su análisis. La preservación de los tejidos en alcohol permitirá posteriormente hacer análisis genéticos basados en ADN completo.

B) RNA-Later:

Sólo se deben preservar muestras de órganos (hígado, riñón, bazo, páncreas) en este fijador. Este proceso requiere de mayor rapidez en comparación con los antes descritos debido a que el ARN debe ser conservado de inmediato para evitar la degradación. En zonas de alta temperatura y elevada humedad relativa el ARN se degrada aún con mayor rapidez. El tamaño de la muestra no deberá ser mayor a una tercera parte del tubo que lo contendrá (1.8/1.5 ml). En conjunto, RNA-Later y muestra tendrán un volumen final de ¾ partes del tubo, esto para evitar el derrame del líquido; se debe asegurar la inmersión total del tejido para una impregnación eficaz en cada uno de los tubos utilizados. Se deberá usar tubos separados para los tejidos de los diferentes órganos. El tubo será previamente etiquetado con el identificador único del ejemplar, con ayuda de un rotulador indeleble al agua y alcohol o con lápiz (la etiqueta irá en la parte superior de la tapa y en el costado del tubo). A las muestras preservadas en esta solución se le agregara una 'R' en la etiqueta para saber que la muestra está contenida en este líquido. Después de obtener la muestra, los tubos se sellarán con papel Parafilm®. Con esta técnica se debe cuidar a detalle la temperatura de traslado; se sugiere el uso de un tanque con nitrógeno líquido o hielo seco; en caso de que no se cuente con éstos, se puede utilizar hielo, cambiándolo continuamente. Una vez en laboratorio, las muestras se almacenarán a una temperatura constante mínima de -40° C (ultracongelador) hasta su análisis. La preservación de tejidos en RNA-later permite la recuperación de RNA mensajero que puede ser útil para establecer qué genes se encuentran transcribiendo al momento de la recolección.



Grabación de llamados de referencia

Los ejemplares deben ser grabados y liberados la misma noche en la que se capturen y lo más pronto posible después de su procesamiento para reducir al mínimo su fatiga y estrés, y así obtener la mejor grabación posible en vuelo. Los murciélagos podrían ser liberados la tarde siguiente sólo en caso de que no puedan ser grabados en la misma noche de captura (por ejemplo, cuando el animal fue capturado cerca del amanecer o en algún refugio durante el día), siempre y cuando se encuentren en buen estado físico. Una vez que éstos hayan sido grabados y únicamente después de asegurarse que todos los datos necesarios hayan sido tomados, deberán liberarse *in situ*. Se necesitan mínimo dos personas para grabar, una encargada de manipular y preparar al murciélago que se va a grabar, y otra encargada del equipo de grabación.

Con fines de usar los llamados para una biblioteca acústica de referencia, solo se deberán grabar sonidos en “fase de búsqueda”. Estos llamados son los que usan los individuos al navegar en el espacio, ubicar los objetos circundantes y buscar alimento al vuelo, y son los que emite generalmente un individuo al ser liberado. Las grabaciones deben ser supervisadas para que no contengan mucho ruido y los sonidos de interés no estén saturados. Al momento de realizar la grabación del individuo se debe registrar con detalle el entorno del sitio de grabación (e. g. si es un sitio abierto, o un camino o claro con vegetación de dosel en los flancos, si es un borde, etc.) y asegurarse que éste ambiente corresponda a los estratos típicos de vuelo de la especie grabada.

Se recomienda que el detector se configure para realizar grabaciones de espectro completo (*full spectrum*), dando preferencia a las grabaciones en tiempo real 1x (*real time*). De utilizar detectores con expansión de tiempo, es necesario especificar el factor de expansión (5x, 10x, 20x, etc.), y se recomienda dar preferencia a la expansión 10x, ya que es la más ampliamente utilizada. Independientemente del detector utilizado, es importante registrar los ajustes (*settings*) utilizados para la grabación de los individuos, es decir, la tasa de muestreo, el formato (indicando la resolución de la muestra en bits), las características del filtro si es que se usa alguno (se recomienda indicar la frecuencia en kHz), así como la marca y modelo del micrófono utilizado en la grabación.

Consideraciones generales

- Colocar el detector en un ángulo de 45° con el micrófono hacia arriba. Nunca apuntar el micrófono al suelo ni a ninguna zona que genera ecos (ej. cueva, agua).
- No liberar murciélagos cerca de cuerpos de agua, troncos gruesos, zonas pavimentadas, paredes u otras estructuras planas que puedan causar ecos en las grabaciones.
- La persona que libera el murciélago tratará de dirigirlo hacia la persona que graba.
- Se permitirá al murciélago volar libremente sin forzarlo o aventarlo.
- Asegurarse que el individuo se encuentre activo (incluso inquieto), con una temperatura adecuada y con el menor estrés posible (algunas especies, especialmente los vespertiliónidos, entran en torpor con facilidad).
- Reducir la manipulación del murciélago al mínimo.
- Preferentemente grabar al murciélago en un ambiente similar a su hábitat típico de forrajeo (**ver Cuadro 1**).



- Evitar grabar a los murciélagos en momentos en que otros individuos estén volando, ya sea de otras especies o conespecíficos, para eliminar lo más posible la contaminación de la grabación.
- Mantener a los individuos hidratados y evitar exponerlos al sol directo o temperaturas elevadas. En caso de trabajar en ambientes fríos, procurar mantenerlos a su temperatura corporal, protegidos y en un ambiente cálido (por ejemplo entre las ropas). En climas secos puede ser necesario humedecer las membranas alares para evitar que se resequen.
- Si se localizan colonias y/o sitios de percha se pueden grabar individuos al salir del refugio, pero a una distancia de 10-20 metros (dependerá de la especie) para evitar saturación por conespecíficos y rebotes de ecos. En este caso, asegurarse primero de que la colonia sea monoespecífica. Conocer la trayectoria de vuelo de emergencia puede ayudar a grabar a los individuos en algún punto lejos de la salida del refugio, pero cerca del individuo para obtener llamados de calidad.
- Se recomienda tener cuidado con la presencia de posibles depredadores al momento de la liberación.
- No grabar a más de 10 m de distancia del murciélagos ya que hay micrófonos que tienen baja sensibilidad. Lo recomendable es grabar a unos 5 m aproximadamente y un poco más para aquellas especies con llamados de alta intensidad.

Métodos de liberación

Los métodos pueden variar dependiendo de la especie que se trate. Se describen los métodos más comunes a continuación:

- Liberación en mano (*hand-release*): Consiste en grabar al murciélagos al momento de ser liberado de la mano de una persona (a una altura razonable, cuando menos a la altura del pecho c.a. 1.50 m).
- Tirolesa (*zip-line*): Este método consiste en colocar dos postes con una altura entre 2.5-3 m unidos con una cuerda de hilo elástico de 5 m aproximadamente. Sobre la cuerda se coloca un anillo deslizable, de preferencia de plástico, al cual se amarra un hilo elástico de 3 a 5 m que, en el otro extremo, sujet a al murciélagos. Se sugiere atar al murciélagos del cuello, de manera que realice un vuelo libre, pero que no le permita liberarse ni lastimarse. El murciélagos se libera de la mano y debe volar por arriba o por los costados de la tirolesa, pero sin poder escapar.
- Jaula de vuelo (*flying cage*): Consiste en liberar al murciélagos dentro de un encierro suficientemente grande, que permita al individuo un vuelo lo más natural posible. Se sugieren encierros hechos de malla plástica con dimensiones aproximadas de 8 m largo x 4 m ancho x 3 m de alto.
- Liberación a gran altura: Una persona puede colocarse en una posición elevada respecto al nivel del suelo (por ejemplo, en un edificio) y liberar al murciélagos en mano o con ayuda de una tirolesa. Una variante de este método es colocar al murciélagos sobre una superficie elevada (edificio, pared rocosa o árbol alto y poco ramificado), y permitir que él mismo escale para tomar altura y volar.

El método de liberación específico dependerá de las características de cada especie.



El Cuadro 1 muestra recomendaciones de grabación para especies o grupos específicos.

Cuadro 1. Métodos de liberación propuestos por grupo de murciélagos.
Los gremios acústicos fueron definidos siguiendo a Denzinger y Schnitzler (2013).

GRUPO/GREMIO	MODO DE GRABACIÓN	ALTURA DE LIBERACIÓN	DISTANCIA AL DETECTOR	AMBIENTE DE LIBERACIÓN
Forrajeadores aéreos de espacios abiertos (e.g. algunas especies de vespertiliónidos como <i>Lasiurus</i> , <i>Myotis</i> de tamaño grande, algunos embalonúridos como <i>Diclidurus albus</i> ; especies como <i>Thyroptera tricolor</i>)	Tirolesa o liberación en mano	2 m	5 m	Abierto
Forrajeadores aéreos de espacios abiertos con llamados de muy alta intensidad (e.g. molósidos)	Tirolesa o liberación a gran altura	> 10 m	> 10 m	Abierto
Forrajeadores aéreos de borde (e.g. embalonúridos como <i>Saccopteryx</i> , <i>Balantiopteryx</i> ; <i>Myotis</i> de pequeño tamaño y otros vespertiliónidos como <i>Eptesicus</i> y <i>Rhogeessa</i>)	Tirolesa o liberación en mano	2 m	5 m	Borde
Forrajeadores de arrastre de borde (e.g. especies que forrajean sobre cuerpos de agua como <i>Myotis yumanensis</i> , <i>Myotis albescens</i> , <i>Noctilio</i>)	Tirolesa o liberación en mano	2 m	5 m	Borde
Forrajeadores detectores de aleteo de espacios cerrados; especies con compensación al efecto de Doppler (e.g. hiposidéridos, rinolófidos, especies dentro del complejo <i>Pteronotus</i>)	Tirolesa o liberación en mano	2 m	5 m	Cerrado
Forrajeadores de sustrato (e.g. filostómidos, natálidos y algunos vespertiliónidos como <i>Antrozous</i> , <i>Corynorhinus</i>)	Tirolesa o jaula de vuelo	N/A	< 1 m	Cerrado

Manejo y etiquetado de los datos

La cantidad de datos, muestras y archivos generados en un proyecto de esta envergadura requiere de un sistema de etiquetado claro, sistematizado e informativo. Este aspecto es crucial para el adecuado manejo y organización de la información resultante y debe ser definido desde un principio por el grupo de especialistas (preferentemente, en el taller de estandarización de técnicas y elaboración del protocolo de trabajo).

Los códigos usados para identificar a cada individuo deberán contener, cuando menos, información geográfica del punto de captura (por ejemplo, región, sitio y localidad). En el caso de las muestras y archivos obtenidos de cada individuo, los códigos deberán contener, además, números o letras que indiquen el tipo de información asociada (llamado de ecolocalización, fotografía, tejido alar, voucher para colección científica, etc.).

Es recomendable establecer desde el principio un sistema jerárquico de organización y almacenamiento de la información digital que se genere durante el proyecto. Por ejemplo, las carpetas podrían ser organizadas de acuerdo con escalas geográficas (por ejemplo, carpetas de región contenido subcarpetas de sitios), y posteriormente por individuo y tipo de dato.



El caso del proyecto SONOZOTZ:

Biblioteca acústica de los murciélagos de México

Origen, planeación y organización del proyecto

El proyecto Sonozotz, “Compilación de fonoteca de referencia de los murciélagos insectívoros de México, Fase 1”, surgió como una necesidad de numerosos investigadores que trabajaban con acústica de murciélagos por contar con una biblioteca nacional de referencia de llamados de murciélagos, donde se pudiera representar su variabilidad, así como por compartir las grabaciones previamente generadas. Es en el marco de los congresos nacionales de mastozoología organizados por la Asociación Mexicana de Mastozoología A.C. (AMMAC), donde un grupo nutrido de investigadores decidió organizarse para elaborar la propuesta del proyecto. La mesa directiva de la AMMAC sostuvo reuniones con autoridades de la Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad (CONABIO), dependencia gubernamental mexicana encargada de promover y apoyar actividades dirigidas al conocimiento de la diversidad biológica, la cual decidió respaldar la propuesta de realizar la biblioteca acústica de los murciélagos insectívoros mexicanos. Se realizaron diversas reuniones para integrar el equipo de investigadores y se decidió que fuera el Dr. Miguel Ángel Briones Salas, entonces presidente de la AMMAC, el coordinador general del proyecto.

El proyecto contó además con un coordinador administrativo, dos coordinadores técnicos y un técnico de apoyo al proyecto. Se propuso una división del país en ocho regiones más o menos naturales y relativamente seguras que pudieran contener faunas diferenciadas y que fueran logísticamente manejables: región Californiana (Baja California, Baja California Sur y Sonora), región Noroeste (Durango, Sinaloa y Chihuahua), región Occidente (Colima, Nayarit y Jalisco), región Oriente (Puebla, Tlaxcala y Veracruz), región Centronorte (Guanajuato, Aguascalientes, Zacatecas y San Luis Potosí), región Centrosur (CDMX, Estado de México, Morelos, Hidalgo y Querétaro), región Sureste (Campeche, Quintana Roo y Yucatán) y región Suroeste (Chiapas, Oaxaca y Tabasco). Cada una de las regiones contó con un coordinador, quien, con apoyo de otros colegas de su región, definió los sitios a muestrear en cada una de ellas. Una vez aceptada la propuesta por parte del financiador, se elaboró el convenio de trabajo y se procedió a la adquisición de redes de niebla de monofilamento y los detectores ultrasónicos, así como las licencias de software para el análisis de los llamados. Se realizó un taller de estandarización, en donde se definió el protocolo de muestreo, se puso en práctica y se realizaron los ajustes necesarios al mismo en un taller inicial de estandarización. Posteriormente se realizaron tres talleres regionales en el sur, centro y norte del país para entrenar a más participantes de todas las regiones de México.

Colecta de datos y grabación de llamados

El diseño de muestreo utilizado para el proyecto Sonozotz, así como los métodos de colecta de datos y grabación de llamados de ecolocalización, están descritos con detalle en Zamora-Gutierrez et al. (2020). En la **Figura 5** se muestra de manera esquemática y simplificada la secuencia de actividades que cada equipo realizó en campo.

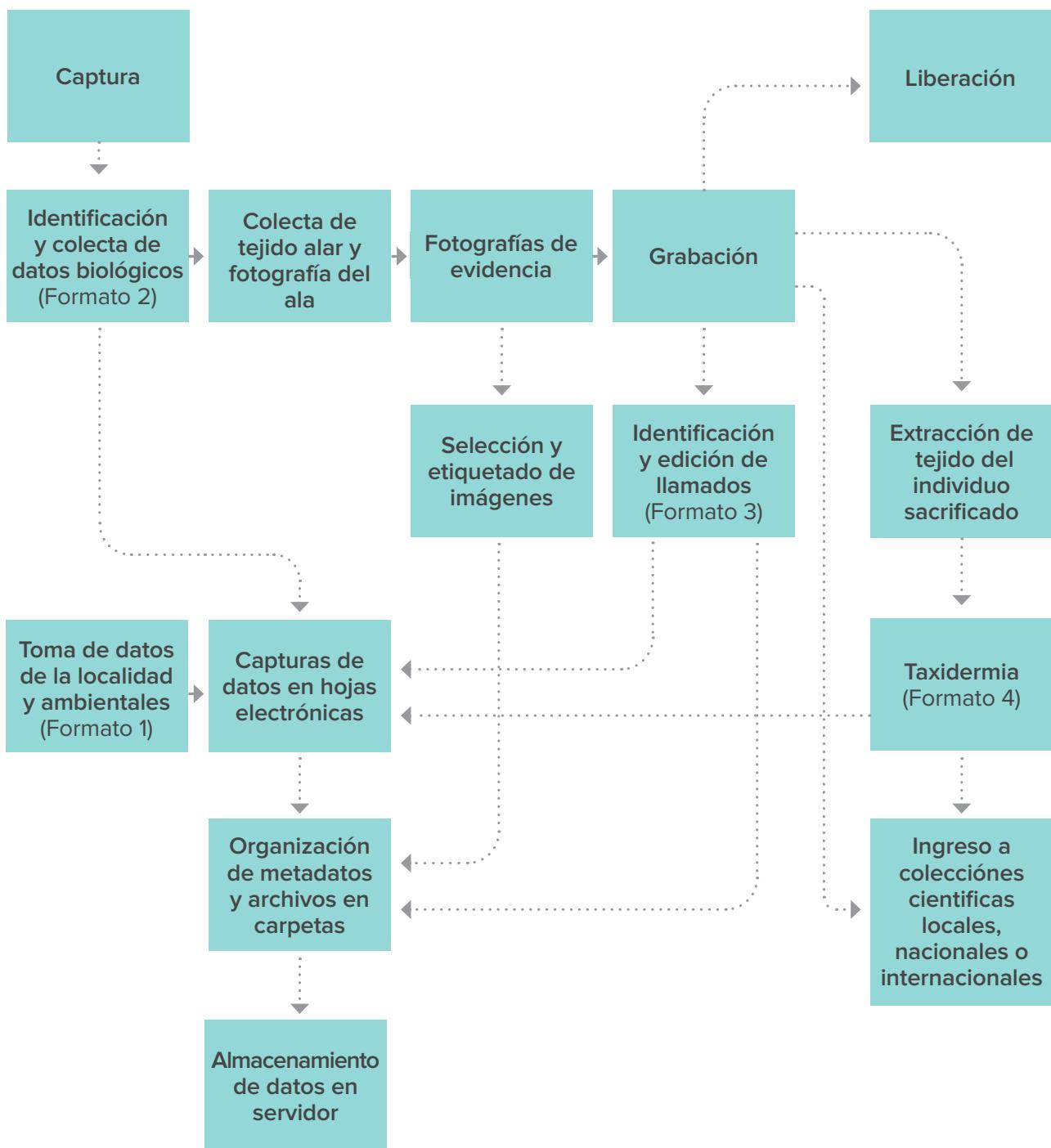


Figura 5. Diagrama de flujo que describe la secuencia de actividades realizadas por cada grupo de trabajo para el proyecto Sonozotz, desde la colecta de datos y obtención de grabaciones en campo hasta el procesamiento de la información resultante.

Manejo y etiquetado de datos

La **Figura 6** muestra todos los datos e identificadores que estuvieron asociados a cada murciélagos capturado y procesado. Se generaron dos identificadores únicos por localidad e individuo capturado, de los cuales derivan todos los demás datos:

- ID de la localidad: El punto geográfico se identificó con el número de la región, sitio y localidad específica. Por ejemplo, si en la región 2, del sitio 12 se muestraron 5 localidades, sus ID de localidad fueron: 021201, 021202, 021203, 021204 y 021205. Asimismo, el ID de la primera localidad del sitio 13 de esa misma región sería 021301. La longitud del identificador de localidad siempre fue igual (i.e. 6 dígitos: dos dígitos para la región, dos dígitos para el sitio y dos dígitos para la localidad).
- ID del ejemplar: Cada individuo capturado fue identificado con la clave de la localidad, un guion y un número consecutivo (por región) de cuatro dígitos, de 0001 a n, de modo tal que el primer ejemplar capturado en cada región era el 0001 y el último, al término del proyecto, era el n. Por ejemplo, el primer ejemplar de la localidad 020101 (primera localidad del primer sitio de la región 2) fue 020101-0001. Debido a que el número de ejemplar era consecutivo por región, sólo podía haber un 0001 por región. Para evitar confusiones entre equipos de trabajo de la misma región, el coordinador de región llevaba el control del número de inicio en cada una de las salidas. Cuando había colectas simultáneas se asignaban con antelación números consecutivos correspondientes a los diferentes grupos de trabajo.

Esta estrategia de etiquetado permitió utilizar identificadores únicos en todos los datos y evitó duplicidades, además de asociar de manera rápida cada dato a regiones geográficas específicas.

ETIQUETADO DE MUESTRAS

Ejemplo: Localidad de colecta 021201

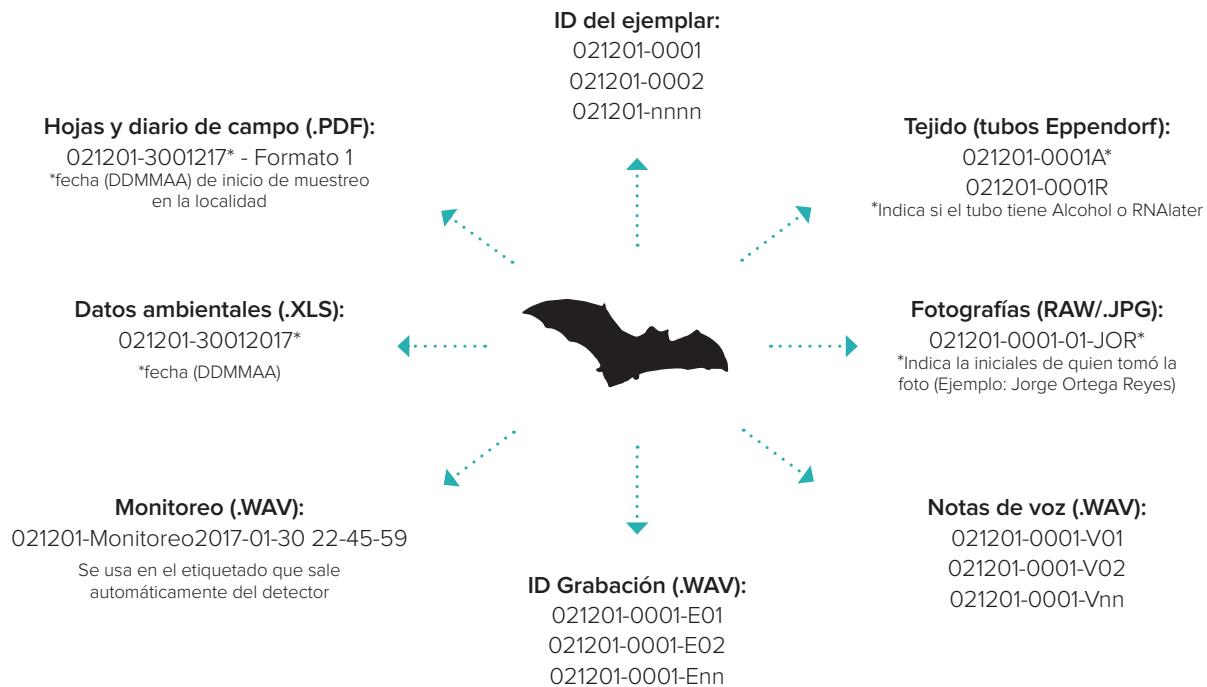


Figura 6. Ejemplo del esquema de etiquetado de datos utilizado en el proyecto Sonozotz. Los datos corresponderían a las muestras, tejidos, fotografías y grabaciones de individuos capturados en la localidad 01, del sitio 12, de la región 02.

Recomendaciones finales

 32
-ES-

Cuidados de seguridad ante SARS-CoV-2

La pandemia ocasionada por el virus SARS-CoV-2 que dio inicio a finales del 2019, ha provocado un replanteamiento y reestructuración de varios elementos en la investigación. Entre ellos está la manipulación de vida silvestre, en especial de los murciélagos por ser reservorios naturales de una gran cantidad de virus, muchos de ellos con potencial zoonótico. Desde antes de esta pandemia, ya se hacían recomendaciones de higiene y seguridad para el manejo de estos mamíferos. Sin embargo, ahora es imperativo que se sigan al pie de la letra para prevenir peores brotes de enfermedades en un futuro, tanto para humanos como para las especies de fauna silvestre, que pueden llegar ser igualmente desastrosos.

Por ello, en este manual incluimos los lineamientos más recientes emitidos por la Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza (IUCN, por sus siglas en inglés) para el manejo seguro de los murciélagos en vida silvestre. Exhortamos a todos los lectores de este documento a leer los lineamientos que presentamos en el esquema de la **Figura 7** y visitar la página web que ahí mismo se cita para enterarse de más recomendaciones.



Figura 7. Recomendaciones de seguridad de la IUCN (Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza, por sus siglas en inglés) para la manipulación de murciélagos ante la contingencia causada por SARS-CoV-2. Licencia de uso CC BY-NC-ND 4.0.

Muestreo acústico pasivo

Considerando el esfuerzo logístico y económico que implica la realización de una biblioteca acústica nacional o regional, es recomendable, en la medida de las posibilidades, llevar a cabo un muestreo pasivo en cada una de las localidades de trabajo. Si este muestreo se realiza de forma sistemática entre todos los participantes, puede obtenerse información adicional, tal como la riqueza de especies registradas acústicamente, el índice de actividad de los murciélagos insectívoros, uso de la localidad como área de forrajeo, entre otras. En el proyecto Sonozotz, se decidió que en cada localidad se grabara durante 15 minutos para tener un registro de la comunidad de murciélagos presente. Para este fin se activó el detector para que comenzara a grabar 15 minutos después de la puesta del sol según indicaba el GPS en cada localidad. Se grabó continuamente durante 5 minutos. Cincuenta y cinco minutos después se grabaron otros 5 minutos, repitiendo una vez más para completar 3 períodos de 5 minutos grabados con intervalos de 1 hora entre ellos. Este monitoreo se etiquetó con el ID de la localidad seguido de la palabra ‘Monitoreo’ y la fecha y hora preestablecida en los ajustes del detector (e. g. 080116-Monitoreo2016-06-10 22-45-59).

Almacenamiento de la información

La construcción de una biblioteca acústica implica la generación de gran cantidad de datos, debido a que los archivos de audio y las fotografías con calidad son archivos con mucha información, en término de bytes. Por lo tanto, los participantes deben decidir antes de iniciar el trabajo de campo, sobre el mecanismo a utilizar para compartir y almacenar la información generada.

ID	041602-0214
Reino	Animalia
Autoridad Reino	Margulis & Chapman, 2009
Phylum	Chordata
Autoridad Phylum	Bateson, 1885
Clase	Mammalia
Autoridad Clase	Wilson & Reeder, 2005
Orden	Chiroptera
Autoridad Orden	Wilson & Reeder, 2005
Familia	Mormoopidae
Autoridad Familia	Wilson & Reeder, 2005
Genero	Pteronotus
Autoridad Genero	Ramirez-Pulido, González-Ruiz, Gardner & Arroyo-Cabral, 2014
Especie	Pteronotus parnellii
Autoridad Especie	Ramirez-Pulido, González-Ruiz, Gardner & Arroyo-Cabral, 2014
Categoría infraspecifica	
Infraspecifica	
Autoridad Infraspecifica	
Categoría subinfraspecifica	
Subinfraspecifica	
Autoridad Subinfraspecifica	
Sexo	Macho
Estado reproductivo	Tacticas reproductivas

Figura 8. Plataforma generada para el almacenamiento y organización de la información del proyecto Sonozotz.



Se recomienda que solo los coordinadores (general, regional y el técnico) tengan acceso al repositorio utilizado, esto para evitar pérdidas de información. En el caso del proyecto Sonozotz, la información generada en cada región fue compartida al curador (técnico del proyecto) a través de una plataforma generada desde la CONABIO, la cual estaba organizada por regiones y a partir de una organización jerárquica. Un sitio se asociaba a los individuos capturados y formatos de campo, mientras que los individuos se asociaban a las grabaciones acústicas, fotografías, tejidos y vouchers (**Fig. 8**). Cada responsable regional era el encargado de compartir la información generada en su región de estudio.

Curación final de la información

Una vez generada y compartida la información derivada de los muestreos de campo, es importante que el técnico del proyecto revise y cure la información. Cada archivo de grabación debe revisarse con cuidado para asegurarse que éste tenga la calidad suficiente, es decir, que los llamados no sean muy débiles y con ruido que impidan una correcta visualización. Si las grabaciones de la especie objetivo se encuentran entremezcladas con otras especies que estuvieran volando en el momento de la liberación, éstas deben de limpiarse, para que el archivo sólo contenga los llamados de la especie objetivo.

En ocasiones, algunas especies pueden emitir llamados sociales o pulsos propios de sitios con obstáculos (**Fig. 2**), por lo que debe asegurarse exclusivamente el uso de los llamados en fase de búsqueda.

BIBLIOGRAFÍA RECOMENDADA

Adams AM, Jantzen MK, Hamilton RM et al. (2012) Do you hear what I hear? Implications of detector selection for acoustic monitoring of bats. *Methods Ecol Evol* 3:992-998.

Armitage DW, Ober HK (2010) A comparison of supervised learning techniques in the classification of bat echolocation calls. *Ecol Inform* 5(6):465-473.

Biscardi SJ, Orprecio MB, Fenton MB et al. (2004) Data, sample sizes and statistics affect the recognition of species of bats by their echolocation calls. *Acta Chiropterol* 6(2):347-363.

Cadotte MW, Carscadden K, Mirochnick N (2011) Beyond species: functional diversity and the maintenance of ecological processes and service. *J Appl Ecol* 48(5):1079-1087.

Denzinger A, Dchnitzler HU (2013) Bat guilds, a concept to classify the highly diverse foraging and echolocation behaviors of microchiropteran bats. *Front. Physiol.* 4(164):1-14.

Greif S, Yovel Y (2019) Using on-board sound recordings to infer behaviour of free-moving wild animals. *J Exp Biol* 222:jeb184689.

Grinell AD, Gould E, Fenton MB (2016) A history of the study of echolocation. In Fenton MB, Grinell AD, Popper AN et al (eds) *Bat bioacoustics*. ASA Press, Springer, New York, p 1-24.

Hill AP, Prince P, Snaddon JL, et al. (2019) AudioMoth: A low-cost acoustic device for monitoring biodiversity and the environment. *Hardware X* 6:e00073.

Jennings N, Parsons S, Pocock MJO (2008) Human vs. machine: identification of bat species from their echolocation calls by humans and by artificial neural networks. *J Zool* 86:371-377.

Jones G, Jacobs DS, Kunz TH et al. (2009) Carpe noctem: the importance of bats as bioindicators. *Endangered Species Res* 8(23):93-115.

Jones KE, Russ J, Bashta A-T et al. (2013) Indicator Bats Program: a system for the global acoustic monitoring of bats. In Collen B, Pettorelli N, Durant S et al (eds) *Biodiversity monitoring and conservation: bridging the gaps between global commitment and local action*. Wiley Blackwell, London.

Lemen C, Freeman PW, White JA, Andersen BR (2015) The problem of low agreement among automated identification programs for acoustical surveys of bats. *West N Am Nat* 75:218–225.

Loeb SC, Rodhouse TJ, Ellison LE et al. (2015) A plan for the North American bat monitoring program (NABat). United States Department of Agriculture, Asheville.

Mac Aodha O, Gibb R, Barlow K et al. (2018) Bat detective-deep learning tools for bat acoustic signal detection. *PLoS Comput Biol* 14(3):e1005995.



MacSwiney G MC, Clarke FM, Racey PA (2008)

What you see is not what you get: the role of ultrasonic detectors in increasing inventory completeness in Neotropical bat assemblages.

J Appl Ecol 45(5):1364-1371.

Parsons S, Szewczak JM (2009)

Detecting, recording, and analyzing the vocalizations of bats. In Kunz TH, Parsons S (eds) Ecological and behavioral methods for the study of bats, 2nd edn. The Johns Hopkins University Press, Baltimore, p 91-111.

Penone C, Kerbiriou C, Julien J-F et al. (2018)

Body size information in large-scale acoustic bat databases.

PeerJ:peerj.5370.

Pettersson L (2002)

The properties of sound and bat detectors. In Brigham RM, Kalko EKV, Jones G, Parsons S, Limpens HJGA (eds) Bat echolocation research tools, techniques and analyses.

Bat Conservation International, p 9-12.

Reicher BE, Bayless M, Cheng T et al. (2021)

NABat: A top-down, bottom-up solution to collaborative continental-scale monitoring. AMBIO A Journal of Human Environment 50(4):901-913.

Russo D, Voigt CC (2016)

The use of automated identification of bat echolocation calls in acoustic monitoring: A cautionary note for a sound analysis.

Ecol Indic 66:598-602.

Skowronski MD, Fenton MB (2009)

Quantifying bat call detection performance of humans and machines.

J Acoust Soc Am 125:513-521.

Skowronski MD, Harris JG (2006)

Acoustic detection and classification of microchiroptera using machine learning: lessons learned from automatic speech recognition.

J Acoust Soc Am 119:1827-1833.

Voigt CC, Kingston T (2016)

Bats in the Anthropocene. In Voigt CC, Kingston T (eds) Bats in the Anthropocene: conservation of bats in a changing world.

SpringerOpen, New York, p 1-9.

Walters CL, Freeman R, Dietz C et al. (2012)

A continental-scale tool for acoustic identification of European bats.

J Appl Ecol 49:1064-1074.

Walters CL, Collen A, Lucas T et al. (2013)

Challenges of using bioacoustics to globally monitor bats. In Adams RA, Pedersen SC (eds) Bat evolution, ecology and conservation. Springer, New York, p 479-499.

Zamora-Gutierrez V, Lopez-Gonzalez C, MacSwiney G MC et al. (2016)

Acoustic identification of Mexican bats based on taxonomic and ecological constraints on call design. Methods Ecol Evol 7:1082-1091.

Zamora-Gutierrez V, Ortega J, Avila-Flores R et al. (2020)

The Sonozotz Project: Assembling an echolocation call library for bats in a megadiverse country. Ecol Evol 10:4928-4943.

Construction of a large-scale acoustic reference library of bats



English Version



PREFACE

The production of a specialized manual requires precise guidelines that enable the reader to put the instructions defined in the text into practice. The information contained in a manual must be detailed so that it is as explicit and understandable as possible for the user, as well as using clear terminology in order to have a broad reach among readers of different academic levels and areas of knowledge. The structure of the manual should involve different levels, from simple procedures to categories of some complexity, but must be consistently understandable. Compliance with these characteristics gives a specialized manual a wide spectrum of reach and enables it to succinctly serve as a practical reference for the users.

The creation of a library of bat sounds is a titanic task for megadiverse countries such as Mexico, given the complexity of their territories in terms of area, orography and diversity of ecosystems, which acts to influence the final composition of the species. The present manual is based on a series of field procedures that were defined, standardized and implemented by a group of researchers in order to record the echolocation calls of the bats of Mexico. However, the generalities of this text can be applied in other countries with similar ecological characteristics.

The understanding of echolocation calls began in the 1950s, when the technology capable of recording the ultrasonic sounds produced by the bats was developed. With the development of highly sensitive bat detectors, it was possible to refine the recording of these echolocation calls to the point of obtaining particular signatures for most of the species, which has allowed the identification and discrimination of these animals without the need for capture. Ultrasonic detectors have now become a popular and complementary tool with which to characterize the chiropterofauna of a region; however, their use has limitations in terms of applicability, as a result of the great intra and interspecific variability that exists in echolocation calls and sensitivity of the microphones that is dependent on the environmental conditions and complexity of the habitat being sampled. Equally, population censuses cannot be conducted because of the lack of discrimination among the calls produced by each individual.

To date, various bat echolocation call libraries have been published for regions or countries with relatively low habitat complexity. However, it is a considerable challenge to create an adequate compilation of bat ultrasounds in ecologically complex countries, under standardized



methodologies, that can achieve an adequate geographic, territorial and taxonomic representativity of the chiroptero fauna at national level.

Our study begins by establishing a project at national level called Sonozotz-AMMAC-CONABIO (hereafter referred to as Sonozotz), funded by the Mexican National Commission for the Knowledge and Use of Biodiversity (CONABIO, by its Spanish acronym), with the Asociación Mexicana de Mastozoología A.C. (AMMAC) serving as the leading institution. The name Sonozotz was created using the terms “Sono”, alluding to the echolocation sounds emitted by the bats, and “Zotz”, which means bat in the Maya language.

The process of producing a large-scale library of echolocation calls involves different stages, most of which include various working groups. As a first step, it is recommended to bring together a group of experts in the field of acoustic detection in order to share experiences about the techniques that adapt best to the particular circumstances, context and objectives of the project. This step is important since there is a need to establish a detailed protocol to ensure the suitable and systemized collection of data. Likewise, decisions must be made in terms of the detector or

detectors with which the recordings will be made, as well as their programming, techniques of bat capture, species identification, recording strategy of the ultrasonic calls for each captured specimen, collection of physical data of the animal, and any additional data that could complement the field effort.

Production of a detailed protocol for collecting data is important since each researcher or participant must be capable of precisely replicating this methodology. Likewise, the implementation of training workshops is recommended in order to follow the protocol directed at different working groups. Depending on the magnitude of the project, regionalization of the study area is recommended in order to concentrate the efforts of each group in a particular zone, making the work and use of available resources more efficient. The present manual presents the methodological consensus generated by a group of experts for a megadiverse country, but this can be particularized to smaller scales.



Introduction

Application of bat acoustics

The study of bat acoustics requires the use of specialized equipment capable of recording at very high speeds and frequencies. Great technological advances have been made in recent years that have allowed the development of this tool, making it accessible to a greater number of people interested in the acoustic study of bats. The more generalized use of ultrasonic detectors has enabled progress in bat acoustics from simple detection of activity and acoustic identification of species, to experimental research.

Likewise, the advances achieved in data management and automatization in the analysis of acoustic information have allowed the establishment of monitoring programs based on citizen science at large spatio-temporal scales. One of the largest acoustic monitoring programs is *iBats* (<http://www.ibats.co.uk>). This program is based on the work of volunteers that cover a certain number of transects in vehicles throughout Europe and other parts of the world, following a pre-established recording protocol. *iBats* has generated an incredible quantity of information over almost a decade that will allow detailed analyses of the spatial and temporal patterns of the bat communities in the monitored zones. This information can be analyzed from countless different angles, from relating the patterns of activity of species to environmental changes to generating detailed data regarding the occupation of species associated with specific factors in the habitats, both natural and anthropized. Another program, the *North American Bat Monitoring Program* (NABat), was created to monitor bats throughout North America thanks to the contribution of volunteers, naturalists, researchers and people associated with different environmental agencies, including Non-Governmental Organizations (NGOs).



Photo:
Zuemy Vallado



Although acoustic identification of species is a theme that has been explored since almost the beginnings of bat acoustic research, it remains a popular, useful and necessary field of study even today. In particularly diverse countries, acoustic exploration has led to the discovery of potentially new species of bats. A combination of molecular and acoustic techniques has allowed the establishment of complexes of cryptic species that were previously considered single taxonomic entities. Likewise, acoustic techniques have allowed the establishment of differences in echolocation calls in different regions of the area of distribution of the species, for which reason, the results raise the possibility of being able to separate species that were previously thought to form part of the same taxonomic complex. For example, bats of the family Emballonuridae are difficult to study with traditional capture nets, since they are rarely caught in these traps (unless they are set in a refuge). The possibility of installing acoustic detectors in remote zones for long periods of time has allowed the exploration of acoustic communities, revealing the existence of possible new species, which could have otherwise passed unnoticed.

Traditionally, the microchiropterans have been classified into two large groups based on the intensity of their calls: “echolocating” and “whispering” bats (belonging to the guild of the substrate foragers). Although all of the microchiropterans produce echolocation calls, this classification intends to emphasize the notion that certain bat species emit echolocation calls with very little energy (at approximately 70 dB SPL measured at 10 cm from the mouth). However, with the arrival of more accessible technology, together with increasingly sensitive microphones, this classification has begun to be obsolete since it has been demonstrated that some species of “whispering” bats can emit calls of very high energy.

These discoveries challenge the paradigm that substrate foraging bats are not good candidates for acoustic research or monitoring. There are an increasing number of studies focused on exploring the acoustic potential of these species that have, until now, been little studied acoustically. Although the calls of substrate foragers are very similar among species, they are easily distinguishable among groups defined by ecological and taxonomic attributes, which gives them good potential for acoustic study at the level of functional or guild diversity. For this reason, there are an increasing number of studies that include the calls of species of a wide variety of guilds in order to allow the continuation of acoustic exploration and to make further discoveries with advances in the mathematical techniques of analysis of ultrasonic sounds.

Despite the considerable progress achieved in bat acoustics, identification to species level in some groups has remained a challenge. For this reason, researchers have begun to explore other options of acoustic identification that include taxonomic levels higher than species (e.g. genus, family), ecological levels (e.g. trophic guilds) and even evolutionary units. The ecological information contained in bat echolocation calls reflects the functional diversity of the communities in question and can generate important information regarding the ecological processes and the ecosystem services present in a given area. Identification of calls based on ecological criteria can be used to perform a rapid and effective characterization of the bat trophic assemblages, to generate ecological associations with environmental characteristics and even to track changes in the structure of communities. These levels of organization have been shown to be precise and could even reduce the cost of monitoring bat communities in highly biodiverse regions.



Likewise, acoustic studies and monitoring have allowed us to understand the effects of anthropogenic activities on bat activity and diversity. Using these data, we have furthered our understanding of important threats to this taxon at global level. For example, acoustic methods have been a novel and indispensable tool that has permitted the discovery of previously ignored patterns and effects of wind farms. In these installations, the traditional use of mist nets to evaluate the level of collision risk does not produce reliable data, since bats in these open zones fly at high altitudes and are imperceptible by mist netting. When acoustic studies began, the true damage and risk represented by wind farms for the bats was understood. Knowledge regarding how human activities affect the biodiversity is a crucial requirement for the development and application of effective conservation programs. Bats are important indicators of the trends in biodiversity and acoustic study is a feasible and efficient method that offers the opportunity to monitor bat communities consistently over time from regional to global scale.

Documentation of bat echolocation calls

The use of acoustic methods has advanced at a much more accelerated pace than the detailed and standardized description of the echolocation calls of the study species. The efforts that have been made to document the wide variety of bat echolocation calls have mostly been isolated and individual, and have involved the compilation of reference calls in order to address specific research questions. Moreover, the acoustic material compiled has not been of open access. This translates into a limited acoustic representation of species and geographic regions. Taking into account the wide variation that exists in calls, even within the same species, this scarcity or lack of accessibility to reference material has impeded the implementation of acoustic studies of entire bat communities or of extensive geographic regions.

In the year 2012, the first global library of bat echolocation calls was created, known as *Echobank*. This is an invaluable resource that contains a total of 53,488 calls of 297 species. However, the greatest representativity in this library is of the species of Europe and temperate zones, which leaves a great gap in the information for tropical zones, in which the composition, diversity and complexity of the communities are greater. Moreover, this is not a library of free and shared access and its material comes from many sources and non-standardized methodologies. It was not until 2016 that Sonozotz arose as the first great effort at national level to create a reference library of bat calls (including tropical species) that contains material compiled in a standardized manner (Zamora-Gutiérrez et al. 2020). To date, Sonozotz hosts the calls of 1,664 individuals of seven families and 69 species of Mexican bats and there are plans to expand this resource. Another characteristic that makes this repository different is that the material held will be of totally free access via the portal of the Mexican governmental agency the National Commission for the Knowledge and Use of Biodiversity (CONABIO, by its Spanish acronym).



The importance of these acoustic repositories is considerable, since they represent the first step in addressing some of the major challenges in the acoustic identification of bats:

1. Similarity of calls:

Bat echolocation evolved for sensorial objectives rather than for communication, for which reason the calls are not designed to confer a specific identity to the species. Echolocation allows species to efficiently exploit the medium they inhabit, for which reason the species that share the same habitat and exploit the same resources often present very similar characteristics of echolocation. This makes the species of some groups almost impossible to separate acoustically (e.g. *Myotis* sp., substrate foragers) (**Fig. 1**).

Although the availability of suitable reference material does not necessarily resolve this problem, it is the key to discover better ways to classify the calls of bats of certain groups, since there are different taxonomic and ecological levels in which the species can be grouped and be effectively identified. Likewise, by simply having material with good representativity, we can assign confidence levels to the acoustic identifications, or even define which species truly have no potential for acoustic identification at species level.

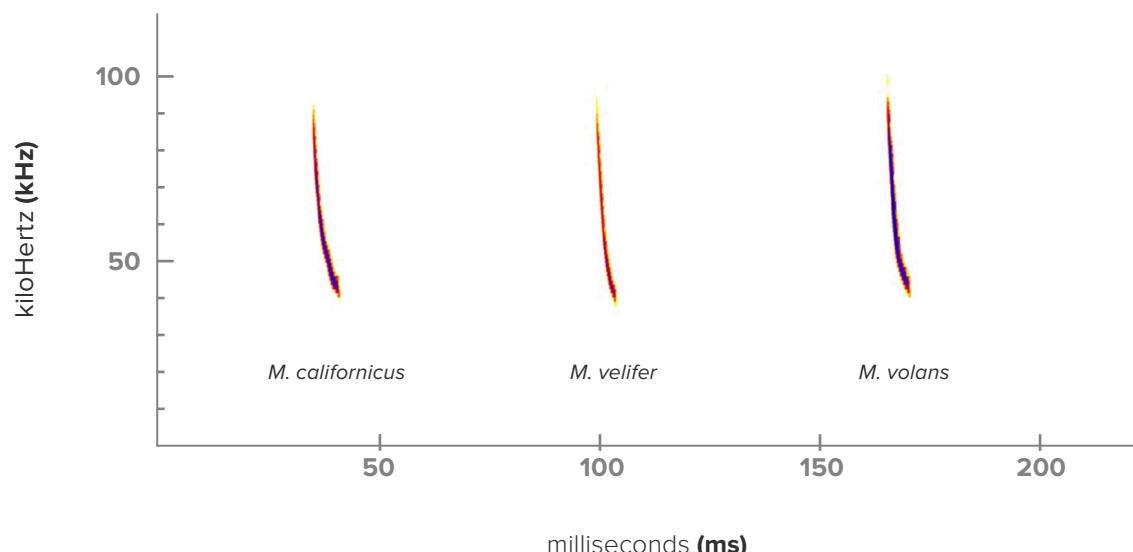


Figure 1. Comparison of the echolocation calls of three species of *Myotis*.
Source: Sonozotz.

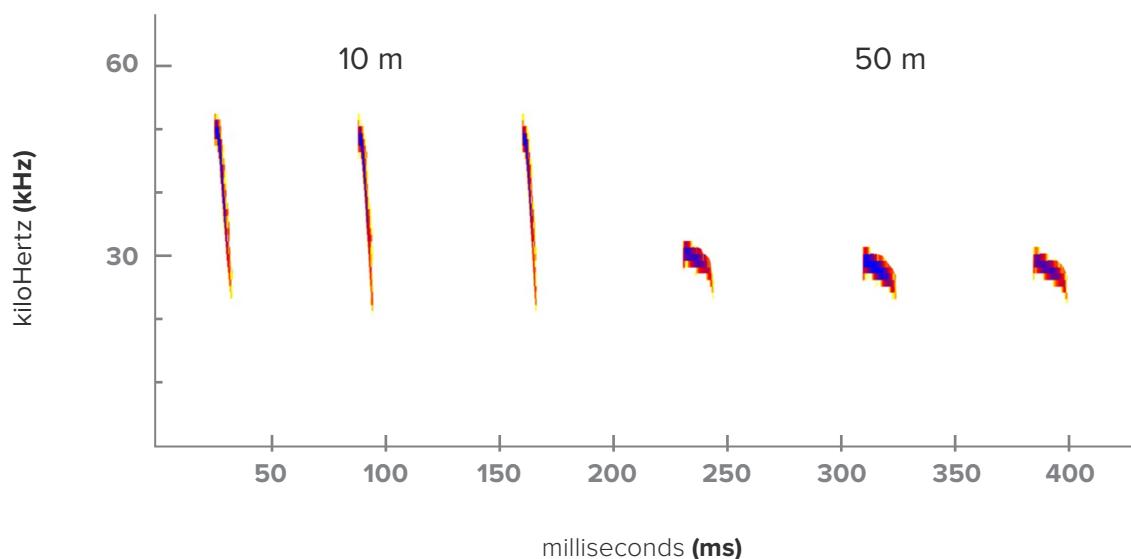
**Figure 1.** Comparison of the echolocation calls of three species of *Myotis*.

Source: Sonozotz.

2. Plasticity and variation of calls:

Bats often have acoustic signatures that distinguish among species or groups, but there are also characteristics of the calls that are flexible and the bats can adapt these according to their sensorial needs (**Fig. 2**). This makes the calls of totally different guilds sometimes seem very similar if the individuals are flying or foraging (eating) under similar environmental conditions. To achieve the correct identification of these species, it is necessary to have adequate knowledge of their ecology and echolocation behavior in order to discern the call types they can produce under given circumstances.

Likewise, it is very useful to have adequate documentation of their calls under different environmental conditions (but natural for the species): flying in open or closed spaces, foraging close to or over water bodies, etc. It is even necessary to have a reference for the calls of the same species throughout its geographic distribution, since it has been found that some species present local or regional “dialects”. It is also necessary to have calls from individuals of different sexes and ages since these can present slight differences. It is here where an acoustic reference library, extensive in both species and in environmental and geographic representativity, becomes indispensable to our understanding of the wide variations of echolocation behavior

**Figure 2.**

Echolocation calls of the same individual of the species *Molossus nigricans* recorded at 10 (close to obstacles) and at 50 (far from obstacles) meters from the point of release, during the same flight sequence. Source: Sonozotz



of the species and thus to arrive at a correct acoustic identification.

3. Methodologies for the acoustic classification of species:

Traditionally, acoustic identification of bat species has been conducted following three main steps: First, certain parameters of the pulses are extracted (e.g. maximum frequency, minimum frequency, call duration), whether manually by measurement with visualization software, or using more specialized software that extracts these parameters in a semi-automatized manner. Secondly, the parameters are compared with other parameters published in the literature and their assignation to certain species or morpho-calls is at the discretion of the person conducting the analysis. Thirdly, these parameters are analyzed with multivariate statistics, such as discriminant function analysis, in order to assign a degree of accuracy of identification to these pre-assignations of species. This method is still in use because it is easy to understand and follow, but it has been demonstrated to have serious statistical limitations in terms of assigning very similar calls at species level. Recently, the family of machine learning algorithms has been recognized as a tool that should be popularized in order to classify bats acoustically. With these algorithms, it is even possible to conduct an analysis of the complete acoustic signal without having to perform the extraction of parameters. However, this family of algorithms must be trained with many data in order to be precise and efficient, which has limited their use to date. The recent popularization and creation of acoustic reference libraries will open the way to application of more advanced techniques of mathematical analysis in order to detect subtle differences between very similar calls, and these techniques could be key to distinguishing among acoustically very similar species.

Objective of this manual

This manual is based on the sampling protocol generated during the Sonozotz project. Its principal objective is to direct people or working groups that wish to generate reference material for the acoustic identification (or classification) of the bat species of a region or country. The following sections describe each of the stages considered necessary to create a robust, informative and systemized database, but they must be adapted to the conditions and contexts of each working group. The recommendations include the collection of some additional data that are not strictly necessary to construct the library of sounds, but which offer the opportunity to conduct complementary genetic, ecological or ecomorphological analyses.

We hope that this document serves as a reference for the creation of acoustic libraries across the world, especially in countries with wide environmental, ecosystem, environmental, taxonomic and sociocultural diversity, as is the case of Mexico. The existence of reference libraries in different countries allows us to create a network of collaboration that, in turn, will facilitate the generation of standardized material available for massive use and sharing.

Organization and planning of the project



46

-EN-

Training of the working team

One of the first steps for the successful production of an acoustic library in a diverse country is to organize working teams. It is recommended to invite colleagues that preferably have experience in the acoustic recording of bats and are familiar with taxonomic identification of the species. It is desirable that these collaborators know sampling sites in their respective study areas and that they can organize working teams at a regional level to perform the highest quantity of fieldwork possible. Forming a working team with colleagues from different regions of the country can help to provide a wide geographic and taxonomic coverage in the acoustic library.

It is advisable to hold presential or virtual meetings with the collaborators in order to organize the first stages of the project, in which important aspects should be discussed, including the roles played by the participants, the decision regarding how to obtain funding to cover the costs of the project, potential sampling sites and the most suitable recording equipment, which must take into account the environmental and social conditions of the area. A key aspect for the management of information generated in the project is the organization and accessibility of the data. For this, it is recommended to find collaborators that can create and/or manage a platform that facilitates the uploading and integration of the information generated by each of the participants in the library.



Photo:
Cesar Guzmán

Assigmentation of roles

Determination of the roles of the participants is a key aspect for the effective functioning of the working team. It is suggested to appoint a *general coordinator* of the project, who will have the fundamental role of being responsible for the general organization of the project from a technical and administrative point of view, as well as being the interlocutor between the working group and the project funders. Designation of an *administrative coordinator* of the project could be very useful to speed up the availability of funds for the fieldwork and the verification of costs. Likewise, it is highly recommendable to designate a *technical coordinator*



of the project, who would be in charge of receiving the organized information of each of the *regional coordinators*, reviewing the quality of the calls and coordinating the uploading of information to the designated platform for its storage. The *regional coordinators* will be those in charge of the fieldwork in their respective regions, as well as coordinating the fieldwork of other colleagues of the same region and organizing the information generated for delivery to a *project technician*, who will be responsible for uploading and incorporating all of the information of the working groups to the platform.

Once the roles of the participants are defined, it is suggested to define how the information will flow and the specific responsibilities of each of the participants so that the fieldwork will be straightforward and the information generated can be quickly uploaded and expedited to the platform for storage.



Photo:
Cesar Guzmán

Selection of suitable detectors and the settings and programs to use

At present, there are many options in terms of ultrasonic detectors for recording the vocal signatures of bats. The general recommendation is that the working group discusses the pros and cons of the different equipment and that the equipment chosen should include a high quality microphone, an indispensable factor in the acquisition of high quality reference calls. It is recommended to obtain detectors that can record in full spectrum and in real time. Portability is another factor for consideration at the time of selecting an ultrasonic detector. Likewise, the equipment must be robust; i.e., must be able to resist extreme conditions of humidity and temperature, which are common in nocturnal fieldwork with bats. The recording settings and specifications of the detectors must be established *a priori* and efforts made so that these are homogenous for most of the species and samplings. This will avoid common errors when modifications are required in the field, depending on the species being recorded as well as the environmental conditions (e.g. background noise). The software for analyzing the recordings should also be discussed by the working team, based on its accessibility and the experience of the researchers.



Recording equipment used
in the Sonozotz project

This figure shows the different parts of the Avisoft Bioacoustics UltraSoundGate 116 hn model.



Obtaining funding

The cost of ultrasonic detectors has decreased in recent years due to great technological advances and to diversification of the manufacturing companies. However, the acquisition of this acoustic equipment for recording vocal signatures in different regions of a country can still represent a considerable economic cost, for which reason the securing of funding is key to guarantee the success of the project. Likewise, the organization of one or several workshops of standardization of methods and fieldwork at regional level for the capture and recording of individuals requires adequate funding. Contracting of the project technician is another aspect for consideration in the budget.



Photo:
Cesar Guzmán

Training and standardization workshops

Once the team of people who will create the library is organized, the funding secured and the recording equipment acquired, it is recommended to hold a workshop of methodology standardization. Attendance of the general coordinator is recommended at this workshop, along with the administrative coordinator, the technical coordinator of the project and the regional coordinators. This workshop serves to put into practice all of the methodologies proposed previously in the organization meetings of the project and any necessary adjustments can then be made. Likewise, it is suggested to conduct an exhaustive review of the detectors and their settings, so that all participants are familiar with the operation and functioning of the equipment, as well as to identify common errors in the functioning and to determine how these can be resolved in the field. It is important that this workshop is held in a locality where it is possible to capture bats and record individuals, in order to put into practice the protocol to be used in the project.

Once the general protocol is redacted and reviewed in the standardization workshop, it is recommended to hold regional workshops, in which all of the researchers and students who collaborate in the fieldwork can participate. The main idea of these workshops is to conduct a replica of the protocol, so that all of the participants who will generate information for the library become familiar with the general protocol and, if necessary, can make final adjustments to it, prior to putting it into practice in each of the regions. For this reason, it is important to hold the standardization workshop in places where bats can be captured.

Data collection



50

-EN-

Sampling design

The creation of a library of echolocation sounds that includes a significant (or at least representative) proportion of the diversity of bat species present in a country presents an enormous challenge in terms of human, technical, material and economic resources. This is particularly true when it involves numerous working groups that generate reference sounds using standardized protocols. The challenge is still greater when the goal is to create a library of sounds for a megadiverse country, or one of great territorial area. For the sounds stored in a library to be representative of the taxonomic and ecological diversity of the country, the first step should be the identification of relatively homogenous spatial units (regions), characterized by distinctive biotas and geographic traits. Ideally, this regionalization should be based on pre-existing classifications, such as maps of the eco-regions or of the physiographic provinces present in the national territory. However, the final regionalization could be adjusted for criteria of logistical type, such as geopolitical limits (states, provinces, departments, etc.), availability of routes of communication (especially highways and roads) and the occurrence of local social conflicts or incidence of crime.



Photo:
Molossus sp.
Emmanuel Solis

Each region should be sampled from a set of collection sites and localities, which together will offer a suitable representation of the diversity of sounds present in the study area. A site corresponds to an area of a limited dimensions, and could be a protected natural area, a National Park or a municipality, that could be sampled in one or several days. To make the use of available resources more efficient, an alternative could be to define *a priori* the number of sites for sampling within each of the identified regions. This number could be assigned in a manner proportional to the area or to the chiropterological richness expected in each region. Alternatively, the number of sites could be distributed in an equitative manner among all of the regions.



In each site, the collectors will select specific sampling points (localities) that maximize the success of bat capture, and could include refuges, water bodies and flight paths (for example, corridors of vegetation). Bats can be captured using different techniques, including mist nets, canopy nets, harp traps or other techniques at the discretion of the collectors. The method should be chosen according to the characteristics of the capture of site and to the attributes of the expected species, such as their levels of aggregation in the refuge, flight patterns and hours of activity. For example, if the intention is to sample at cave or refuge with hundreds, thousands or millions of individuals, the use of mist nets is not recommended or, if they are used, they must be placed in a state or position that allows the capture of a manageable number of individuals without causing them stress or even death.



Photo:

Emmanuel Solis

Environmental data

For studies that require the use of acoustic methods in bats, recording of the environmental conditions offers very valuable information since, to a large extent, these parameters define the patterns of activity of the different species or functional groups, and can therefore determine capture success. If it is possible to obtain high quality acoustic data, this information will allow an exploration of how the physical environment influences the components of the echolocation calls. For this reason, it is always recommended to at least record data pertaining to the temperature and humidity presented during sampling of the bats. At present, very economical and accessible devices are available that can measure these parameters in an optimized manner, e.g., USB Data Loggers.

In order to record these data, it is recommended that, prior to beginning the sampling session, the device be programmed to activate itself at regular intervals at least during the time of conducting the activities of capture and recording of the bats. As far as possible, the hours of sampling of the bats and the recording of environmental data should be standardized across all of the localities and working teams (preferably using the local sunrise and sunset times according to GPS), especially if it is desired to use the sampling to obtain additional data (see annex). The apparatus will be programmed to take a measurement of the environmental variables every given period in minutes and this will depend on each particular device and the specific needs of each project.



Taxonomic and ecological identity of the local bat assemblages locales de murciélagos

Prior to collecting data of any type, it is important to conduct an investigation of the study area. In the concrete case of fieldwork for acoustic studies, it is recommended to have a previously prepared list of the species that are potentially present in the area and the guilds to which they belong, as well as to research their basic ecology in the literature. This will be of great help to determine the best strategies of capture and recording (according to their flight and foraging habits). Likewise, prior to any fieldwork, it is recommended to locate the groups of species of problematic identification in order to make rapid decisions regarding their processing (taking of tissue samples or vouchers) should they be captured. Finally, this prior research will also help to identify the most suitable field guides or books to bring to the field.



Photo:
Bauerus dubiaquercus
Mercedes Morelos



Photo:
Corynorhinus townsendii
Juan Cruzado Cortés



Photo:
Lasionycteris noctivagans
José Gabriel Martínez Fonseca

Capture and identification of specimens

Once the bat is captured, manipulation and stress must be minimized during its processing, for which reason, immediately after capture, specimens must be placed in clean cloth bags (one individual per bag to facilitate labeling). A very useful recommendation is that each bag be labeled with adhesive tape, stating the time and date of collection and an assigned unique consecutive number. Adoption of this practice means that this piece of tape will follow the bat throughout its processing, as described below, ensuring that the unique identifier will be present and correct for all of the information pertaining to that specimen. At the end of the processing, it is recommended to destroy the tape, or associate it with the prepared specimen whenever this is the case. The bats should remain in the cloth bags while there is no need for manipulation and, if they are being recorded in cold locations, they should be kept in a place that allows them to maintain their body temperature (e.g. inside tents or some other refuge, below a cloth or jacket, etc.). Some species of bats are more fragile than others, but in general it is recommended not to keep any individual captive for more than two hours.



Standard measurements and data should be taken from each captured bat, including the weight, forearm length, relative age (juvenile or sub-adult, adult) and reproductive condition. For the females, the standard designation is inactive, pregnant, lactating or post-lactating. For the males, this is defined according to the position of the testicles: abdominal, inguinal (sexually inactive) or scrotal (active). Once these data are recorded, identification can take place. If the identification is conducted by someone with experience of the species in the area, it is not strictly necessary to consult the local identification guides (where these exist). However, if identification is conducted by someone still under training, suitable identification guides are required and should be studied and analyzed prior to any fieldwork. Likewise, it is recommended that a participant with experience should corroborate these identifications *in situ*. For species that are hard to identify or cryptic species, it is recommended to collect a wing tissue sample (see section on tissue collection) for corroboration of the species using molecular methods.

Sacrifice of specimens must be conducted only under very special circumstances, such as in the presence of irreparable injuries such as complete tearing of the wing or fracture of a bone derived from its capture in the net or trap. If it is suspected that the captured individual may be a record of a new species in the country or a notable extension of its national distribution, it is recommended to collect the specimen for inclusion in a scientific collection for future consultation. From each sacrificed specimen, morphometric measurements must be taken and, where possible, internal organ tissues obtained (see section on tissue collection).

Photographs

Photographs of evidence:

To support the taxonomic identification, it is recommended that a face photograph is taken of each individual captured, either in profile from ¾ or directly in front, with sufficient proximity to recognize traits that allow the individual to be identified and documented. It is recommended to take various photographs in order to select the best image. These photographs should be saved with no editing, according to at least the following recommendations:

- Minimum resolution of 300 dpi.
- File format JPG or TIFF, but preferably in RAW format.
- Good clarity, color and illumination (neither dark nor burned by excess light).
- Preferably with a dark background.

A minimum of two people are required to obtain suitable photographs, one to manipulate and prepare the bat for the photograph and another to operate the camera. The photographs must be both functional (to visualize key characteristics of the species) and aesthetic, as far as possible. When manipulating the bat manually, do not forget to use gloves. It is recommended that the first photograph of each specimen be of the tape with the unique identifier in order to avoid confusion among individuals. It is also suggested that only one person take the photographs with the same camera, in order to avoid errors.

Alternatively, the following photographs can be taken in order to help with the identification and documentation of the species:



- Complete dorsal body view.
- Complete ventral body view.
- Dorsal and ventral uropatagium.
- Characters of importance for identification, such as bands of color in the fur, fringe hairs, dorsal lines, warts, glandular sacs, etc.

Photographs for analysis of the wing morphology:

Depending on the quantity of work and individuals captured per night, there may be the possibility of taking photos of the wings for morphometric analysis. To produce these images, the bat is positioned face down on a sheet of millimetric paper to establish the scale (it is recommended to cover the sheet with an opaque laminate in order to avoid the reflection from the camera flash in the photograph), as shown in **Figure 3**.



Figure 3. Photograph of the right wing of an individual of *Sturnira hondurensis*, illustrating the wing position (dotted line) and the angle between the forearm and the humerus (red lines).

It is recommended to photograph the right wing of all of the specimens in order to standardize the photographs. This will, in turn, allow comparisons to be made among the photographs taken by other working groups. Once the bat is positioned, it must be ensured that both the wing membrane and the uropatagium are completely stretched in a natural position that neither hurts the bat nor overstretches the wing. The wingtip must also be completely stretched out. The image shown in Figure 3 was captured by locating the camera perpendicular to the plane of the image. To achieve a uniform capture of the images, the wings were extended from the tip, placing the polex at the height of the head and the forearm at a right angle with the humerus. It is suggested to place the tape with the unique identifier on the laminated millimetric sheet as a reference for the photograph (**Fig. 3**).



If the bat is very restless, another person can help to maintain the foot of the bat towards the bottom or placed on the paper so that the plagiopatagium remains adequately stretched. This same person can secure one or two points of the wing of the bat so that it remains correctly placed on the paper. Care must be taken not to cover any of the wing joints. Shadows on the image must also be avoided.

Tissue collection

It is recommended to take wing tissue samples from those individuals for which identification is in some doubt or from specimens of particular interest (rare, hard to capture, new records, etc.). To take these samples, the wing membrane of the specimen is extended with the dorsal part upwards on flat surface previously disinfected with hydrogen peroxide, ethanol or hand sanitizer. A sample is taken from the most distal part of each wing using a biopsy punch or forceps and fine scissors. Samples should not exceed 3 mm in diameter or the diameter of the biopsy punch. When tissue is extracted from the wing membranes, samples should be taken from close to the body (between the leg and the fifth finger of the wing) in order to minimize the potential effect on flight performance. The researcher should be very careful to avoid perforations close to large blood vessels or at the edge of the wing, in order to avoid tearing. Moreover, to avoid infections, gentian violet, hydrogen peroxide, Topazone or some other antiseptic can be applied to the site of tissue sample extraction.

After each tissue extraction, the scissors or biopsy punch must be cleaned with alcohol to avoid contamination. The biopsy needle can be sterilized using the direct flame of a gas lighter in order to eliminate all residues between samples, or it can be cleaned with disposable wet wipes containing bleach.

The tissue samples obtained should be stored in 1.8 ml tubes with a screw cap and/or plastic packing, or in 1.5 ml Eppendorf tubes containing 96% alcohol or molecular grade absolute ethanol (filling $\frac{3}{4}$ of the tube). The tube should be previously labeled with the unique identifier of the specimen, with a permanent marker that is indelible to water and alcohol, or with a pencil. This label can be on the upper part of the cap and on the side of the tube. After obtaining the sample, the tubes should be sealed with Parafilm® to avoid the tissue sample drying out through evaporation of the alcohol. The samples can be kept at ambient temperature, avoiding direct light and, once in the laboratory, should be maintained at a temperature of between 4 and -10 °C until analysis.

Collection of reference vouchers

If the specimen is to be prepared for a scientific collection (as a reference voucher), it is recommended that this be done as soon as possible after completion of collecting the information in the steps described previously. If this is not possible, the specimen should be kept alive until the following day for subsequent processing. The specimen sacrifice method should be adjusted to the protocols emitted by the local environmental authorities or by any institutional commission of bioethics. Consideration must be given to the correct handling of the anesthetic substances in order to avoid undesired effects on the people handling them.



Efforts should be made to prepare all of the samples, such as skin and skulls, with a standard protocol (following the procedure described in Hall, 1981, *Mammals of North America*, for example, or in any mastozoology manual, Fig. 4). If there are no means by which to avoid degradation of the specimen, the tissue samples must be taken immediately after death and the rest of the specimen preserved (in alcohol). In this case, it is recommended to prepare it as a complete skeleton if the temperature and environmental humidity are very high. The preparation data will be included in the corresponding catalog.



Figure 4. Bat specimen prepared for the museum.

Photograph: Celia López G.

Tissue from the internal organs of reference voucher specimens

It is recommended that voucher specimens be utilized to generate the maximum quantity of information possible, although this is not directly related to the creation of a library of sounds. If the specimen dies before processing, a sample of muscular tissue should be extracted in order to avoid degradation of the DNA. Once this sample is obtained, the cadaver can be stored in a plastic bag and preserved in ice or refrigerated until processing. Under no circumstances should it be frozen prior to extracting the tissue sample.

If the specimen is sacrificed, a person with experience in the dissection and identification of tissues should collect some samples using previously disinfected forceps, scissors and scalpels. These tissues can be preserved in one of two substances:

A) Etanol:

Once the specimen is sacrificed, a thoracic-abdominal incision is made in order to obtain samples of muscular tissue (pectoral, heart), as well as of the liver, kidney, spleen and pancreas. This process must be undertaken immediately after the death of the animal to avoid degradation of the genetic material. The size of the tissue sample (3 x 3 mm) should not exceed 1/3 of the volume of the tube that will contain it (1.8/1.5 ml). Together, the ethanol and sample should have a final volume of ¾ that of the tube, in order to avoid spillage of the ethanol. The tissue obtained should be kept in 1.8 ml tubes with screw caps and/or plastic packing or in 1.5 ml Eppendorf tubes containing 96% ethanol or molecular grade absolute ethanol (to a volume of ¾ that of the tube). The tube should be labeled previously with the unique identifier of the specimen, using a permanent marker indelible to water or alcohol, or a pencil (the label should go on the upper part of the cap and on the side of the tube). Samples preserved in alcohol should have the letter 'A' added to the label in order to clarify that the sample is contained in this liquid. After obtaining the sample, the tubes should be sealed with Parafilm®. Samples can be kept at ambient temperature, avoiding direct light. Once in the laboratory, they should be kept at a temperature of between 4 and -10° C until analysis. Preservation of the tissues in alcohol allows subsequent genetic analysis based on complete DNA.

B) RNA-Later:

Only organ samples (liver, kidney, spleen, pancreas) should be preserved in this fixative. This process requires more haste than those described previously because the RNA must be conserved immediately in order to avoid degradation. In zones of high temperature and relative humidity, RNA degrades even more quickly. The sample size must not exceed one third of the volume of the tube that contains it (1.8/1.5 ml). Together, the RNA-Later and sample should have a final volume of ¾ that of the tube, in order to avoid spillage of the liquid. Total immersion of the tissue sample must be ensured for effective impregnation of the sample in each of the tubes used. One tube only should be used for the tissue of a particular organ. The tube should be labeled previously with the unique identifier of the specimen, using a permanent marker indelible to water or alcohol, or a pencil (the label should go on the upper part of the cap and on the side of the tube). Samples preserved in this solution should have the letter 'R' added to label to clarify in which liquid the sample is contained. After obtaining the sample, the tubes should be sealed with Parafilm®. With this technique, great care must be taken with the transport temperature. It is suggested to use a tank with liquid nitrogen or dry ice. In case these are not available, ice can be used, if changed constantly. Once in the laboratory, the samples must be stored at a constant temperature of -40 °C (ultrafreezer) until analysis. The preservation of tissue in RNA-later allows the recuperation of messenger RNA that can be useful for establishing which genes were transcribing at the moment of specimen collection.



Recording of reference calls

The specimens must be recorded and released during the same night on which they are captured and as soon as possible after processing in order to reduce to a minimum their fatigue and stress and thus obtain the best recording possible in flight. Bats can be released the following evening only in cases where they could not be recorded on the same night as they were captured (for example, when the animal was captured close to dawn or in some refuge during the day), and only when they are in good physical condition. Once these have been recorded and only after ensuring that all of the necessary data have been taken, they can be released *in situ*. At least two people are required for recording: one responsible for manipulating and preparing the bat to be recorded and the other responsible for the recording equipment.

In order to use the calls for an acoustic reference library, only sounds emitted in the “search phase” should be recorded. These are the calls used by the individuals while navigating the space, locating nearby objects and hunting for food in flight, and are those generally emitted by an individual on being released. The recordings should be supervised to ensure that they do not contain much noise and that the sounds of interest are not saturated. At the time of recording of the individual, a detailed note of the surroundings of the recording site should be made (e.g. whether it is an open site, or a road or clearing with canopy vegetation on the flanks, whether it is an edge, etc.) and it should be ensured that this corresponds to the species being recorded.

It is recommended that the detector with which the recordings will be made be configured to make full spectrum recordings, giving preference to recording in 1x real time. If using detectors with time expansion, it is necessary to specify the expansion factor (5x, 10x, 20x, etc.), and it is recommended to give preference to the expansion factor 10x since this is the most widely used. Independently of the detector used, it is important to record the settings utilized for the recording of individuals; i.e., the rate of sampling, the format (indicating the resolution of the sample in bits), the characteristics of the filter where applicable (it is recommended to indicate the frequency in kHz), as well as the brand and model of the microphone used in the recording.

General considerations

- Set the detector at a 45° angle with the microphone pointing upwards. Never point the microphone towards the ground or towards any zone that produces echoes.
- Do not release bats close to water bodies, thick trunks, paved areas, walls or other flat structures that can cause echoes in the recordings.
- The person releasing the bat should try to direct it towards the person who is recording.
- The bat should be allowed to fly freely without forcing or throwing it.
- Ensure that the individual is active (even restless), with a suitable temperature and is under the least stress possible (some species, especially the vespertilionidae, can easily enter a torpor).
- Keep manipulation of the bat to a minimum.
- Preferably record the bat in a similar environment to its typical foraging habitat (**see Table 1**).



- Avoid recording the bats at times when other individuals are flying, whether these are other species or conspecifics, in order to eliminate contamination from the recording as far as possible.
- Keep the individuals hydrated, avoid their exposure to direct sunlight or high temperatures. In the case of working in cold environments, try to keep the individuals at body temperature. In dry climates, it may be necessary to moisten the wing membranes to prevent them being damaged.
- If colonies and/or roosting sites are located, individuals can be recorded leaving the refuge, but at a distance of 10-20 m (depending on the species) to avoid saturation by conspecifics and rebounding echoes. In this case, first ensure that the colony is monospecific. Knowing the trajectory of the emergence flight can help to record those individuals at some point distant from the exit of the refuge, but close to the individual in order to obtain quality call recordings.
- It is recommended to take care for the presence of possible predators at the moment of release.
- Do not record at more than 10 m distance from the bat since there are microphones in use that have low sensitivity. It is recommended to record at some 5 m distance, and a little further for those species with calls of high intensity.

Methods of release

Methods of release can vary according to the species in question. The most common methods are described below:

- Hand-release: Consists of recording the bat at the moment of release from the hands of a person (at a reasonable height, at least breast height, or ca. 1.50 m).
- Zip-line: This method consists of placing two posts of height between 2.5 and 3 m linked with a nylon cord (fishing line) of approximately 5 m in length. Fixed to this cord is placed a sliding ring, preferably made of plastic, with an elastic cord of 3 to 5 m in length, to which the bat is attached at the other end. It is suggested to attach the bat by the neck, such that it can fly freely but cannot escape or hurt itself. The bat is released from the hand and can fly above or to the sides of the zip-line, but it cannot escape.
- Flying cage: Consists of releasing the bat inside an enclosure sufficiently large to allow the individual a flight that is as natural as possible. Enclosures made of plastic mesh are suggested, with approximate dimensions of 8 m in length x 4 m in width x 3 m in height.
- Release at great height: One person can occupy an elevated position relative to ground level (for example, in a building), and release the bat from the hands or using a zip-line. One variant of this method is to place the bat on an elevated surface (building, rock wall or tall tree with few branches) and allow the bat to climb in order to gain height and fly.

The specific release method will depend on the characteristics of each species. **Table 1** makes recommendations for recording specific species or groups.

Table 1. Proposed release methods per bat group.

The acoustic guilds were defined following Denzinger and Schnitzler (2013).

GROUP/GUILD	RECORDING MODE	HEIGHT OF RELEASE	DISTANCE TO THE DETECTOR	RELEASE ENVIRONMENT
Aerial foragers of open spaces (e.g. some species of <i>Vespertilionids</i> such as <i>Lasiurus</i> , <i>Myotis</i> of large size, some embalonurids such as <i>Diclidurus albus</i> ; species such as <i>Thyroptera tricolor</i>)	Zip-line or hand release	2 m	5 m	Open
Aerial foragers of open spaces with calls of very high intensity (e.g. molosids)	Zip-line or release at great height	> 10 m	> 10 m	Open
Aerial edge foragers (e.g. embalonurids such as <i>Saccopteryx</i> , <i>Balantiopteryx</i> ; <i>Myotis</i> of small size and other vespertilionids such as <i>Eptesicus</i> and <i>Rhogeessa</i>)	Zip-line or hand release	2 m	5 m	Edge
Trawling edge foragers (e.g. species that forage on water bodies such as <i>Myotis yumanensis</i> , <i>Myotis albescens</i> , <i>Noctilio</i>)	Zip-line or hand release	2 m	5 m	Edge
Wing beat detecting foragers of closed spaces with compensation for the Doppler effect (e.g. hipposiderids, rinolophids, species within the <i>Pteronotus</i> complex)	Zip-line or hand release	2 m	5 m	Closed
Substrate foragers (e.g. filostomids, natalids and some vespertilionids such as <i>Antrozous</i> , <i>Corynorhinus</i>)	Zip-line or flying cage	N/A	< 1 m	Closed



Data management and labeling

The quantity of data, samples and files generated in a project of this magnitude requires a clear, systemized and informative labeling system. This aspect is crucial for the adequate management and organization of the resulting information and must be defined from the beginning by a group of specialists (preferably in the workshop of standardization of techniques and production of the working protocol).

The codes used to identify each individual must at least contain geographic information pertaining to the point of capture (for example, region, site and locality). In the case of the samples and files obtained from each individual, the codes must also contain numbers or letters that indicate the type of information associated (echolocation call, photograph, wing tissue, voucher for scientific collection, etc.).

It is recommended to establish from the outset a hierarchical system of organization and storage of the digital information generated during the project. Folders could be organized according to geographic scale (for example, folders for the regions containing subfolders for the sites) and then according to individual and data type.

The case of the SONOZOTZ project:

Acoustic library of mexican bats

Origin, planning and organization of the project

The Sonozotz project, “Compilation of a reference record library of the insectivorous bats of Mexico, Phase 1”, arose as a necessity from various researchers who work with bat acoustics and who wished have a national reference library of bat calls that could represent their variability, as well as to share previously generated recordings. It is in the framework of the national congresses of mastozoology, organized by the Asociación Mexicana de Mastozoología A.C. (AMMAC), where a large group of researchers decided to organize themselves to produce the proposal of the project. The board of direction of the AMMAC held meetings with the authorities of the Mexican National Commission for the Knowledge and Use of Biodiversity, a governmental agency responsible for promoting and supporting activities directed at the knowledge of biological diversity, which decided to support the proposal of creating an acoustic library of the Mexican insectivorous bats. Various meetings were held in order to integrate the team of researchers and it was decided that the general coordinator of the project would be Dr. Miguel Ángel Briones Salas, the then president of the AMMAC.

The project also had an administrative coordinator, two technical coordinators and a technician in support of the project. It was proposed to divide the country into eight more or less natural and relatively secure regions that could contain different faunas and would be logically manageable: the Californian region (Baja California, Baja California Sur and Sonora), Northwestern region (Durango, Sinaloa and Chihuahua), Western region (Colima, Nayarit and Jalisco), Eastern region (Puebla, Tlaxcala and Veracruz), Central-northern region (Guanajuato, Aguascalientes, Zacatecas and San Luis Potosí), Central-southern region (CDMX, Estado de México, Morelos, Hidalgo and Querétaro), Southeastern region (Campeche, Quintana Roo and Yucatán) and Southwestern region (Chiapas, Oaxaca and Tabasco). Each of the regions had a coordinator who, with the help of other colleagues from that region, defined the best sampling sites in their particular region.

Once the funder accepted the proposal, the working agreement was produced and monofilament mist nets and ultrasonic detectors were acquired, as well as software licenses for the acoustic analysis. A standardization workshop was held, in which the sampling protocol was defined, put into practice and the necessary adjustments made. Three regional workshops were then held in the south, center and north of the country in order to train more participants of all regions of Mexico.

Data collection and call recording

The sampling design utilized in the Sonozotz project, along with the methods of data collection and recording of echolocation calls are described in detail by Zamora-Gutiérrez et al. (2020). **Figure 5** shows, in a schematic and simplified manner, the sequence of activities performed by each team in the field.

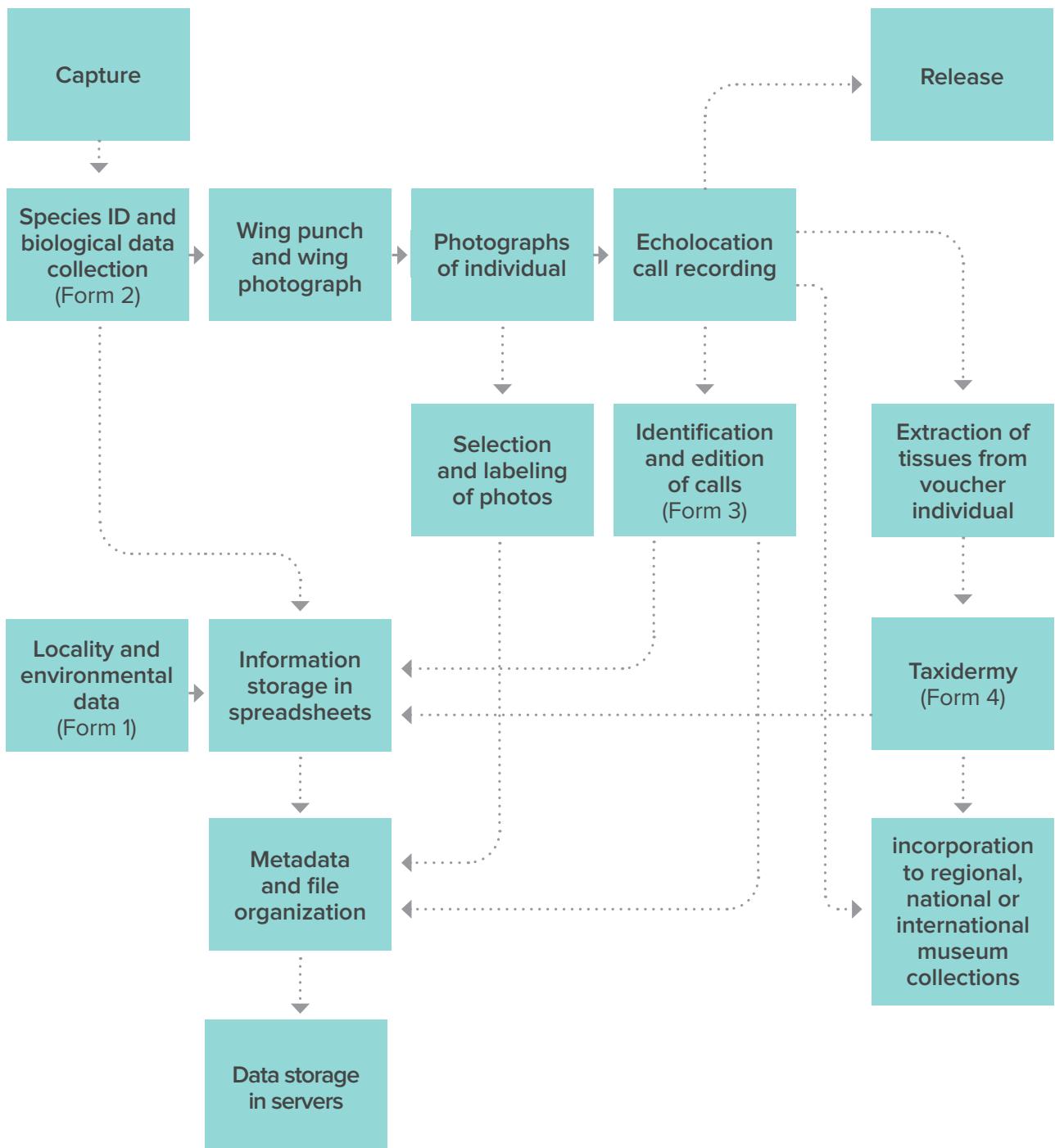


Figure 5. Flow diagram describing the sequence of activities conducted by each working group for the Sonozotz project; from the collection of data and acquisition of recordings in the field to the processing of the resulting information.



Management and labeling of data

Figure 6 shows all of the data and identifiers that were associated with each captured and processed bat. Two unique identifiers were generated per locality and captured individual, from which all of the other data are derived:

- ID of the locality: The geographic point was identified with the number of the region, site and specific locality. For example, if in region 2, site 12, five localities were sampled, their locality IDs would be: 021201, 021202, 021203, 021204 and 021205. Likewise, the ID of the first locality of site 13 of this same region would be 021301. The length of the locality identifier was always the same (i.e. six digits: two for the region, two for the site and two for the locality).
- ID of the specimen: Each captured individual was identified with the key for the locality, a hyphen and a consecutive number (per region) of four digits, de 0001 to n, such that the first specimen captured in each region was number 0001 and the last, at the end of the project, was n. For example, the first specimen of locality 020101 (first locality of the first site of region 2) was 020101-0001. Given that the specimen number was consecutive for each region, there could only be one number 0001 per region. To avoid confusions among working teams of the same region, the regional coordinator had control of the starting number in each field trip. When simultaneous collections were to be conducted, numbers were allocated beforehand to each group.

This labeling strategy allowed the use of unique identifiers for all of the data and thus avoided duplication, while allowing the rapid association of each datum with specific geographic regions.

LABELING OF SAMPLES

Example: Collecting locality 021201

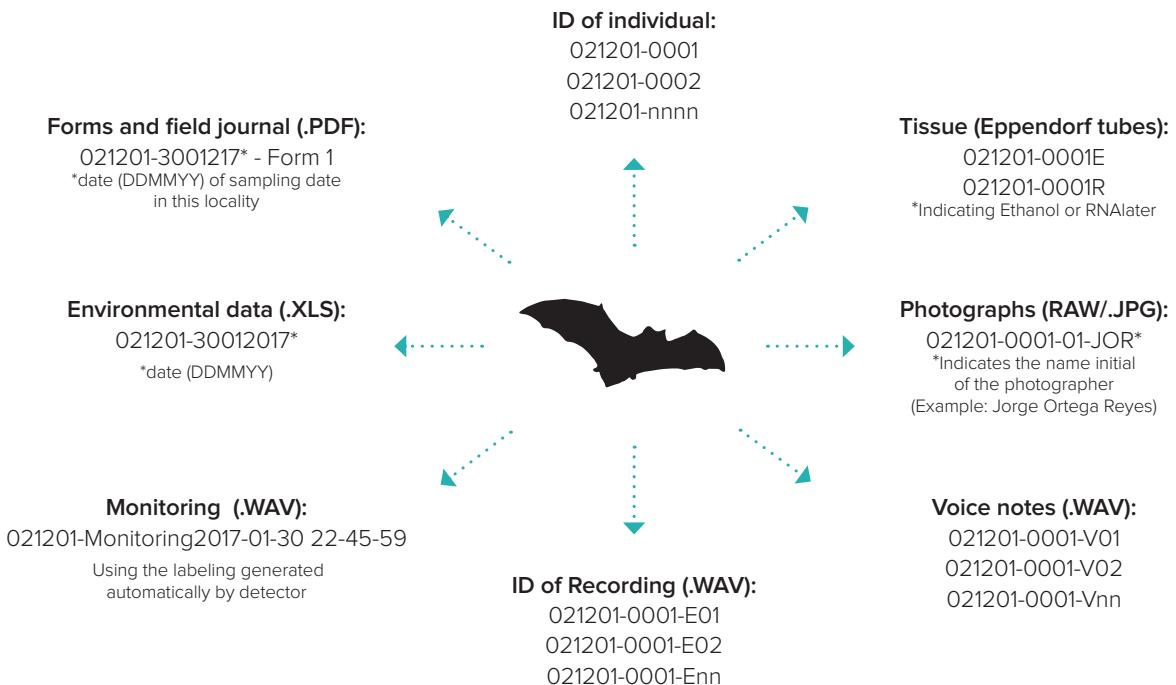


Figure 6. Example of the data labeling scheme used in the Sonozotz project. The data corresponded to the samples, tissues, photographs and recordings of individuals captured in locality 01, at site 12, in region 02.



Final recommendations

Safety in the face of SARS-CoV-2

The pandemic caused by the virus SARS-CoV-2, which began at the end of 2019, has provoked the re-proposal and re-structuring of several elements in research. These include the manipulation of wildlife, especially bats, which are natural reservoirs of a large number of viruses, many of which have zoonotic potential. Since before the pandemic, recommendations of hygiene and safety were already in place for the management of these mammals. However, it is now imperative that these guidelines are followed to the letter in order to prevent worse disease outbreaks in the future, for both humans and species of wildlife, which could be equally disastrous.

For this reason, we include in this manual the most recent guidelines emitted by the International Union for the Conservation of Nature (IUCN) for the safe handling of wild bats. We urge all readers of this document to read the guidelines presented in the scheme of **Figure 7** and to visit the website cited in the figure in order to make themselves aware of more recommendations.

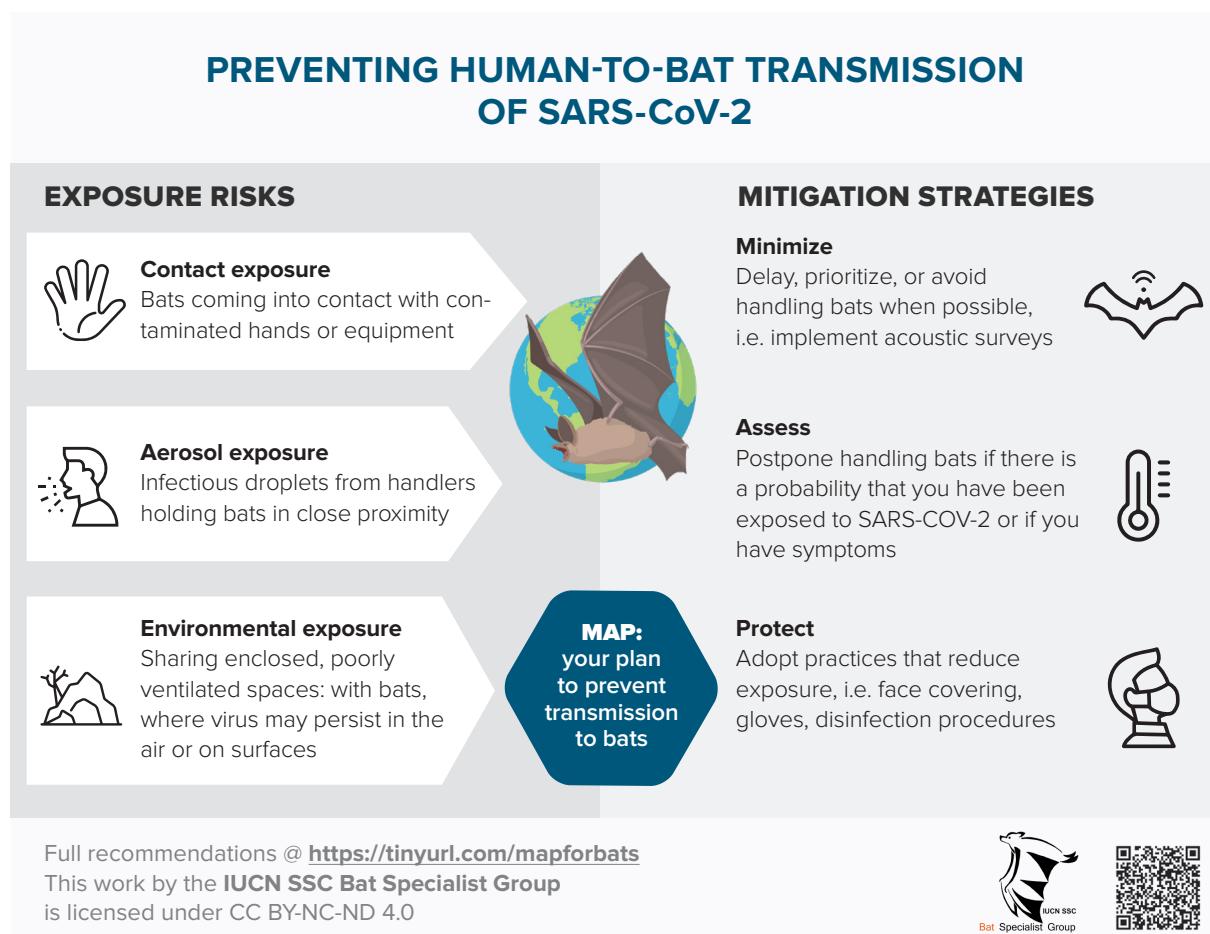


Figure 7. Safety recommendations from the IUCN (International Union for the Conservation of Nature) for the manipulation of bats in the face of the contingency caused by SARS-CoV-2. License of use: CC BY-NC-ND 4.0.

Passive acoustic sampling

Considering the logistic and economic effort implied by the creation of a national or regional acoustic library, it is recommended, as far as possible, to conduct passive sampling in each of the working localities. If such sampling is conducted in a systemic manner among all of the participants, additional information can be obtained, such as the richness of species recorded acoustically, the index of activity of the insectivorous bats and the use of the locality as a foraging area, among others. In the Sonozotz project, it was decided to record for 15 minutes in each locality in order to have a record of the bat community present. To this end, the detector was activated so that it began to record 15 minutes after sunset as indicated by GPS in each locality. A continuous recording was made for five minutes. Fifty-five minutes later, another 5 minutes were recorded, repeating this once more to complete 3 periods of five minutes recorded with intervals of one hour between them. This monitoring was labeled with the ID of the locality, followed by the word 'Monitoring' and the date and time pre-established in the detector settings (e.g. 080116-Monitoring2016-06-10 22-45-59).

Information storage

The construction of an acoustic library implies the generation of a large quantity of data, due to the fact that the audio records and high quality photographs are files with much information, in terms of bytes. For this reason, the participants must decide, prior to initiating fieldwork, which mechanism to use in order to share and store the information generated. It is recommended that only the coordinators (general, regional and the technical coordinator) should have access to the repository utilized, in order to avoid losses of information.

Figure 8. Platform generated for the storage and organization of the information of the Sonozotz project.



In the case of the Sonozotz project, the information generated in each region was shared with the curator (technician of the project) through a platform generated from CONABIO, which was organized by region and through a hierarchical organization. A site was associated with the individual bats captured and field formats, while the individuals were associated with the acoustic recordings, photographs, tissues and vouchers (**Fig. 8**). Each regional head was responsible for sharing the information generated in their particular study region.

Final curation of the information

Once the information derived from the fieldwork was generated and shared, it is important that the project technician reviews and curates the information. Each recorded audio file must be reviewed with care in order to ensure that it is of sufficient quality, i.e., that the calls are not too weak and with noise that could impede correct visualization. If the recordings of the target species are intermingled with other species that were also flying at the time of release, these must be cleaned so that the file only contains the calls of the target species.

On occasion, some species can emit social calls or pulses associated with sites with obstacles (**Fig. 2**), for which reason it is necessary to verify that the calls used to characterize the species are those emitted exclusively in the hunting phase.

RECOMMENDED BIBLIOGRAPHY

Adams AM, Jantzen MK, Hamilton RM et al. (2012) Do you hear what I hear? Implications of detector selection for acoustic monitoring of bats. *Methods Ecol Evol* 3:992-998.

Armitage DW, Ober HK (2010) A comparison of supervised learning techniques in the classification of bat echolocation calls. *Ecol Inform* 5(6):465-473.

Biscardi SJ, Orprecio MB, Fenton MB et al. (2004) Data, sample sizes and statistics affect the recognition of species of bats by their echolocation calls. *Acta Chiropterol* 6(2):347-363.

Cadotte MW, Carscadden K, Mirochnick N (2011) Beyond species: functional diversity and the maintenance of ecological processes and service. *J Appl Ecol* 48(5):1079-1087.

Denzinger A, Dchnitzler HU (2013) Bat guilds, a concept to classify the highly diverse foraging and echolocation behaviors of microchiropteran bats. *Front. Physiol.* 4(164):1-14.

Greif S, Yovel Y (2019) Using on-board sound recordings to infer behaviour of free-moving wild animals. *J Exp Biol* 222:jeb184689.

Grinell AD, Gould E, Fenton MB (2016) A history of the study of echolocation. In Fenton MB, Grinell AD, Popper AN et al (eds) *Bat bioacoustics*. ASA Press, Springer, New York, p 1-24.

Hill AP, Prince P, Snaddon JL, et al. (2019) AudioMoth: A low-cost acoustic device for monitoring biodiversity and the environment. *Hardware X* 6:e00073.

Jennings N, Parsons S, Pocock MJO (2008) Human vs. machine: identification of bat species from their echolocation calls by humans and by artificial neural networks. *J Zool* 86:371-377.

Jones G, Jacobs DS, Kunz TH et al. (2009) Carpe noctem: the importance of bats as bioindicators. *Endangered Species Res* 8(23):93-115.

Jones KE, Russ J, Bashta A-T et al. (2013) Indicator Bats Program: a system for the global acoustic monitoring of bats. In Collen B, Pettorelli N, Durant S et al (eds) *Biodiversity monitoring and conservation: bridging the gaps between global commitment and local action*. Wiley Blackwell, London.

Lemen C, Freeman PW, White JA, Andersen BR (2015) The problem of low agreement among automated identification programs for acoustical surveys of bats. *West N Am Nat* 75:218–225.

Loeb SC, Rodhouse TJ, Ellison LE et al. (2015) A plan for the North American bat monitoring program (NABat). United States Department of Agriculture, Asheville.

Mac Aodha O, Gibb R, Barlow K et al. (2018) Bat detective-deep learning tools for bat acoustic signal detection. *PLoS Comput Biol* 14(3):e1005995.

**MacSwiney G MC, Clarke FM, Racey PA (2008)**

What you see is not what you get: the role of ultrasonic detectors in increasing inventory completeness in Neotropical bat assemblages.

J Appl Ecol 45(5):1364-1371.

Parsons S, Szewczak JM (2009)

Detecting, recording, and analyzing the vocalizations of bats. In Kunz TH, Parsons S (eds) Ecological and behavioral methods for the study of bats, 2nd edn. The Johns Hopkins University Press, Baltimore, p 91-111.

Penone C, Kerbiriou C, Julien J-F et al. (2018)

Body size information in large-scale acoustic bat databases.

PeerJ:peerj.5370.

Pettersson L (2002)

The properties of sound and bat detectors. In Brigham RM, Kalko EKV, Jones G, Parsons S, Limpens HJGA (eds) Bat echolocation research tools, techniques and analyses.

Bat Conservation International, p 9-12.

Reicher BE, Bayless M, Cheng T et al. (2021)

NABat: A top-down, bottom-up solution to collaborative continental-scale monitoring. AMBIO A Journal of Human Environment 50(4):901-913.

Russo D, Voigt CC (2016)

The use of automated identification of bat echolocation calls in acoustic monitoring: A cautionary note for a sound analysis.

Ecol Indic 66:598-602.

Skowronski MD, Fenton MB (2009)

Quantifying bat call detection performance of humans and machines.

J Acoust Soc Am 125:513-521.

Skowronski MD, Harris JG (2006)

Acoustic detection and classification of microchiroptera using machine learning: lessons learned from automatic speech recognition.

J Acoust Soc Am 119:1827-1833.

Voigt CC, Kingston T (2016)

Bats in the Anthropocene. In Voigt CC, Kingston T (eds) Bats in the Anthropocene: conservation of bats in a changing world.

SpringerOpen, New York, p 1-9.

Walters CL, Freeman R, Dietz C et al. (2012)

A continental-scale tool for acoustic identification of European bats.

J Appl Ecol 49:1064-1074.

Walters CL, Collen A, Lucas T et al. (2013)

Challenges of using bioacoustics to globally monitor bats. In Adams RA, Pedersen SC (eds) Bat evolution, ecology and conservation. Springer, New York, p 479-499.

Zamora-Gutierrez V, Lopez-Gonzalez C, MacSwiney G MC et al. (2016)

Acoustic identification of Mexican bats based on taxonomic and ecological constraints on call design.

Methods Ecol Evol 7:1082-1091.

Zamora-Gutierrez V, Ortega J, Avila-Flores R et al. (2020)

The Sonozotz Project: Assembling an echolocation call library for bats in a megadiverse country.

Ecol Evol 10:4928-4943.

Primera edición, octubre de 2022

D.R. © 2022, Asociación Mexicana de Mastozoología, A.C. (AMMAC)
Hacienda Vista Hermosa 107, Colonia Villa Quietud, Alcaldía Coyoacán 04960,
Ciudad de México

La reproducción total o parcial de los contenidos de este material está permitida,
siempre y cuando sea sin fines de lucro y se cite la fuente.

Editado en México

Este manual es el reflejo de todas las actividades realizadas por un grupo de investigadores para obtener una compilación acústica representativa de los murciélagos insectívoros mexicanos. El manual incluye una serie de pasos a seguir para conformar un protocolo estandarizado y funcional en campo, tomando en cuenta la alta heterogeneidad de un país megadiverso como lo es México.

Consideramos que nuestra experiencia al realizar un esfuerzo de la magnitud del proyecto Sonozotz, puede servir como un ejemplo para la elaboración de bibliotecas acústicas en otras regiones del mundo.

Los autores

This manual is the reflection of all the activities carried out by a group of researchers to obtain a representative acoustic compilation of Mexican insectivorous bats. The manual includes a series of steps to create a standardized and functional protocol in the field, taking into account the high heterogeneity of a megadiverse country such as Mexico.

We believe that our experience in carrying out an effort of the magnitude of the Sonozotz project can serve as an example for the development of acoustic libraries in other regions of the world.

The authors



Asociación Mexicana
de Mastozoología A.C.

