



Técnicas de Inventario y Monitoreo para los Anfibios de la Región Tropical Andina

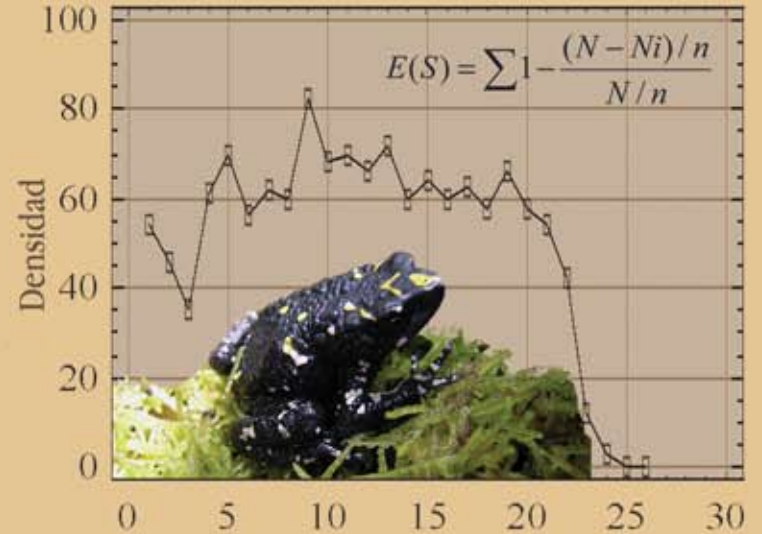
2

CONSERVACIÓN INTERNACIONAL  
SERIE MANUALES DE CAMPO

## Técnicas de Inventario y Monitoreo para los Anfibios de la Región Tropical Andina

Editores  
Ariadne Angulo  
José Vicente Rueda-Almonacid  
José Vicente Rodríguez-Mahecha  
& Enrique La Marca

Serie de Tiempo



2006



**CONSERVACIÓN INTERNACIONAL**

**SERIE MANUALES PARA LA CONSERVACIÓN**

**2**

**TÉCNICAS DE INVENTARIO Y  
MONITOREO PARA LOS ANFIBIOS DE LA  
REGIÓN TROPICAL ANDINA**

**Ariadne Angulo**

**José Vicente Rueda-Almonacid**

**José Vicente Rodríguez-Mahecha**

**& Enrique La Marca**

---

**Editores**



CONSERVACIÓN  
INTERNACIONAL  
ANDES CBC

**BOGOTÁ, D.C. - COLOMBIA**

**2006**

## **Copyright 2006 © Conservación Internacional**

Todos los derechos están reservados, y ninguna parte de este libro puede ser reproducida sin el permiso expreso de los editores. Esta publicación debe citarse como:

ANGULO A., J. V. RUEDA-ALMONACID, J. V. RODRÍGUEZ-MAHECHA & E. LA MARCA (Eds). 2006. Técnicas de inventario y monitoreo para los anfibios de la región tropical andina. Conservación Internacional. Serie Manuales de Campo N° 2. Panamericana Formas e Impresos S.A., Bogotá D.C. 298 pp

Las solicitudes o comentarios sobre esta obra pueden ser enviados a los:

### **Editores de la Serie**

**José Vicente Rodríguez-Mahecha** (jvrodriguez@conservation.org)  
Unidad de Conservación de Especies - Conservación Internacional

**José Vicente Rueda-Almonacid** (jvrueda@yahoo.com)  
Cordinador programa Biodiversidad Colombia  
Conservación Internacional - Colombia

**Andrés González-Hernández** (andresgonzalezgh@gmail.com)  
Coordinador Iniciativa Especies Amenazadas  
Unidad de Conservación de Especies - Conservación Internacional

### **Editores de este número**

**Ariadne Angulo** (aangulo@conservation.org)  
Cordinadora Iniciativa Atelopus  
Conservación Internacional

**José Vicente Rueda Almonacid** (jvrueda@yahoo.com)  
Cordinador programa Biodiversidad Colombia  
Conservación Internacional - Colombia

**José Vicente Rodríguez-Mahecha** (jvrodriguez@conservation.org)  
Unidad de Conservación de Especies - Conservación Internacional

**Enrique La Marca** (lamarca1@movistar.net.ve)  
Universidad de los Andes, Mérida, Venezuela

### **Fotografías:**

Jaime Bosch, Corinne Richards, Jamie Voyles, Ariadne Angulo, Andrés González-H., Santiago Sánchez

### **Dibujos e ilustraciones:**

Ted Khan, Marco Rada

### **Diseño y diagramación:**

Andrés González-Hernández

### **ISBN 978-958-97690-5-8**

Impreso en Colombia por Panamericana Formas e Impresos S.A., Bogotá D.C.



## CONSERVACIÓN INTERNACIONAL

**Bogotá, D. C., septiembre 5 de 2006**

Para la Unidad de Conservación de Especies del Centro de Biodiversidad de los Andes (CBC) de Conservación Internacional, es motivo de orgullo dar a conocer a la comunidad científica y ambientalista de Latinoamérica, el segundo número de nuestra serie “Manuales de Campo”, el cual compila información actualizada sobre las diferentes metodologías y técnicas para la realización de inventarios y propuestas de monitoreo de los anfibios, uno de los grupos faunísticos más amenazados del planeta y cuyo epicentro de diversidad se localiza en el “hotspot” de los Andes tropicales en Venezuela, Colombia, Ecuador, Perú y Bolivia, cuya riqueza dista notablemente de la encontrada en cualquier otra región o país en el mundo.

Este número de la serie recoge la preocupación de las instituciones y personas relacionadas con el manejo e investigación de los recursos naturales en el sentido de orientar esfuerzos hacia la profundización del conocimiento de su biodiversidad y particularmente sobre el seguimiento y monitoreo de sus organismos amenazados de extinción, con el objeto de implementar las acciones de manejo indispensables para la estabilización de estas poblaciones y que nos conduzcan a adoptar estrategias de conservación que mitiguen las graves amenazas que atentan contra la biodiversidad.

Esta tarea fue acometida con mucho esfuerzo por el CBC de los Andes de Conservación Internacional que, con el apoyo de la Iniciativa Darwin, convocó a un grupo selecto de investigadores y conservacionistas de los países andinos y de otras regiones del mundo, el cual se reunió por primera vez en la ciudad de Villa de Leyva, Colombia, en agosto de 2003. El tema central de la reunión fue el de desarrollar una estrategia de conservación e investigación regional para los anfibios y el de fortalecer las alianzas existentes y conformar una red de especialistas en anfibios tropicales cuyo nom-

bre fue dedicado a uno de los géneros más amenazados de extinción y por ello se le denominó la “Red Atelopus”. Como resultado de este taller se evidenció la necesidad de colocar al alcance de la comunidad regional de herpetólogos y conservacionistas las principales metodologías para la realización de prospecciones de campo y la formulación de propuestas de monitoreo de anfibios, mediante la edición de un manual profusamente ilustrado, escrito en español e impreso en grandes cantidades para acceder al mayor número de investigadores e instituciones de Latinoamérica.

El desarrollo y la elaboración de este Manual de Campo ha sido el producto de un esfuerzo colectivo, que ha involucrado profesionales de diferentes instituciones y países de los Andes tropicales y de especialistas de otros países en América y Europa. Su conocimiento, experiencia extensiva y compromiso en la conservación de los anfibios han sido claves para el desarrollo del mismo. Este compendio de experiencias llega en un momento en que los esfuerzos para la conservación de los anfibios son tan altamente necesarios como críticos y urgen el incremento del trabajo de campo que permita disminuir los vacíos de conocimiento colectivo acerca de los anfibios andinos.

Este manual se desarrolló con estas prioridades en mente, ya que ha sido escrito como herramienta de apoyo para los biólogos especialistas o para aquellas personas profesionales o en curso de serlo, interesados en los anfibios, con el objeto de facilitarles la estructuración de proyectos de investigación en los Andes tropicales. Esperamos que con la masiva difusión de esta guía se motive a los estudiantes y biólogos a adelantar las investigaciones sobre estos temas prioritarios para los Andes tropicales y a acoger los apoyos de la Iniciativa de Especies Amenazadas (IEA) ([www.andescbc.org](http://www.andescbc.org)) que es manejada por Provita en Venezuela ([www.provitaonline.org](http://www.provitaonline.org)), Omacha en Colombia ([www.omacha.org](http://www.omacha.org)), Ecociencia en Ecuador ([www.ecociencia.org](http://www.ecociencia.org)), Apeco en Perú ([www.apeco.org.pe](http://www.apeco.org.pe)) y Puma en Bolivia ([www.fundacionpuma.org/iea.htm](http://www.fundacionpuma.org/iea.htm)), instituciones que en alianza otorgan capital semilla para responder a los interrogantes de conservación de las especies amenazadas.

Con este segundo número de la serie, titulado “Técnicas de inventario y monitoreo para los anfibios de la región tropical andina” recogemos el deseo de los autores de los capítulos en ofrecer el estado del arte sobre el conocimiento de los mecanismos, prácticas y metodologías sobre el inventario y monitoreo de los anfibios con la esperanza de motivar el reclutamiento de nuevos investigadores que, a través de su propia iniciativa o de los cursos que hasta ahora han venido siendo adelantados por la Iniciativa Atelopus, puedan ampliar su formación académica en beneficio de la conservación de nuestra herencia natural.



*Eleutherodactylus prolixocidiscus*

*José Vicente Rodríguez-Mabecha*

*José Vicente Rueda-Almonacid*

*Andrés González-Hernández*

***Editores de la serie***

# Prólogo

Como ha sido ampliamente divulgado en las revistas científicas y medios de comunicación del orbe, los anfibios enfrentan, en la actualidad, una grave amenaza para su conservación. Esta crisis mundial es el resultado de una sinergia de muchas amenazas que están conspirando contra la supervivencia de uno de los grupos de vertebrados de una forma nunca observada en tiempos modernos. Con este conjunto de situaciones negativas como la creciente pérdida de hábitat, el inclemente uso de pesticidas, el aumento de la radiación ultravioleta, y la peligrosa expansión y patogenicidad de la chitridomicosis, los anfibios en general y muy seguramente otros grupos de especies de nuestra rica biodiversidad tendrán que enfrentar un futuro sombrío. La buena noticia, si hay alguna, es que aún podemos hacer algo, pero requerimos dedicar esfuerzos a adquirir información reciente sobre la situación de conservación de las poblaciones, hacerles seguimiento y obtener de esta manera elementos de juicio para adelantar acciones novedosas y creativas que contrarresten esta crisis de conservación. Igualmente es importante resaltar que la investigación in situ y el trabajo mancomunado de muchos actores debe ser un componente central y clave para desarrollar este nuevo conocimiento.

El reto es enorme, máxime si reconocemos y comprendemos que el estar en el epicentro de la biodiversidad convierte a los cinco países andinos en un escenario de máxima vulnerabilidad, pues los impactos de esa aún incomprendida sinergia de amenazas creciente, pueden ser desastrosos sobre nuestros recursos dado que siempre tendremos mucho que perder, pero también mucho que ganar en la medida que establezcamos un frente común para contenerlos.

Al igual que el estatus de conservación de las especies de anfibios en los Andes tropicales, nuestro conocimiento sobre la historia natural, niveles poblacionales y usos benéficos está en peligro. Y aunque los científicos lleven muchos años trabajando para incrementar el conocimiento sobre la diversidad de especies y se hayan adelantado los pasos necesarios para identificar algunas de las causas más im-

portantes de la disminución de sus poblaciones, la realidad es que hay aún un enorme desconocimiento sobre aspectos relevantes de la historia natural en general y sobre la identidad de muchas de las especies que habitan en diversas regiones inexploradas o exploradas parcialmente. Todo ello conduce a pensar que el gran número de especies deficientes de datos (DD), casi amenazadas (NT) listadas en la última evaluación global de anfibios de 2004 según los criterios de UICN, pueden modificar sustancialmente e incrementar el número de especies en los niveles de amenaza (CR, EN, VU) que surjan de próximas evaluaciones a nivel nacional o global y probablemente, en la medida que conozcamos más sobre la situación real, se incrementen también tristemente en la categoría de extinta (EX). Esta situación nos señala que las exploraciones de campo deben ser una prioridad para la investigación en el futuro y dentro de ellas las que contribuyan a implementar actividades de monitoreo de las especies identificadas como amenazadas y los inventarios de sitios inexplorados.

Con esta gran preocupación en mente este manual recoge la experiencia de varios investigadores quienes han dedicado buena parte de su vida profesional al desarrollo de técnicas de seguimiento y a la ardua tarea de ponerlas en prueba por largos periodos para ver sus bondades en los resultados generados. De la misma manera estas experiencias se han puesto en práctica en los tres cursos de campo sobre inventario y monitoreo de anfibios desarrollados por la Iniciativa Atelopus de Conservación Internacional y la Iniciativa Darwin en Perú, Venezuela y Bolivia. El resultado final de este proceso de depuración es el producto que hoy se presenta a la comunidad académica y en general a todos aquellos interesados en los anfibios.

Igualmente este manual representa una pequeña pero estratégica parte del esfuerzo global para enfrentar las disminuciones y extinciones como se menciona en el Plan para la Conservación de los Anfibios (ACAP), documento desarrollado durante la Cumbre de la Conservación de los Anfibios que se reunió en Washington, D.C. en septiembre de 2005, y que es la guía para las acciones de conservación de los anfibios que se implementen, a nivel global, durante los próximos años. Esperamos que al promover la investigación con iniciativas como ésta, podamos incrementar nuestro conocimiento



y ser más eficaces en enfrentar la pérdida de poblaciones y salvar conjuntamente nuestros anfibios de la extinción.



*Hyla virolinensis*

Claude Gascon, Ph. D.  
Vice-President Senior,  
División de Programas Regionales  
Conservación Internacional  
Co-Director del grupo Global de Especialistas en Anfibios,  
Comisión de Supervivencia de Especies, UICN

Prólogo .....	8
Agradecimientos .....	16
El estado global de los anfibios .....	19
Introducción .....	19
Objetivos de la GAA .....	20
Estado de la Lista Roja .....	20
Extinciones .....	22
Estado por grupo taxonómico .....	23
Patrones geográficos .....	24
Diversidad .....	24
Geografía de las especies amenazadas .....	27
Especies en rápido proceso de disminución .....	30
Patrones de endemismo .....	34
Amenazas .....	37
Preferencias de hábitat .....	38
Conclusión .....	40
Agradecimientos .....	41
Hacia una estrategia regional de investigación y conservación para los anfibios de los países tropicales andinos. ¿Una oportunidad? .....	43
Introducción .....	43
El porqué de la estrategia .....	44
Estructura de la estrategia .....	45
El caudal informativo histórico. Un punto de partida .....	46
Diseño experimental y análisis estadístico .....	51
Introducción .....	51
Fundamentos de diseño experimental .....	53

¿Cuántas hay? Problemas asociados a la estimación de parámetros ...	58
¿Cuáles variables predicen la abundancia? Problemas relacionados con causalidad .....	60
Modelos generales lineales .....	61
Métodos no paramétricos.....	65
¿Existen patrones espaciales y temporales? Problemas de autocorrelación .....	67
¿Cómo se clasifican? .....	69
En resumen ¿qué hacer? .....	71
<b>Protocolo de bioseguridad y cuarentena para prevenir la transmisión de enfermedades en anfibios .....</b>	<b>73</b>
Introducción.....	73
Quitridiomycosis cutánea en anfibios .....	74
Iridovirus .....	76
Síndrome de las patas rojas .....	77
Otros agentes infecciosos.....	78
Bioseguridad en el campo .....	79
Planificación de visitas a localidades múltiples.....	79
Manipulación de anfibios y muestras de tejido .....	81
Desinfección del equipo de campo .....	83
Desinfección de instrumentos .....	84
Transporte de anfibios y muestras de tejido .....	84
Descarte de cadáveres, tejido y material sólido contaminado .....	87
Bioseguridad en el laboratorio.....	88
Protocolo de cuarentena .....	88
Síndrome de aclimatación y mal-adaptación .....	90
Desinfección.....	90
Cambios y disposición de agua .....	91
Eutanasia .....	91
<b>Fundamentos de bioacústica y aspectos prácticos de grabaciones y análisis de cantos .....</b>	<b>93</b>
Introducción.....	93
Fundamentos teóricos .....	95
Sonidos: Qué son y algunas propiedades fundamentales.....	95
Fundamentos prácticos .....	100

Grabación .....	100
Monitoreo acústico .....	108
El proceso: De la rana a la computadora .....	109
Componentes de un sistema de grabación y análisis de sonido.....	109
Laboratorios de acústica y bancos/bibliotecas de sonido .....	127
Consideraciones importantes en el campo.....	128
Mantenimiento y almacenamiento.....	131
Agradecimientos.....	133
Anexo 1. Antes de trabajar.....	134
<b>Técnicas para el inventario y muestreo de anfibios: Una compilación.....</b>	<b>135</b>
Introducción.....	135
Técnicas de muestreo.....	137
I) Inventario completo de especies (búsqueda libre y sin restricciones) .....	137
II) Muestreo de Relevamiento Sistemático (MRS) .....	139
III) Relevamiento por Encuentros Visuales (REV) .....	140
IV) Muestreos de parcelas o cuadrantes .....	145
V) Muestreo por transectas de banda estrecha (2 m) o de banda fija (la longitud y el ancho de cada transecta son pre-establecidos por el investigador).....	146
VI) Transectas de bandas auditivas .....	147
VII) Muestreo con cercas de conducción en línea recta y trampas de foso o trampas de puerta unidireccional .....	148
VIII) Muestreo de estadios larvales .....	153
Datos asociados.....	155
Datos geográficos mínimos .....	155
Datos sobre el hábitat.....	156
Consideraciones generales.....	158
Muestreo de poblaciones.....	160
Clasificación de los métodos de muestreo.....	162
Tipos de distribución espacial de los organismos .....	167
Anexo 2. Transformación de los datos* .....	168
1) La transformación logarítmica .....	169
2) La transformación raíz cuadrada .....	169
3) La transformación angular o arcoseno .....	170
Anexo 2. Planilla de campo para la realización transectas.....	171
<b>Preparación y preservación dematerial científico .....</b>	<b>173</b>
Introducción.....	173

Notas de campo.....	174
<b>Preparación del material científico .....</b>	<b>182</b>
Procedimiento para el sacrificio.....	182
Procedimiento para la fijación .....	186
Procedimiento para la preservación .....	191
<b>Preparaciones especiales .....</b>	<b>191</b>
Fijación y preservación de huevos y larvas.....	191
Diafanización (transparentado) y tinciones.....	204
<b>Embalaje de ejemplares científicos.....</b>	<b>207</b>
Muestras vivas.....	208
Muestras conservadas .....	208
Muestras congeladas.....	210
Otras consideraciones .....	211
<b>Almacenamiento de ejemplares .....</b>	<b>211</b>
Condiciones físicas del ambiente de almacenaje.....	212
Condiciones de preservación de los ejemplares para su almacenaje.....	214
Holotipos y paratipos.....	218
Otras consideraciones .....	218
<b>Monitoreo de anfibios .....</b>	<b>221</b>
Introducción.....	221
Tipos de monitoreo.....	222
Diseño de estudios de monitoreo .....	224
Generalidades acerca de la(s) hipótesis a evaluar .....	230
¿Qué monitorear?.....	231
Monitoreo de diferentes estadios del ciclo de vida y de categorías de sexo y edad (premetamórficos y/o postmetamórficos; machos y/o hembras; adultos, juveniles y crías) .....	235
¿Dónde monitorear?.....	237
Cuándo, cuánto y con qué frecuencia monitorear .....	241
¿Cómo monitorear? .....	245
Variables asociadas al monitoreo.....	252
Análisis de datos .....	255
<b>Literatura citada .....</b>	<b>266</b>
<b>Recursos/fuentes de información de Internet.....</b>	<b>284</b>
<b>Glosario .....</b>	<b>288</b>



*Hyalinobatrachium ibama*

# Agradecimientos

Nuestra gratitud al Ministerio del Ambiente (MINAMB) de Venezuela; al Ministerio del Ambiente, Vivienda y Desarrollo Territorial (MDAVDT) de Colombia; al Ministerio del Ambiente de Ecuador; al Instituto Nacional de los Recursos Naturales (INRENA) de Perú y al Ministerio de Desarrollo Rural, Agropecuario y Medio Ambiente (MDRAMA) de Bolivia, así como a las Unidades de Parques Nacionales de Colombia y Venezuela, y a los funcionarios de los programas de Conservación Internacional en los países andinos, por el considerable esfuerzo en el otorgamiento de los permisos necesarios y por el apoyo institucional y la acogida en las reservas naturales y localidades visitadas durante los diferentes cursos. Igualmente queremos resaltar nuestro reconocimiento por la cálida hospitalidad y por permitir que varios de sus investigadores compartieran sus conocimientos y experiencias en los cursos de entrenamiento y enriquecer así el contenido de este manual a las siguientes instituciones en cada uno de los países: Venezuela: Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas-IVIC, Estación Biológica de Rancho Grande, Universidad Central, Universidad Rómulo Gallegos-UNERG, Universidad Experimental de los Llanos Orientales Ezequiel Zamora-UNELLEZ, Museo de Historia Natural- Fundación La Salle, Universidad de los Andes y a las Fundaciones Provita y Andígena. Colombia: Pontificia Universidad Javeriana, Instituto de Ciencias Naturales (ICN) de la Universidad Nacional de Colombia, Universidad de los Andes, Universidad del Cauca, Universidad del Valle, Universidad Tecnológica de Tunja, Universidad del Magdalena y a las Fundaciones Omacha, Proaves y Ecohabitats. Ecuador: Escuela Politécnica Nacional, Universidad San Francisco de Quito y la Fundación Arco Iris. Perú: Universidad Mayor Nacional de San Marcos, la Comunidad de San José e Inibico. Bolivia: Universidad Nacional Mayor de San Andrés, Colección Boliviana de Fauna, Madidi.com y al Eco-Albergue de San Miguel del Bala. Wildlife Trust, NatureServe, UICN/SSC y CABS.

Sin el soporte económico de la Iniciativa Darwin del Reino Unido, el CBC de los Andes de Conservación Internacional, la Fundación

Moore, el Fondo para la Acción Ambiental y la Niñez, y las Corporaciones Autónomas Regionales CVS, Departamento Administrativo del Medio Ambiente de Antioquia, Corantioquia, EAAB, Universidad de Córdoba en Colombia, no hubiera sido posible la edición, impresión y distribución de este manual y la realización de los cursos de entrenamiento.

A los investigadores y conservacionistas asistentes al taller de la Iniciativa Atelopos convocado en Villa de Leyva en agosto de 2004, para discutir aspectos relacionados con el grave fenómeno de la declinación global de los anfibios, y cuyos aportes fortalecieron este manual, nuestro sincero agradecimiento por disponer de su valioso tiempo para contribuir en esta noble causa.

A la American Association for the Advancement of Science (AAAS), Biblioteca Macaulay, Elsevier, Herpetológica, y a Robert Mannell por permitirnos incluir material previamente publicado en otras fuentes.

Un reconocimiento especial a todos los autores y coautores de los capítulos por sus contribuciones y en particular a los participantes de los cursos de entrenamiento, puesto que sin su estímulo y energía no hubiera sido posible poner en práctica y valorar los alcances de las diferentes metodologías desarrolladas para el estudio de los anfibios.

Queremos destacar la gestión adelantada por Fabio Arjona en la búsqueda de socios y aliados para la publicación de esta obra; a Robert Bensted-Smith por su apoyo en el tema de los anfibios y su preocupación sobre la temática en general; igualmente debe ser reconocido el esfuerzo de Andrés González en el montaje y diagramación de los artes finales. Nuestro agradecimiento a Marco Rada, Santiago Sánchez y Pedro Galvis por la elaboración de diagramas y dibujos; a Diego Cisneros-Heredia por su apoyo en la traducción del capítulo “El estado global de los anfibios”; a Jaime Bosch, Jamie Violes, Corinne Richards, Juan Manuel Renjifo, Germán Corredor y Ted Khan por permitir el uso de sus fotografías y dibujos para ilustrar los textos, y en general a todos aquellos que contribuyeron de una u otra forma para llevar a feliz término esta obra.





*Dendrobates histrionicus*



*Dendrobates fantasticus*

# El estado global de los anfibios

*Simon N. Stuart<sup>1</sup>, Janice S. Chanson<sup>1</sup>, Neil A. Cox<sup>1</sup> & Bruce E. Young<sup>2</sup>*

## Introducción

Los científicos comenzaron a preocuparse sobre la amplia extensión de las disminuciones de poblaciones de anfibios cuando se reunieron en 1989 en el Primer Congreso Mundial de Herpetología. Datos históricos indican que las disminuciones se iniciaron hacia la década de los 70 en el occidente de los Estados Unidos de Norteamérica, Puerto Rico y el noreste de Australia (BURROWES *et al.* 2004, CZECHURA E INGRAM 1990, DROST & FELLERS 1996, KAGARISE SHERMAN & MORTON 1993). Reportes subsiguientes revelaron la gravedad de las disminuciones. En un solo sitio en Costa Rica, 40% de la fauna anfibia desapareció en un corto período a finales de la década de los 80 (POUNDS *et al.* 1997). Repentinas desapariciones de especies montañas se notaron simultáneamente en Costa Rica, Ecuador y Venezuela (LA MARCA & REINTHALER 1991, POUNDS & CRUMP 1994, POUNDS *et al.* 1997, RON *et al.* 2003, YOUNG *et al.* 2001). En algunas regiones, muchas de las disminuciones se dieron en hábitats aparentemente prístinos. Estos reportes fueron inicialmente recibidos con cierto escepticismo, ya que las poblaciones de anfibios pueden fluctuar ampliamente (PECHMANN & WILBUR 1994), pero pruebas con modelos nulos probabilísticos demostraron que las disminuciones eran mucho más extendidas y severas de lo que se hubiese esperado bajo variación demográfica normal (POUNDS *et al.* 1997). Este descubrimiento, en conjunto con muchos reportes de disminuciones

1 IUCN/SSC - CI/CABS Biodiversity Assessment Initiative, c/o Center for Applied Biodiversity Science, Conservation International, 1919 M Street NW, Suite 600, Washington DC 20036, USA. [s.stuart@conservation.org](mailto:s.stuart@conservation.org)

2 NatureServe, Apartado 75-5655, Monteverde, Puntarenas, Costa Rica. [bruce\\_young@natureserve.org](mailto:bruce_young@natureserve.org)

Figuras y textos escogidos reimpresos con permiso de STUART, S.N., CHANSON, J.S., COX, N.A., YOUNG, B.E., RODRIGUES, A.S.L., FISCHMAN, D.L. Y WALLER, R.W. 2004. Status and trends of amphibian declines and extinctions worldwide. *Science* 306: 1783-1786. Copyright/Derechos Reservados 2004 AAAS.

en los años 90 (ver p. ej., HEYER *et al.* 1988, HOULAHAN *et al.* 2000, LAURANCE *et al.* 1996, LIPS 1998, 1999, LYNCH & GRANT 1998, YOUNG *et al.* 2001), fue clave para convencer a la mayoría de herpetólogos de que las disminuciones de anfibios son eventos unidireccionales y no al azar.

La Evaluación Global de los Anfibios (GAA, por sus siglas en inglés) es la primera evaluación exhaustiva del estado de conservación de las 5,743 especies de anfibios reconocidas del planeta (UICN, Conservación Internacional y NatureServe 2004, STUART *et al.* 2004). Este proyecto, en el cual participaron más de 500 científicos de 60 países durante tres años, representa la primera valoración global de anfibios a través de las Categorías y Criterios de la Lista Roja de la Unión Mundial para la Conservación (UICN 2001).

### Objetivos de la GAA

Determinar la escala (tanto de magnitud de amenaza como del enfoque geográfico) de la actual crisis de extinción de los anfibios.

Identificar las áreas geográficas y hábitats más importantes que requieran ser conservados para evitar más extinciones.

Identificar las amenazas principales y proponer medidas de mitigación y acciones de conservación prioritarias para enfrentar estas amenazas.

Establecer una red de expertos enfocada en los anfibios, de manera que la Evaluación Global de Anfibios (GAA) pueda mantenerse actualizada; esta experiencia puede ser canalizada para abordar las más altas prioridades de conservación.

### Estado de la Lista Roja

Uno de los objetivos principales de la Evaluación Global de los Anfibios es la evaluación de cada especie de anfibio conocida con respecto a las Categorías y Criterios de la Lista Roja de la UICN. Estas categorías de amenaza proveen una base explícita para determinar el estado de conservación de una especie, con énfasis en la identificación de aquellas con mayor riesgo de extinción global. En este contexto, el término “Amenazado” se refiere a aquellas especies

clasificadas bajo las categorías de la Lista Roja como Vulnerable, En Peligro, o Críticamente Amenazada.

De los 5743 anfibios evaluados, casi un tercio (1856 especies ó 32.3 %, según STUART *et al.* 2004) están globalmente amenazados (Figura 1). Esto es considerablemente más alto que figuras comparables para aves (12 %, de acuerdo con BirdLife International 2004) y mamíferos (23 %, véase BAILLIE *et al.* 2004, UICN 2004), los únicos otros grupos para los cuales algunos análisis globales exhaustivos han sido completados. Treinta y cuatro especies están consideradas Extintas (EX), y sólo una como Extinta en la Naturaleza (EW). Otras 2558 especies no están actualmente consideradas como amenazadas, y están clasificadas en las Categorías UICN como Casi Amenazada (NT) o Preocupación Menor (LC), mientras que no hubo información suficiente disponible para evaluar el estado de 1294 especies adicionales (STUART *et al.* 2004).



Figura 1. Estado de la Lista Roja UICN para todas las 5743 especies conocidas de anfibios.

En relación con otros grupos animales, una proporción particularmente grande de anfibios está en las categorías de amenaza más altas. Por ejemplo, 7.4 % de los anfibios fueron listados como Críticamente Amenazados (427 especies) comparados con 1.8 % de aves (179 especies) y 3.8 % de mamíferos (184 especies). Los niveles de amenaza para los anfibios están también indudablemente subestimados,

dado que casi un cuarto (22.5%) de las especies son muy pobremente conocidas como para ser evaluadas (p. ej., Datos Deficientes), y es posible que una proporción significativa de ellas esté globalmente amenazada. Las figuras comparativas para aves y mamíferos son 0.8 % y 5.3 % respectivamente (BirdLife International 2004, BAILLIE *et al.* 2004, UICN 2004).

La documentación de tendencias poblacionales es clave para evaluar el estado de las especies, y un esfuerzo especial se realizó para determinar cuáles especies están disminuyendo, cuáles se encuentran estables, o en incremento. La GAA encontró que las disminuciones están ampliamente distribuidas entre los anfibios, con un 43.2 % de especies reportadas con disminuciones. En contraste, 27.2 % parecen estar estables y sólo el 0.5 % están en incremento. Debido a que no hay información sobre tendencias poblacionales disponible para 29.1 % de las especies, el porcentaje de especies en disminución puede de hecho ser considerablemente mayor (STUART *et al.* 2004).

## Extinciones

Las extinciones son notoriamente difíciles de confirmar. Utilizando las estimaciones más conservadoras al documentar extinciones, sólo se sabe de 34 anfibios que se han extinguido desde el año 1500 (STUART *et al.* 2004). De mayor preocupación, sin embargo, son los muchos anfibios que están ausentes y que no pueden ser encontrados. Hasta que se puedan llevar a cabo muestreos exhaustivos que prueben estas desapariciones, estas especies no pueden ser clasificadas en la categoría de la Lista Roja de Extintos, pero pueden ser señaladas como “posiblemente extintas” dentro de la categoría de Críticamente Amenazada. La GAA documenta 134 de esas especies posiblemente extintas (STUART *et al.* 2004).

Desafortunadamente, hay fuertes evidencias de que la cantidad de extinciones está en incremento (BAILLIE *et al.* 2004, STUART *et al.* 2004). De las 34 extinciones conocidas, 9 han ocurrido desde 1980, incluyendo especies como el Sapo Dorado (*Bufo periglenes*) de Monteverde, Costa Rica. Entre aquellas especies consideradas como “posiblemente extintas”, cerca de 113 han desaparecido y no han sido vistas desde 1980 (ver BAILLIE *et al.* 2004). Afortunadamente, unos pocos anfibios

que fueron previamente considerados como posiblemente extintos han sido redescubiertos. Por ejemplo, *Atelopus cruciger* no había sido visto en su Venezuela nativa desde 1986, hasta que una pequeñísima población fue encontrada en el 2003 (MANZANILLA & LA MARCA 2004), y *Atelopus mucubajiensis*, presumido extinto desde 1994, fue recientemente encontrado en una localidad de bosque nublado en los Andes de Venezuela (BARRIO-AMORÓS 2004).

## Estado por grupo taxonómico

Los anfibios comprenden tres grandes grupos, u órdenes taxonómicos: Anura (ranas y sapos), Caudata (salamandras y tritones), y Gymnophiona (cecilias). Existen diferencias significativas entre estos grupos tanto en el número de especies como en el estado de amenaza (ver Tabla 1). Por ejemplo, las ranas y sapos superan en diversidad a las salamandras y tritones por un orden de magnitud, y se conocen aún menos cecilias. Las ranas y sapos, con 5067 especies, dirigen el nivel de amenaza promedio para los anfibios como grupo, con 32.6% (1653 especies) entre amenazadas o extintas. Las salamandras y tritones, sin embargo, muestran significativamente mayores niveles de amenaza, con 46% (234 especies) de las especies amenazadas o extintas (STUART *et al.* 2004). Las cecilias, en cambio, parecen estar relativamente seguras con sólo 2.3 % (4 especies) amenazadas (STUART *et al.* 2004). No obstante, dos tercios (66%) de las cecilias son tan pobremente conocidos que han sido evaluados como Datos-Deficientes.

Tabla 1. Estado de la Lista Roja por orden taxonómico.

ORDEN	TOTAL	EX	EW	CR	EN	VU	NT	LC	DD	% Amenazadas o Extintas
<b>Anura</b> Ranas & Sapos	5067	32	1	381	655	584	302	1991	1121	32.6
<b>Caudata</b> Salamandras & Tritones	508	2		46	105	81	57	155	62	46.0
<b>Gymnophiona</b> Cecilias	168				1	3		53	111	2.3
Total	5743	34	1	427	761	668	359	2199	1294	32.9

También se exhibe una diferencia significativa en los niveles de amenaza al nivel taxonómico de Familia. Familias muy diversas de ranas y sapos que están más amenazadas que el promedio global incluyen a los Bufonidae, Leptodactylidae y Rhacophoridae (BAILLIE *et al.* 2004). Entre las familias grandes de salamandras, Hynobiidae y Plethodontidae exhiben niveles de amenaza mucho mayores que Salamandridae (BAILLIE *et al.* 2004).

Los Bufonidae tienen el mayor número de especies que parecen estar disminuyendo rápidamente debido a impactos del hongo quitridio (LA MARCA *et al.* 2005). Más dramáticamente, 74 de las 77 especies evaluadas en el género *Atelopus* (sapos arlequines, jambatos) están amenazadas o extintas (UICN, Conservación Internacional y NatureServe 2004). Otros géneros de sapos importantes con altos porcentajes de especies amenazadas incluyen (UICN, Conservación Internacional y NatureServe 2004) a los sapos vivíparos de Africa (*Nectophrynoides* y *Nimbaphrynoides*). Los Leptodactylidae son la más grande familia de anfibios, más de la mitad de los cuales están considerados amenazados. La familia está dominada por los 700 miembros del género *Eleutherodactylus* (el género con mayor número de vertebrados), los cuales típicamente tienen rangos de distribución muy pequeños, por lo que son particularmente susceptibles a la pérdida de hábitat. Algunos miembros de esta familia también han sufrido los impactos de la enfermedad del hongo quitridio (UICN, Conservación Internacional y NatureServe 2004).

## Patrones geográficos

### Diversidad

Los patrones globales de diversidad de anfibios están dramáticamente ilustrados en la Figura 2. Este mapa de diversidad muestra claramente ciertas áreas de alta diversidad global, incluyendo América del Sur tropical y África del Oeste tropical. En contraste con los patrones usuales de alta diversidad de especies que ocurren en los trópicos, el sureste de los Estados Unidos es un centro global de diversidad de anfibios, particularmente con su diversidad de salamandras. Sin embargo, el problema de la disparidad en los esfuerzos de investiga-

ción alrededor del mundo complica la interpretación de este mapa. Es muy probable que regiones como Indonesia, Nueva Guinea y la Cuenca del Congo estén sub-representadas en este mapa debido a la falta de investigaciones adecuadas.

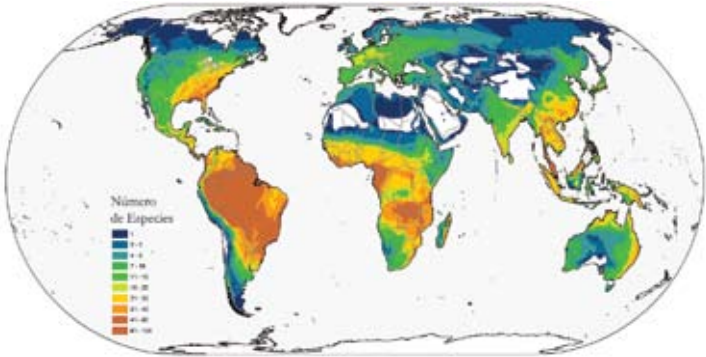


Figura 2. Diversidad global de las especies de anfibios.

Al observar la diversidad de anfibios desde el punto de vista de países, Brasil, con por lo menos 731 especies, tiene el mayor número de especies de anfibios que cualquier otro país de la Tierra, seguido cercanamente por Colombia. La Tabla 2 lista los 20 países más diversos y revela algunos hallazgos interesantes. Por ejemplo, Colombia, que había sido tradicionalmente considerada como el país más rico en anfibios, ha sido sobrepasada recientemente por Brasil. En general, sin embargo, estos resultados deben ser considerados con relación al nivel de esfuerzo de investigación. Tanto Colombia como Brasil han recibido esfuerzos extensivos de investigación en las últimas décadas, y aunque se espera que ambos países puedan incrementar significativamente sus totales de especies, el nivel de incremento posiblemente sea menor que en algunos de los otros países altamente diversos. En Sudamérica, Perú en particular ha sido pobremente muestreado y es más que seguro que el incremento en su número total de especies sea muy sustancial, y puede predecirse que pase el nivel del Ecuador. La diversidad en el Ecuador es, sin embargo, excepcional para un país tan pequeño. Observando desde una perspectiva regional, las cinco naciones tropicales Andinas (Bo-



## Estado global de los anfibios

---

livia, Colombia, Ecuador, Perú y Venezuela) se ubican entre los 15 países con la mayor cantidad de especies de anfibios. Colectivamente, estas naciones albergan 1400 especies, lo cual comprende el 24% de la diversidad global de anfibios.

Tabla 2. Países con la mayor cantidad de especies de anfibios.

<b>RANGO</b>	<b>PAÍS</b>	<b>TOTAL ESPECIES</b>
1	Brasil	731
2	Colombia	698
3	Ecuador	447
4	Perú	398
5	México	351
6	Indonesia	340
7	China	315
8	Venezuela	293
9	Estados Unidos	263
10	Papúa Nueva Guinea	237
11	India	234
12	Madagascar	222
13	Australia	215
14	República Democrática del Congo	210
15	Bolivia	201
16	Malasia	199
17	Camerún	189
18	Panamá	189
19	Costa Rica	179
20	Tanzania	157

Entre los países del Viejo Mundo, el nivel de esfuerzo de investigación es frecuentemente mucho más bajo que en América. Se puede predecir que Indonesia sea el país más rico fuera de América, pero incluso la mitad de sus especies probablemente aún no son conocidas; podría terminar con un nivel de diversidad comparable con los de Brasil y Colombia. La situación en India está por cambiar dramáticamente, con más de 100 especies en proceso de descripción. También pueden predecirse grandes incrementos en el total de especies para Papua Nueva Guinea y la República Democrática del Congo; este

último país no ha recibido un trabajo de investigación apreciable en anfibios en los últimos 40 años.

Países que no están lejos de pasar el nivel de las 200 especies incluyen a Malasia, Camerún, Tanzania, Panamá y Costa Rica. Se puede predecir que los Estados Unidos de América y Australia puedan caer en su clasificación en relación con los otros países a lo largo del tiempo; sin embargo, el primero permanecerá como el país con el mayor número de salamandras, con la posible excepción de México.

### Geografía de las especies amenazadas

Un mapa que muestra la distribución global de los anfibios amenazados (Figura 3) revela patrones muy diferentes de los ilustrados para la diversidad general de especies. La mayor concentración de dichas especies—incluyendo casi la mitad de los anfibios amenazados actualmente conocidos—está en un área relativamente limitada que va desde el sur de México hacia el sur hasta Ecuador y Venezuela, y las Antillas Mayores (detalles en la Figura 4). Esta región está dominada por especies con distribuciones pequeñas, frecuentemente ubicadas en áreas montañas. Muchas de estas especies han estado sujetas a una severa pérdida de hábitat y exposición a la enfermedad micótica de la quitridiomycosis (p. ej., LA MARCA *et al.* 2005, LIPS 1998, 1999, LIPS *et al.* 2004, RON *et al.* 2003, YOUNG *et al.* 2001).

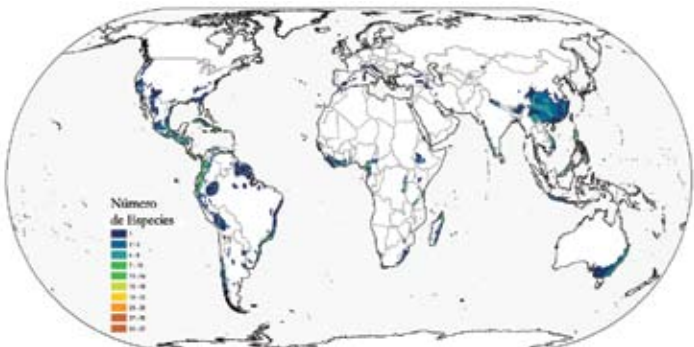


Figura 3. Distribución global de los anfibios amenazados.

Otras importantes concentraciones de especies amenazadas se encuentran en los bosques atlánticos del sur de Brasil, los bosques de Guinea superior en el occidente de África, los bosques de Camerún occidental y del este de Nigeria, la Falla Geológica Albertina o región de los grandes lagos y montañas de África central, las Montañas del Arco Oriental de Tanzania, Madagascar, los Ghats Occidentales de India, Sri Lanka, China central y sur, Borneo, las Filipinas y el este de Australia.

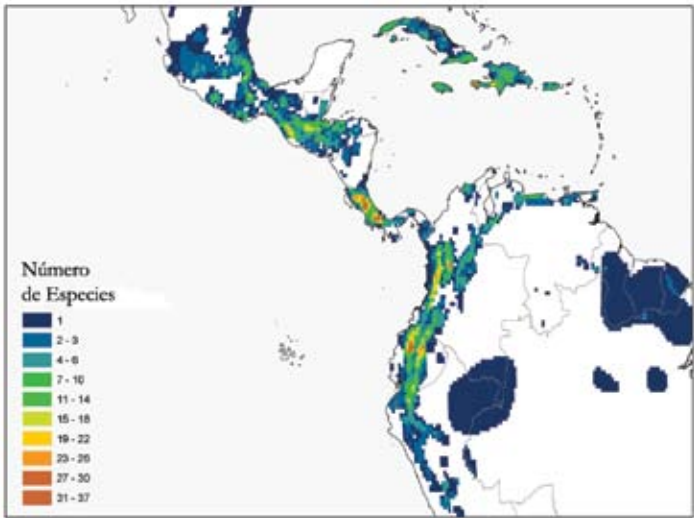


Figura 4. Distribución de anfibios amenazados en América Central, norte de América del Sur y el Caribe.

La Tabla 3 lista los 20 países con el mayor número de anfibios amenazados. Estos países son en muchos casos diferentes de aquellos listados en la Tabla 2, lo cual sugiere que, o los anfibios en algunos países son más susceptibles a las amenazas, o las amenazas varían entre los países, o hay otros factores que influyen sobre la distribución de las especies amenazadas.

Tabla 3. Países con la mayor cantidad de anfibios amenazados.

RANGO	PAÍS	ESPECIES AMENAZADAS
1	Colombia	208
2	México	191
3	Ecuador	163
4	Brasil	110
5	China	86
6	Perú	78
7	Guatemala	74
8	Venezuela	68
9	India	66
10	Costa Rica	61
11	Madagascar	55
12	Honduras	53
13	Panamá	52
14	Estados Unidos	51
15	Camerún	50
16	Filipinas	48
17	Australia	47
18	Cuba	47
19	Haití	46
20	Malasia	45

Los países listados en la Tabla 3 tienen una responsabilidad particularmente mayor hacia la protección de los anfibios amenazados del planeta. Colombia, el segundo país más diverso, tiene el mayor número de especies amenazadas. El mayor peligro para los anfibios en Colombia es la pérdida de hábitat, aunque han habido muchas disminuciones aún inexplicadas, y la topografía dramática de los Andes implica que muchos de los anfibios tienen distribuciones muy restringidas, haciéndolos más vulnerables a procesos de amenaza. Colectivamente, los cinco países tropicales Andinos (Colombia, Venezuela, Ecuador, Perú y Bolivia) tienen 472 especies globalmente amenazadas, lo que constituye un 25% del número de especies globalmente amenazadas del planeta. Brasil, el país más diverso, se ubica en cuarto lugar por el número de especies amenazadas, la mayoría de las cuales están en la región de los bosques atlánticos, y tiene un porcentaje significativamente más bajo de sus anfibios amenazados que el promedio global.

En México, ubicado en quinto lugar por su diversidad, pero segundo por el número de especies amenazadas, más del 50% de anfibios

están amenazados. Las principales amenazas en algunas regiones son la severa pérdida de hábitat y las epidemias. En los cinco países tropicales Andinos (Colombia, Venezuela, Ecuador, Perú y Bolivia) el porcentaje de especies amenazadas en relación al total de especies de la región es de 33.7%, valor éste ligeramente más alto que el promedio global.

### Especies en rápido proceso de disminución

Existen 435 especies que actualmente califican para ser listadas en las categorías de mayor amenaza de la UICN, lo cual no habría ocurrido en 1980 (STUART *et al.* 2004). Definimos a estas especies como de “rápida disminución”, y las dividimos en tres grupos con base en las siguientes causas de disminuciones: “sobre-explotadas”- disminuciones a raíz de una fuerte extracción (50 especies); “hábitat reducido”- especies que sufren de una pérdida significativa de hábitat (183 especies); y “disminuciones enigmáticas”- especies cuyas poblaciones están en proceso de disminución aún cuando existe hábitat apropiado (207 especies). En este último caso, las razones no están enteramente comprendidas, aunque enfermedades y cambio climático se perfilan como las causas probablemente más comunes. Cinco especies caen tanto en el rubro de “sobre-explotadas” como en el de “disminuciones enigmáticas”. Especies “sobre-explotadas” y de “hábitat reducido” están ampliamente registradas en muchos grupos taxonómicos, tales como aves y mamíferos, que son el centro de atención tradicional de esfuerzos conservacionistas. Sin embargo, las especies que presentan “disminuciones enigmáticas” nunca han sido registradas a un nivel comparable al que actualmente se observa en los anfibios. El porcentaje de especies que presenta “disminuciones enigmáticas” aumenta con un incremento en riesgo de extinción, desde un 9.7 % de las especies de “rápida disminución” en la categoría UICN Casi Amenazada, a un 25.0 % en Vulnerable, 47.3% En Peligro, 57.1% En Peligro Crítico, y 92.4% En Peligro Crítico (Posiblemente Extinta o cercana a extinguirse). Esta observación sugiere que los factores que causan disminuciones “enigmáticas” están llevando a las especies hacia la extinción en forma particularmente rápida.

La distribución geográfica de las especies de “rápida disminución” es no-aleatoria (Tabla 4). Las especies Neotropicales se encuentran mucho

más afectadas que, por ejemplo, aquellas en los Dominios Afrotropical e Indomalayo. Las especies del Dominio Australasia-Oceanía muestran valores promedio de especies de “rápida disminución”; pero si Australia y Nueva Zelanda se consideran como un grupo separado, tendrían significativamente más especies de “disminuciones enigmáticas” que el promedio para los anfibios en total. La distribución geográfica de las especies de “rápida disminución” (Figura 5) muestra que las especies “sobre-explotadas” se concentran en el sureste y este asiáticos; especies de “hábitat reducido” ocurren en forma más amplia, pero especialmente en el sureste de Asia, África Occidental y el Caribe; y las especies de “disminuciones enigmáticas” están restringidas mayormente a Sudamérica, Mesoamérica, Puerto Rico y Australia. Las concentraciones de especies en las tres categorías se sobreponen poco geográficamente.

Tabla 4. Preferencias de hábitat y afinidades biogeográficas de los anfibios de “rápida disminución” y “disminuciones enigmáticas” con respecto a todas las especies de anfibios

Preferencias de hábitat	Número total de especies (%)	Número de especies de “rápida disminución” † (%)	Número de especies de “disminuciones enigmáticas” ‡ (%)
Bosque	4,699 (81.8)	365 (82.6)	187 (90.3)***↑
Sabana	487 (8.5)	7 (1.6)***↓	0 (0.0)***↓
Matorrales	814 (14.2)	47 (10.6)*↓	14 (6.8)***↓
Pastizales	953 (16.6)	81 (18.3)	39 (18.8)
Agua corriente	2,650 (46.1)	277 (62.7)***↑	164 (79.2)***↑
Pantanos/ ciénagas	760 (13.2)	43 (9.7)*↓	14 (6.8)**↓
Cuerpos de agua mansa	2,030 (35.3)	107 (24.2)***↓	28 (13.5)***↓
Hábitats terrestres artificiales	1,304 (22.7)	40 (9.0)***↓	22 (10.6)***↓
Hábitats tropicales de llanura	3,392 (59.1)	212 (48.0)**↓	79 (38.2)***↓
Hábitats tropicales montañosos	2,714 (47.3)	251 (56.8)***↑	155 (74.9)***↑
<b>Dominios Biogeográficos</b>			
Afrotropical	951 (16.6)	28 (6.3)***↓	1 (0.5)***↓
Australasia/ Oceanía	561 (9.8)	36 (8.1)	23 (11.1)
<i>Australia y Nueva Zelanda</i>	219 (3.8)	32 (7.2)***↑	23 (11.1)***↑
Indomalayo	938 (16.3)	59 (13.3)	1 (0.5)***↓
Nelártico	331 (5.8)	24 (5.4)	9 (4.3)
Neotropical	2,825 (49.2)	279 (63.1)***↑	174 (84.1)***↑
Paleártico	451 (7.9)	34 (7.7)	2 (1.0)***↓

† Especies de “rápida disminución”: aquellas que ahora califican para listado en una de las categorías de mayor amenaza de la Lista Roja de la UICN, lo cual no ocurría en 1980.

‡ Especies de “disminuciones enigmáticas”: especies que han demostrado una disminución dramática o desaparición de poblaciones, aún cuando perdura un hábitat apropiado, por razones que todavía no están bien comprendidas. Ver texto para más detalles.

\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$  (27). ↑ significativamente mayor que el promedio, ↓ significativamente menor que el promedio.



Figura 5. Patrón geográfico de la causa dominante de rápidas disminuciones en especies de anfibios: “sobre-explotación” (variantes en azul); “hábitat reducido” (variantes en verde); “disminuciones enigmáticas” (variantes en rojo). Donde hay dos tipos de amenazas traslapadas en la misma celda, el color que representa al tipo de amenaza con el mayor número de especies de “rápida disminución” en esa celda es el que se indica en el mapa. Se utilizan colores intermedios en los casos en donde hay igual número de especies que experimentan dos tipos de disminuciones en la misma celda, como se muestra en la leyenda. Los colores más oscuros corresponden a números más elevados de especies de “rápida disminución” de cualquier tipo (no solamente el tipo dominante de la celda en cuestión).

Las especies de “disminuciones enigmáticas” presentan el mayor reto para la conservación porque actualmente no se conocen técnicas para asegurar su supervivencia en estado silvestre. Tales disminuciones han ocurrido aún dentro de áreas bien protegidas, tales como el Parque Nacional Yosemite, en California (KAGARISE SHERMAN & MORTON 1993), la Reserva de bosque montano de Monteverde (Costa Rica) (POUNDS & CRUMP 1994, POUNDS *et al.* 1997) y el Parque Nacional Eungella (Australia) (UICN, Conservación Internacional y NatureServe 2004). Las especies de “disminuciones enigmáticas” están positivamente asociadas a quebradas de alta elevación en los trópicos, y negativamente asociadas con aguas mansas y elevaciones bajas (Tabla 4). Varios estudios indican que la virulencia de la enfermedad micótica de quitridiomycosis – una de las más citadas causas de disminuciones “enigmáticas” – es mayor en localidades de altitud elevada y entre especies de quebradas o riachuelos. La mayoría de las “disminuciones enigmáticas” han sido registradas en las Américas al sur hacia Ecuador (p. ej., BURROWES *et al.* 2004, DROST

& FELLERS 1996, KAGARISE SHERMAN & MORTON 1993, LA MARCA *et al.* 2005, LIPS 1998, 1999, LIPS *et al.* 2004, LYNCH & GRANT 1998, POUNDS & CRUMP 1994, POUNDS *et al.* 1997, RON *et al.* 2003, YOUNG *et al.* 2001) y Brasil (ETEROVICK *et al.* 2005, HEYER *et al.* 1988), Australia (CZECHURA E INGRAM 1990, LAURANCE *et al.* 1996) y Nueva Zelanda (BELL *et al.* 2004), pero estas disminuciones están expandiéndose, por ejemplo al Perú (LÖTTERS *et al.* 2005), Chile (GLADE 1993), Dominica (MAGIN 2003), España (BOSCH *et al.* 2001) y Tanzania (WELDON & DU PREEZ 2004). Es posible que la Evaluación Global de Anfibios (GAA) subestime el número y extensión geográfica de las disminuciones “enigmáticas”, particularmente en los trópicos, donde ha habido una insuficiencia de monitoreos de anfibios. Estas disminuciones tienden a ser bastante rápidas, y pocas de ellas han sido en efecto observadas directamente. Lo que suele ocurrir más comúnmente es que los investigadores regresan a una localidad para encontrar que varias especies han desaparecido desde su última visita. Por ejemplo, recientemente se ha documentado la desaparición de ranas en el sur de México, aunque algunas de estas disminuciones probablemente ocurrieron a principios de la década de los 80 (LIPS *et al.* 2004). Igualmente, países más muestreados tienden a tener una mayor incidencia de disminuciones “enigmáticas”: por ejemplo, 12.9% en Costa Rica, comparado con el 6.0% en toda la región geográfica donde la mayoría de las disminuciones “enigmáticas” han ocurrido. También es posible que ciertas especies no estén experimentando disminuciones “enigmáticas” aún, pero que sean susceptibles a ellas, particularmente si éstas son los resultados de factores tales como la diseminación de una enfermedad contagiosa o el incremento de la severidad en las condiciones ambientales debido a cambios climáticos.

Las rápidas disminuciones de los anfibios muestran importantes patrones taxonómicos al igual que patrones regionales. Cuatro familias anfibias poseen significativamente más especies de “disminuciones rápidas” que el promedio dado para todos los anfibios: Rheobatrachidae (ranas de incubación gástrica), Leptodactylidae (ranas Neotropicales típicas), Bufonidae (sapos verdaderos) y Ambystomatidae (salamandras excavadoras).

Cuatro familias contribuyen dramáticamente al número total de especies en “rápida disminución: Bufonidae, Leptodactylidae, Hylidae (ranas arborícolas) y Ranidae (ranas en el sentido propio de la palabra). Los tres tipos de disminución varían en su importancia



para cada familia. La sobre-explotación es mucho más importante en Ranidae que en las otras grandes familias, lo que refleja la extensiva cosecha de estas especies para el consumo humano, especialmente en Asia. Las disminuciones causadas por la pérdida de hábitat son importantes en la mayoría de las familias, y las disminuciones “enigmáticas” han tenido un impacto particularmente drástico en los Bufonidae. Algunas familias muy pequeñas, tales como Rheobatrachidae, Rhinodermatidae (ranas de Darwin) y Cryptobranchidae (salamandras gigantes) también tienen altas proporciones de especies con “disminuciones rápidas”.

La gran variación entre familias en el número y proporción de especies de “disminuciones rápidas” está sesgada por el patrón geográfico no aleatorio de las disminuciones (Tabla 4). Las familias que son endémicas de las regiones donde las disminuciones “enigmáticas” han ocurrido tienden a ser más susceptibles a disminuciones serias. Si las disminuciones “enigmáticas” se extienden a otras regiones, especialmente en África y Asia, entonces es posible que algunas de las otras familias sean susceptibles a disminuciones rápidas.

Las cinco naciones tropicales andinas (Colombia, Venezuela, Ecuador, Perú y Bolivia) constituyen un centro global de especies de “disminuciones rápidas”. Un total de 118 especies de “disminuciones rápidas” ha sido registrado para estos cinco países, lo cual representa un 27.1% del total global. De estos, 11 están en el grupo de “sobre-explotación” (22% del grupo); 23 están en el grupo de “hábitat reducido” (12.6%); y 84 están en el grupo de “disminuciones enigmáticas” (40.6%). La importancia de los Andes para especies que están experimentando disminuciones “enigmáticas” es clara. Los Andes constituyen el hogar para más del 40% de estas especies, además de ser un área donde las disminuciones están expandiéndose, con informes recientes de disminuciones “enigmáticas” expandiéndose al sur a través del Perú.

## Patrones de endemismo

El número y porcentaje de anfibios endémicos por país muestra algunos patrones importantes. La Tabla 5 lista los 20 países con el mayor número de especies endémicas (es decir, que no ocurren en otros países), mientras que la Tabla 6 lista los 20 países con el mayor porcentaje de endemismos.

Tabla 5. Países con mayor cantidad de especies endémicas.

RANGO	PAÍS	ENDÉMICOS POR PAÍS
1	Brasil	467
2	Colombia	336
3	México	233
4	Madagascar	221
5	Australia	201
6	China	200
7	Estados Unidos de América	182
8	Perú	167
9	Ecuador	157
10	Papúa Nueva Guinea	157
11	Indonesia	154
12	India	150
13	Venezuela	147
14	Sri Lanka	78
15	Filipinas	77
16	Tanzania	61
17	Cuba	56
18	Malasia	54
19	República Democrática del Congo	53
20	Camerún	50

Tabla 6. Países con el mayor porcentaje de endémicos.

RANGO	PAÍS	% ENDEMISMOS
1	Jamaica	100%
2	Seychelles	100%
3	São Tomé y Príncipe	100%
4	Nueva Zelanda	100%
5	Fiji	100%
6	Palau	100%
7	Madagascar	99.5%
8	Cuba	96.6%
9	Australia	93.5%
10	Sri Lanka	83.0%
11	Filipinas	78.6%
12	Japón	78.2%
13	Puerto Rico	77.8%
14	Estados Unidos de América	69.2%
15	Chile	67.9%
16	México	66.4%
17	Papúa Nueva Guinea	66.2%
18	India	64.1%
19	Brasil	63.9%
20	China	63.5%

Los países con la mayor cantidad de especies endémicas (Tabla 5) coinciden considerablemente con aquellos con la mayor diversidad total de especies (Tabla 2), lo cual no es sorprendente. No obstante, cabe notar que varios de los países isleños que no aparecen en la Tabla 2 sí lo hacen en la Tabla 5: Sri Lanka, Filipinas y Cuba; Brasil y Colombia tienen muchas más especies endémicas que cualquier otro país, donde destacan México, Madagascar, Australia y China -cada uno con más de 200 endemismos.

Cuatro de las cinco naciones tropicales andinas (Colombia, Ecuador, Perú y Venezuela) se encuentran entre los 15 países que poseen la mayor cantidad de especies endémicas.

El porcentaje de endemismo (Tabla 6) muestra un patrón muy diferente, con seis países isleños cada uno con un 100% de endemismo (ninguno de estos con faunas anfibias muy diversas). De los países con una alta diversidad anfibia (Tabla 2), Madagascar y Australia (ambas, en esencia, islas muy grandes) destacan por sus elevados niveles de endemismo.

La Figura 6 permite dar un vistazo preliminar a las Áreas Endémicas de Anfibios. Este mapa está basado en la misma metodología adoptada por BirdLife International al definir Áreas Endémicas de Aves (EBAs por sus siglas en inglés; STATTERSFIELD *et al.* 1998). Definimos un Área Endémica Anfibia como cualquier lugar donde se dé el traslape de por lo menos dos especies con áreas inferiores a 50,000 km<sup>2</sup>. Aproximadamente el 70% de los anfibios tienen áreas de distribución inferiores a 50,000 km<sup>2</sup>, comparado con solamente el 25% de las especies de aves.

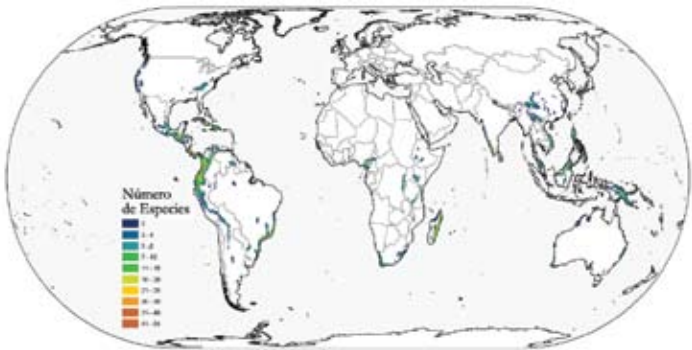


Figura 6. Áreas Endémicas de Anfibios.

La Figura 6 parece notoriamente semejante al mapa global de las Áreas Endémicas de Aves (y también se asemeja a otros mecanismos de definición de prioridades tales como los “Hotspots” de Conservación Internacional). Claramente, los anfibios con áreas pequeñas de distribución se concentran generalmente en las mismas áreas que las aves. Los resultados preliminares para mamíferos también revelan un patrón muy semejante, lo que sugiere algunos patrones biogeográficos fundamentales que tienden a incluir grupos taxonómicos diversos, con distintos patrones de historia de vida, y diferentes tendencias de diversidad alfa-beta. Estos patrones fundamentales son claramente claves para guiar el desarrollo de estrategias de conservación en el futuro.

Nuestro análisis de Áreas Endémicas Anfibias incluye especies Datos-Deficientes, las que talvez debieran haber sido omitidas, dado que incluyen un número de especies actualmente conocidas sólo por sus localidades tipo, pero que podrían tener mayor distribución. Sospechamos que si estas especies Datos-Deficientes son removidas, algunas de las Áreas Endémicas Anfibias en lugares tales como las cuencas Amazónica y del Congo desaparecerían, resultando en un mapa aún más semejante a aquél de las Áreas Endémicas de Aves.

## Amenazas

Una variedad de amenazas están impactando a las especies de anfibios alrededor del mundo, ocasionando las dramáticas disminuciones poblacionales documentadas durante la Evaluación Global de Anfibios (GAA). Para mejor comprender las principales amenazas a los anfibios, los investigadores de la GAA reportaron aquellas amenazas conocidas para cada especie de anfibio utilizando una lista estandarizada de amenazas principales (el Archivo de la Autoridad en Amenazas Principales de la UICN). Un resumen del número de especies afectadas por cada proceso de amenaza se muestra en la Figura 7.

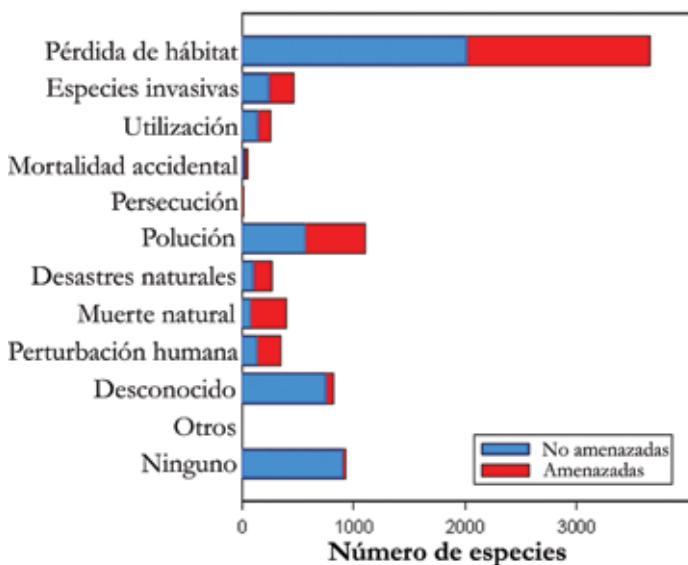


Figura 7. Amenazas principales para los anfibios.

Las pérdidas de hábitat y degradación son, de lejos, las mayores amenazas a los anfibios en este momento, ya que afectan a casi 4000 especies. El número de especies impactadas por la pérdida de hábitat y la degradación es casi cuatro veces mayor que la siguiente amenaza más común, la contaminación. Aunque las enfermedades parecen ser una amenaza relativamente menos significativa para los anfibios, para aquellas especies afectadas pueden ocasionar disminuciones poblacionales repentinas y dramáticas, lo que resulta en una rápida extinción. En comparación, aunque la pérdida de hábitat y la degradación afectan a un número mucho mayor de especies, la tasa a la cual una especie disminuye es usualmente mucho más lenta, y existen una serie de estrategias, tales como la creación de áreas protegidas, para contrarrestar esta amenaza.

## Preferencias de hábitat

Las preferencias de hábitat para cada especie de anfibio fueron registradas por los investigadores de la Evaluación Global de An-

fibios, a través de una lista estandarizada de los hábitats principales (el Archivo de la Autoridad en Hábitats de la UICN, [http://www.iucnredlist.org/info/major\\_habitats](http://www.iucnredlist.org/info/major_habitats)). Un resumen de los hábitats más importantes para los anfibios se muestra en la Figura 8.

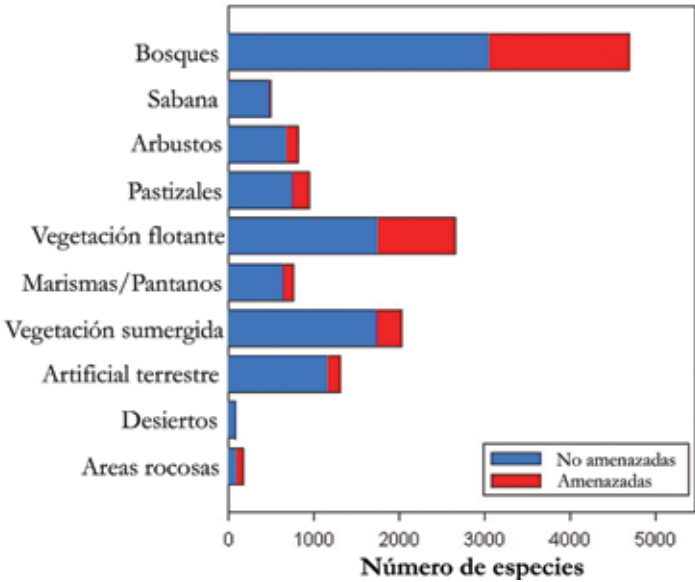


Figura 8. Las preferencias de hábitat principales de los anfibios.

La gran mayoría de los anfibios—casi 5000—dependen de los bosques. Otros hábitat terrestres son menos preferidos por los anfibios, en particular los hábitat más secos, tales como las sabanas y los desiertos. Estos resultados no son sorprendentes, puesto que los anfibios son conocidos por su preferencia por lugares húmedos.

Tal vez un resultado más sorprendente es que sólo 3908 anfibios dependen del agua dulce durante alguna etapa de su ciclo de vida. Los anfibios son reconocidos por sus dos estilos de vida, comenzando como juveniles en hábitats acuáticos para luego metamorfosearse en adultos terrestres. Sin embargo, aunque esta es la estrategia de historia de vida más común para los anfibios, también hay muchas especies que se desarrollan directamente de los huevos sin pasar por la etapa

larval (y algunas especies incluso tienen desarrollo directo —es decir, son “vivíparas”). Muchas de estas especies no dependen para nada de un hábitat de agua dulce.

Los hábitats de agua dulce preferidos por los anfibios han sido clasificados dependiendo de si es que son aguas mansas, corrientes o pantano-cenagosas (a diferencia de las aguas mansas - abiertas - estos últimos son dominados por vegetación emergente).

Un hábitat de agua dulce mansa son frecuentemente las pozas temporales producto de lluvias u otras pequeñas charcas de agua dulce. Un hábitat de agua dulce corriente son usualmente las quebradas o riachuelos. Un hábitat de agua dulce pantano-cenagosa son frecuentemente ambientes de agua dulce mansa dominados por vegetación emergente. Esta distinción entre diferentes tipo de hábitats de agua dulce tiene una fuerte influencia en la probabilidad de que una especie esté amenazada. Por ejemplo, las especies que están asociadas con agua corriente tienen una probabilidad mucho más alta de estar amenazadas que aquellas que usan aguas mansas (Tabla 4).

## Conclusión

Los descubrimientos de la Evaluación Global de Anfibios (GAA) confirman las sospechas anteriores de que las disminuciones rápidas y pobremente explicadas en las poblaciones de anfibios están suscitándose adicionalmente a las causas típicas de pérdida de biodiversidad, incluyendo la pérdida del hábitat y la sobre-explotación (las que también son serias amenazas para los anfibios). De esta investigación se desprende que los anfibios están más amenazados, y están disminuyendo más rápidamente, que las aves o los mamíferos (BAILLIE *et al.* 2004, BirdLife International 2004, UICN 2004).

Las disminuciones “enigmáticas” han afectado 48% de las especies de rápida disminución, y son las que están llevando a una extinción más rápida de las especies. Las disminuciones son no-aleatorias en términos de las preferencias ecológicas de las especies, distribuciones geográficas y asociaciones taxonómicas, y son más prevalentes entre las especies asociadas a quebradas de las zonas montañosas Neotropicales.

Las disminuciones “enigmáticas” están ahora ampliamente documentadas en las áreas montañosas de Mesoamérica, Colombia, Venezuela, Ecuador y Australia, y también hay reportes de Chile, el sureste de Brasil, las islas del Caribe, y los Estados Unidos. Recientemente, las disminuciones “enigmáticas” parecen estar expandiéndose hacia el sur en los Andes peruanos, al igual que en Nueva Zelanda, Tanzania y España.

La mayoría de los modelos de tasas de extinción se basan en predicciones de la pérdida de hábitat, ya sea como un resultado directo de la actividad humana o del cambio climático (p. ej., THOMAS *et al.* 2004). Dado que estos modelos no toman en cuenta las disminuciones “enigmáticas” del tipo que afecta a las especies de anfibios, ellos subestiman la tasa actual de extinciones en los anfibios. Para una especie que enfrenta una disminución “enigmática”, la única opción de conservación actualmente disponible es la crianza en cautiverio, pero muchas de las especies afectadas son difíciles de mantener bajo condiciones *ex situ*. Si estas disminuciones no son rápidamente comprendidas y revertidas, se puede esperar que cientos de especies de anfibios se extingan en las próximas décadas.

## Agradecimientos

Los autores desean agradecer a Diego Cisneros-Heredia por su ayuda en la traducción del presente trabajo al español y a la American Association for the Advancement of Science (AAAS) y su revista *Science* por permitir el uso de material publicado en la referencia: Stuart, S.N., Chanson, J.S., Cox, N.A., Young, B.E., Rodrigues, A.S.L., Fischman, D.L. y Waller, R.W. 2004. Status and trends of amphibian declines and extinctions worldwide. *Science* 306: 1783-1786 en la elaboración del presente trabajo.





*Phyllobates femoralis*



*Dendrobates variabilis*

# Hacia una estrategia regional de investigación y conservación para los anfibios de los países tropicales andinos. ¿Una oportunidad?

*José Vicente Rodríguez-Mabecha<sup>1</sup>*

## Introducción

Desde su creación la Iniciativa Atelopus se propuso como reto la generación de una estrategia regional de investigación y conservación de los anfibios de los cinco países tropicales andinos (Bolivia, Colombia, Ecuador, Perú y Venezuela) que comprendiese los lineamientos guía de todo lo necesario para enfrentar esa terrible realidad de la declinación acelerada de las poblaciones que estamos padeciendo de manera acelerada. Una primera aproximación para el corto plazo surgió consensualmente en el primer taller desarrollado en agosto del 2004 en la ciudad de Villa de Leyva, Colombia. Allí con la participación de 35 científicos expertos en la Región Andina procedentes de 10 países (Alemania, Bolivia, Colombia, Costa Rica, Ecuador, Panamá, Perú, Reino Unido, EEUU y Venezuela) se gestaron algunos de los lineamientos que aquí se comentan.

Teniendo en cuenta que la problemática de declinación de las poblaciones de anfibios es similar en sus efectos en todos los países de la región, sí es diferente el contexto y receptividad con la cual ha sido recibida esta propuesta regional, ya que por razones obvias los ejercicios participativos en escenarios nacionales son más incluyentes y pueden vincular muchos más colaboradores y de la misma forma ser más aceptados y validados por las autoridades respectivas. Este es el

---

1. Unidad de Conservación de Especies del Centro de Conservación de la Biodiversidad de los Andes Tropicales (AndesCBC). Conservación Internacional. [jvrodiguez@conservation.org](mailto:jvrodiguez@conservation.org)

ejemplo de Venezuela donde por el liderazgo de un connotado grupo de investigadores de diferentes instituciones se ha venido desarrollando un proceso participativo que los llevará a plasmar en el corto tiempo una Estrategia Nacional que será pionera en la región.

Consideramos que si bien es cierto que inicialmente la Iniciativa Atelopus y el conjunto de investigadores en su primera reunión promovieron como meta el desarrollo de una estrategia con una visión regional, es igualmente valioso que siguiendo el ejemplo de Venezuela, todos los demás países desarrollaran participativamente su estrategia nacional de acuerdo a sus realidades institucionales, culturales y socio económicas que sirva de guía maestra avalada y aceptada por las instancias gubernamentales, académicas y de la sociedad civil relacionadas con la temática. De todas maneras la sumatoria de estas experiencias generarán indudablemente procesos que implementará de manera específica la Estrategia Regional de Biodiversidad para los países del Trópico Andino promovida por la CAN (Comunidad Andina) en el marco de la Decisión 523 de 2002.

Este proceso no es necesariamente complejo pero puede que no sea factible en el corto plazo en algunos países donde el conjunto de investigadores relacionados no sea extenso para acometer, por ello creemos que compartiendo lo recomendado en la reunión de Villa de Leyva pueda estimular iniciativas locales para ganar experiencia e impulsar a los rezagados en la planificación de las acciones que buscarán enfrentar la terrible amenaza de declinación poblacional y pérdida de biodiversidad de este grupo que no tiene comparación alguna con lo sucedido en tiempos recientes.

## El porqué de la estrategia

El objetivo principal de una estrategia para la investigación y conservación de los anfibios debe ser el de proveer un marco teórico sobre el cual se puedan fundamentar acciones concertadas a largo plazo, generando así una estructura y dirección para poder priorizar actividades y formular acciones efectivas y costo-eficientes. Debe facilitar además la identificación de actores relevantes, la repartición de tareas institucionales, así como la identificación de fuentes de fi-

nanciamiento potenciales e identificación de fondos de contrapartida de sustento para llevar a cabo las actividades necesarias.

El proceso de desarrollo e implementación de la estrategia debe ser dinámico y participativo. Dinámico porque es un proceso continuo y adaptable, donde las acciones se redefinen en la medida que exista o se adicione información novedosa, y participativo porque todas las personas e instituciones interesadas deben ser bienvenidas a colaborar, tanto en el desarrollo como en la implementación de las actividades necesarias.

Cabe mencionar varios aspectos que posibilitan que una estrategia sea exitosa en su operación. Estos condicionantes incluyen la colaboración y un alto nivel de compromiso, tanto de instituciones como de miembros de la sociedad civil a nivel regional e internacional y, en una visión más amplia, la participación activa de las diversas comunidades, desde la académica hasta la política. En particular, debe considerarse la vinculación de personal especializado o de instituciones específicas para el desarrollo de actividades clave (por ejemplo, la actualización del marco jurídico en el manejo de los recursos naturales); e involucrar al Estado desde el inicio para lograr una capacidad de convocatoria más amplia y alcanzar un poder de decisión y ejecución relevante; por último si se logra esta sinergia institucional e individual será relativamente más sencillo obtener disponibilidad de fondos para llevar a cabo las actividades propuestas.

## Estructura de la estrategia

El grupo de especialistas andinos recomendó tres componentes clave para una estrategia regional que consideramos son aplicables y necesarios a nivel de todos los países: 1) Investigación y monitoreo de poblaciones, 2) Divulgación, comunicación, capacitación y recaudación de fondos, y 3) Conservación. Para el desarrollo de la estrategia cada línea de acción debe tener una serie de resultados para ser logrados en un determinado tiempo, los cuales deben alcanzarse mediante actividades específicas. Estas actividades, a su vez, deben ser monitoreadas a través de indicadores, identificando igualmente las entidades o personas y los potenciales colaboradores responsables para desarrollarlas.

## El caudal informativo histórico. Un punto de partida

Es razonable suponer que para la preparación de la discusión de cualquier planteamiento estratégico se deba partir del acopio de la información existente y de su actualización y adecuación para futuros análisis. Este conjunto de datos que ya existe en todos los países acumulado en las colecciones de referencia de los Museos de Historia Natural, requiere de acciones prioritarias para su sistematización y georreferenciación. Aunque esta labor ha sido iniciada gradualmente en muchas instituciones, dista mucho de estar actualizada o completada, especialmente por el gran volumen de datos acopiados en los Museos de la región e incluso del extranjero. Los estimativos actuales señalan que existen alrededor de unos 200.000 ejemplares en museos nacionales y cerca de 150.000 ejemplares en otros museos del mundo, principalmente en Norteamérica y Europa.

Es indudable que esta labor requiere de esfuerzos muy grandes de curatoría para concluir la actualización taxonómica de muchos ejemplares o la descripción de nuevas especies, algunas recientemente colectadas y otras depositadas allí durante el desarrollo de cada colección. No obstante, a pesar de que estas labores forman parte del diario quehacer del personal de los museos, es necesario resaltar que la misma debe recibir una mayor atención en cualquier estrategia que pretenda lograr un diagnóstico actualizado de los lugares de importancia para la conservación de los anfibios de una región determinada. Igualmente esta información es necesaria para evaluar con la rigurosidad necesaria el impacto de los eventos sinérgicos que están causando las declinaciones poblacionales de anfibios y la constricción de los areales de distribución de las especies afectadas, así como de los procesos nacionales de recategorización del estatus de conservación.

Indudablemente son muchos los beneficios que la información histórica pueden brindar y por ello la elaboración y refinamiento de los catálogos de localidades de colecta para anfibios debe ser un ejercicio complementario a la sistematización de los datos de cada país. Con ellos en construcción podremos aprovechar que muchos de los colectores que aún están en actividad puedan aportar descripciones o precisiones adicionales sobre los sitios de colecta; ya

que era frecuente en el pasado no llegar al detalle de los lugares de las capturas limitando el valioso aporte de información geográfica que un ejemplar puede brindar.

Los éxitos en esta labor nos acercarán a identificar primero que todo los vacíos de conocimiento y priorizar cuales áreas inexploradas requieren ser objeto de inventarios exhaustivos por su potencial importancia para la conservación de los anfibios, además de que podrá mostrarnos un escenario de lo que ha sido en el contexto histórico la herpetofauna de una región o país.

Como ya se mencionó antes, esta tarea básica ha venido acometiéndose gradual y paralelamente con otras acciones en todos los países; no obstante siempre será deficiente debido a las limitaciones de los recursos económicos de los museos y a la capacidad de los taxónomos para revisar el gran número de ejemplares acumulados. Con esta labor actualizada se podrá empezar a consolidar el banco de datos de los anfibios del país siguiendo parámetros estandarizados y así responder a muchas preguntas que de otra manera serían imposibles de resolver o que requerirían un tiempo considerable en el acopio y análisis. Es indudable que este logro hace más eficiente la gestión de una organización e igualmente facilita la evaluación de las necesidades que deban ser plasmadas en solicitudes de apoyo financiero y científico.

Todo lo anteriormente considerado debe conducir a un primer resultado de la estrategia, que es el establecimiento de un banco de datos para los anfibios, que puede incluir otros parámetros además de los anteriormente señalados, tales como archivos de sonidos, archivos de imágenes, bibliografía, análisis de amenazas, estatus poblacional y estatus de conservación a nivel global y nacional. Con esa plataforma de información montada, el ideal para incrementar la información disponible es el de establecer acciones de inventario en áreas poco conocidas o totalmente inexploradas, así como programas de monitoreo de especies amenazadas, bien sea que hayan sido declaradas ya formalmente o que se sospeche que se encuentran en peligro y, que por ausencia de información no hayan sido adecuadamente categorizadas. Estos programas de seguimiento deben ser seguir

en lo posible métodos estandarizados, como los expuestos en otros capítulos de esta obra.

Una segunda meta para alcanzar es la de incrementar el número de investigaciones sobre especies potencialmente amenazadas, es decir aquellas que hayan sido categorizadas como Datos Deficientes (DD) o Casi Amenazadas (NT). El primer esfuerzo sobre estas especies debe estar dirigido a evaluar la situación actual a nivel poblacional, definir su ámbito de distribución geográfica, evaluar el estado del hábitat, identificar las amenazas de diversa índole, entre otras el impacto de especies introducidas, y muy especialmente el estado sanitario o de infección por chitridomicosis. Igualmente se debe indagar y sistematizar la presión de uso (ya sea para fines alimenticios, farmacéuticos, y comerciales) y valorar el volumen de captura de animales vivos con destino al mercado de mascotas, centros de experimentación etc.

La estrategia debe considerar el aspecto divulgativo, tanto para estimular una conciencia ciudadana sobre la importancia de los anfibios y del peligro en que se encuentran, como también de compartir la información sobre su diversidad con el público en general. Para ello las campañas publicitarias creativas asociadas a programas de campo y difundidas por todos los medios de comunicación pueden tener un gran impacto.

Como actividad fundamental para compartir el conocimiento sobre la biodiversidad se debe estimular el desarrollo de guías de identificación para las especies del país o de ciertas regiones, igualmente de parques nacionales u otras áreas de conservación o de interés particular de la sociedad civil. Todos estos elementos ambientan los escenarios propicios para convencer a los donantes a invertir en los proyectos específicos o generales. De esta manera se incrementa la capacidad de captación de fondos y se contribuye al apropiado desarrollo de campañas de recaudación que permitan el logro de los propósitos de la estrategia. Otras oportunidades para obtener recursos puntuales está dada por los programas de padrinazgo de especies, en estos casos se debe consensuar la identificación de un banco de especies nuevas lo suficientemente atractivas para que el beneficiario de una especie aporte recursos importantes para

la compra de terrenos u otras labores que sean necesarias para la conservación de la misma.

El entrenamiento y la capacitación es otro de los aspectos cruciales en cualquier estrategia; por lo tanto el diseño de cursos sobre inventario y monitoreo como los que la Iniciativa Atelopus ha venido desarrollando, deben consolidarse y ser adoptados como cursos elegibles con créditos para el estudiante por universidades u otras instituciones académicas interesadas.

La generación de redes locales con diferentes tipos de miembros estimula el intercambio de experiencias entre los investigadores y debe ser el órgano de difusión de la estrategia donde se invite a la implementación de las acciones identificadas y se promueva la organización de encuentros y otros eventos presenciales y otros eventos relacionados.

Para el desarrollo del componente de conservación in situ se debe promover la identificación de las áreas de importancia para la conservación de los anfibios, las cuales surgen del análisis de la información compilada en la base de datos y del juicio de expertos. Estas áreas deben ser definidas mediante criterios consensuados que incluyan endemidad, categoría(s) de amenaza de la especie(s), procesos singulares, tales como áreas de reproducción o de concentración buscando articularlas o declararlas como áreas protegidas haciendo sinergia con otras áreas identificadas para fines similares, como han sido las IBAS o AICAS, que son áreas que protegen aves en peligro u otros grupos animales. Otras acciones novedosas para el manejo y aprovechamiento sostenible de grandes áreas naturales han sido las concesiones de conservación, las cuales ha impulsado el Perú, y que son considerables extensiones donde comunidades campesinas manejan el aprovechamiento de especies mediante la maximización de la oferta natural de grupos reproductivos, a cambio de que la comunidad se comprometa a brindar protección al hábitat evitando destruir la cobertura boscosa. Estas concesiones pueden ser una excelente herramienta para la protección de cuencas hidrográficas, pero requieren de compromiso comunitario y del respeto de los acuerdos internacionales sobre comercio de especies amenazadas como la CITES.



En cuanto a la conservación ex situ es conveniente que se identifiquen las capacidades institucionales para el manejo de individuos en condiciones controladas, y se diseñe un programa de capacitación en las técnicas de manejo. Idealmente los centros donde se manejen individuos de especies amenazadas deben contar con representación de los pisos térmicos cálidos y fríos de los países, dado que el manejo de especies que tienen grandes exigencias de control de temperatura no siempre es fácil de adelantar por lo costoso del proceso. Igualmente el tener más de un centro posibilita una activa participación de interesados que se apropien con más fortaleza en la conservación de una especie o grupos de ellas cuando son de su región. El objetivo de estos centros debe estar orientado al estudio de la biología reproductiva de las especies, además de otros aspectos relativos al comportamiento, incidencia de enfermedades, desarrollo de resistencia a las mismas, todo ello con la visión de adelantar programas de reintroducción con criterios consensuados y protocolos de monitoreo eficientes.



*Dendrobates variabilis*

# Diseño experimental y análisis estadístico

*Adolfo Amézquita<sup>1</sup>, César Molina<sup>2</sup> & Juan Elías  
García-Pérez<sup>3</sup>*

## Introducción

Probablemente la primera pregunta que el lector se haga en relación con este capítulo es si debería existir. Se podría pensar que la información sobre el análisis de datos de inventario y monitoreo de anfibios puede ser obtenida de los libros de estadística. Sin embargo, la estadística que aparece en los libros de texto, la que se suele enseñar en los cursos básicos universitarios, la que utilizamos en los experimentos cuidadosamente diseñados en el laboratorio (y ocasionalmente en el campo), es usualmente insuficiente para los estudios de inventario y monitoreo. La razón es simple. Como otros estudios de campo, los estudios de inventario y monitoreo se caracterizan porque los datos suelen no cumplir a cabalidad algunos preceptos de la estadística básica. En un estudio de inventario, por ejemplo, las estaciones de muestreo suelen no mantener el mismo nivel de independencia entre ellas; en el caso de estudios de monitoreo, realizar muestreos sucesivos sobre la misma área afecta profundamente el nivel de independencia entre los datos. En contra de lo que a veces se piensa, los datos obtenidos de inventarios y monitoreos no son simples conteos de especies o individuos; representan más bien complejos esquemas en los que extraer la información no siempre

1 Departamento de Ciencias Biológicas, Universidad de los Andes, AA 4976, Bogotá, Colombia. Correo electrónico: aamezqui@uniandes.edu.co

2 Oficina Nacional de Diversidad Biológica, Ministerio del Ambiente y de los Recursos Naturales, Centro Simón Bolívar, Torre Sur, piso 6, Of. 611, Caracas, Venezuela. Correo electrónico: cesar.molinarodriguez@gmail.com

3 Museo de Zoología, Programa de Ciencias del Agro y el Mar, Vice-Rectorado de Producción Agrícola, UNELLEZ, Guanare, Portuguesa, Venezuela. Correo electrónico: jegarcia@cantv.net

es fácil. Para afrontar estos problemas, son necesarias estrategias de análisis más realistas, es decir, que involucren escenarios en los que los preceptos de independencia y representatividad de las muestras son en alguna medida violados.

Muy pronto en la formación de los investigadores se hace claro que es preferible invertir tiempo en la planeación de un estudio y en la colecta juiciosa (i.e. bien fundamentada, ajustada a las decisiones iniciales sobre el diseño experimental) de datos, que experimentar la frustración de nadar en mares de información sin conseguir evidencia suficiente para apoyar la presencia o ausencia de patrones con respecto a las variables de estudio. En una situación así, es inevitable pensar que se ha perdido buena parte del enorme esfuerzo y del dinero que se invirtieron para conseguir la información deseada. Nos motiva reducir la probabilidad de que el entusiasmo inicial madure en frustración. Y nos motiva también la perspectiva de que la comunidad herpetológica latinoamericana contribuya a originar una sólida base de conocimientos acerca de los mecanismos responsables de generar y mantener la diversidad de anfibios en el trópico; una base de conocimientos que realmente sirva para tomar decisiones políticas educadas sobre la conservación y el uso de la biodiversidad.

La buena noticia es que la estadística y el diseño experimental han avanzado lo suficiente como para tratar datos con problemas de dependencia espacial o temporal. La otra noticia es que la naturaleza de tales avances no puede ser presentada en detalle dentro de un capítulo introductorio y con las limitaciones de espacio que caracterizan a un libro como éste. Hemos hecho, sin embargo, un esfuerzo por: (1) presentar los fundamentos conceptuales que afectan las decisiones sobre el diseño y el análisis del estudio, (2) resumir en unas pocas frases la lógica que subyace cada una de las técnicas estadísticas recomendadas, y (3) construir un diagrama de flujo que ayude a tomar las decisiones iniciales sobre las estrategias de análisis. El lector debe entonces considerar este libro como un apoyo para planear, desde la perspectiva del diseño experimental, un estudio de inventario y monitoreo, o para escoger las técnicas estadísticas que le permitirán analizar un conjunto de datos que ya existe. Recomendamos al lector aproximarse a este capítulo en una variante de la secuencia de los objetivos: empezaría por estudiar (o repasar) los fundamentos

presentados, utilizaría luego el diagrama de flujo para seleccionar las posibles técnicas a utilizar en relación con el tipo de investigación, repasaría los fundamentos de estas técnicas y, finalmente, consultaría otras fuentes bibliográficas para conseguir el dominio conceptual necesario para utilizarlas e interpretarlas.

## Fundamentos de diseño experimental

La acumulación de datos en estudios biológicos se relaciona con alguno de tres objetivos fundamentales. El investigador puede estar interesado en (1) describir cuantitativamente una característica o proceso, (2) agrupar individuos, especies o localidades con base en sus características, o (3) proponer relaciones de causalidad, es decir, establecer en qué medida la variación en una característica o proceso puede ser atribuida a la variación en una o más variables estudiadas. Por ejemplo, un investigador que pretende estimar la riqueza de especies en una nueva área protegida y que, además, intenta calcular cuál es el margen de error con respecto a su estimación estaría resolviendo un problema de tipo 1 (descripción). Alguien interesado en clasificar un número de hábitats (o comunidades) con base en la presencia o ausencia de un conjunto de especies, estaría interesado en resolver un problema de tipo 2 (clasificación). Finalmente, quien se preocupa por entender cuáles características ambientales podrían explicar las diferencias en abundancia de individuos de una especie estaría resolviendo un problema de tipo 3 (causalidad). En otras palabras, el análisis de los datos permitiría probar la hipótesis biológica de que ciertas características ambientales causan variación en la abundancia de individuos. En la jerga estadística, el análisis establecería la probabilidad de equivocarse al descartar la hipótesis nula de que las características ambientales no se relacionan con la abundancia. Si esta probabilidad es pequeña (p.ej.  $P < 0.05$  ó  $P < 0.01$ ), el análisis indicará que es aceptable rechazar la hipótesis nula. Los valores de 0.05 y 0.01, que se utilizan como un criterio estándar para la toma de estas decisiones, no representan un paradigma sagrado ni una cifra descubierta a partir de profundas reflexiones filosóficas: sugerir que un valor  $P$  de 0.047 representa evidencia inobjetable de relaciones causales mientras un valor de 0.053 no, es por lo menos absurdo. La

ausencia de números mágicos en este sentido implica que el investigador debe además hacer un esfuerzo de interpretación de sus propios datos para poder explicar los resultados de sus análisis.

En cualquiera de los tres casos, la materia prima para resolver el problema consiste en un conjunto de objetos (individuos, poblaciones, especies, cuadrantes, sitios, ecosistemas, muestreos) y un conjunto de atributos (abundancia, riqueza, temperatura, luminosidad, tipo de hábitat) que pueden ser medidos en cada uno de los objetos.

Existen varias maneras de medir los atributos (variables) que se estudian. En la situación más simple, se puede asignar a cada objeto una categoría que se desprende de las observaciones. Por ejemplo, se puede declarar que se trata de un *área intervenida* o *bosque maduro* en relación con el atributo *Tipo de hábitat*, o que se trata de un individuo *juvenil*, *macho*, o *hembra*, en relación con el atributo *Sexo*. En estos casos se dice que la variable que describe el atributo es de tipo **categórica**. En una variante de la situación anterior, tres o más categorías pueden ser ordenadas de una manera que tenga sentido biológico. Por ejemplo, el *Grado de perturbación antrópica* de un hábitat podría ser clasificado como *alto* (existencia de cultivos y construcciones para varias familias), *medio* (tala y quema de árboles para el cultivo de chagras/chacras), *bajo* (tala selectiva de algunos árboles para extracción de madera) y *nulo* (no hay perturbación aparente por los seres humanos). En este caso hipotético, el orden de las categorías es único (no es intercambiable) por lo que podemos describir este atributo como de tipo **ordinal**; sin embargo, no podemos garantizar que la diferencia entre hábitats de perturbación *alta* y *media* es la misma que entre hábitats de perturbación *media* y *baja*, por lo que decimos que la variable no utiliza un intervalo que tenga sentido. Finalmente, existe la posibilidad de describir el grado de perturbación antrópica con base, por ejemplo, en fotografías aéreas sobre las que se puede estimar la proporción de área deforestada en relación con el área total cubierta por la fotografía. En este caso, la *Proporción de área deforestada* es un atributo de tipo continuo, cuyos intervalos tienen sentido (i.e. la diferencia entre 0.5 y 0.6 de área deforestada es la misma que entre 0.8 y 0.9).

Los puntos más importantes a considerar en el diseño de un estudio se relacionan precisamente con las características de los atributos (variables) y de los objetos (unidades de análisis). Entre los problemas asociados con los atributos, nos interesa principalmente la validez interna. Existe una diferencia entre, por ejemplo, la densidad de individuos como el atributo biológico de una especie en una localidad y la estrategia que utilizamos para estimar esa densidad: la variable. El número de individuos avistados en 100 m<sup>2</sup> puede no ser un buen indicador de la densidad real de individuos en especies que son crípticas; la tasa de recaptura puede ser inútil para estimar el tamaño (o la densidad) de una población, si la técnica de marcaje reduce la probabilidad de supervivencia de los individuos marcados. La calidad de un estudio, y de las conclusiones que de él se derivan, depende en buena parte de su validez interna, es decir, de la buena relación que exista entre los atributos biológicos sobre los cuales se quiere hacer inferencias y las variables que se utilizan para estimarlos.

Entre los problemas asociados con los objetos de estudio, mencionaremos la *representatividad* y la *independencia* de la muestra. Lo usual en diseño experimental es que si queremos hacer inferencias sobre un universo de objetos, no estudiemos cada uno de los objetos que lo componen, sino una muestra que los represente. La idea parece ser simple pero ha probado ser difícil de aplicar o evaluar en situaciones reales. Por ejemplo, continuando con la idea del estudio acerca del efecto de la perturbación antrópica sobre la riqueza de especies, en algún momento tendríamos que afrontar la decisión sobre cuántos sitios planeamos incluir y, tal vez lo más importante, cuáles sitios representarán la condición *perturbado* y cuáles la condición *no perturbado*. Por razones que van desde limitaciones geográficas impuestas por quienes nos financian un estudio, hasta la belleza del paisaje o la calidez de sus gentes, podríamos seleccionar sitios en los que la perturbación antrópica podría consistir en cultivos secos (7 sitios), cultivos inundados (p.ej. de arroz; 1 sitio) y áreas de ganadería (2 sitios). De manera similar, los 10 sitios que escogiésemos como representativos de la condición no perturbada, podrían diferir en el área total del bosque que la contiene, la complejidad estructural del hábitat, o la distancia a un ecotono. El problema en realidad no está en que los sitios que representen la condición *perturbada* (o la

condición *no perturbada*) difieran entre sí. Sería inútil procurar una situación como la de laboratorio, en la que los objetos son iguales con respecto a todos sus atributos, excepto aquellos que se estudian (la condición de perturbación y la riqueza de especies). El problema está en pretender hacer una inferencia sobre el efecto de la perturbación utilizando sitios principalmente perturbados por la existencia de cultivos, cuando (tal vez) la perturbación más frecuente de los bosques tropicales consiste en el establecimiento de áreas de ganadería. Al final, la mayor perturbación podría ser la que se ve en el investigador, al reconocer que no puede hacer inferencias ni sobre el efecto de la perturbación ni sobre el efecto de la ganadería (a menos que elimine algunos sitios) en la riqueza de especies.

Utilizar una muestra verdaderamente representativa del universo implicaría conocerlo con suficiente detalle, como ocurre por ejemplo en las encuestas profesionales donde la muestra empleada suele representar las proporciones de sexos, edades y estatus socioeconómico de la población original. En esta forma de muestreo sistemático, el investigador consigue formar una especie de universo en miniatura, que le permite realizar inferencias sólidas sobre el universo real. Esta situación es, sin embargo, rara en los estudios biológicos. Dado el contexto, probablemente la mejor solución para incrementar la representatividad de la muestra consiste en utilizar hasta donde sea posible la información existente sobre el universo (como en las encuestas profesionales) e incrementar hasta donde sea lógicamente razonable el número de objetos. En términos generales, un mayor número de objetos suele implicar una mejor representatividad de la muestra, si los objetos son escogidos al azar en relación con el universo. La escogencia aleatoria de los objetos puede ser apoyada por el uso de tablas de aleatorización (ver capítulo de inventarios en este libro), o las funciones RND o RN que generan números aleatorios en una calculadora o un computador. En una situación más agreste, se puede pensar en el uso de dados, o en la escogencia a ciegas entre cartas o papелitos marcados y adecuadamente mezclados.

El problema de *independencia* entre los objetos de estudio es probablemente el más prevalente (extendido, generalizado), perjudicial (nocivo, dañino, desventajoso) y perverso (maligno, maldito y

execrable). En el párrafo anterior mencionamos que no es realista esperar que los objetos de una muestra biológica sean idénticos con respecto a todos sus atributos, excepto aquellos que se estudian. En este párrafo asumimos que sean diferentes, pero esperamos que sean más o menos “igualmente diferentes”. Semejante giro idiomático simplemente implica que los objetos de la muestra no formen grupos naturales con respecto a las variables no estudiadas o, utilizando la jerga estadística, que el efecto de las variables no estudiadas (**error**) se distribuya al azar entre los objetos.

Por ejemplo, en un estudio donde se quiere establecer si la precipitación anual se relaciona con la riqueza de especies se utilizan 20 sitios. Si 7 de los sitios pertenecen a la vertiente oriental de una cordillera, mientras los otros 13 pertenecen a la vertiente occidental, podemos suponer que el nivel de independencia entre dos sitios que pertenecen a la misma vertiente no es el mismo que entre sitios que pertenecen a vertientes opuestas. Esta suposición podría implicar un grave problema de diseño experimental si, como suele ocurrir, las vertientes difieren en otras variables, además de la precipitación anual. Si una de las vertientes está más cerca de un puente biogeográfico, la riqueza de especies podría ser mayor simplemente porque esta vertiente está conectada con un área biogeográficamente privilegiada. El investigador concluiría que la precipitación está positivamente correlacionada con la riqueza de especies, pensando erróneamente que tal conclusión está soportada por 20 sitios independientes. En el escenario propuesto, el efecto de la precipitación podría confundirse con el efecto de la proximidad geográfica al puente biogeográfico, porque los 20 sitios no son igualmente independientes entre sí con respecto a por lo menos una de las variables no estudiadas (la proximidad geográfica). Para reducir el problema de la confusión de efectos, el investigador podría considerar únicamente dos de estos sitios (uno en cada vertiente) y agregar otros sitios en áreas diferentes, que mantienen niveles similares de independencia entre ellos. En otros escenarios en los que el problema es menos severo, es posible utilizar técnicas que consideran la distribución espacial de los objetos (en este caso los sitios) y permiten medir su nivel de independencia en ese sentido (ver Autocorrelación espacial y temporal).



El problema de confusión de efectos puede ser grave en experimentos de laboratorio y campo. Cuando las réplicas de un experimento no son verdaderas réplicas en el sentido de que las variables no estudiadas se distribuyen de manera sesgada entre ellas, abriendo el camino para la confusión de efectos, se habla de pseudoreplicación. La mejor manera de reducir este riesgo sería asignar de manera aleatoria cada uno de los objetos a los tratamientos experimentales. Recomendamos al lector revisar con atención lo que se considera un clásico de la literatura científica sobre este tema: el artículo de S. H. HURLBERT (1984) sobre pseudoreplicación en el diseño de experimentos de campo. Proporciona una excelente descripción de las diferentes modalidades y ofrece alternativas de diseños experimentales para evitar su efecto. Más recientemente, HEFFNER *et al.* (1996) y KROODSMA *et al.* (2001) constataron que la prevalencia de la pseudoreplicación sigue siendo alta en publicaciones de revistas de alto nivel.

### ¿Cuántas hay? Problemas asociados a la estimación de parámetros

Con frecuencia, los inventarios y monitoreos son utilizados para estimar un parámetro como la riqueza de especies en un área, o para estimar la densidad poblacional de una especie. Se podría pensar que el resultado de tales investigaciones es en cada caso un número (37 especies ó 0.21 individuos/m<sup>2</sup>, por ejemplo) y que, por lo tanto, no se necesita un tratamiento estadístico para ese número. Sin embargo, tarde o temprano el investigador estará interesado en comparar su número con otros números nuevos o pre-existentes, y deberá entonces admitir que su número no es exacto sino que implica algún margen de error. La información sobre el margen de error podría ser incorporada dentro de la comparación, de manera que se pueda concluir si los dos o más números comparados son diferentes a pesar del margen de error inherente a cada estimación.

Consideraremos el escenario en que se pretende estimar el tamaño poblacional de cierta especie en un área protegida. Para hacerlo, se han trazado 50 cuadrantes (de 100 m<sup>2</sup> cada uno) distribuidos en el área de estudio y se ha contado el número de individuos encontrados dentro de cada cuadrante. En este escenario simple, la densidad

poblacional se calcula como el número promedio de individuos por cada metro cuadrado inspeccionado; este número es único y no tiene asociado ningún margen de error. Una forma de ver el problema del margen de error es pensar en qué tanto depende nuestra estimación de que hayamos escogido precisamente esos 50 cuadrantes que utilizamos. En otras palabras, qué tanto cambiaría nuestro estimado si hubiéramos detenido el muestreo al completar 45 cuadrantes o si no hubiéramos incluido aquel sitio donde apareció como por arte de magia una enorme cantidad de individuos escondidos. Para saberlo, podríamos hacer el ejercicio de volver a calcular la densidad poblacional escogiendo de forma aleatoria 40 de los 50 cuadrantes que realmente estudiamos. Si repetimos el ejercicio muchas veces (digamos unas 100 ó 1000), cada vez escogiendo al azar 40 cuadrantes, obtendríamos 100 ó 1000 estimaciones de densidad. La variación entre tales estimaciones nos daría una razonable idea de cuan sensible es nuestra estimación de densidad a la escogencia de ciertos cuadrantes o a la presencia de cuadrantes que representan situaciones atípicas; en otras palabras, nos proporcionaría un margen de error para el estimado de densidad. Si repetimos el ejercicio con otro valor de densidad, por ejemplo calculado de otra población, podríamos establecer si las poblaciones difieren en densidad, a pesar del margen de error de las estimaciones.

A los análisis estadísticos que utilizan estas técnicas de re-muestreo se les conoce como métodos de aleatorización o de MonteCarlo. La utilización de estas técnicas para calcular márgenes de error en un parámetro incluye métodos como el *bootstrapping* y el *jackknifing* (DIXON 1993, MCPEEK & CÁLIZ 1993). Aunque los métodos de aleatorización pueden ser utilizados para resolver muchos tipos de análisis estadísticos, señalamos aquí su utilidad para estimar márgenes de error (o intervalos de confianza) sobre los estimados obtenidos en estudios de inventario y monitoreo.

# ¿Cuáles variables predicen la abundancia?

## Problemas relacionados con causalidad

Es importante comenzar esta sección señalando que no es lo mismo correlación que causalidad. Por ejemplo, si nos encontramos con el hecho de que hay una correlación positiva entre la abundancia de renacuajos de una especie de anfibio (Y) y la abundancia de una especie de planta acuática (X), esto no significa necesariamente que la abundancia de la especie X sea la responsable de la abundancia de la especie Y. Podría ocurrir que ambas especies (anfibio y planta) están respondiendo a un mismo conjunto de factores ambientales, por ejemplo el pH del agua. Para demostrar la causalidad, tendríamos que demostrar con un experimento manipulado (es decir, de tipo manipulativo) que la presencia de la especie de planta X favorece la presencia de los renacuajos de la especie Y.

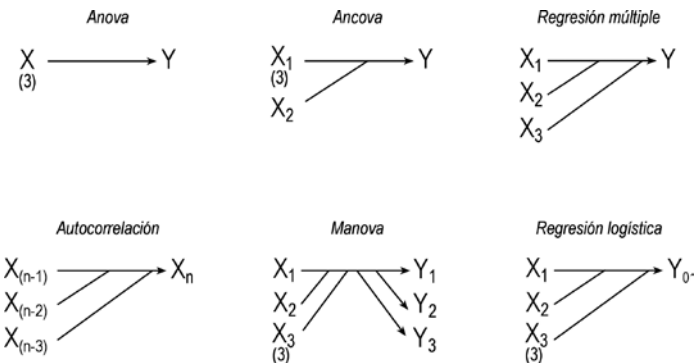


Figura 1. Diagramas de flujo que representan problemas de investigación (y los modelos estadísticos asociados) en los que se pretende establecer qué proporción de la(s) variable(s) Y(s) puede ser atribuida a (o parece ser causada por) la(s) variable(s) X(s). El número entre paréntesis indica que se trata de una variable categórica u ordinal (ver Fundamentos de diseño experimental) que consiste precisamente de, en este caso, tres niveles (p.e. macho, hembra y juvenil). Las expresiones “n-1, n-2 y n-3” en la autocorrelación señalan que se trata de la misma variable X, pero con desfase temporal o espacial de 1, 2 ó 3 unidades, respectivamente (ver ¿Existen patrones espaciales y temporales? Problemas de autocorrelación. La expresión  $Y_0$  [01 van como subíndices] indica que Y es una variable binaria, es decir, con sólo dos estados posibles

## Modelos generales lineales

Los modelos generales lineales constituyen el conjunto de técnicas más frecuentemente utilizadas para resolver preguntas sobre correlación o causalidad. Se presentan de manera agrupada porque comparten una lógica matemática y porque asumen, según lo indica su nombre, que las relaciones entre las variables son primariamente lineales y que las variables involucradas siguen la distribución normal (Figura 1). El poder de esta lógica está en su parsimonia, es decir, en que asume la relación más simple que uno se pueda imaginar entre dos variables: la de una línea recta. Por supuesto, los modelos generales lineales también pueden ser utilizados para analizar relaciones no lineales entre las variables cuando, por ejemplo, las variables son linearizadas mediante una transformación matemática.

El ANOVA (siglas de *ANalysis Of VAriance*) es una prueba estadística que permite probar posibles diferencias entre dos o más grupos de datos con base en sus promedios y su dispersión (p.ej. varianza, desviación típica o rango). En otras palabras, este método se usa para descubrir el efecto que tienen una o más variables categóricas independientes (las que se utilizan para generar los grupos de datos), aleatorias o fijadas por el investigador, sobre la variable dependiente o respuesta (DANIEL 1977). Las variables categóricas son llamadas en este caso **factores**, y pueden ser subdivididas en niveles; por ejemplo, la variable categórica sexo puede ser dividida en los niveles macho y hembra. Hay que hacer notar que en este tipo de análisis la hipótesis nula es que los promedios no difieren entre los grupos, asumiendo además que existe homogeneidad de varianzas entre los grupos a comparar. Dependiendo del número de factores involucrados podemos tener ANOVAS de una, dos o múltiples vías; aunque la diferencia parece trivial, mientras más factores (variables) o más niveles por factor (categorías en que se divide cada variable) incluyamos en el análisis, necesitaremos más datos y tendremos más interacciones posibles entre las variables, lo que dificulta la interpretación de los resultados. Cuando los resultados de un ANOVA sugieren que hay diferencias significativas entre tres o más grupos de datos, se deben utilizar pruebas *a posteriori* para establecer cuáles grupos difieren entre sí. Como ejemplo, podríamos utilizar esta técnica si

quisiéramos probar el efecto que tiene el tipo de bosque (siempre verde, semidecuido y decuido) y el estado de intervención de los mismos (prístino, levemente degradado y severamente degradado) sobre la abundancia de adultos de una especie de anfibio del género *Eleutherodactylus*. Otros ejemplos de su utilización están descritos en BARR & BABBITT (2002), FOX *et al.* (2004), MARSH (2001), WALDRON *et al.* (2003) y WELLS & OLLIVER (1998).

El ANCOVA (siglas de *ANalysis of COVariance*) es usado para evaluar el efecto de una o más variables independientes categóricas (factores) sobre una variable dependiente continua, manteniendo controlado el efecto de otras variables continuas que covarían con la variable dependiente. Difiere de un ANOVA en la presencia de estas últimas covariables. Es sumamente útil cuando se quiere remover el efecto de variables que modifican la relación de las variables categóricas con la variable independiente o respuesta. Por ejemplo, esta técnica nos permitiría ver el efecto que tiene el tipo de pozas o cuerpos de agua (aisladas o no de la corriente principal) y el tipo de depredadores (peces, insectos y cangrejos) sobre la abundancia de renacuajos de una especie de *Colostethus*, controlando el efecto del caudal de la corriente principal. Otro ejemplo de su aplicación puede ser leído en KNAPP *et al.* (2003).

El MANOVA (siglas de *Multivariate Analysis Of Variance*) o análisis de varianza multivariado se usa para probar el efecto de dos o más variables independientes categóricas (factores) y sus interacciones sobre dos o más variables dependientes continuas. Se diferencia de las distintas modalidades del ANOVA en la existencia de múltiples variables dependientes, que usualmente están correlacionadas entre sí. Dada la similitud lógica entre los dos tipos de análisis, los resultados de un MANOVA con frecuencia van acompañados de varios ANOVAS, uno sobre cada una de las variables dependientes. Tomando como base un ejemplo anterior, con esta técnica podríamos evaluar el efecto que tiene el tipo de bosque (siempre verde, semidecuido y decuido) y el estado de intervención de los mismos (prístino, levemente degradado y severamente degradado) sobre la abundancia de adultos de varias especies de *Eleutherodactylus*. La abundancia de cada una de las especies representaría cada una de las variables de-

pendientes. Otros ejemplos de aplicación de MANOVAS han sido descritos en MARSH (2001) y WALDRON *et al.* (2003).

La *regresión logística* es una técnica formulada para predecir y explicar la ocurrencia de cada uno de los dos estados posibles de la variable dependiente categórica binaria (dicotómica) a partir de una o múltiples variables, sean estas categóricas, continuas o combinaciones de ambas (HAIR *et al.* 1995). Como su nombre lo indica, las variables binarias tienen dos estados posibles (0 y 1) por lo que representan con frecuencia la ausencia o presencia de una especie, de actividad reproductiva, de huevos, de larvas, etc. La interpretación de los resultados de una regresión logística es de manera general similar a la interpretación de una regresión lineal, aunque en la regresión logística se predice la probabilidad (entre 0 y 1) de la ocurrencia de los dos estados que puede tomar la variable dependiente. Por otra parte, la interpretación de los coeficientes de la ecuación logística requiere de cierta elaboración ya que se presentan en la forma de exponentes de la mencionada ecuación, significando el incremento de la probabilidad de un estado de ocurrencia de la variable dependiente categórica, cuando la variable predictora - asociada a este coeficiente- cambia en una unidad. Esta técnica es bastante robusta (es decir, es poco afectada) frente al no cumplimiento de la suposición básica de normalidad de las variables continuas. Con esta técnica podríamos, por ejemplo, estudiar cuáles variables predicen la presencia o ausencia de una especie de rana arlequín (género *Atelopus*) en quebradas, basándonos en ciertas características de este tipo de hábitat (ancho, profundidad y caudal de la quebrada, pH y temperatura del agua) o en la presencia de otras especies de anfibios y/o de peces. Otros ejemplos de su aplicación son descritos en AMÉZQUITA & HÖDL (2004) y BARR & BABBITT (2002).

La *regresión múltiple* es una técnica que permite probar si una o más variables independientes continuas tienen un efecto lineal sobre una variable dependiente, que también es continua, aunque existen variantes de la técnica que permiten introducir variables categóricas como predictoras en forma de variables simuladas (dummy). Se trata por supuesto de una extensión de la regresión lineal simple, la cual evalúa la relación entre una variable dependiente y una única variable

independiente. En el apartado de la regresión logística, intentamos predecir la ausencia/presencia de una especie de *Atelopus* con base en las características de su hábitat. Podríamos proponer el mismo ejemplo para el uso de la regresión múltiple, sólo que la variable dependiente no sería binaria (ausencia/presencia) sino continua: por ejemplo, la abundancia de individuos o su tamaño corporal. Otros ejemplos de aplicación de las regresiones múltiples pueden ser encontrados en BARR & BABBITT (2002), HYDE & SIMONS (2001), LOWE & BOLGER (2002), y WELLS & LIND (1995, 1996).

La *correlación canónica* es una única técnica multivariada que consiste en encontrar un número de combinaciones lineales de dos conjuntos de variables, el de las variables dependientes y el de las independientes, de tal manera que expresen mejor la correlación de ambos conjuntos. La técnica puede utilizar variables categóricas, ordinales y continuas. Aunque se puede trabajar con variables continuas que no siguen la distribución normal, el poder de esta técnica aumenta con la normalidad de las variables (HAIR *et al.* 1995). Con esta técnica podríamos evaluar la relación entre la abundancia o la ocurrencia de un conjunto de anfibios asociados a quebradas de montaña y ciertas características ambientales de un conjunto de quebradas. Un ejemplo de su aplicación con organismos diferentes a anfibios puede ser encontrado en ROSENBERG & PALMA (2003).

El *análisis de componentes principales* no es propiamente una técnica para probar relaciones de causalidad, pero con frecuencia es utilizada como un paso inicial y luego combinada con análisis estadísticos como los descritos arriba. Es una técnica descriptiva y exploratoria para grandes conjuntos de datos, cuyo propósito es reducir un número grande de variables originales a un conjunto menor de nuevas variables (los componentes principales) que resumen los patrones de correlación entre las variables originales, minimizando la pérdida de información. Esta reducción permite representar los objetos estudiados en un espacio de (p.ej. dos o tres) dimensiones representadas por los componentes principales. Los componentes principales son construidos como combinaciones lineales de las variables originales, que deben estar correlacionadas linealmente para que la técnica funcione. En la versión más frecuentemente utilizada, los componentes

principales que se obtienen no están correlacionados entre sí, lo cual implica que cada uno de ellos despliega información no redundante con respecto a la dada por los restantes, condición que facilita la interpretación de los datos (JOLLIFFE 1986, PEÑA 2002). Con esta técnica podríamos por ejemplo representar 25 variables medidas en un conjunto de charcas en un número menor de variables según los patrones de correlación entre las variables originales. Podría resultar que los componentes principales obtenidos (las nuevas variables) describan respectivamente características fisicoquímicas, bióticas, y de dimensiones físicas de las charcas. Al terminar el análisis, podríamos utilizar los componentes principales como nuevas variables en alguno de los escenarios descritos anteriormente: por ejemplo, como predictores de la abundancia de renacuajos de leptodactílicos. Un ejemplo de su aplicación en otro grupo taxonómico puede ser encontrado en BIANCHINOTTI (2001).

### Métodos no paramétricos

En una gran cantidad de datos biológicos colectados, es muy difícil establecer si su distribución original es normal (SEAMAN & JAEGER 1990) y, por ende, cumplir con los preceptos de la *estadística paramétrica*. Para analizar estos datos se necesitan procedimientos independientes de cualquier distribución específica, es decir, que no estén basados en parámetros como medias y varianzas poblacionales (SIEGEL 1989, STEEL & TORRIE 1988). Al conjunto de pruebas estadísticas que se utiliza en estos contextos se le conoce como *estadística no paramétrica*. Los métodos no paramétricos constituyen también una excelente alternativa cuando los valores de las variables son medidos en escala nominal, categórica o en escala ordinal, como es el caso de muchos datos ecológicos (SEAMAN & JAEGER 1990). La presente sección describe métodos sencillos para analizar estadísticamente poblaciones y comunidades de anfibios, en la circunstancia particular en que los datos no se ajustan a una distribución normal o que incluyen variables ordinales.

Algunos de ellos son poco usados, a pesar de ser bastante útiles en el tratamiento de datos biológicos (SEAMAN & JAEGER 1990). Para



un panorama más amplio, incluyendo el uso de otros métodos, ver HAYEK (1994).

La *prueba de Kolmogorov – Smirnov (KS)* es una técnica de bondad de ajuste no paramétrica que se utiliza para verificar si una distribución (continua de preferencia, pero puede ser discreta) se ajusta o no a una distribución esperada, o si dos muestras provienen de la misma distribución. La única premisa que requiere para su aplicación es que las mediciones se encuentren, al menos, en una escala de intervalo (variable continua), sin hacer ningún tipo de suposición sobre el tipo de distribución de los datos. Aunque es aplicable cualquiera que sea el tamaño de la muestra, es más potente para muestras grandes. Con esta técnica podríamos predecir, por ejemplo, si el patrón de presencias y ausencias de las especies de anfibios de dos bosques aledaños (cualesquiera que sean las características en que difieren) muestran la misma distribución.

Otras pruebas de bondad de ajuste pueden ser utilizadas para resolver preguntas similares. En ecología de poblaciones, la estructura poblacional de una especie determinada puede ser descrita por una distribución de frecuencias que representa, p.ej., la abundancia de individuos según diferentes categorías de edades. Un investigador podría estar interesado en establecer si un conjunto de datos recién tomados se ajusta a esa distribución conocida o, en otras palabras, si la distribución ha cambiado en el tiempo. Por supuesto, la distribución conocida puede provenir también de predicciones basadas en modelos teóricos. En cualquier caso, una prueba que contrasta los valores reales obtenidos de una muestra con proporciones estimadas de antemano, es la prueba de bondad de ajuste.

Las pruebas para dos muestras pareadas nos permiten comparar dos situaciones en una misma comunidad como, por ejemplo, la actividad reproductiva en una comunidad de anfibios, medida como el número de vocalizaciones registradas antes y después de un prolongado aguacero. La *prueba de los signos* es especialmente útil cuando la escala de la variable es ordinal, por ejemplo, cuando se puede determinar si la actividad vocal es superior o inferior pero no hay una medida cuantitativa de la misma (ver LIPS *et al.* 2001).

Cuando la variable a comparar es de intervalo, es aconsejable utilizar una prueba de mayor potencia que considera, además de la dirección de las diferencias, la magnitud de éstas (SIEGEL 1989). Precisamente, la *prueba de rangos igualados de Wilcoxon* da mayor peso a las diferencias mayores en magnitud, en lugar de asignarle igual valor a las diferencias como en la prueba de los signos.

Entre los diseños experimentales más frecuentemente utilizados se encuentra el ya mencionado ANOVA (ver Modelos generales lineales). Cuando no se puede corroborar la distribución normal de los datos o cuando los mismos son de escala ordinal por su naturaleza, existen alternativas al ANOVA entre los métodos no paramétricos. El *Análisis de Varianza de Kruskal-Wallis*, o la *prueba de Kruskal-Wallis*, ofrecen una alternativa para analizar datos obtenidos a través de un muestreo completamente aleatorio. La variable debe ser, al menos, de carácter ordinal. Puede ser utilizado para evaluar, por ejemplo, el efecto del tipo de hábitat sobre la abundancia de una especie, cuando ésta es expresada en términos de rangos. La *prueba de Friedmann de clasificación de dos vías* es otra alternativa no paramétrica al ANOVA para el caso especial en que los datos que pertenecen a diferentes categorías (p.ej. dos tipos de hábitat) están relacionados por algún otro criterio (p.ej. hora del día). Sería entonces la opción para comparar abundancias de especies entre diferentes tipos de hábitat, cuando se ha hecho un muestreo a cada una de las horas del día. Sin embargo, si los datos de inventario no implican valores de abundancia sino sólo de presencia-ausencia, es decir valores de ceros y unos, la *prueba Q de Cochran* es la más indicada (SIEGEL 1989).

## ¿Existen patrones espaciales y temporales?

### Problemas de autocorrelación

Con frecuencia, el investigador interesado en monitoreos quisiera saber si existen patrones de agrupación de los objetos que estudia tanto en el espacio como en el tiempo. Por ejemplo, podría querer probar si los territorios de ranas de la familia Dendrobatidae presentan algún patrón de agregación espacial dentro de un parque natural. Si existen o no “parches” de territorios separados por áreas sin territorios puede ser resuelto mediante el trazado de transectos

lineales que consisten de  $N$  estaciones, en cada una de las cuales se contó el número de machos territoriales que se veían. Una forma de establecer si existe agregación espacial de territorios es probar si existe una correlación entre el número de territorios contados desde cada estación y el número de territorios contados en la estación vecina. La misma lógica se extiende cambiando la separación (desfase o “lag”) entre los pares de estaciones que se pretende correlacionar: cada estación con la estación que se encuentra dos, tres, cuatro, etc., posiciones más adelante. Combinando todos los coeficientes de correlación calculados, se puede probar si el hecho de que haya muchos o pocos territorios en una estación se relaciona con la misma condición en las estaciones vecinas. La técnica estadística que combina estos coeficientes de correlación se conoce con el nombre de *Autocorrelación Espacial* y la gráfica que resume cómo cambia el coeficiente de correlación en función de la separación entre muestras (desfase o “lag”) se conoce como autocorrelograma.

La lógica de la autocorrelación espacial puede ser extendida a aquellas situaciones en las que los muestreos no son sucesivos en el espacio sino sucesivos en el tiempo. Por ejemplo, un investigador podría interesarse en establecer si hay ciclos de abundancia en una especie del género *Eleutherodactylus* en cierto bosque. La materia prima para su análisis serían muestreos de abundancia que se realizan cada mes, durante cinco años consecutivos, en la misma área. Haciendo una analogía con la situación descrita anteriormente, el objetivo del investigador podría re-expresarse como: saber si existe una correlación entre la abundancia (o escasez) de ranas en un mes y la abundancia en los meses subsiguientes. En este escenario una prueba de *autocorrelación temporal*, que técnicamente es idéntica a la autocorrelación espacial, le permitiría no sólo establecer si existen los patrones de abundancia sino, mediante la inspección del respectivo autocorrelograma, estimar además la duración promedio de los supuestos ciclos de abundancia.

Como una extensión del problema anterior, el investigador habría medido en cada estación (o muestreo) no sólo la abundancia de ranas sino alguna otra variable climática como, por ejemplo, la humedad relativa de cada estación en el ejemplo de la autocorrelación espacial

o la precipitación en el ejemplo de la autocorrelación temporal. En este caso, surgirían por lo menos dos preguntas adicionales de interés. Primero, si existen patrones espaciales (parches) o temporales (ciclos) en la variable climática y, segundo, si estos patrones detectados en las variables climáticas se correlacionan con los parches o ciclos de abundancia de ranas. La primera pregunta implica simplemente repetir los análisis de autocorrelación pero con las variables climáticas. La segunda, más novedosa, implica sobreponer los patrones climáticos con los patrones de abundancia mediante un análisis de *autocorrelación cruzada*. Este interesante análisis no sólo prueba si existe coincidencia temporal entre los dos tipos de patrones (en este caso climático y de abundancia) sino que además prueba si hay algún tipo de correlación desfasada. Por ejemplo, que los picos de precipitación antecedan en dos meses a los picos de abundancia de los *Eleutherodactylus* o, en el caso de una autocorrelación cruzada negativa, que los parches de mayor humedad relativa tiendan a separarse más o menos 5-7 estaciones de los parches con mayor escasez de territorios de dendrobátidos. El lector interesado en conocer algunos ejemplos prácticos de uso de las técnicas de autocorrelación podría consultar a AUGUSTIN *et al.* (1996), KOENIG (1998, 1999), LEGENDRE (1993) y SWANSON (1998).

## ¿Cómo se clasifican?

En estudios de inventarios, los problemas de clasificación parten usualmente de una matriz que combina atributos (variables) y objetos (p.ej. especies). Cuando el investigador se interesa en una agrupación gradual de variables o especies en bloques según su nivel de similitud (o disimilitud), el *Análisis de Conglomerados*, también conocido como “Cluster Analysis”, es una herramienta bastante poderosa. El resultado de un análisis de conglomerados permitirá por ejemplo crear agrupaciones de especies tales como gremios, agrupaciones de localidades de acuerdo con su composición de especies y agrupación de especies de acuerdo con su hábitat. El análisis está basado en calcular distancias multivariadas con alguno de varios criterios y utilizar tales distancias para gradualmente agrupar los objetos de acuerdo con su similitud. Para una discusión más completa de los diferentes

tipos de distancias a calcular y de los parámetros a considerar en el análisis de conglomerados, sugerimos al lector revisar el clásico libro de HAND (1981).

Otros análisis utilizan distancias multivariadas para simultáneamente resolver problemas de clasificación y proponer relaciones de causalidad. El *análisis de correspondencias* es una técnica descriptiva y exploratoria para representar las filas (p.ej. presencia de especies) y columnas (p.ej. sitios) de tablas de contingencia de manera resumida y simultánea, con base en un ordenamiento de las especies y de los sitios de tal manera que maximiza la correlación entre ellos (TER BRAAK 1985, PALMER 1993, PEÑA 2002). Obtenido el ordenamiento, se pueden utilizar los datos de las características ambientales de cada sitio para establecer cuáles variables fundamentan el ordenamiento de los sitios. El método es de útil aplicación en trabajos exploratorios donde son pocas o inexistentes las hipótesis. Los requisitos que deben cumplir las tablas de datos que se analizan bajo este método son: todos los datos deben ser positivos, sus magnitudes deben ser del mismo orden, y tanto las filas como las columnas de la tabla deben ser susceptibles de ser sumadas (p.ej. FERNÁNDEZ 2002). Con esta técnica podemos evaluar el ordenamiento que puede surgir de un conjunto de quebradas evaluadas según la presencia de varias especies de *Atelopus*. Si deseamos conocer cuáles variables ambientales fundamentan el ordenamiento obtenido, se puede examinar la correlación entre los sitios y las variables ambientales registradas en los mismos. Un ejemplo de su aplicación puede ser leído en FOX *et al.* (2004).

El *análisis de correspondencia canónica* es una técnica que relaciona de manera directa un conjunto de datos de ocurrencia o abundancia de especies, con un conjunto de sitios caracterizados por una serie de variables ambientales (cuantitativas o nominales), asumiendo que hay un conjunto de variables ambientales fundamentales a las cuales las especies responden (TER BRAAK 1986). En esta técnica los ejes de ordenación son seleccionados bajo la imposición de que sean combinaciones lineales de las variables ambientales que separan al máximo a las especies consideradas en el análisis. De allí que la variación en la comunidad de especies se relacione directamente con la variación ambiental. Esta técnica es una extensión del análisis de correspon-

dencia, que funciona mejor cuando los datos son colectados en un rango de sitios o hábitats lo suficientemente amplio como para que la relación de las especies con dichos sitios sea unimodal (PALMER 1993). Con esta metodología podemos intentar predecir el patrón de abundancia de un ensamblaje de anuros basados en variables ambientales de un conjunto de sitios que representan un gradiente sucesional de vegetación boscosa. Un ejemplo de su aplicación puede ser encontrado en URBINA & LONDOÑO (2003).

### En resumen ¿qué hacer?

**Hasta ahora, el lector ha encontrado una lista de pruebas estadísticas con una mención de su lógica subyacente y, en la mayoría de los casos, un ejemplo de su aplicación. Como mencionamos en la introducción, esta información es de poca utilidad si no es vista dentro de un contexto más amplio y, sobre todo, más relacionado con la realidad que aborda el investigador. El propósito del siguiente diagrama (Figura 2) es precisamente apoyar al lector en esa dirección. Se trata de una serie de preguntas que, respondidas en la secuencia recomendada, deberían conducir a una sugerencia sobre la probable estrategia de análisis. Por supuesto, el diagrama no pretende ser exhaustivo y solamente cubre aquellos análisis más frecuentemente utilizados en problemas de inventario y monitoreo. Probablemente el lector deberá referirse al resto del texto para obtener una mejor idea del contenido de cada cuadro. Y, seguramente, el lector interesado en profundizar en los detalles de la técnica deberá acudir a la bibliografía especializada. Esperamos, sin embargo, que el contenido de este capítulo cumpla con su objetivo de suministrar una orientación inicial para navegar entre la literatura biológica y, especialmente, entre la literatura estadística que permitirá sacar el máximo provecho de los propios resultados. En otras palabras, esperamos haber ofrecido al lector un mejor contexto y familiaridad con las estrategias de análisis estadístico en estudios de inventario y monitoreo.**

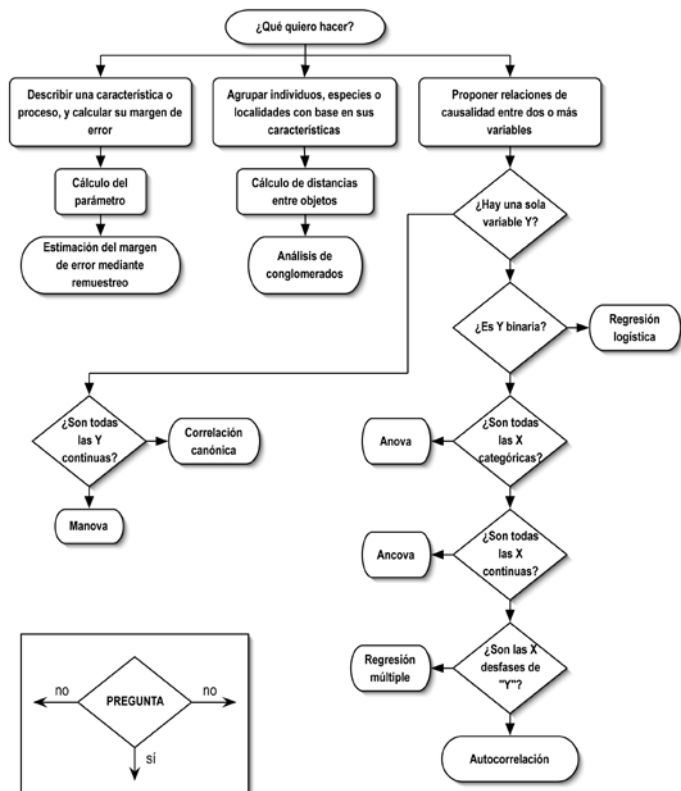


Figura 2. Guía preliminar para escoger un modelo estadístico con base en el tipo de pregunta que se quiere responder y en la naturaleza de las variables medidas. El procedimiento se inicia en la parte superior y el flujo depende de si las respuestas a las preguntas son afirmativas o negativas (ver recuadro). Es necesario referirse al texto para una descripción con ejemplos de los procedimientos estadísticos mencionados.



# Protocolo de bioseguridad y cuarentena para prevenir la transmisión de enfermedades en anfibios

A. Alonso Aguirre<sup>1</sup> & Margarita Lampo<sup>2</sup>

## Introducción

Publicaciones recientes muestran evidencias sólidas de que la presencia de enfermedades emergentes infecciosas en anfibios y otras especies de vida silvestre está estrechamente vinculada a factores antropogénicos (AGUIRRE *et al.* 2002, BERGER *et al.* 1998, DASZAK *et al.* 1999, 2003). El conocimiento de la epidemiología, transmisión, control y tratamiento de estas enfermedades está en su infancia, aunque algunos avances técnicos en esta rama de la conservación son evidentes. Se han identificado varias enfermedades en anfibios que pueden ser devastadoras (AGUIRRE 1994, BERGER *et al.* 1998, DASZAK *et al.* 1999, 2003, LAURANCE *et al.* 1996), al grado de causar disminuciones locales, globales y, en casos severos extinciones, si son introducidas inadvertidamente o intencionalmente en poblaciones que nunca han estado expuestas a estos patógenos. Dos enfermedades infecciosas emergentes de gran importancia a nivel global son la quitridiomycosis cutánea de anfibios, causada por el hongo *Batrachochytrium dendrobatidis* (BERGER *et al.* 1999, BLAUSTEIN *et al.* 1994), y la infección por ranavirus (WRIGHT & WHITAKER 2001). Aunque se necesitan muchas más investigaciones antes de comprobar si estas enfermedades fueron inducidas por cambios ocasionados por los humanos, es de suma importancia tomar las medidas preventivas para minimizar la posibilidad de introducir agentes infecciosos potencialmente patógenos, cuando se esté trabajando con anfibios silvestres o en cautiverio. Se

---

1 Wildlife Trust, 460 West 34th Street, 17th Floor, New York, NY 10001, EEUU. [aguirre@wildlifetrust.org](mailto:aguirre@wildlifetrust.org)

2 Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas - I.V.I.C.- Caracas, Venezuela. [mlampo@ivic.ve](mailto:mlampo@ivic.ve)



debe recordar que cualquier manipulación hecha en el campo es una fuente de estrés que puede inducir un estado de inmunodepresión en los individuos y, potencialmente, aumentar la susceptibilidad de la población en estudio a patógenos introducidos o autóctonos. Por ejemplo, mientras más largo el tiempo en cautiverio de un anfibio, es más probable que éste sea expuesto a una gama de virus, parásitos y especies simbióticas o comensales diferentes a las que normalmente está expuesto en vida libre.

El objetivo principal de este protocolo es el de prevenir y minimizar las oportunidades de introducir enfermedades cuando se esté trabajando con anfibios en vida libre o en cautiverio. Está dirigido a todas aquellas personas —herpetólogos, veterinarios, conservacionistas, biólogos, investigadores, ambientalistas y aficionados a la herpetología— que tengan previsto entrar en contacto con anfibios en su ambiente natural o en cautiverio. Su propósito es el de proporcionar instrucciones simples, claras y precisas para evitar la dispersión de enfermedades infecciosas entre poblaciones de anfibios, en la manipulación de adultos, renacuajos o huevos.

### Quitridiomicosis cutánea en anfibios

Una de las mayores amenazas que encaran los anfibios a nivel global es la de la quitridiomicosis cutánea. Esta enfermedad, producida por el hongo parasítico *Batrachochytrium dendrobatidis*, ha sido incriminada en las desapariciones locales de poblaciones —y en algunos casos extinciones— de numerosas especies de anfibios (BERGER *et al.* 1998, BLAUSTEIN *et al.* 1994, LAURANCE *et al.* 1996). *B. dendrobatidis* invade la piel de los anfibios causando la muerte en algunas especies. A pesar de que la quitridiomicosis cutánea se considera una enfermedad de aparición reciente, la distribución actual de *B. dendrobatidis* incluye a muchos países en los seis continentes. Aunque no se conoce su origen, se cree que ha sido el hombre el responsable de la dispersión de este hongo alrededor del mundo, a través del manejo de anfibios con fines comerciales, e incluso, científicos. La enfermedad se ha reportado en muchas especies de ranas y sapos tanto en vida libre como en cautiverio. Debido a que el hongo usa la queratina como sustrato, su crecimiento está restringido a la capa superficial de

la epidermis, y otras estructuras con alto contenido de queratina. Algunos signos clínicos típicos de la infección en los adultos son la muda excesiva de la piel, y la hiperemia (enrojecimiento) de la piel pálida. Los dedos normalmente son los primeros afectados. En renacuajos, la queratina del área bucal puede presentar deformaciones. No obstante, en varios brotes epidémicos, la muerte súbita ha sido la única manifestación clínica observada. Es muy probable que toda la sintomatología esté relacionada con alteraciones en la regulación osmótica de la piel, aunque la invasión de otros agentes secundarios



Figura 1. Individuo encontrado en una postura agónica típica de los ejemplares que sufren por infección de quítridos. Foto © Jaime Bosch

también pudiera ocurrir en algunos casos.

El diagnóstico de la enfermedad normalmente se hace por histopatología de los tejidos afectados. En anfibios vivos se han usado dedos cortados y raspados de piel. Recientemente, se ha descrito que el hongo puede también ser detectado utilizando técnicas de amplificación de fragmentos de ADN (reacción en cadena de la polimerasa, o PCR, por sus siglas en inglés) de exudados de piel

tomados con hisopos estériles (BOYLE *et al.* 2004, ANNIS *et al.* 2004). La enfermedad ha sido tratada con éxito en dendrobátidos, bañando a las ranas moribundas por cinco minutos cada día, durante 11 días, con una suspensión de itraconazol al 0.01% en solución salina al 0.6%. Como la infección es superficial también se ha recomendado aplicar una pomada cutánea de itraconazol. Se han reportado otros hongos, como el *Cladosporium* sp. en *Bufo marinus*, los que pueden causar una dermatitis micótica (WRIGHT & WHITAKER 2001).



Figura 2. Manifestación de la quitridiomycosis, el sapo (*Bufo woodhousii* = *Anaxyrus woodhousii*) de la izquierda está sano y el de la derecha está infectado con quitridos. Fotos ©Jamie Voyles

## Iridovirus

Los dos grupos de la familia Iridoviridae que causan enfermedades severas en anfibios son el de ranavirus y el de iridovirus eritrocíticos. En renacuajos silvestres, el virus de edema de renacuajos (TEV, Ranavirus tipo III) es altamente infeccioso, letal y agudo, y ha causado grandes mortalidades en *Rana catesbeiana*, algunos bufónidos y una especie de pelobátido. El virus de rana-3 (FV-3, Ranavirus tipo I) fue aislado en *Rana pipiens* con adenocarcinoma de Lucké, que por

muchos años se consideró como un herpesvirus. Este virus también es altamente letal en varias especies de anfibios. Por otra parte, el iridovirus Bohle, aislado originalmente de *Limnodynastes ornatus* en Australia, es altamente patogénico a renacuajos y animales en metamorfosis (CUNNINGHAM *et al.* 1996, JANKOVICH *et al.* 1997, WRIGHT & WHITAKER 2001).

## Síndrome de las patas rojas

La mayoría de infecciones bacterianas cutáneas reportadas en anfibios se caracterizan por causar bacteremia severa y lesiones generalizadas. Este síndrome, conocido desde finales del siglo XIX, se atribuye principalmente a *Aeromonas hydrophila*, aunque se han descrito otros géneros de enterobacterias. Aún cuando se han aislado aeromonas de anfibios clínicamente sanos, éstas pueden causar un eritema generalizado, usualmente en el vientre y los dedos, focos múltiples de necrosis o ulceración de la epidermis, pápulas epidérmicas hemorrágicas y hemorragias petequiales y equimóticas de la dermis (ver ejemplo de la sintomatología en la figura 12). En muchos casos existe necrosis (muerte celular) de dígitos, pero esta lesión se ha descrito también en otras enfermedades causadas por hongos y virus. Se han descrito otras especies de bacteria como *Mycobacterium marinum* asociadas a mortalidades de anfibios.



Figura 3. Manifestación del síndrome de patas rojas visto en *Alytes obstetricans*. Foto © Jaime Bosch

## Otros agentes infecciosos

Experimentalmente, el ranavirus FV-3 (frog virus 3) puede causar altas mortalidades de embriones y huevos. Saprolegniasis es una enfermedad causada por levaduras acuáticas de Oomicetos del género *Saprolegnia*. El síndrome de mortandad post-metamórfica (PDS, por sus siglas en inglés) se ha descrito en varios anfibios y se ha atribuido al síndrome de patas rojas (SCOUT 1993). Las características epidemiológicas de PDS, especialmente la sincronidad de mortalidades masivas a nivel regional, la relación taxonómica de especies afectadas, y el efecto “ripple”, esto es la enfermedad, afecta a varias especies y ecosistemas causando cambios profundos en las relaciones ecológicas, sugieren la posibilidad de un patógeno nuevo. Además, existen muchos endoparásitos -microsporidios, trematodos musculares y de la piel, helmintos, filarias, y capilarias- y ectoparásitos (ver figura 13) –garrapatas y ácaros- descritos en anfibios que pueden ser dispersados durante el manejo y traslado de anfibios. Algunos de éstos, además, pueden ser transmitidos a los humanos (zoonosis). De allí la importancia de aplicar procedimientos de campo y de laboratorio que minimicen el riesgo de contaminación de las personas y eviten la dispersión de patógenos entre localidades.



Figura 4a. Algunos ectoparásitos encontrados en la piel de los sapos. Fotos © Corinne Richards



Figura 4b. Algunos ectoparásitos encontrados en la piel de los sapos. Fotos © Corinne Richards

## Bioseguridad en el campo

### Planificación de visitas a localidades múltiples

Para evitar la infección de áreas libres de patógenos, se debe planificar la visita a sitios en donde se conoce la existencia de éstos, una vez

**1** **Planificación de visitas a localidades.** De acuerdo con el estado de infección conocida se debe buscar acudir primero a aquellas identificadas como **NO infectadas**, seguido por aquellas en donde se desconoce la presencia del patógeno y, finalmente, los sitios infectados.

Localidad 1 No infectada  
Localidad 2 No infectada  
Localidad 3 No infectada  
Localidad 4 Desconocida  
Localidad 5 Desconocida  
Localidad 6 Infectada  
Localidad 7 Infectada  
Localidad 8 Infectada  
Localidad 9 Infectada  
Localidad 10 Infectada

**2** **Nunca** se debe obviar la aplicación de este protocolo. El desconocimiento de la presencia del patógeno en un área particular no debe interpretarse como la ausencia del mismo.

## Recolección de anfibios animales vivos

**1** Manipular los animales vivos con las manos si no se dispone de guantes desechables.



Si no dispone de guantes desechables, puede utilizar las bolsas plásticas. Se inserta la mano dentro de la bolsa y esta se utiliza como guante para transportar al ejemplar; luego se retira la bolsa de manera que esta se voltee sobre sí misma con lo que el animal queda adentro y en ningún momento se entró en contacto directo con él y además ya quedó en su respectiva bolsa.



Al manipular los renacuajos o los adultos se corre el mayor riesgo de contaminación, pues se entra en contacto directo con el medio donde crecen las zoosporas.



**2** Aislar los animales vivos en bolsas plásticas grandes individuales para evitar la contaminación entre individuos. Se debe usar una bolsa por animal para evitar contaminación entre animales y ninguna debe ser reutilizada una vez que haya entrado en contacto con el espécimen.

**3** Después de manipular cada animal, desinfectar las manos con solución desinfectante quirúrgica o utilizar guantes desechables, un par por cada muestra o animal.



## Cadáveres

**1** **Nunca** se deben manipular anfibios muertos o moribundos sin guantes.

**2** Los guantes deben desecharse en bolsas plásticas debidamente rotuladas con la etiqueta “desechos contaminados”, para luego ser descartados siguiendo las indicaciones descritas en el protocolo de Descarte de cadáveres, tejido y material sólido contaminado.

visitados aquellos en donde no se sabe si están presente. No obstante, el desconocimiento de la presencia del patógeno en un área particular no debe interpretarse como la ausencia del mismo, y por lo tanto, **NUNCA** se debe obviar la aplicación de este protocolo.

### Manipulación de anfibios y muestras de tejido

Al manipular los renacuajos o los adultos se corre el mayor riesgo de contaminación, pues se entra en contacto directo con el medio donde crecen las zoosporas. Para minimizar este riesgo es necesario desinfectar las manos después de manipular a cada animal con solución desinfectante quirúrgica o utilizar guantes desechables, un par por cada muestra o animal. **NUNCA** se deben manipular anfibios muertos o moribundos sin guantes. Si no se dispone de guantes desechables, se insertan las manos dentro de las bolsas plásticas que se usarán para transportar a los ejemplares y luego se voltean para envolver al animal. Se debe usar una bolsa por animal para evitar contaminación entre animales y ninguna debe ser reusada, una vez que ha entrado en contacto con el ejemplar. Los animales vivos también deben aislarse en bolsas plásticas grandes individuales para evitar la contaminación entre individuos.

Para tomar muestras de tejido, marcar animales mediante cortes de dedos, implantar radio transmisores, “data loggers” o cualquier otro tipo de equipo intra o extra corporal, los instrumentos deben desin-



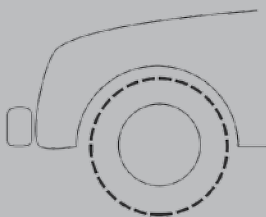
fectarse entre ejemplares siguiendo el protocolo de desinfección de instrumentos (ver abajo). Las heridas que se producen en la implantación quirúrgica de equipos son especialmente susceptibles a la entrada de patógenos. Por ello deben ser cuidadosamente desinfectadas con Betadine® (solución al 1%) y selladas con Vetbond® (WELLINGTON & HEARING 2001). Todo el material desechado, cadáveres, tejido, guantes, bolsas plásticas, papel o hisopos debe transportarse en una bolsa plástica debidamente rotulada como desechos contaminados para ser descartados siguiendo las indicaciones descritas en la sección Descarte de cadáveres, tejido y material sólido. **NUNCA** deben atraparse animales al menos que sea estrictamente necesario.

### Desinfección de equipo de campo

**1** Los equipos de campo como redes, trampas, botas, cubos plásticos y llantas (neumáticos o cauchos) de carros se desinfectan con etanol al 70%, hipoclorito de sodio al 4%, formol al 37% o desinfectantes a base de cloruro de benzalconio o cloruro de didecil-dimetil amonio.



**2** La desinfección del equipo debe hacerse en el mismo lugar de trabajo para evitar la dispersión del patógeno, pero **NUNCA** tan cerca de la charca o quebrada como para que el desinfectante drene hacia ésta.





## Desinfección del equipo de campo

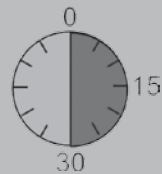
Tiene como objeto eliminar zoosporas que pudieran haber permanecido en los equipos al entrar en contacto con anfibios o con el agua de las charcas o quebradas en donde ellos habitan. Para el trabajo de campo, se recomienda el uso de botas de goma, ya que éstas pueden lavarse y desinfectarse con facilidad. Para los equipos de campo como redes, trampas, botas, y cubos de plástico que requieren mayores volúmenes, puede utilizarse etanol al 70%, hipoclorito de sodio al 4%, formol al 37% o desinfectantes a base de cloruro de benzalconio o cloruro de didecil-dimetil amonio (SPEARE 2003, JOHNSON *et al.* 2003). También se ha utilizado Gerdex® que es un fungicida a base de bromuro de lauril di-metil bencil amonio, aunque no ha sido probado su efecto específico en patógenos de anfibios. En todos los casos, se retiran los desechos sólidos, se enjuaga el equipo con agua hervida o esterilizada y se frota con la solución desinfectante. Se recomienda usar un cepillo de mango largo y un balde de 20 a 40 litros. Las llantas o cauchos de los carros que han entrado en contacto con agua de charcas o quebradas también deben desinfectarse. La desinfección del equipo debe hacerse en el mismo lugar de trabajo para evitar la dispersión del patógeno, pero **NUNCA** tan cerca de la charca o quebrada como para que el desinfectante drene hacia ésta.

## Desinfección de instrumentos

**1** Los instrumentos deben desinfectarse, luego de haber entrado en contacto con los ejemplares, para lo cual pueden utilizarse productos a base de cloroaminas o clorohexidinas



**2** También se pueden sumergir estos instrumentos por 30 minutos en alcohol étílico o isopropílico al 70%.



## Desinfección de instrumentos

Para los equipos de campo e instrumentos más pequeños y delicados como balanzas de resorte, calibradores o reglas, tijeras de disección, escálpelos y pinzas, que requieren de volúmenes menores, se pueden utilizar desinfectantes a base de cloroaminas o clorohexidinas, que pueden usarse también para las manos. El alcohol etílico o isopropílico al 70% es efectivo también pero los equipos deben sumergirse al menos por 30 minutos (WELLINGTON & HEARING 2001).

## Transporte de anfibios y muestras de tejido

**NUNCA** deben trasladarse anfibios o muestras de anfibios de un lugar a otro, si el programa de investigación o monitoreo que se lleva a

### Transporte de anfibios vivos

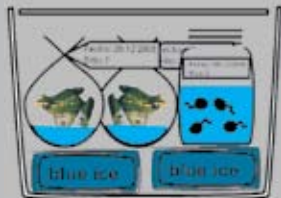
**1** Introducir los juveniles y adultos en bolsas individuales con aire y sustrato húmedo del suelo.



**2** Introducir los renacuajos en frascos con suficiente agua y un volumen equivalente de aire.



**3** Transportar las bolsas y los frascos en contenedores plásticos (neveras) que en el fondo contengan hielo o bolsas de refrigerante artificial (Blue Ice®) envueltas en papel periódico.



**4** **NUNCA** deben trasladarse anfibios si el programa de investigación o monitoreo no lo requiere.

## Toma de muestra de tejido, marcaje de individuos e implantación quirúrgica de equipo intra-corporal

**1** Los instrumentos deben desinfectarse siguiendo el protocolo de Desinfección de instrumentos.

**2** Las heridas que se producen deben ser cuidadosamente desinfectadas con Betadine® (solución de povidona yodada al 1%) y selladas con el adhesivo líquido de piel Vetbond®.

**3** Cada muestra debe ser almacenada individualmente. Todos los materiales desechados, cadáveres, tejido, guantes, bolsas plásticas, papel o hisopos deben ser transportados en una bolsa plástica debidamente rotulada como DESECHO CONTAMINADO.

Las heridas que se producen en la implantación quirúrgica de equipos son especialmente susceptibles a la entrada de patógenos



cabo no lo requiere. Los adultos y juveniles vivos deben transportarse en bolsas plásticas individuales en las cuales se ha dejado aire y se ha introducido sustrato húmedo del suelo. Los renacuajos se pueden transportar también en bolsas plásticas o frascos individuales con suficiente agua y un volumen equivalente de aire. Cada bolsa debe

## Toma de frotis para diagnóstico con PCR

**1** Con un hisopo (palillo con extremo envuelto en algodón) estéril, frotar la zona inguinal y las palmeaduras y dedos de las manos y patas de los juveniles o adultos.

**2** Guardar cada hisopo individualmente en un tubo de ensayo estéril y mantenerlo en un lugar fresco hasta su almacenaje.

**3** Almacenar los hisopos dentro de sus envases a 4°C.



ser rotulada individualmente con la fecha y sitio de recolección, y el nombre de la persona que recolectó la muestra. Para evitar el derrame de líquidos contaminados durante el transporte de especímenes vivos o muertos, o muestras de tejido, es recomendable usar contenedores plásticos. Para animales vivos es aconsejable usar cavas con bolsas de refrigerante artificial (Blue Ice®) previamente congeladas, e introducir papel periódico arrugado para restringir el movimiento de la bolsa y absorber el líquido que se produce por condensación. Los animales muertos deben preservarse en formalina buferada al 10% para el diagnóstico histopatológico; si se desea llevar a cabo un diagnóstico por PCR es necesario tomar una muestra y almacenarla en etanol al 70%, antes de preservar al animal en formalina buferada. Animales moribundos o recién muertos son los especímenes más valiosos. Después de realizar una eutanasia adecuada, usando cualquiera de las



técnicas recomendadas en la sección de Eutanasia, se debe hacer una necropsia minuciosa preferentemente por un veterinario patólogo en el laboratorio, y tomar muestras de tejido epitelial de la zona inguinal, de membranas interdigitales y del hígado, y almacenarlas en hielo para el cultivo in vitro del patógeno. Si no se dispone de contenedores plásticos o cavas deben usarse dos bolsas plásticas grandes de basura y cajas de cartón. Cada contenedor, cava o caja de cartón se rotulará como “material contaminado”. Éstas **NUNCA** deben abrirse hasta llegar al sitio de destino de la muestra (AGUIRRE & GREEN 2001).

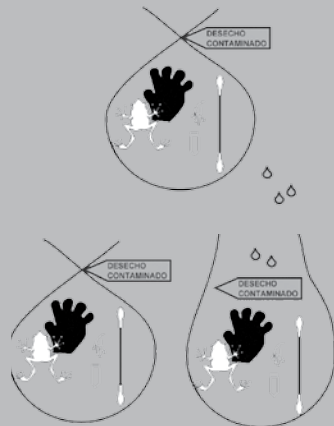
### Descarte de cadáveres, tejido y material sólido contaminado

Se considera material para descarte contaminado los restos de animales que no se utilizarán y el papel, bolsas, guantes, hisopos y otros

## Descarte de cadáveres, tejido y material sólido contaminado

**1** Todo material de desecho debe ser transportado en bolsas rotuladas como **DESECHO CONTAMINADO**.

**2** Si no es posible incinerar o esterilizar el material de desecho este debe ser sumergido en la solución desinfectante descrita en el protocolo de Desinfección de Equipo de Campo.



#### ¿Qué constituye el material de desecho?

Restos de animales, papel, bolsas, guantes, hisopos y otros elementos que hayan entrado en contacto con éstos animales, o el agua en donde ellos fueron recolectados.

elementos que hayan entrado en contacto con estos animales, o el agua en donde ellos fueron recolectados. Todo este material debe ser incinerado o esterilizado, y, si no es posible, sumergido en solución desinfectante antes de ser arrojado en la basura.

## Bioseguridad en el laboratorio

### Protocolo de cuarentena

Los anfibios que han sido adquiridos para ser mantenidos en cautiverio por razones de experimentación o exposición en parques zoológicos, herpetarios o acuarios deben ser sometidos a cuarentena. El período de cuarentena es arbitrario debido a la falta de conocimiento epidemiológico de las enfermedades que afectan a los anfibios, pero **NUNCA** debe ser de menos de 30 días, en anfibios con examen coproparasitoscópico negativo. Idealmente se recomienda mantener estos anfibios en cuarentena hasta 60 días. Los anfibios que han sido capturados en vida libre deben ser sometidos a cuarentena por lo menos por 90 días, especialmente si son de origen desconocido y han sido expuestos a un estrés severo al ser transportados. Durante este período de cuarentena, cada animal debe ser examinado por un veterinario para determinar la presencia subclínica de virus, bacteria, hongos y parásitos. Cualquier animal enfermo debe ser aislado permanentemente de la colección del laboratorio o herpetario y **NUNCA** debe ser utilizado para propósitos de reintroducción. Cualquier animal que muera durante este período de aislamiento debe ser sujeto a una necropsia detallada que incluya exámenes específicos histopatológicos y cultivo de *B. dendrobatidis* e iridovirus. Debido a los peligros asociados a estas dos enfermedades, **NUNCA** deben exponerse animales sanos en estado silvestre o cautivo a anfibios infectados o sospechosos. Siempre es recomendable documentar la fauna parasitaria de anuros en las áreas de estudio, al igual que se deben verificar los estudios parasitológicos previos en estas áreas.

Las áreas de cuarentena -peceras o herpetarios-, pueden ser relativamente rústicas para este propósito. Así es que cajas de plástico, vivarios de policarbonato o acuarios de vidrio sirven perfectamente como encierros de cuarentena en la mayoría de los anfibios. Toallas



de papel pueden servir como sustrato, y bolas de toallas de papel humedecidas pueden servir como cubierta y áreas de protección. Estos encierros deben tener suficientes barreras visuales para evitar estrés en individuos específicos. Los tanques deben cubrirse con una tapa con la posibilidad de mantener por lo menos una humedad relativa alta (>70%). Se debe proveer ventilación adecuada, y la humedad puede ser mantenida con nebulizados frecuentes con agua no clorinada. Los encierros de cuarentena deben, preferiblemente, ubicarse en cuartos alejados de la colección principal.

El protocolo mínimo de seguimiento debe comprender un examen clínico detallado que incluya monitoreo del peso del animal, postura física, y cambios de apariencia. Idealmente, se debería tomar una muestra de sangre para su examen hematológico, bioquímica sanguínea y determinación de la relación Ca:P. Por lo menos un frotis sanguíneo puede proporcionar datos importantes de la salud, estrés y estado inmunológico del animal. Se debe llevar a cabo un examen coproparasitológico de las heces utilizando la metodología estándar en frotis fecales. Además, se debe hacer un diagnóstico de quitridiomycosis cutánea a través de histopatología de los dedos o algunas de las nuevas técnicas de reacción de polimerasa en cadena (PCR) o el ensayo inmuno absorbente ligado a enzimas (ELISA). Los protocolos para el examen histológico se han publicado detalladamente en el sitio de internet "Amphibian diseases home page" moderado por R. Speare de la Universidad James Cook en Australia ([www.jcu.edu.au/dept/PHTM/frogs/ampdis.htm](http://www.jcu.edu.au/dept/PHTM/frogs/ampdis.htm)). En algunos casos, la presencia de iridovirus se puede diagnosticar utilizando un frotis sanguíneo o cultivando el virus en líneas celulares comercialmente disponibles a partir de los tejidos colectados durante la necropsia.

Desafortunadamente en Latinoamérica existen pocos laboratorios con las técnicas y/o infraestructura necesaria para el aislamiento viral. El Laboratorio Medicina de Conservación basado en la Escuela Superior de Medicina del Instituto Politécnico Nacional en la ciudad de México y el National Wildlife Health Center del U. S. Geological Survey en Madison, Wisconsin, en Estados Unidos, son dos laboratorios donde se pueden procesar ejemplares con cuotas bastante módicas. También se puede realizar histopatología y microscopía electrónica. Idealmente, todas las técnicas son requeridas para un diagnóstico apropiado. Con



las más recientes técnicas moleculares ha sido posible identificar a la bacteria o virus causa de mortalidad sin necesidad de utilizar las técnicas tradicionales de aislamiento e identificación de especies.

El mantenimiento de registros médicos y de manejo detallados es esencial para una cuarentena adecuada. Todo el personal que tenga contacto con animales en cuarentena, tejidos provenientes de éstos o el material de desecho debe tener acceso a todos los protocolos detallados y por escrito.

### Síndrome de aclimatación y mal-adaptación

El Síndrome de Aclimatación y Maladaptación (AMS, por sus siglas en inglés) se observa comúnmente en anfibios adquiridos en estado silvestre, o importados para colecciones cautivas. AMS es un complejo de síntomas clínicos asociados con la falta de adaptación de ciertas especies al cautiverio aún cuando las condiciones de este sean similares a su estado silvestre. Muchos de estos anuros desarrollan lesiones del rostro y la piel ocasionadas en el encierro, hay pérdida de peso, anorexia e infecciones secundarias. Para evitar el AMS durante el manejo de anfibios en cautiverio es necesario conocer la biología y requerimientos de cada especie antes de traerlos a confinamiento.

### Desinfección

La limpieza y desinfección son una de las claves para la manutención adecuada de anfibios en cautiverio. Es importante enfatizar que se debe limpiar cuidadosamente cualquier objeto o encierro antes de desinfectarlo o esterilizarlo. En colecciones establecidas, se deben realizar dos desinfecciones. Por ejemplo, una herramienta, después de ser lavada, se desinfecta con una solución de cloro (hipoclorito de sodio al 5%) de 10-15 minutos. Después de este enjuague, se sumerge en una segunda solución de amonio (5-10%), por otros cinco minutos, y se vuelve a enjuagar antes de su uso. Este enjuague entre desinfectantes es importante ya que ambas soluciones pueden formar gases tóxicos si se combinan. Los desinfectantes mencionados son muy efectivos para eliminar la mayoría de patógenos potenciales. En caso de la colección en cuarentena con animales recién capturados o con enfermedades existentes, se puede, además, utilizar la aplicación



prolongada de vapor aunque ésta no es muy práctica. Una solución salina con formalina (>500 ppm) puede ser otra opción para patógenos como *Mycobacterium*. El tratamiento de equipo y encierros debe ser de por lo menos 30 minutos siguiendo el protocolo antes descrito. En conclusión, los protocolos de desinfección y esterilización dependen de la colección y deben desarrollarse de acuerdo a los riesgos de salud y enfermedades, presupuesto y objetivos de la colección.

## Cambios y disposición de agua

Para mantener una calidad de agua adecuada se requiere una filtración del 10% del agua cada semana, o 20% cada 15 días. Los sistemas sin filtros requerirán cambios múltiples de agua diariamente, además de la remoción del alimento no consumido y los desperdicios tóxicos. Es obvio que la temperatura, pH, dureza y turbidez del agua deben ser similares al estado silvestre de los animales. Es necesario llevar a cabo un monitoreo adecuado de varios parámetros. El agua no debe contener cloro u otros químicos. Es importante suministrar minerales esenciales como Na y Ca en el agua, ya que los anfibios dependen de éstos para llevar a cabo varios procesos metabólicos. Se debe recordar que una calidad de agua adecuada es una inversión excelente que es premiada con anfibios sanos.

## Eutanasia

En ocasiones el biólogo de campo, herpetólogo, veterinario o conservacionista se verá en la necesidad de inducir eutanasia (una muerte sin dolor humanamente inducida) a anfibios moribundos o que necesitan ser sacrificados por razones de experimentación y transporte. El método de eutanasia depende de la condición del animal, la necesidad de exámenes postmortem o preservación corporal. Obviamente el método a elegir debería estar en manos de un veterinario calificado. Los métodos más apropiados incluyen:

1. Sobredosis con metanosulfonato de triclaína normalmente por inmersión, el cual se considera el método más adecuado y menos estresante para anfibios. La triclaína se puede inyectar por vía intracelómica (200 mg/kg).

2. Sobredosis con etanol a concentraciones de 20% o más, con una sedación inicial con etanol al 5%. Este método es adecuado para la conservación de especímenes para museo.
3. Barbitúricos como el pentobarbital a dosis de 100 mg/kg por vía intracelómica causa muerte en 30 minutos. Estas sustancias pueden ocasionar alteraciones histopatológicas e inhiben crecimiento bacteriano en algunas pruebas bacteriológicas.
4. La descerebración (“pithing”) se puede efectuar en anfibios inconscientes y se debe realizar en dirección del rostro desde el *foramen magnum* al igual que en forma caudal hacia el canal vertebral. En caso de lesiones de sistema nervioso esta técnica no se recomienda.
5. El congelamiento también se puede utilizar en anfibios inconscientes pequeños de menos de 40 g de peso, los que pueden ser sumergidos en nitrógeno líquido. Congelamiento en un congelador casero a  $-2^{\circ}\text{C}$  no es aceptable, además algunas especies pueden tolerar este método hasta por más de 48 horas. El congelamiento es inaceptable en especies montañosas y neárticas.
6. Se ha sugerido como método el trauma en la cabeza con un objeto sólido, pero no es el más recomendable, ya que se necesita experiencia para causar una muerte rápida y no dolorosa.
7. La administración de dióxido de carbono es totalmente inaceptable al igual que la decapitación, hipertermia, electrocución y exsanguinación.

# Fundamentos de bioacústica y aspectos prácticos de grabaciones y análisis de cantos

*Ariadne Angulo<sup>1,2</sup>*

## Introducción

La bioacústica es la ciencia que trata del estudio de los sonidos emitidos por animales, su grabación y análisis, así como los sistemas de comunicación acústica y ecolocación. Tiene muchísimas aplicaciones y un sinfín de potenciales objetos de estudio, desde pequeños insectos hasta ballenas. Su importancia viene del hecho de que una buena cantidad de sonidos animales y sus mecanismos de generación poseen información. De esta manera, las señales acústicas son componentes fundamentales en la comunicación entre individuos de una misma especie, “que se comunique acústicamente”.

En el área de herpetología, específicamente en lo que se refiere a sonidos producidos por anfibios anuros, la bioacústica viene a ser una poderosa herramienta. Las señales acústicas producidas por anuros pueden poseer una o más funciones, según el contexto en el cual se generan. Una clasificación general identifica los siguientes tipos de cantos: 1) cantos de “advertencia” o anuncio (“advertisement calls”), los que son producidos por machos y cuyas funciones principales son la atracción de la hembra y la demarcación de territorio ante posibles competidores; 2) cantos de cortejo (“courtship calls”), producidos por machos vocalizadores al ser abordados por una hembra y que suelen estar seguidos de un amplexo; 3) cantos agresivos y/o agonísticos (“aggressive calls”) y (“agonistic calls”), generados por

---

1 Conservación Internacional, Carrera 13 No. 71-41, Bogotá, Colombia. [aangulo@conservation.org](mailto:aangulo@conservation.org)

2 Departamento de Herpetología, Museo de Historia Natural de San Marcos, Apartado 140434, Lima 14, Perú.

una rana interactuando con otra en una situación de conflicto; 4) cantos de desprendimiento (“release calls”), producidos por una rana involucrada en un amplexo indeseado; y 5) cantos de “desesperación” (“distress calls”), generados por una rana al ser atrapada por un predador o al escapar de uno (RAND 1988). Cabe notar que, a veces, identificar la función de un canto no es tarea sencilla, y se debe recordar que esta clasificación es una herramienta de identificación, pero que puede haber aún otros tipos de señales acústicas, o señales compuestas, cuya función se desconoce.

Los cantos de anuncio, en particular, son muy importantes para la identificación de los miembros de la misma especie. Dado que existen muchas especies morfológicamente crípticas en el mundo de los anfibios anuros, y dado que el componente acústico es sumamente importante en la elección de un potencial pretendiente, es fundamental minimizar el riesgo de equivocación. Es decir, es importantísimo asegurar que el pretendiente sea de la misma especie, para de esta manera garantizar la viabilidad de la fertilización. Por ello, los cantos de advertencia de los anfibios anuros suelen ser importantes mecanismos de aislamiento pre-reproductivo entre especies simpátricas (DUELLMAN & PYLES 1983) y cada especie tiene su canto distintivo (FOUQUETTE 1960). Y es justamente esta naturaleza distintiva la que puede ser utilizada por el investigador para determinar la identidad de las especies, incluso aquellas que son crípticas en su morfología. Es por ello que las grabaciones en campo son una herramienta fundamental y poderosa para trabajos tanto de inventario (p. ej. determinación de especies) como de monitoreo (p. ej. seguimiento de poblaciones), si bien hay que tomar precauciones antes de proceder a cualquier grabación para que pueda ser de utilidad a futuro. Las grabaciones pueden ser efectuadas en campo y ser analizadas posteriormente, para lo cual se debe asociar un canto particular con el individuo que lo emite (ejemplar “testigo” o “voucher” del canto, el cual puede ser colectado y referenciado a los datos de campo). El análisis de estos cantos permite comparaciones entre especies cuya identificación sea problemática, como en los casos en que se trata de determinar si una o más especies están involucradas. Las grabaciones también le permiten al investigador familiarizarse con los cantos de anuros de una comunidad dada, lo que es muy útil si se van a efectuar



“transectos” audio y/o monitoreo acústico de sitios de apareamiento sin necesidad de colecta en lugares específicos, por ejemplo.

Este breve capítulo acerca de ciertos elementos fundamentales de la bioacústica, así como de grabaciones en campo y análisis de sonidos dentro del rango audio, busca simplemente servir como un punto de contacto inicial para aquel investigador que no esté familiarizado con esta disciplina. No es nuestra intención el proporcionar un tratado sobre el tema, ni mucho menos profundizar en él, sino simplemente servir como una guía inicial a partir de la cual el investigador pueda comenzar a elaborar una propuesta sobre algún tema específico. La bioacústica, subdisciplina de la acústica, campo de la física, es extremadamente compleja, y amerita un tratado profundo para su mejor comprensión. Para el investigador que procure informarse más al respecto, le referimos a algunas fuentes bibliográficas así como de internet al final de este manual.

#### **Antes de empezar**

**Antes de iniciar cualquier estudio que comprenda información acústica y antes de salir al campo, es muy importante que el investigador tenga muy claro cuáles son los objetivos de su estudio, el tipo de información que necesitará recopilar para poder cumplir con los objetivos propuestos, y el equipo que necesitará para llevar a cabo su trabajo. La fase de gestación y planificación es absolutamente necesaria para procurar que el estudio esté bien fundamentado, y que los resultados que se obtengan reflejen esta planificación a través de su confiabilidad.**

## Fundamentos teóricos

### Sonidos: Qué son y algunas propiedades fundamentales

¿Qué es un sonido? Si definimos sonido desde una perspectiva física, nos referimos a la generación de vibración que se transmite en un medio físico (SPEAKS 1996). O en otras palabras, consta de una serie de compresiones y rarefacciones (cambios de presión) mecánicas, o una onda que se propaga en un medio. Un sonido se puede generar

mediante un cuerpo físico que tenga la capacidad de vibración, es decir, posea las propiedades físicas de masa y elasticidad (SPEAKS 1996).

El sonido se propaga a partir de un generador de sonido mediante ondas longitudinales donde las partículas del medio físico oscilan en la dirección de la propagación de la onda con una velocidad determinada (MICHELSEN 1983). Un ejemplo de onda longitudinal se muestra en la Figura 1, donde una mano genera una onda longitudinal en un resorte al moverse periódicamente hacia atrás y hacia

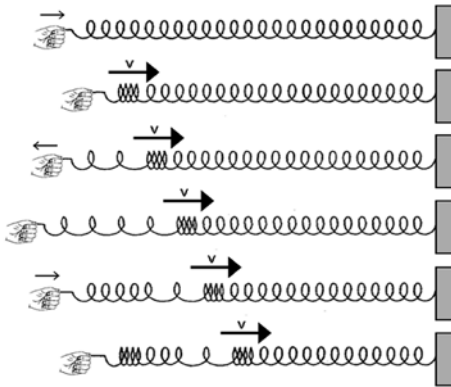


Figura 1. Ejemplo de onda longitudinal. La mano pulsa el resorte hacia atrás y adelante periódicamente, creando así un movimiento de compresiones y rarefacciones en línea con la dirección del resorte. Tomado de MANNELL (2004).

delante “en línea” con la dirección del resorte y ocasionando que las áreas de compresión altas y bajas se muevan a lo largo del resorte (MANNELL 2004). Cuando un objeto en vibración genera ondas, éstas se propagan en todas las direcciones (FLETCHER 1992). El sonido se propaga entonces esféricamente (propagación geométrica o “geometric spreading” en inglés), disminuyendo en intensidad a medida que se incrementa la distancia de la fuente de sonido.

Una onda posee una serie de atributos o dimensiones, y la combinación de éstos le dan una naturaleza específica. Algunas de estas propiedades están ilustradas gráficamente en la Figura 2.

**La amplitud de una onda (a)** se refiere al desplazamiento que una partícula del medio experimenta con relación al nivel de presión normal (sin excitación vibratoria, o en equilibrio  $-0-$ ). Una onda se

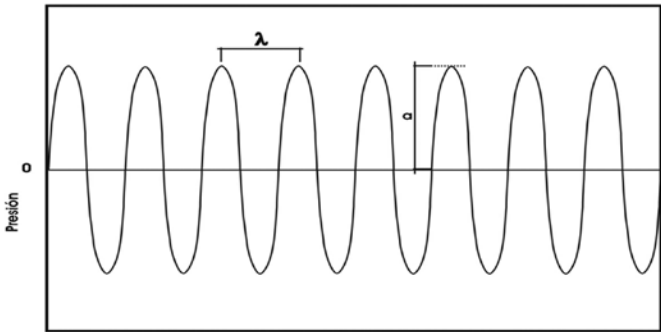


Figura 2. Representación visual de una onda sinusoidal simple. La línea que atraviesa la figura horizontalmente indica el nivel de presión normal,  $a$  indica la amplitud, y  $\lambda$  representa la longitud de onda.

desplaza del equilibrio a un desplazamiento máximo en una dirección, para luego volver a pasar por el equilibrio, y luego a otro desplazamiento máximo pero en sentido opuesto. Esto es lo que se llama un ciclo de vibración (SPEAKS 1996). La frecuencia ( $f$ ) de un sonido se refiere entonces al número de estos ciclos completados por segundo, expresados en Hertz (Hz). El periodo ( $T$ ) es el tiempo que se requiere para completar un ciclo, y es inverso a la frecuencia, es decir:

$$f = 1/T$$

Una dimensión adicional de una onda sinusoidal viene a ser la longitud de onda ( $\lambda$ ), que es la distancia cubierta por una onda durante un periodo de vibración o la distancia entre dos puntos idénticos en dos ciclos adyacentes (SPEAKS 1996; ver Figura 2). La longitud de onda de un sonido puede ser calculada mediante la siguiente ecuación:

$$\lambda = c/f$$

Donde  $c$  es la velocidad de la propagación en un medio dado en metros por segundo y  $f$  es la frecuencia en Hz. En el caso del aire, a 20°C y nivel del mar,  $c = 343 \text{ m s}^{-1}$ , en el caso del agua, a la misma temperatura a nivel del mar y 32% de salinidad,  $c = 1518 \text{ m s}^{-1}$  (BASS & CLARK 2003). Por ejemplo, si una señal acústica posee una frecuencia de 2 kHz (2000 Hz) y se propaga



en el aire a 20°C, entonces la longitud de onda de esa señal será  $\lambda = 343/2000 = 0.17$  m, ó 17 cm.

Las propiedades mencionadas anteriormente son importantes para definir la naturaleza de una onda, y por ende también para definir una señal acústica producida por un animal.

Una señal acústica puede ser de naturaleza sinusoidal (la forma más sencilla de una onda) y un componente fundamental de otras ondas de sonido (Figura 3 a), aunque es frecuente encontrar señales que sean compuestas de ondas complejas (Figura 3 b), definidas así porque son compuestas por dos o más ondas sinusoides que pueden diferir en amplitud, frecuencia y fase (punto de inicio de una onda dentro de un ciclo). Es decir, cuando dos o más ondas sinusoides distintas se adicionan, lo que resulta es una onda compleja (SPEAKS 1996).

Las ondas de sonido tienden a comportarse diferencialmente en

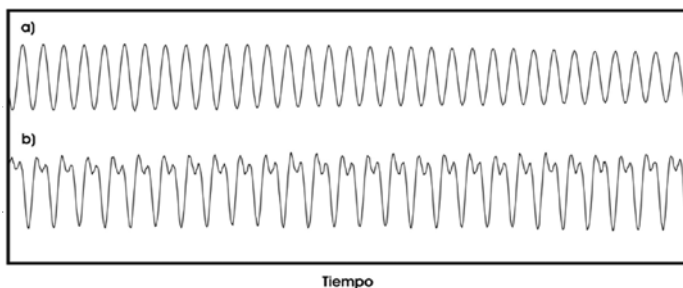


Figura 3. Representación visual de a) una onda sinusoidal simple y b) una onda compleja.

función a la distancia de la fuente generadora de sonido. En las cercanías del generador de sonido, la onda se transmite de forma compleja (campos cercanos o “near fields” en inglés), mientras que a distancias mayores (campos lejanos o “far fields”) el comportamiento de la onda puede ser más sencillo. Campos libres (o “free fields”) se refieren a una situación donde no hay sonidos re-direccionados. Es importante tener estos campos en consideración al posicionar un micrófono para efectuar una grabación, ya que en el caso de fuentes pequeñas de sonido se debe estar a por lo menos una longitud de onda de distancia para estar en el campo lejano, y así poder efectuar una grabación donde el comportamiento de las ondas es más



sencillo (ver MICHELSEN 1983). La **intensidad del sonido** también se ve afectada por la distancia del generador. Se define la intensidad como la cantidad de energía transmitida por segundo en un área de un metro cuadrado (SPEAKS 1996). Esta energía debe estar referida a algún parámetro. Por comodidad y convención, el nivel de sonido está indicado en decibeles (dB), pero éstos deben estar referenciados a una presión de sonido dada. En este caso, se denomina **nivel de presión de sonido (NPS)** o “sound pressure level” (SPL) en inglés y se calcula mediante la siguiente ecuación:

Donde  $\rho$  es la presión de sonido sobre la cual se quiere calcular el NPS y  $\rho_r$  es la presión de referencia. Normalmente esta presión de

$$\text{NPS} = 20 \log_{10} \frac{\rho}{\rho_r} \text{ dB}$$

referencia es de 0.0002  $\mu$ bar (aproximadamente el umbral humano a 1 kHz; MICHELSEN 1983). Los NPS pueden ser medidos a través de un medidor de nivel de presión de sonido (en inglés “sound pressure level meter”).

Si la producción del generador se mantiene constante (es decir, si una rana canta a la misma intensidad cada vez, por ejemplo), el conocer un nivel de presión de sonido para una señal acústica sobre una distancia dada nos permite estimar los niveles de presión de sonido a otras distancias del receptor al generador. Esto es posible gracias a la llamada ley del cuadrado inverso (“inverse square law” en inglés), la que indica que en una situación de **atenuación** por propagación geométrica, en un medio sin fricción y libre de vegetación y superficies ásperas, el orden de magnitud de atenuación es de 6 dB por cada duplicación de distancia (ver MICHELSEN 1983). Por ejemplo, si una señal acústica bajo estas condiciones es de un orden de magnitud de 80 dB a 50 cms del receptor, entonces a 100 cms del receptor la señal teóricamente debiera ser 74 dB.

## Fundamentos prácticos

### Grabación

Antes de proceder a grabar, se debe tener muy claro cuáles son los objetivos del estudio de señales acústicas y qué tipo de información se necesita. Esto es de suma importancia, puesto que estos datos van a determinar los requerimientos de equipo para efectuar el estudio. Hoy en día existe una gama de equipos de audio disponibles en el mercado, con rangos de especificaciones distintas y precios que van desde unos cuantos cientos, a miles de dólares americanos. Una inversión óptima requiere de un conocimiento de los objetivos y requerimientos del estudio, del animal o grupo de animales que serán estudiados, así como cierto conocimiento del equipo.

La literatura primaria indica que la gran mayoría de las ranas y sapos producen sonidos en el rango audio, es decir, frecuencias que van desde los 20 Hz hasta aproximadamente los 20000 Hz (20 kHz). La mayoría de grabadores analógicos o digitales semi-profesionales o profesionales que cubren ese rango de frecuencias son económicamente más accesibles que en el rango de frecuencias de ultrasonidos, por ejemplo. Es importante notar, sin embargo, que los grabadores comerciales que son fácilmente disponibles en los comercios de electrodomésticos no son necesariamente apropiados para grabaciones que se hagan con el propósito de análisis de sonido. Esto es porque en muchos casos no se especifican los rangos de frecuencias (“frequency range” en inglés), o la curva de respuesta de frecuencias (“frequency response curve”) cubiertas por el grabador, o si hay algún algoritmo de compresión de frecuencias. Una curva de respuesta de frecuencias, o **respuesta de frecuencias**, indica cómo el aparato electrónico trata o detecta las frecuencias dentro de un rango dado (ver Figura 4). Es decir, si trata a todas las frecuencias dentro de su rango de capacidad de manera uniforme (respuesta plana o “flat frequency response”), o si es que artificialmente enfatiza unas frecuencias sobre otras (por ejemplo, enfatizando las frecuencias de la voz humana sobre otras frecuencias en grabadores de uso doméstico), o si algunas frecuencias son comprimidas, afectando así el sonido grabado y su posterior análisis. Se busca que la curva de respuesta de frecuencias

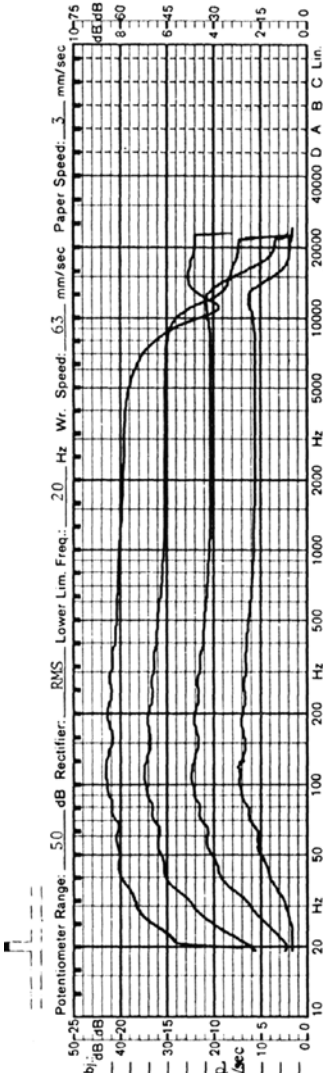


Figura 4. Ejemplo de una curva de respuesta de frecuencias, donde el eje de las ordenadas muestra la intensidad en decibels (dB) y el eje de las abscisas indica el rango de frecuencias cubierto por el aparato electrónico. Tomado de WICKSTROM (1982), reimpresso con permiso de Elsevier.

sea relativamente plana y suave, y que haya pocos cambios bruscos en amplitud a lo largo del rango de frecuencias que cubra el grabador u otro aparato electrónico.

### Documentación y calibración

Antes de iniciar el estudio, el investigador debe tener en cuenta dos palabras claves: *documentación y calibración* (ver WICKSTROM 1982). Esta es la mejor manera de asegurar la rigurosidad científica de los procedimientos seguidos y minimizar los factores de error introducidos por falta de controles. Es fundamental que se tomen buenos datos acerca de la grabación y que se incluyan no solamente dentro de la cinta, pista, o archivo, sino también en la libreta de campo. Igualmente, es sumamente importante que el equipo esté calibrado antes de efectuar una grabación, pues de lo contrario no hay certeza sobre la confiabilidad de la grabación y esta pierde su valor científico.

Para que una grabación pueda ser utilizada en estudios de inventarios y sistemática (para investigar identidades biológicas), debe tener algunas características básicas: 1) se debe tener confianza en la grabación, es decir, confianza en el equipo y la

forma en que se efectuó la grabación, 2) la grabación debe estar bien documentada y 3) se debe tener acceso al animal grabado, el cual constituye un espécimen “testigo” o “voucher” del canto.

1. La confianza en la grabación depende del equipo utilizado (si es fiel a las especificaciones, si fue calibrado antes de salir al campo, y si fue monitoreado antes de proceder a la grabación) y de la forma en que se condujo la grabación (si la hizo un investigador experimentado, si se documentó apropiadamente, etc.).
2. Una grabación bien documentada (ver siguiente sección para detalles de documentación de grabaciones), es un valioso componente de una colección museológica, siempre y cuando esté referenciada apropiadamente a los números de campo y de museo del espécimen.
3. Cuando sea posible y necesario, se recomienda capturar al individuo cuyo canto fue grabado. En el caso de que el individuo haya sido grabado mas no colectado, es muy importante mencionar esto tanto al finalizar la grabación como en las anotaciones de campo. Un “voucher o ejemplar testigo” de canto es un ejemplar muy valioso por partida doble: constituye una muestra de la variación morfológica de una población o especie, pero al mismo tiempo también constituye una muestra de vocalizaciones para esa misma población o especie, de manera que no queden dudas con relación al canto característico de esa unidad biológica. Existe también el potencial de efectuar estudios donde se pueden correlacionar datos morfológicos asociados con la producción de las vocalizaciones generadas. Si lo que se va a hacer es monitoreo acústico, o si se trata de especies amenazadas, *no hay necesidad de coleccionar a los ejemplares*, pero siempre es recomendable medirlos y pesarlos, para permitir la asociación de datos de tamaño a características del canto. También, y sobre todo en el caso de especies amenazadas, es fundamental que la documentación fotográfica acompañe a los cantos grabados. De esta manera se busca recabar evidencia fotográfica que ayude a la posterior confirmación de la especie.



## Documentación de datos acústicos

Aunque la cantidad y detalle de la información utilizada para documentar una grabación puede parecer un tanto abrumadora, es muy importante incluir la mayor cantidad de información posible acerca de la misma. Esto no sólo hace que la grabación tenga valor científico, sino que también tenga el potencial de posibilitar estudios que utilicen algún aspecto específico de los datos colectados. Proporcionamos aquí una relación de los tipos de datos que son tomados y que recomendamos se incluyan con las grabaciones y/o libreta de campo (derivados de GONZÁLEZ-GARCÍA 2004, HEYER *et al.* 1994, KROODSMA *et al.* 1996, página web del Laboratorio Borrór de Bioacústica (<http://blb.biosci.ohio-state.edu/>), y experiencia personal de la autora). La lista está dividida en dos rubros, constituidos por 1) aquellos datos que son considerados necesarios, y 2) aquellos datos que serían útiles, pero que pueden ser prescindibles. Es importante mencionar que, en algunos estudios, ciertos datos que podrían ser considerados útiles en determinadas circunstancias podrían ser considerados necesarios en otras; esto dependerá de los objetivos de cada estudio.

### Datos necesarios

1. Nombre de la persona que ejecuta la grabación, afiliación institucional y dirección.
2. Datos geográficos y localidad (de general a específico).
3. Número de cinta/CD/archivo/disco.
4. Fecha.
5. Hora de grabación.
6. Temperatura (del medio de transmisión -aire, agua- y si es posible del animal).
7. Especie.
8. Número de campo de espécimen, si lo hay (especificar).
9. Tamaño del ejemplar grabado (longitud rostro-cloacal), dado

que los patrones de frecuencia varían en función al tamaño, ya que generalmente existe una correlación negativa: a mayor tamaño, frecuencia más grave.

10. Hábitat general y detalles de microhábitat.
11. Condiciones climáticas y del tiempo, humedad relativa.
12. Contexto en que se observó la producción de vocalizaciones (p.ej., ¿Estaba solo el animal cuando cantaba? ¿Había otras ranas de la misma (u otras) especie(s) en la proximidad y de ser así a qué distancia? ¿Había llovido? ¿Había luna llena?). Este tipo de observaciones puede ayudar en la compilación de un inventario de los diferentes tipos de vocalizaciones que pueda tener una especie.
13. Si el animal fue expuesto a estímulos acústicos vía reproducción de cantos grabados (“playbacks”).

### Datos útiles

1. Peso del ejemplar grabado.
2. Marca y modelo de todos los equipos utilizados (grabadora, micrófono, parlantes, etc.).
3. Si el equipo tiene varias opciones para grabar (estéreo vs. mono, con o sin atenuación –“Dolby system”-, cambio de velocidad, direccionalidad del micrófono, tipos de cinta, casete, etc.) anotar las opciones utilizadas.
4. Número de ranas observadas, o detectadas por canto.
5. Si más de una rana de una misma especie está cantando, indicar a cuales de las vocalizaciones grabadas pertenece el ejemplar, y aproximadamente cuántas están vocalizando en el entorno inmediato a la hora de efectuarse la grabación.
6. Otras especies de ranas observadas o cantando en las intermediaciones.
7. Distancia aproximada entre el ejemplar y el micrófono.

### Temperatura

**Uno de los datos de mayor importancia que se debe tomar en cuenta al efectuar grabaciones de anfibios anuros es la temperatura del medio de transmisión, y si es posible, del propio animal grabado. Esto es porque dado que los anuros son poiquiloterms, ciertas características de sus vocalizaciones suelen variar con cambios de temperatura (que afecta notablemente algunas características temporales tales como duración, tasa de repetición y tasa de pulsos del canto (ZWEIFEL 1959, 1968)), de manera que el canto de una especie grabado a 23°C puede diferir substancialmente de aquel grabado a 15°C. Esto puede afectar el análisis de variación en canto, de manera que si se tienen suficientes animales grabados y estas vocalizaciones ocupan un rango de temperaturas, se sugiere hacer una corrección a través de un análisis de regresión simple.**

8. Posición relativa del animal con relación al micrófono (frente a él, de espaldas, a 90° del micrófono, etc.)
9. Lapso o período de grabación según la numeración del medidor de cinta o según el indicador del grabador.
10. Otros sonidos que pudieran ser percibidos al efectuarse la grabación.

Existen algunas pautas que pueden ser útiles en la documentación de las grabaciones, como lo son:

1. Establecer un patrón metódico de registro y almacenamiento de información (incluyendo el orden en el cual se anexa la información pertinente a una grabación o corte dado, lo que puede ser al principio o al final de la grabación), de manera que su posterior extracción sea más fácil.
2. Establecer cuándo se acaba una grabación; normalmente se hace verbalmente con la palabra “corte” o “fin de grabación”.
3. Si se hacen paradas en el transcurso de la grabación tratar



Tabla 1. Ejemplo de formulario de campo para la colección de datos de grabaciones de vocalizaciones

## Formulario de campo para la colección de datos de grabaciones de vocalizaciones

Nombre:		Afilación:	
Número de cinta/disco/tarjeta:		Indicador de cinta/pista/archivo:	
Localidad:			
GPS:		UTM:	
Fecha:		Hora Inicio:	Hora Fin:
Temperatura	Animal:	Aire:	Agua:
Especie:		Ejemplar colectado?	___ Si ___ No
Número de campo:		Tamaño rostro-cloacal (mm):	Peso (gr.):
Hábitat:			
Microhábitat:			
Condiciones climáticas			
Humedad relativa:		Precipitación:	Cielo:
Viento:		Fase lunar:	
Equipo			
Grabadora:		Micrófono:	Parlantes:
Opciones:		Opciones:	Opciones:
Distancia entre ejemplar y micrófono:		Ángulo de grabación:	
Número de ranas observadas/detectadas por canto:			
Otras especies observadas/escuchadas:			
Contexto de vocalización:			
Notas/observaciones:			



de indicar en la misma cinta, pista o archivo cuándo se han efectuado, el porqué, y si se conocen los intervalos de tiempo entre parada y parada, incluirlos en la cinta o pista antes de que se le olvide.

4. Como una ayuda para recordar cuáles datos son lo que se deben tomar en el campo, se recomienda imprimir formularios de campo vacíos y sacarles fotocopias, de manera que una vez que se esté en el campo sólo sea necesario rellenar los formularios con los datos (ver ejemplo de formulario en Tabla 1).

### *Calibración del equipo*

La calibración se debe efectuar antes de salir al campo, y consiste en probar el rendimiento del equipo y que éste opere de acuerdo con sus especificaciones. Ya el monitoreo o control se efectúa tanto antes de entrar al campo como antes de grabar. Los equipos de audio se pueden calibrar mediante el uso de tonos puros de las diferentes frecuencias de interés, los que comúnmente son producidos por un generador de frecuencias o digitalmente; y se busca la relativa uniformidad de la curva de respuesta de frecuencias del aparato en evaluación, la que es tomada a través de un medidor de intensidad de sonido y programas de análisis de sonido. Se puede usar, además, un osciloscopio para la visualización de las ondas reproducidas por el equipo de sonido. El uso combinado de estos aparatos permite la detección de cualquier irregularidad, y la calibración y ajuste del equipo para compensar estas irregularidades.

Los componentes electrónicos que forman parte de un sistema de grabación y análisis de sonido influyen sobre la señal que pasa a través del mismo. En muchos casos el efecto es beneficioso, pero también existen costos, tales como la adición de ruido y distorsión de la señal (WICKSTROM 1982). La mejor manera de minimizar los efectos negativos que tengan estos costos en la señal es comprender cómo operan los instrumentos utilizados y, dadas sus propiedades, cómo optimizar su calidad y rendimiento. Igualmente, al ejercer controles (monitoreo) en el proceso de grabación, se busca no solamente una grabación viable, sino también mejorar la calidad de la

señal adquirida (para detalles ver bajo “Consideraciones importantes en el campo”).

### Monitoreo acústico

Las vocalizaciones y grabaciones de las mismas pueden ser muy útiles en trabajos de monitoreo de poblaciones y comunidades. Este tipo de monitoreo acústico se puede efectuar en la forma de “transectos audio” (recorridos de detección de vocalizaciones) o de inspecciones en sitios de apareamiento. En el caso de transectos audio, los que funcionan en forma semejante a los “transectos visuales” (recorridos de detección visual de ejemplares), el propósito es identificar y cuantificar el número de machos que vocalicen a lo largo de un transecto. La ventaja del transecto audio es que provee una mejor relación en términos de tiempo empleado y personal involucrado. Las desventajas son que este tipo de monitoreo sólo se puede efectuar con especies vocalizadoras; que sólo se registran los machos vocalizadores mas no las hembras y juveniles o algunos machos satélite, si los hubiera; que hay una curva de aprendizaje para lograr identificar a los cantos correctamente y a estimar el número de machos vocalizadores (esto hasta un cierto punto pues con un gran número de individuos es muy difícil estimar con precisión), y que los resultados pueden variar dramáticamente con las condiciones climáticas en el momento en que se efectúe el muestreo (ver LIPS *et al.* 2001). Existen varias propuestas para estimar la densidad poblacional de machos con un rango subjetivo de abundancia. Recomendamos el uso de la propuesta de “ranking” en LIPS *et al.* (2001):

1. Para un individuo macho
2. Para un coro de 2-5 machos
3. Para un coro de 6-10 machos
4. Para un coro de >10 machos

En lo que refiere a inspecciones en sitios de apareamiento, el propósito es identificar y cuantificar el número de machos que vocalicen en un sitio dado a una hora o intervalo de horas determinadas. En este caso, se recomienda que los puestos de escucha se encuentren a distancias mayores de 100 m para evitar sobreposiciones y contar a uno o más machos más de una vez (revisar LIPS *et al.* 2001). Una

herramienta muy útil en sitios de apareamiento son los Sistemas o Unidades de Grabaciones Audio (SGA o UGA). Estos son sistemas de grabación que frecuentemente integran la capacidad de grabar automáticamente cortes de duración predeterminada por el investigador a intervalos regulares con instrumentación que provee información complementaria, tal como la temperatura y la humedad relativa.

### El proceso: De la rana a la computadora

Muy sucintamente, lo que se está logrando cuando se efectúa una grabación acústica, es un cambio de forma de energía. Es decir, la energía se transforma. Cuando una rana emite una vocalización en un medio físico tal como lo es el aire, el canto toma la forma de energía vibratoria. Al grabar una vocalización, lo que se está haciendo es transformar esta energía vibratoria en un tipo de energía eléctrica que se puede almacenar en dispositivos especiales tal como lo son las cintas de audio magnéticas o digitales o discos ópticos (ver Figura 5). La posterior extracción de estas vocalizaciones se efectúa mediante otra transformación de energía. Para lograr estas transformaciones se utiliza lo que se llaman **transductores**, que son dispositivos que convierten un tipo de energía en otro. Por ende, aparatos eléctricos tales como micrófonos y parlantes constituyen transductores electroacústicos (HALL 1987).

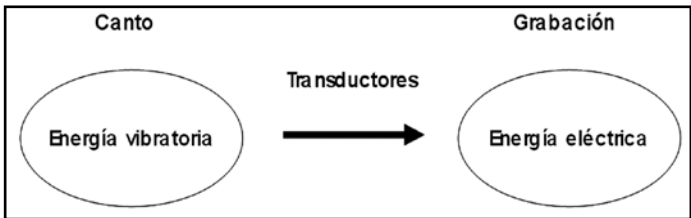


Figura 5. Esquema de representación de la conversión de energía en una grabación. Una señal acústica comprende un tipo de energía vibratoria, la cual es convertida en energía eléctrica mediante el uso de un transductor.

### Componentes de un sistema de grabación y análisis de sonido

¿Qué ocurre desde la grabación hasta el análisis? Podemos resumir este proceso en tres etapas: 1) grabación, 2) digitalización y 3) análisis.

Cabe resaltar que para todas las etapas se requiere ciertos componentes básicos, los que por comodidad dividimos en hardware (los componentes físicos, p. ej. electrónicos, mecánicos y magnéticos) y software (programas).

### 1. Grabación

El primer paso para efectuar una grabación es armar un sistema de grabación. La selección adecuada de los componentes de este sistema le permitirá al investigador maximizar la cantidad de información que pueda extraer de sus grabaciones, así como ahorrarle tiempo, dinero y frustraciones.

Un sistema básico de grabación (constituido mayormente por componentes físicos) comprende: a) micrófono (externo o interno de un grabador, aunque de preferencia externo), b) grabador, c) medio de almacenamiento (cintas magnéticas, cintas de audio digitales, discos de memoria, discos ópticos), y d) audífonos. Existe otra instrumentación adicional útil en el proceso de grabación (p. ej. parlantes, amplificadores, parábolas o reflectores parabólicos, medidores de intensidad de sonido, cables conectores), pero su uso dependerá de las necesidades del estudio [p. ej. si se requiere estimular una respuesta acústica, como un canto agresivo, que podría derivar en una grabación (parlantes y amplificadores), o efectuar grabaciones de animales que estén vocalizando desde muy lejos o desde el dosel de un bosque (parábola o reflector parabólico), o para medir la intensidad de una señal acústica (medidor de intensidad de sonido)].

Todo equipo electrónico que se utilice para grabaciones con fines de análisis científico debe contar con un folleto informativo que detalle las especificaciones del equipo, sobretodo detalles importantes como lo son el rango de frecuencias cubierto y curva de respuesta a estas frecuencias. Así y todo, existe una cierta varianza en la producción del equipo, y las especificaciones suelen ser más precisas al tratarse de unidades nuevas (WICKSTROM 1982).

Los tipos y modelos de grabadores han variado en el tiempo, y si bien en la actualidad hay una mayor diversidad, existen modelos antiguos que, aunque discontinuados son herramientas populares en la grabación de señales acústicas. (ver GONZÁLEZ-GARCÍA 2004 y

### **Equipo básico de grabación en campo**

**Los componentes básicos de un equipo de grabación para el campo incluyen:**

- Grabador
- Micrófono externo
- Audífonos
- Medios de almacenamiento (casetes, discos, etc.)
- Fuente de energía (pilas o baterías en el equipo y de reserva)
- Termómetro
- Vernier/calibrador (para medir el tamaño de los animales)
- Balanza (para pesar a los animales)
- Libreta de campo
- Lápiz o rapidógrafo (lapicero de tinta china)

HAVEN & RANFT 2005) Se incluyen, además, unos breves comentarios sobre algunos modelos analógicos en esta sección, al igual que otros modelos más recientes. La autora ha utilizado extensamente Sony® Walkman® Professional WM D6C y también ha usado el Marantz® PMD-222. Ambos grabadores analógicos se desempeñan bien en el campo, si bien se ha experimentado que en condiciones muy húmedas los cabezales del Sony® Walkman® Profesional WM D6C pueden trabarse temporalmente. Para minimizar que esto ocurra, ya sea con este modelo u otros modelos de grabadores analógicos, se recomienda tener el grabador en un ambiente seco hasta el momento de su uso.

En lo que refiere a los grabadores digitales, la autora tiene experiencia con el grabador Sony® DAT PCM-M1 y con el MiniDisc Sony® Hi-MD MZ-RH10.

Del tamaño de un Walkman el modelo PCM-M1, es muy portátil, utiliza cintas DAT, ofrece una nítida calidad de grabación, y permite selección de pistas in situ. Las desventajas son el costo de las cintas y el hecho de que el grabador consume rápidamente las pilas alcalinas convencionales, por lo que es necesario utilizar pilas recargables tipo

NiMH. El MiniDisc RH10 opera bien ante la humedad y condiciones de campo, y la calidad de grabación es muy buena y nítida. Algunas observaciones prácticas en relación con este modelo son 1) los botones de control son pequeños, especialmente el de grabación, por lo que en condiciones de poca visibilidad queda difícil apretar el botón apropiado, 2) al grabar las secuencias en el disco, el aparato hace un sonido mecánico de grabación cada cierto intervalo de tiempo, y si se tiene un micrófono muy sensible lo captará, por lo que se debe tener el micrófono a cierta distancia y/o aislar acústicamente el equipo con material aislante (p. ej. espuma, o ponerlo dentro de un estuche de cámara con insule); esto puede hacerse difícil si se está controlando el nivel de grabación, 3) el control del nivel de grabación debe ser puesto en manual cada vez que se opere la unidad, pues el “default” es automático, 4) cuando se presiona pausa el aparato automáticamente asigna una pista nueva a la secuencia siguiente, 5) el estuche de la batería externa se aloja justamente sobre el puerto USB, por lo que para poder transferir los archivos a la computadora hay que remover el estuche, y 6) hay una curva de aprendizaje para aprender el manejo de los menús digitales, por lo que es altamente recomendable practicar el uso de los menús antes de salir al campo.

La Biblioteca Macaulay del Laboratorio de Ornitología de la Universidad de Cornell ([www.birds.cornell.edu/macaulaylibrary/](http://www.birds.cornell.edu/macaulaylibrary/)) ha producido un informe de grabaciones de campo en formato pdf con una evaluación de equipo audio disponible en el mercado. El informe es accesible a través de la siguiente página web: <http://content.ornith.cornell.edu/UEWebApp/data/bin/RecordingEquipment.pdf>, y provee detalles de equipo que incluyen marcas, precios, ventajas y desventajas. Igualmente, la página web de la Biblioteca de Sonidos de las Aves de México ([www.ecología.edu.mx/sonidos](http://www.ecología.edu.mx/sonidos)) también proporciona información acerca de equipo audio (GONZÁLEZ-GARCÍA 2004). Referimos al lector(a) a estos documentos y a otras fuentes proporcionadas al final de este capítulo para detalles más específicos de equipo.

Un buen equipo de audio portátil para el trabajo de campo en regiones tropicales debería contar con ciertas propiedades básicas, entre ellas (GONZÁLEZ-GARCÍA 2004, HEYER *et al.* 1994):



- Poder capturar las frecuencias de las vocalizaciones con exactitud
- Poseer un buen control de la velocidad de grabación (en el caso de grabadores analógicos)
- Poseer un medidor del nivel de grabación
- Permitir la reproducción de la grabación
- Poseer opciones para el uso de diferentes fuentes de energía (red eléctrica o pilas)
- Poseer conexiones de entrada y salida del equipo, las que permiten conectarlo a tableros de adquisición de datos y computadoras
- Ser relativamente fácil de usar
- Ser resistente a la humedad
- Ser durable

Cabe mencionar aquí que el elemento de costo es también de gran importancia.

Dada la naturaleza especializada de lo que implica efectuar grabaciones en ambientes naturales para su posterior análisis acústico, la gama de equipo electrónico para este propósito disponible en el mercado era tradicionalmente algo limitada (aunque ha habido un notable incremento en opciones con la nueva tecnología digital) y con costos que, para el bolsillo latinoamericano común, iban desde lo moderado hasta bastante elevado. En la actualidad hay más opciones con precios más asequibles. Se busca, pues, llegar a un término donde se puedan satisfacer los requerimientos de grabación dadas las fuentes económicas disponibles.

#### **a) Micrófono**

El micrófono constituye el primer transductor del sistema de grabación, y por ello es un elemento fundamental. Se recomienda utilizar un micrófono que se pueda conectar al grabador mediante un cable, en vez de los micrófonos que vienen integrados a ciertos grabadores. Algunas consideraciones importantes en la elección de un micrófono son i) el tipo de dispositivo para convertir la energía, ii) el patrón polar, iii) la respuesta de frecuencias, y iv) la eficiencia.



Estas consideraciones se resumen a continuación de acuerdo a WICKSTROM 1982.

- i) En lo que refiere al dispositivo para convertir la energía, un micrófono puede ser dinámico, condensador, de cristal o cerámica, o de cinta. La base de un *micrófono dinámico* es un diafragma conectado a un tubo, el que está envuelto por una bobina de alambre en un campo magnético. Cuando el sonido hace vibrar el diafragma, la bobina se mueve dentro del campo magnético, creando una corriente eléctrica dentro de la bobina. Las ventajas del micrófono dinámico son su sencillez, durabilidad y resistencia al ambiente. Las desventajas son su sensibilidad al ruido mecánico, baja intensidad de volumen, inestabilidad ante diferentes temperaturas, pobre manejo de señales cortas y frecuencias bajas.

El *micrófono condensador* posee un diafragma hecho de material conductivo fino. Tras este diafragma se encuentra una placa conductiva, y ambas superficies constituyen un “capacitador”. A medida que el diafragma vibra, la “capacitancia” varía, creando una señal eléctrica ya sea por un cambio en voltaje proporcional a la variación de la “capacitancia”, o por un cambio de frecuencia en el circuito resonante de un oscilador. El micrófono condensador suele ser estable, resistente a ruidos mecánicos, y ofrece una buena respuesta de frecuencias. Las desventajas son que requieren de fuentes de energía para su operación, el diafragma se puede contaminar fácilmente, y es sensible a la humedad -factor que aumenta la cantidad de ruido de bajas frecuencias.

El *micrófono de cristal o cerámica* usa un material que produce un voltaje eléctrico cuando se ve deformado (material piezoeléctrico). Se anexa un diafragma a este material o el material en sí se convierte en diafragma. Este tipo de micrófono es de uso limitado.

El *micrófono de cinta* usa una cinta metálica ligera dentro de un fuerte campo magnético. A medida que la cinta vibra, se genera un voltaje proporcional a la velocidad de la onda.

- ii) El patrón polar se refiere a la sensibilidad del micrófono en relación con el ángulo de incidencia del sonido. El patrón polar de los micrófonos puede ser omnidireccional, bidireccional o unidireccional (cardioide, lo que puede incluir una serie de variantes, incluso un micrófono “shotgun”, el que es altamente direccional; ver Figura 6). La elección de un micrófono de determinado patrón polar dependerá del tipo de grabación que se requiera. Por ejemplo, si se requiere de una grabación clara de una sola rana un micrófono unidireccional

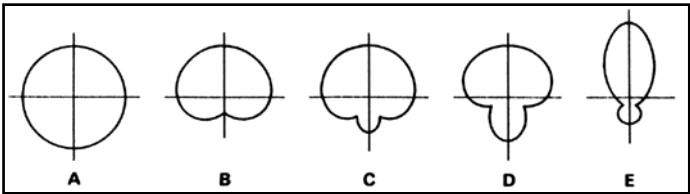


Figura 6. Patrones polares de los diferentes tipos de micrófonos, los cuales son como sigue: A) omnidireccional, B) cardioide, C) hipercardioide, D) supercardioide y E) shotgun. Tomado de WICKSTROM (1982), reimpresso con permiso de Elsevier.

sería una buena opción, mientras que si se requiere grabar coros un micrófono omnidireccional sería una alternativa apropiada.

- iii) Idealmente se busca utilizar un micrófono que posea una respuesta de frecuencias lo más uniforme o plana posible sobre el total abanico de frecuencias que pueda cubrir, y que puede variar entre 20 y 20000 Hz en aquellos micrófonos de rango audio disponibles en el mercado.
- iv) La eficiencia de un micrófono se puede interpretar como una combinación del nivel de intensidad (“output level”) y sensibilidad. Generalmente se prefieren aquellos micrófonos que tengan un nivel de intensidad más alto dado que comúnmente hay cierto grado de ruido interno generado por el sistema, además del ruido externo, con los que hay que contender.

#### b) Grabador

Al igual que en el caso del micrófono, existen varias consideraciones que se recomienda tener en cuenta al elegir un grabador, tales como

son i) el formato o tecnología, ii) la respuesta de frecuencia, iii) la velocidad (en el caso de grabadores analógicos), iv) distorsión, y v) proporción señal-ruido.

- i) Existen varios formatos para efectuar grabaciones disponibles en el mercado actual. Los formatos incluyen sistemas analógicos (grabadoras de carrete a carrete, también conocidas como multicanales, y cintas casetes) y digitales (grabadoras de cintas digitales audio o R-DAT: digital audio tape, grabadoras de disco duro, grabadoras de tarjetas de memoria, minidisks y discos compactos). Los formatos se han hecho progresivamente más pequeños, siendo las grabadoras de carrete a carrete (más antiguas) las de mayor porte, hasta los recientemente desarrollados sistemas digitales, algunos de los cuales caben cómodamente dentro de un bolsillo (p.ej. los MiniDiscs). Cabe resaltar que cada formato tiene tanto ventajas como desventajas, y la idoneidad del sistema en su aplicación dependerá del contexto en el cual se use. También se debe tomar en cuenta la relativa facilidad para obtener medios de almacenamiento y ayuda técnica en el caso que se requiriera en el país del investigador.

Los sistemas analógicos convierten los cambios de presión de un sonido en energía eléctrica mediante una fuerza eléctrica o campo magnético. Los materiales son magnetizados por fuerzas externas, y permanecen en esa condición aún cuando ya no existe esa fuerza. Durante una grabación, el material magnético (p.ej. una cinta casete) pasa por un transductor (que viene a ser el cabezal) formando un circuito magnético. A medida que la cinta pasa por el cabezal, las partículas del material se magnetizan proporcionalmente a la corriente que se transmite en ese instante (WICKSTROM 1982). Ya los sistemas digitales tratan las variaciones de presión del sonido mediante algoritmos numéricos, los que convierten a señales acústicas en una serie de números discretos, donde cada número representa la presión del aire en un momento dado y que viene a constituir la grabación. En sistemas digitales como los MiniDiscs, se utiliza un rayo láser para transferir las señales

---

acústicas al medio de almacenamiento (GONZÁLEZ-GARCÍA 2004). Los sistemas digitales incorporan ya elementos de la digitalización, y tienen la capacidad de generar una alta calidad y nitidez de grabación (ver sección 2: Digitalización).

- ii) La respuesta de frecuencias de un grabador es tan importante como lo es la de un micrófono, e igualmente se busca un grabador con una respuesta de frecuencias lo más plana posible sobre el mayor número de frecuencias dentro del rango que abarca la unidad (normalmente de 20 a 20000 o 22000 Hz).
- iii) En el caso de grabadores de carrete a carrete y de casete, la velocidad de una cinta puede variar, operando en forma ya sea más rápida (vibración) o más lenta (ululación), introduciendo así una alteración en la señal grabada o reproducida. Se busca que estos valores sean muy bajos (GONZÁLEZ-GARCÍA 2004).
- iv) Las distorsiones en una grabación pueden estar dadas por adiciones involuntarias ajenas a la señal (denominada distorsión armónica) y/o por la interacción de dos frecuencias captadas simultáneamente por el grabador (distorsión intermodular). Ambos tipos se expresan como un porcentaje, y se busca que estos valores sean lo más bajos posible (GONZÁLEZ-GARCÍA 2004).
- v) La relación existente entre información y ruido en una determinada grabación se denomina la relación entre señal y ruido (“signal to noise ratio”, o S/N). En lo que se refiere a un grabador, esta relación señal-ruido se aplica a la intensidad de la señal que ingresa al grabador en relación con la intensidad del ruido generado por los circuitos del grabador y del medio de almacenamiento utilizado. Cuanto mayor sea la relación señal-ruido, menor será el contenido de ruido. Igualmente, una proporción menor de señal-ruido indica una grabación ruidosa. Algunos equipos, sobre todo los de bajo costo y/o que utilicen un micrófono integrado al aparato, suelen captar el sonido del mecanismo de arrastre de la cinta en una grabación, incrementando el nivel del ruido

en una grabación. Se busca siempre maximizar la relación señal-ruido, y aunque existen técnicas de “limpieza” (filtros) que se pueden efectuar con posterioridad a la grabación, el mejor momento para maximizar esta relación es en el momento de la grabación (WICKSTROM 1982). Esta relación varía también con el tipo de medio de almacenamiento que se use (GONZÁLEZ-GARCÍA 2004).

### **c) Medios de almacenamiento**

El medio de almacenamiento inicial de una grabación dependerá del tipo de grabador que se utilice (analógico o digital). Sin embargo, dado el creciente uso de formatos digitales, se está buscando convertir las secuencias previamente grabadas en cintas magnéticas en archivos digitales, lo cual facilita la extracción de la información, siempre y cuando las secuencias se digitalicen dentro del rango de frecuencias de interés del investigador.

En el caso de grabadores analógicos de casete, se utilizan cintas magnéticas, las que pueden variar notablemente según el componente (óxido férrico o “tipo I”, dióxido de cromo o “tipo II” y metal, o “tipo IV”) o la polaridad (normal o alta). El tipo de cinta utilizada debe ir de acorde con las opciones para cintas que tenga el grabador, puesto que el uso de una cinta determinada en un grabador que no tiene capacidad para procesarla, o cuya opción no está seleccionada para ese tipo de cinta, puede resultar en distorsiones en la grabación (GONZÁLEZ-GARCÍA 2004). Normalmente se recomienda el uso de cintas tipo II o IV (debido a su mayor fidelidad) en equipo con estas opciones. Las cintas cassette también vienen en formatos de diferente duración, y se recomienda utilizar las cintas de menor duración como 45 o 60 minutos para evitar problemas relacionados con el uso de cintas más delgadas (de mayor duración) como son el estiramiento de la cinta (GONZÁLEZ-GARCÍA 2004). Asimismo, se sugiere el uso de un solo lado de la cinta de ser posible, para evitar posibles “sangrías” (migración de señales magnéticas de una parte de la cinta a otra adyacente; HEYER 1994).

Las cintas de carrete vienen en diferentes tamaños, pero al igual que las cintas cassette también vienen en diferentes grosores y longitudes.



Estas cintas son comparativamente más resistentes al estiramiento y posibles daños (GONZÁLEZ-GARCÍA 2004).

Las cintas R-DAT vienen en un formato semejante a un cassette de video. También vienen en diferentes longitudes, y tienen una alta capacidad de almacenamiento de datos así como una excelente calidad de grabación (baja distorsión y ruido interno mínimo), si bien son más delicadas que las cintas de cassette y de carrete por ser más angostas y vulnerables al polvo, suciedad y humedad, lo cual puede alterar la grabación (BIBLIOTECA MACAULAY 2004).

Los discos ópticos para los modelos más recientes de MiniDisc (Hi-MD, una notoria mejoría a los modelos anteriores de MiniDisc que comprimen frecuencias y al hacerlo sus grabaciones son dudosas para el análisis) poseen una capacidad de 1 GB, lo que se traduce en poco más de una hora y media de grabación estéreo total sin compresión por disco (BIBLIOTECA MACAULAY 2004). Constituyen un desarrollo relativamente reciente.

#### **d) Audífonos**

Es fundamental el poder evaluar y monitorear auditivamente la calidad de las grabaciones en el momento de su obtención en el campo, puesto que, en función a lo que se escuche, se puede re-dirigir el equipo o arreglar cualquier desperfecto proveniente del grabador, micrófono, una cinta o cable, logrando así maximizar la calidad de la grabación. Aunque muy variables en estilos, es importante que los audífonos tengan un buen nivel de intensidad y que a la vez provean cierto aislamiento (atenuación de ruido) del entorno inmediato para así poder escuchar bien la señal en el proceso de grabación (BIBLIOTECA MACAULAY 2004).

## *2. Digitalización*

Una vez obtenida una grabación de valor científico, la segunda etapa consiste en extraer la grabación del medio de almacenamiento y transformarla en un archivo digital para poder proceder a la generación de representaciones visuales y consecuentemente al análisis de las señales acústicas almacenadas. Con ciertos equipos más recientes la digitalización se puede efectuar en forma casi inmediata, de tal manera que la grabación pueda ser archivada como un documento

digitalizado desde un principio, lo que ahorra tiempo. Con equipos analógicos, la digitalización se puede hacer a través de tarjetas de sonido de la computadora o tableros de adquisición de datos.

En todo caso, un fundamental concepto en la digitalización es aquel de la tasa de muestreo (“sampling rate”), que es constituida por el número de veces que se registran diferentes puntos de amplitud en una señal acústica en un intervalo de tiempo determinado, y que se expresa en Hz o ciclos por segundo (Figura 7). Según el Teorema de Muestreo, para evitar distorsión en la reconstrucción digital de una señal analógica de banda espectral limitada, la tasa de muestreo debe ser de un orden de magnitud por lo menos dos veces mayor que la frecuencia máxima de la señal. El valor que cae en la mitad de esta tasa de muestreo se conoce como la frecuencia de Nyquist. La exactitud de la distribución de frecuencias en una señal digitalizada es mayor por debajo de la frecuencia de Nyquist. Las frecuencias dominantes de las vocalizaciones de muchas ranas están comprendidas en un rango de 300 a 8000 Hz, aproximadamente. Suponga-

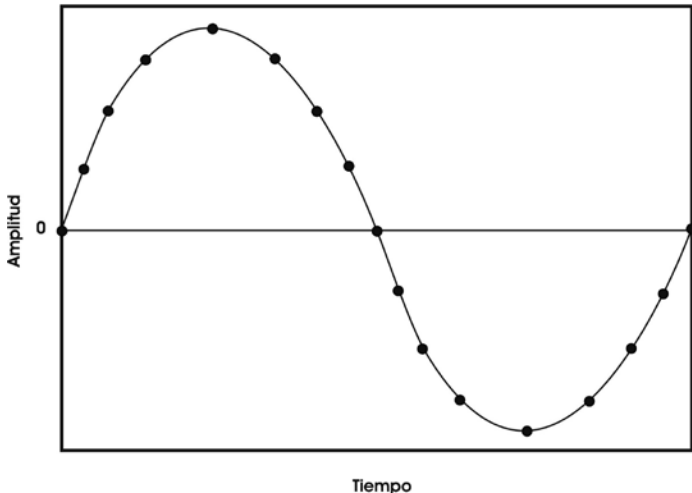


Figura 7. Ejemplo de una tasa de muestreo en un ciclo completo. La onda representa una señal analógica, mientras que los círculos negros representan los puntos de muestreo de la señal en el proceso de digitalización. A mayor cantidad de puntos de muestreo, mayor será la tasa de muestreo en ciclos por segundo.



mos entonces que grabamos una rana, pero que desconocemos su frecuencia dominante. Asumiendo que su frecuencia dominante se encuentre dentro del rango arriba mencionado, se podría calcular una tasa de muestreo utilizando el valor de 8000 Hz:  $8000 \times 2 = 16000$  Hz, de manera que la tasa de muestreo para esa señal podría ser de 16000 Hz. Sin embargo, las tasas de muestreo utilizadas en la práctica suelen ser muy superiores a este valor. Esto es en parte porque las vocalizaciones suelen tener armónicos, los que usualmente tienen valores superiores a la frecuencia dominante, y que se pueden perder no sólo en la grabación (bajo el efecto de la distancia de grabación), sino también al elegir una tasa de muestreo muy baja. En estos casos, es preferible elegir una tasa de muestreo más elevada (donde el costo incurrido es uno de almacenaje, ya que los archivos generados con tasas de muestreo más altas ocupan mayor memoria), que una tasa de muestreo más baja (donde se arriesga a perder información o en caso extremo distorsión de la señal).

Una consideración importante, ya sea en la fase de digitalización o en la fase de análisis, es el uso de filtros. Un filtro acústico viene a ser un mecanismo mediante el cual se bloquean o pasan componentes de sonido de diferentes frecuencias (JOHNSON 2003), siendo así una importante herramienta para manejar problemas de ruido. Dependiendo del estudio o la calidad de la grabación, una secuencia puede ser filtrada en el proceso de digitalización, en cuyo caso el archivo digital resultante ya ha tenido ciertos componentes espectrales retirados. En estudios exploratorios, sin embargo, se recomienda usar una banda de paso muy ancha (cubriendo una amplia gama de frecuencias), dado que se pueden perder componentes espectrales valiosos al filtrar durante la digitalización. Cabe resaltar que una vez que la secuencia ha sido filtrada no se puede ampliar al rango de frecuencias original, y se tendría que volver a digitalizar la grabación. Otra opción es filtrar una secuencia una vez que esta se encuentra digitalizada. En este caso, siempre se puede revertir al archivo original. Los filtros pueden atenuar o remover frecuencias altas (y entonces son conocidos como filtros “pasa-baja” o “low pass”, dado que permiten el paso de frecuencias bajas) o frecuencias bajas (filtros “pasa-alta” o “high pass”, que permiten el paso de frecuencias altas), y una combinación de ambas al definir bandas de paso.



Se recomienda verificar las especificaciones del hardware que se esté empleando para asegurar que la tasa de muestreo máxima del equipo sea suficiente para cubrir las necesidades de la investigación. Elegida la tasa de muestreo a ser utilizada, así como el número de bits, los filtros, canales y/o formato o extensión en el cual se irá a archivar el documento (estos datos adicionales dependerán del programa que se utilizará), se procede a la digitalización de la secuencia. Algunos equipos digitales recientes ya vienen con algunos de estos elementos pre-determinados.

### **Filtración anti-alias**

Este tipo de filtración es importante para lograr mediciones precisas y confiables de frecuencias de señales audio. Al muestrear frecuencias, el proceso llamado “aliasing” genera falsa(s) frecuencia(s) (o “alias”), la(s) que acompaña(n) las frecuencias correctas. Esto ocurre siempre que la secuencia a ser muestreada posea componentes espectrales iguales o superiores a la frecuencia de Nyquist. La función de la filtración anti-alias entonces es reducir o eliminar componentes espectrales que sean superiores a la frecuencia de Nyquist.

Una vez digitalizado y conservado en un formato con una extensión compatible con el programa de análisis de sonido, el archivo se encuentra listo para el siguiente paso: el análisis.

### *3. Análisis: caracterización y cuantificación*

Al tener una secuencia disponible en formato digital y con una extensión reconocible, se puede proceder a la descripción y análisis de los caracteres acústicos de interés mediante el uso de programas de análisis de sonido. El análisis efectuado por el investigador puede ser de dos tipos: un análisis acústico, el que genera un inventario de propiedades físicas de la señal, y un análisis estadístico (p. ej. medidas de tendencia central y tendencias de variabilidad) de estas propiedades físicas (GERHARDT & HUBER 2002). Juntos, ambos tipos de análisis suelen ser utilizados en la caracterización de señales acústicas. Para poder medir los parámetros de un análisis acústico se requiere de representaciones visuales de las señales acústicas. Estas representa-



ciones visuales se pueden dar de varias formas, dependiendo de si los parámetros que estén siendo evaluados son de naturaleza temporal (relacionada al tiempo) o espectral (relacionada a la frecuencia), o una combinación de ambas.

Las formas más comunes de representaciones visuales son el oscilograma o forma de la onda (“waveform”), el espectrograma (o audioespectrograma) y el espectro de poder. El oscilograma es una representación de la señal acústica (ver Figuras 8a y 8b) que permite observar los patrones de amplitud o intensidad (eje de las y) de la señal en el transcurso del tiempo (eje de las x). Las unidades de amplitud son relativas. Se recomienda utilizar el oscilograma para mediciones de parámetros temporales. El espectrograma permite visualizar el componente espectral (distribución, energía, número y patrones de frecuencias utilizadas) y de cómo éste varía en el transcurso del tiempo (ver Figura 8c). Tradicionalmente ha sido el espectrograma el que se ha utilizado para caracterizar vocalizaciones en la literatura sobre cantos de anfibios; sin embargo, existen elementos temporales informativos, dados por los patrones de amplitud, que no pueden ser inferidos a partir de un espectrograma, y por ende más y más se están utilizando combinaciones de representaciones visuales en la literatura especializada. Un espectro de poder (“power spectrum”), por otro lado, provee información de amplitud (eje de las y) o energía vs. frecuencia (eje de las x) (Figura 8d). El nivel de resolución (lo cual permite observar ya sea un mayor nivel de detalle o un patrón más generalizado) puede ser ajustado según las necesidades del investigador en cualquiera de estas representaciones visuales.

Los cantos generados por ranas normalmente varían tanto en el dominio temporal como en el dominio espectral, y es esta variación la que es caracterizada y cuantificada. Los caracteres acústicos pueden ser (GERHARDT & HUBER 2002) ya sea cualitativos (p.ej. presencia/ausencia de armónicos) o cuantitativos discretos (p. ej. número de pulsos en el canto) o cuantitativos continuos (p.ej. duración del canto). Lo que se vaya a necesitar en términos de mediciones va a depender de la naturaleza del estudio y del sujeto del mismo. Además existen variaciones en la literatura en cuanto a cómo se interpretan o se miden determinados parámetros (no hay definiciones universales), los que

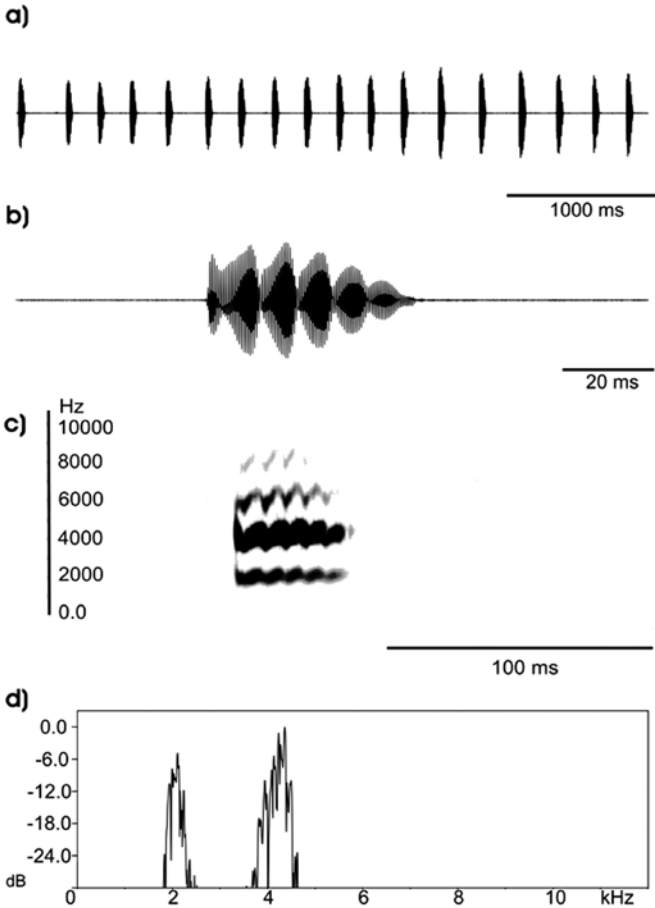


Figura 8. Representaciones del canto de una especie de rana de hojarasca *Leptodactylus hylaedactylus*. Las figuras a) y b) son ambas oscilogramas que muestran amplitud de la señal versus tiempo, difieren por sus distintos niveles de resolución (mayor resolución en b). La figura c) muestra cómo la frecuencia de la señal cambia con el tiempo, representación conocida como espectrograma. La figura d) muestra la relación entre amplitud y frecuencia en la señal acústica, representación que se conoce como espectro de poder. Modificado de ANGULO *et al.* (2003).

son establecidos y definidos por el investigador a priori. No obstante, hay algunos parámetros que si bien varían un tanto en su definición

y/o medición, suelen ser los más utilizados en la caracterización y cuantificación de los cantos. En el dominio temporal (Figura 9), rubros tales como la duración del canto, tasa de canto/tasa de repetición de canto, número de notas/pulsos por canto, intervalo entre cantos, período de pulsos, y duración del pulso son parámetros frecuentes en la literatura. Igualmente, en el dominio espectral (Figura 10), la frecuencia dominante, la frecuencia fundamental (Ewing, 1989) y los armónicos son elementos útiles y comúnmente utilizados para describir un canto. El factor de calidad o valor Q, que indica el ancho de banda de la frecuencia dominante a 3 ó 10 dB bajo el pico de

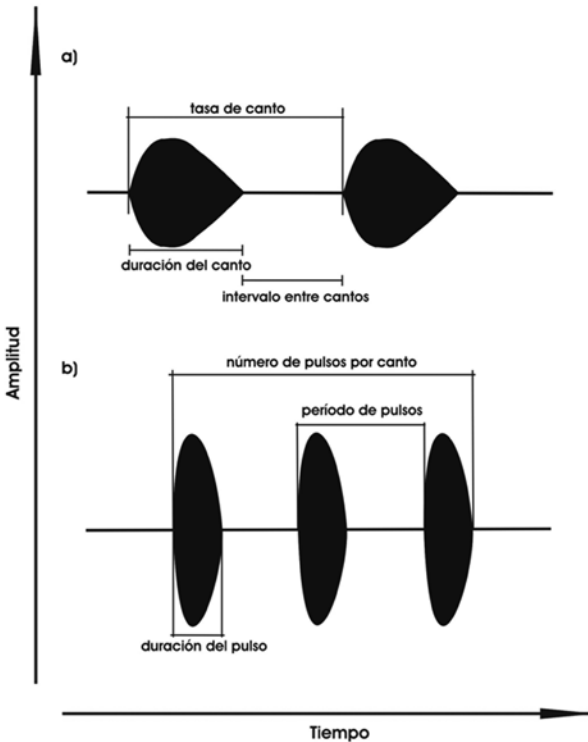
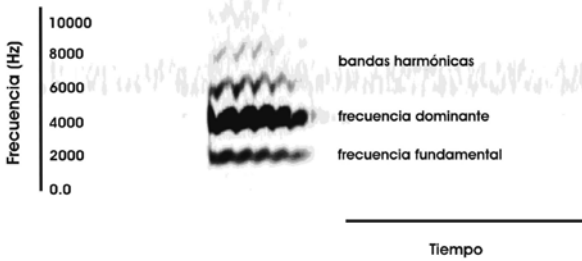


Figura 9. Representación gráfica de algunos parámetros temporales usualmente empleados en la descripción de cantos de anuros. Los cantos de anfibios anuros presentan una gran variedad de formas, las ilustradas aquí son sólo dos ejemplos de una amplia gama de posibilidades.

Modificado de ANGULO (2004).

máxima amplitud en el dominio espectral (BENNET-CLARK 1999), es otro importante descriptor de señales acústicas. Cabe recordar que los inventarios acústicos no necesariamente se limitan sólo a estos parámetros descriptores, se pueden utilizar otros parámetros, los que usualmente son definidos por el investigador según las características de las señales acústicas que vaya a analizar.

a)



b)

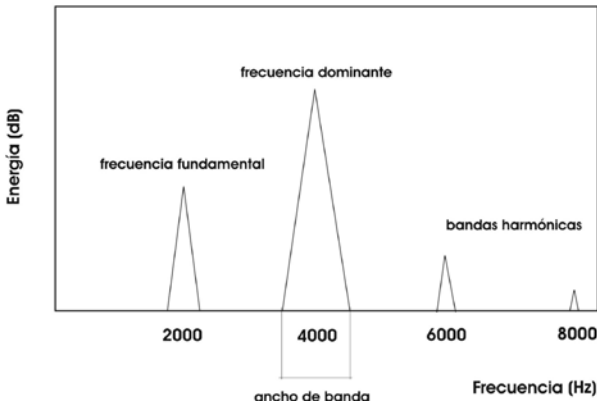


Figura 10. Representaciones gráficas de algunos parámetros espectrales comúnmente utilizados en la descripción de cantos de anuros. En la figura a) se observa la distribución de frecuencias del canto de *Leptodactylus hylaedactylus* en un espectrograma. Notar que todas las bandas espectrales mostradas son múltiplos de la frecuencia fundamental, constituyendo armónicos, y que luego de la frecuencia dominante el nivel energético de los armónicos va disminuyendo al incrementarse la frecuencia. La figura b) representa un espectro de poder con las frecuencias de a). Modificado de ANGULO (2004).



Existen varios programas de análisis de sonido disponibles tanto en forma comercial como gratuita (ver al final de este manual en la sección de recursos/fuentes de información de internet para más detalles). La mayoría de los programas comerciales permiten el uso de estos tres tipos de representaciones visuales, aunque no todos los programas que son de distribución gratuita o de uso compartido (“shareware”) permiten el uso de los tres a la vez, o proveen ciertas facilidades para su uso (es decir, a veces permiten una representación mas no una cuantificación de la señal). La elección del programa dependerá del sistema operativo utilizado, las necesidades de investigación, ya que como ha sido mencionado anteriormente, no todos los programas poseen la misma gama de funciones, y del costo del programa.

### **Análisis espectral - FOURIER y su teorema**

Al hablar de análisis espectral, debemos mencionar las transformaciones de Fourier. El espectrograma y el espectro son representaciones visuales donde se descomponen las diferentes frecuencias existentes en una señal acústica, lo que en análisis de sonidos se conoce como Transformación Rápida de Fourier (o “Fast Fourier Transform”- FFT por sus siglas en inglés). La FFT es una expresión matemática basada en el teorema de Fourier, el cual indica que cualquier función periódica puede ser descompuesta en una suma de elementos sinusoidales. Es decir, un patrón u onda compleja cualquiera puede ser descompuesta en las diferentes ondas sinusoidales que la componen sin importar el patrón, siempre y cuando se repita. Por lo tanto, cuando se le solicita al programa de análisis de sonido que genere un espectrograma, lo que ocurre es un cálculo de FFT, donde se descomponen las frecuencias de la secuencia analizada.

### **Laboratorios de acústica y bancos/bibliotecas de sonido**

Los laboratorios de acústica, o que utilicen equipos acústicos, pueden ser un recurso valioso para el investigador, al igual que los bancos/bibliotecas de sonido. Estos laboratorios suelen contar con personal versado en efectuar grabaciones y análisis de datos acústicos, así

como recursos bibliográficos y herramientas electrónicas. En muchos casos, incluso es posible conseguir un préstamo o alquiler de materiales, y el personal puede proveer información y técnicas útiles para los investigadores de campo. Laboratorios de herpetología, ornitología, mastozoología y entomología, además de laboratorios de ingeniería acústica, son potenciales de exploración.

Los bancos/bibliotecas de sonido son lugares de depósito de grabaciones efectuadas por distintos investigadores, y frecuentemente incluyen archivos sonoros de una diversidad de taxones y localidades. Cumplen funciones de investigación, educativas, comerciales y personales (GONZÁLEZ-GARCÍA 2004). Es más común encontrar bancos/bibliotecas especializados en un determinado grupo de animales que bancos/bibliotecas generalistas; nuevamente, las mejores fuentes de información acerca de estos bancos las constituyen los laboratorios, departamentos o grupos de investigación (universidades, institutos y museos) especializados en grupos dados y fuentes confiables de internet. Las colecciones privadas también pueden ser una fuente de archivos sonoros, si bien su acceso dependerá del o los investigadores a quienes pertenezcan.

### Consideraciones importantes en el campo

Antes de salir al campo, se recomienda que el investigador que vaya a trabajar con bioacústica por vez primera tenga en consideración dos elementos importantes: *silencio* y *paciencia*. El estudio de cualquier aspecto etológico (o de comportamiento) en muchos animales requiere de ambos factores, y es sobre todo importante en el caso de estudios de bioacústica puesto que 1) al mantener silencio el animal puede sentirse menos vulnerable y continuar la generación de señales, y 2) a menor ruido en el ambiente inmediato de la grabación, mejor calidad de la misma. El elemento de paciencia también es importante puesto que muchos animales se inhiben fácilmente al detectar la presencia de un posible predador (en este caso, el investigador), y pueden tardar en sentirse lo suficientemente seguros como para reanudar sus actividades de canto (y también hay que tomar en cuenta que en muchos casos no lo hacen).

Otra consideración bastante importante en el campo la comprende el ruido. Se entiende por ruido cualquier sonido que interfiera con la



transmisión y recepción de la señal de interés (RYAN 1988). El ruido puede estar constituido por elementos bióticos, tales como los cantos de otros animales co-específicos (otros machos de la misma especie) y de animales hetero-específicos (otras especies de ranas, insectos, aves, mamíferos, por ejemplo), o abióticos (p. ej., el viento, agua corriente, etc.). El ruido ambiental suele ser uno de los principales problemas tanto para los animales que buscan comunicarse como para el investigador que busca grabar. Algunos ambientes son particularmente difíciles, como por ejemplo los márgenes de las quebradas de agua corriente rápida y pequeñas o medianas caídas de agua, el bosque tropical a ciertas horas del día, los alrededores de lagunas y charcas que sirven de ambiente reproductivo para especies de reproducción explosiva, páramos y punas expuestos al viento, y alrededores de carreteras o centros poblados. Muchas especies han adoptado ciertas estrategias para lidiar con el problema del ruido (cantar a diferentes frecuencias u horas, utilizar diferentes posicionamientos, utilizar micro-ambientes especiales, etc.). El investigador cuenta también con herramientas de auxilio (p. ej. filtros, micrófonos direccionales, quiebra-vientos), pero se recomienda especialmente que se busque optimizar la relación de señal y ruido en el momento de la grabación, pues es el mejor momento para lograr un registro sonoro de buena calidad (WICKSTROM 1982).

### *¿Cómo iniciar una grabación?*

Es una frecuente pregunta para el investigador que comienza sus estudios de acústica y grabaciones. En el caso específico de ranas y sapos, el primer paso consiste en localizar un animal que esté cantando (la vocalización más común es el canto de advertencia). Esto suena más fácil de lo que en ocasiones es, sobre todo si el animal canta desde el dosel o desde la hojarasca de un bosque o entre aglomeraciones densas de gramíneas, arbustos, o maraña de raíces de ciertos árboles, por ejemplo. Si no se puede localizar al animal visualmente desde un principio, es importante por lo menos localizar el área inmediata desde donde está vocalizando, e intentar una grabación. Una vez identificada el área y/o localizada la rana, se procede a “armar” el equipo de grabación (prender el micrófono, si es de pilas, encender el grabador, revisar todas las conexiones entre los diferentes aparatos,



controlar que todas las opciones (p.ej. velocidad, si lleva atenuación o no, radio de acción, tipo de cinta) de los equipos sean las seleccionadas por el investigador, y monitorear el nivel de grabación (no muy intenso para evitar distorsión, pero tampoco demasiado tenue para mejorar la relación de señal-ruido ver figura 11). Cuando todo el sistema está conforme, se puede proceder a efectuar la grabación, buscando siempre la mejor relación de señal-ruido. Es muy posible (y hasta frecuente) que en el transcurso de todo ésto o incluso antes, la rana o sapo haya dejado de vocalizar. En estos casos, si es de noche, se recomienda tener el equipo listo para grabar (micrófono posicionado y botón para grabar por presionar o en pausa), apagar la linterna y permanecer en silencio y sin movimiento por un periodo de tiempo (este es subjetivo, dependiendo de la motivación del animal y de la circunstancia, necesidad o motivación del investigador en grabar a ese ejemplar en particular), hasta que (o si) el animal decida retomar sus vocalizaciones. Una alternativa a apagar la linterna es utilizar una luz roja tenue, lo cual se puede lograr adicionando un filtro rojo a una linterna de cabeza o de mano. La ventaja de usar una luz roja es que se pueden observar los movimientos del animal objeto de la grabación.

### *¿A qué distancia?*

Entre localizar a la rana y proceder a la grabación, debemos tomar una decisión en cuanto a qué tan cerca se debe posicionar el micrófono con respecto al animal (considerando, además, el nivel de aproximación que pueda permitir el animal). Si ponemos el micrófono demasiado cerca, mejoramos la relación de señal-ruido pero podemos introducir distorsiones por la complejidad propia del campo cercano; pero si lo ponemos demasiado lejos, nuestra razón de señal a ruido se ve afectada negativamente y perdemos detalles de la señal. Si ya tenemos alguna idea de la frecuencia utilizada por la rana (pongamos por caso que provenga de grabaciones previas o archivos de un CD o banco de sonidos), podemos utilizar esta información para calcular la longitud de onda y utilizar este valor para determinar el campo cercano. Si no tenemos idea de la frecuencia utilizada, es recomendable intentar grabar a más de una distancia, la que puede estar comprendida entre 0.5 y 2 metros, indicando



aproximadamente el valor de ésta al finalizar cada grabación. Así, es posible luego proceder al análisis de estas secuencias y determinar la longitud de onda, y cuál distancia de grabación es la más cercana a este parámetro.

### *¿Cuánto se graba?*

Este es un parámetro muy subjetivo, pero se pueden adaptar ciertos criterios generales en función a la tasa de repetición del canto del animal que se quiere grabar. Si se trata de un tipo de vocalización que se repite en forma rápida y constante, un par de minutos pueden bastar para grabar varias docenas de cantos. Si se trata de vocalizaciones más espaciadas en el tiempo, entonces se busca grabar nítidamente entre 10 y 30 cantos, siempre y cuando el animal coopere. Es importante tener acceso a varios cantos de un mismo individuo para determinar la variación tanto en el individuo como a nivel intrapoblacional, al compararse con otras grabaciones de la misma especie. También es recomendable que se prolongue la grabación por un tiempo ligeramente mayor que el final de la(s) vocalización(es).

### **Mantenimiento y almacenamiento**

Independientemente del sistema de grabación que se esté utilizando, se deben tener ciertas consideraciones con relación al almacenaje y mantenimiento del equipo. Se recomienda que se almacene el equipo electrónico en lugares secos en la medida de lo posible. Normalmente el equipo electrónico suele ser vulnerable a los efectos inmediatos y acumulativos de la humedad propia de muchas localidades donde se efectúan trabajos de campo. Por ende, tanto en el laboratorio como en el campo, un recipiente o bolsa plástica hermética con una sustancia desecante tal como Silicagel® o Dryrite® son apropiados para el almacenamiento de material de grabación. En el caso de no tener estos químicos a la mano y ante una emergencia, se puede utilizar arroz crudo, desecado previamente en una sartén limpia, almacenado dentro de una media/caletín y guardado con el equipo dentro del recipiente hermético. Si se encuentra en el campo efectuando una grabación, es muy importante que el equipo no se moje, sobre todo el micrófono, los cabezales del grabador analógico, el compartimiento

del disco de grabadores digitales, y los puntos de conexión (input/output) de todos los aparatos electrónicos.

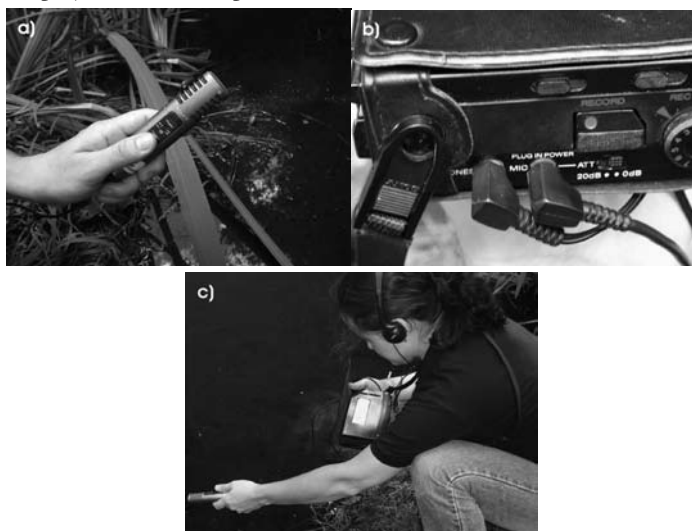


Figura 11. Preparación del equipo audio justamente antes de efectuar una grabación. a) Si el micrófono es de pilas asegurarse de que se encuentre prendido, b) revisar que todas las conexiones (micrófono, audífono o parlante) tengan contacto integral y que estén funcionando bien, así como asegurarse de que las opciones de grabación sean las elegidas (p.ej. nivel de atenuación 0 dB, tipo de cinta utilizada y velocidad de la misma si se trata de un grabador de casete o cinta, y c) monitoreo del nivel de grabación en el momento que se está efectuando la grabación.

Si se está utilizando equipo analógico, se recomienda la frecuente limpieza (a través de un hisopo humedecido con alcohol) y desmagnetización de los cabezales (mediante un desmagnetizador, que se puede utilizar cuando el sistema esté apagado).

Se recomienda también la frecuente revisión de pilas o baterías, ya que ciertos equipos electrónicos continúan operando aún cuando las pilas están bajas, y esto puede afectar la grabación (p.ej., la velocidad de transporte de la cinta en un grabador analógico). En el caso de equipo digital, el sistema suele dejar de operar apenas baja el poder de las pilas a un determinado umbral (con pilas alcalinas nuevas algunos



equipos digitales suelen operar un aproximado de dos horas de uso continuo). Se recomienda el uso de pilas NiMH recargables, pues duran más que las alcalinas.

## Agradecimientos

A Glenn Morris por su invaluable orientación en materia de bioacústica y grabaciones en campo, a Gerlinde Hoebel y Enrique La Marca por revisar este capítulo y por sus valiosos comentarios. A la Biblioteca Macaulay, por permitir la inclusión de un enlace a su informe.

A Robert Mannell por permitirnos el uso de la Figura 1.

A Herpetológica por permitirnos el uso de variantes de la Figura 5 de: ANGULO, A., R. B. COCROFT & S. REICHLER. 2003. Species identity in the genus *Adenomera* (Anura: Leptodactylidae) in southeastern Perú. *Herpetológica* 59(4): 490-504.

Las figuras 4 y 6 fueron reimpresas de: WICKSTROM, D.C. 1982. Factors to consider in recording avian sounds. pp. 1-52. En: KROODSMA, D. E., E. H. MILLER, Y H. OUELLET (eds) *Acoustic Communication in Birds*, Volumen 1., con permiso de ELSEVIER.

### **Lista de chequeo de procedimientos para realizar una grabación exitosa**

1. ¿Se encuentra el equipo de grabación calibrado?
2. ¿Lleva fotocopias de la hoja con los datos básicos que requiere recopilar en el campo?
3. ¿Lleva suficientes medios de almacenamiento?
4. ¿Tiene pilas o baterías cargadas en los equipos y de repuesto?
5. ¿Lleva equipo de repuesto?
6. ¿Lleva termómetro o termohigrómetro?
7. ¿Lleva materiales y recipientes para guardar y proteger el equipo una vez finalizada la grabación?

## Anexo 1. Antes de trabajar...

### **Recuerde:**

1. Probar el equipo antes de salir al campo
2. Controlar y monitorear el equipo y el ajuste de sus conexiones antes y durante el desarrollo de una grabación
3. Monitorear el nivel de grabación y lo que está grabando
4. Grabar a una distancia entre 0.5 y 2 metros del animal si no conoce su frecuencia. Si la conoce, grabar a aproximadamente una longitud de onda de distancia del animal
5. Buscar optimizar la razón de señal a ruido antes o en el transcurso de la grabación, evitando a la vez la distorsión
6. Grabar varios cantos por individuo en la medida de lo posible
7. Documentar la grabación en las hojas y en el medio de almacenamiento, así como la temperatura, las condiciones climáticas y hábitat en los que se efectuó la grabación
8. Establecer un patrón metódico de registro y almacenamiento de información
9. Escribir o indicar cualquier aspecto de importancia (si utilizó “playbacks” para obtener los cantos, si hubo interrupciones en la grabación y porqué, si hubo otros sonidos, etc.) al finalizar la grabación, antes de que se le olvide
10. Proteger el equipo de grabación del contacto directo con el agua o con tierra, suciedad, etc.
11. Llevar equipo extra de repuesto en el caso de cualquier eventualidad, donde sea posible
12. Tener paciencia
13. Mantener silencio mientras efectúa sus grabaciones
14. Revisar la carga de las pilas/baterías con regularidad

# Técnicas para el inventario y muestreo de anfibios: Una compilación

*José Vicente Rueda<sup>1</sup>, Fernando Castro<sup>2</sup> & Claudia Cortez<sup>3</sup>*

## Introducción

Un inventario es el estudio de un área, lugar o hábitat para determinar el número de especies (riqueza), por lo que el resultado final es una lista de especies; en tanto que el monitoreo consiste en el estudio de la abundancia de individuos, en una o más poblaciones de una especie, a lo largo del tiempo. La base para los programas de monitoreo de poblaciones de anfibios es la estimación de la abundancia absoluta o relativa con el objetivo de hacer inferencias sobre variación en espacio y/o tiempo.

Existen diversas técnicas para medir la diversidad biológica, las cuales dependen para su aplicación de los objetivos de los estudios, los recursos económicos y de personal que se tengan para su implementación y el nivel de precisión que se desee lograr en estos estudios. Es importante conocer la precisión y el nivel de profundidad de los inventarios, dado que, por presupuestos bajos, y la alta inversión de tiempo que demandan los estudios sobre densidades poblacionales, muchas veces resulta más útil medir y comparar la riqueza de especies.

Como casi siempre resulta imposible efectuar conteos de todos los individuos y especies de un determinado lugar (censo), se recurre

---

<sup>1</sup> Conservación Internacional, Carrera 13 No. 71-41, Bogotá, Colombia. [jvrueda@yahoo.com](mailto:jvrueda@yahoo.com)

<sup>2</sup> Universidad del Valle, Facultad de Ciencias Naturales y Exactas, Laboratorio de Herpetología, Cali-Colombia. [fcastro@univalle.edu.co](mailto:fcastro@univalle.edu.co)

<sup>3</sup> Investigadora Asociada a la Colección Boliviana de Fauna, calle Pedraza #344, Casilla 9179 La Paz, Bolivia. [mabuyaccf@yahoo.com](mailto:mabuyaccf@yahoo.com)

a efectuar un muestreo sobre la base de selección aleatoria y representativa de las poblaciones y hábitats. A partir de las muestras se pueden realizar inferencias acerca de los tamaños de las poblaciones y la diversidad de especies. Para tener precisión en los estimadores es necesario identificar las fuentes de variabilidad y sesgos: periodo del día, condiciones climáticas, capacidad/experiencia de los observadores, distribución de especies, variación natural de los hábitats, etc. Igualmente es necesario que los estudios puedan ser replicados para validar los resultados obtenidos, lo cual puede realizarse remuestreando los sitios originales de muestreo o muestreando en hábitats similares.

Si los puntos de muestreo no están distribuidos al azar, en toda el área de estudio, el análisis de las muestras resultantes podrá subestimar o sobrestimar la biodiversidad. La heterogeneidad ambiental puede evitarse: 1) reconociendo la variación, efectuando submuestreos en los diferentes tipos de hábitats y luego comparando las estimaciones resultantes entre los tipos de hábitat (muestreo estratificado), o 2) ignorando la heterogeneidad y muestreando al azar, sin tener en cuenta el tipo de hábitat (THOMPSON 2002, MORRIS & DOAK 2002). En ambos casos, distribuir los muestreos al azar en el área de estudio es una excelente estrategia para minimizar el problema del sesgo del muestreo, tanto en comparaciones dentro de un mismo estudio como en comparaciones entre estudios.

La meta principal de los estudios de inventario y monitoreo es brindar datos comparativos para el análisis de la biodiversidad, así como examinar las tendencias poblacionales, las extinciones locales y el impacto de las actividades locales sobre las poblaciones de anfibios.

En este manual se resumen algunas de las técnicas expuestas en HEYER *et al.* (2001), LIPS *et al.* (2001), BIBBY *et al.* (1998), THOMPSON, *et al.* (1998) y SCHEMNITZ (1980), para medir la riqueza de anfibios, en un sitio en particular, mediante *procedimientos cuantitativos y diseños aleatorios para que un inventario inicial de anfibios pueda expandirse a un programa de monitoreo*. La clave de un programa de monitoreo radica en obtener los objetivos dentro de las limitaciones de costos, por lo que la selección de una técnica de muestreo debe ser vista en términos de costos y utilidad de los resultados. La utilidad de los resultados depende del

nivel de precisión y sesgos de los estimadores poblacionales. De la misma manera, los métodos de análisis de la información que se sugieren a continuación, están orientados a interpretar los datos acopiados informando acerca de las restricciones impuestas por la detectabilidad de anfibios en los diferentes hábitats, la experiencia de los investigadores y el tiempo.

## Técnicas de muestreo

### 1) Inventario completo de especies (búsqueda libre y sin restricciones)

Es el método más eficiente para obtener el mayor número de especies en el menor tiempo por parte de colectores experimentados. Consiste en realizar caminatas durante el día y la noche, en busca de anfibios, pero sin que existan mayores reglas para la búsqueda (excepto el revisar minuciosamente todos los microhábitats disponibles). Su objetivo es registrar el mayor número posible de especies; la eficiencia y comparabilidad se fortalecen si el muestreo, a corto plazo, se realiza durante el período del año y condiciones climáticas en que la herpetofauna es más activa (época de lluvias y alta humedad). La herpetofauna, en general, suele incrementar su movilidad 2 ó 3 días después de lluvias fuertes dependiendo de la temperatura ambiente. Esta técnica permite comparaciones entre hábitats en un solo lugar, puesto que las comparaciones entre lugares diferentes resultan inapropiadas, en virtud de las diferencias ambientales (clima, cobertura vegetal, predadores, competidores, etc.) que tienen un impacto significativo sobre la composición y abundancia de la herpetofauna. Se recomienda estratificar por tipos de hábitats. Es de vital importancia que se cuantifique el esfuerzo de colecta valorado bien sea como el número de individuos avistados o atrapados, o en términos de área o tiempo.

Para que las comparaciones resulten válidas se requiere medir el nivel de esfuerzo; éste se puede realizar mediante la curva de acumulación de especies, en donde la frecuencia de adicionar una especie, no avistada previamente, decrece con el tiempo. Las curvas de acumulación de especies muestran qué tan rápidamente aumenta el número de



especies registradas en cierta localidad con relación al aumento en el esfuerzo de muestreo. Las curvas de acumulación de especies son útiles para contrastar la riqueza de especies en varias localidades, aún cuando el esfuerzo de muestreo haya sido distinto.

Se recomienda cuantificar el período de tiempo gastado para registrar la riqueza, el número de observadores y el número de horas muestreadas; si se registra también el tiempo y la fecha en que cada especie es observada es posible adelantar varios análisis (determinación de patrones de actividad, índices de abundancias relativas). Se debe tener en cuenta que si se trabaja en parejas, cada pareja representa en la práctica un único observador; igualmente períodos simultáneos de observación por diferentes parejas pueden ser agrupados o tratados como períodos de observación consecutivos, verbigracia, dos parejas trabajando en diferentes áreas, a la misma hora, pueden ser tratadas como una unidad, la unidad de tiempo puede ser expresada en horas o días (semanas, meses, etc). Es preciso recordar que unidades de tiempo menores de un día pueden sesgar la curva (por cambios en los patrones de actividad de las especies).

### *Análisis de los datos*

El propósito es efectuar comparaciones entre sitios y permitir predicciones acerca de la riqueza de los sitios y describir la abundancia relativa de las diferentes especies en un mismo hábitat y entre sitios. La riqueza estimada puede ser predicha sobre las curvas de acumulación de especies (exponencial o logarítmica), o mediante una recta de regresión (número de nuevas especies registradas por cada unidad de muestreo contra el logaritmo<sup>10</sup> del número acumulado de especies). La curva exponencial resulta más adecuada en aquellos casos que se muestrea una anfibiafauna bien conocida, en un área pequeña y homogénea; pero en aquellos casos que se muestrean grandes áreas inexploradas y heterogéneas es preferible utilizar una curva logarítmica; en todo caso se recomienda seleccionar la curva con la más baja varianza residual. La curva de aparición de especies estima qué tanto del total de la riqueza de un sitio ha sido registrado durante un muestreo y el número total de especies que es factible registrar.

La Tabla 1 demuestra cómo se calcula el acumulado de especies en función del número de ejemplares capturados/día.

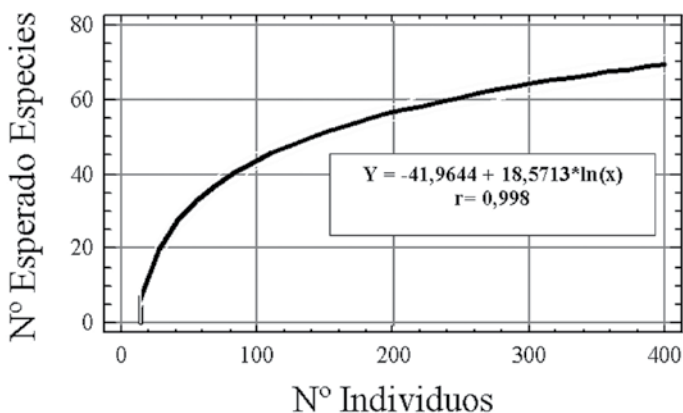


Figura 1. Curva de rarefacción para las comunidades herpetológicas de bosque primario en la Selva de Florencia, Caldas.

Tabla 1. Ejemplo de cálculo del acumulado de especies en función del número de ejemplares capturados/día. El acumulado resulta de la adición de los valores de captura anteriores al día del cálculo. En este caso, los números de animales son fracciones en lugar de enteros por cuanto son promedios de un gran número de trampas de caída.

Día	Captura ( $C_i$ )	Acumulado ( $M_i$ )
1	4.7	0
2	3.0	4.7
3	2.1	7.7

## II) Muestreo de Relevamiento Sistemático (MRS)

Muestreo riguroso a corto plazo limitado por el número, en donde se registra cada animal encontrado en cada hábitat hasta una cantidad preseleccionada de antemano (30-50 individuos); este procedimiento se centra en la captura o avistamiento de ejemplares y no de especies. Los coros de reproducción se contabilizan como UN ejemplar. El MRS es más comparable entre sitios muestreados con diversas técnicas de colecta, y en los que los tiempos de búsqueda están bien distribuidos entre hábitats y horas del día y la noche.

### III) Relevamiento por Encuentros Visuales (REV)

Búsqueda limitada por unidad de tiempo de esfuerzo (que brinda un cierto número de especies colectadas u observadas por persona hora). Para su empleo se debe estandarizar el esfuerzo de colecta dentro de los diversos tipos de hábitats; así se pueden expresar tanto los datos de abundancia individual de especies como el número de animales vistos por unidad (distancia o superficie) de hábitat por hora. Su principal limitación es que no todos los hábitats y micro-hábitats pueden ser muestreados con la misma eficiencia, y debido a la violación de gran cantidad de los supuestos (igual probabilidad de detección para todos los individuos y todas las especies, no ocurren sesgos debido a la capacidad de los observadores, un individuo solo es registrado una vez durante el muestreo), la abundancia relativa de especies puede ser comparada sólo entre sitios con el mismo tipo de hábitat. Cuando se utiliza el individuo detectado como la unidad de muestreo (y no una unidad de tiempo de muestreo, así por ejemplo, una hora de muestreo), se controla la variación temporal en la detectabilidad causada por el hecho de que ciertas horas del día son más productivas para la detección de animales. Este método es útil para registrar lagartijas grandes, culebras y ranas arborícolas.

#### *Métodos para estimar abundancias relativas*

##### **a) Tasas de encuentro**

Si se registra el tiempo (horas) invertido en cada muestreo y el número de individuos de cada especie detectada, se puede derivar una tasa de encuentro por especie, al dividir el número de anfibios registrados por el número de horas invertido en el muestreo (anfibios por hora para cada especie). Información adicional puede ser derivada si se determinan por separado las tasas de encuentro para cada tipo de hábitat.

Por otra parte, si se asume que una especie es tan fácil de localizar en un sitio como en otro, entonces la tasa de encuentro por especie puede ser empleada como un indicador de la abundancia relativa (no un sustituto de la densidad). La tasa de encuentro puede ser clasificada en categorías ordinales de abundancia, como se muestra en las Tablas 2 y 3.

Tabla 2. Categorías de abundancia relativa en función a la tasa de encuentro de individuos y su interpretación jerárquica y ordinal.

Categoría de abundancia (Número de individuos por 100 horas de observación)	Jerarquía Abundancia	Escala Ordinal
<0.1	1	Rara
0.1-2.0	2	No común
2.1-10	3	Frecuente
10.1-40	4	Común
>40	5	Abundante

Tabla 3. Cálculo de las categorías de abundancia relativa en función a la tasa de encuentro de múltiples observadores. Tasa de encuentro = Número total de individuos registrados por uno o todos los observadores dividido por la duración del período de observación.

Especies	Número de individuos por cada observador (3 observadores)			Número de individuos/10 horas Tasa de encuentro x10	Abundancia Relativa
	1 (2h)	2 (3h)	3 (3h)		
<i>Rana vaillanti</i>	1	0	0	1,25	No común
<i>Bufo marinus</i>	5	2	1	10	Frecuente
<i>Hyla microcephala</i>	8	4	6	22,50	Común

### b) Listas de Mackinnon (MACKINNON & PHILLIPS 1993)

Técnica para estimar curva de acumulación de especies y establecer un índice de abundancia relativa que se basa en el tiempo (unidad de esfuerzo) que le toma a un investigador registrar un número pre-determinado de especies. Su ventaja radica en su menor sensibilidad a las habilidades de los investigadores y periodos de actividad de la fauna. El observador hace una lista de especies registrando cada nueva especie hasta que un número predeterminado (8-20 taxa) es alcanzado. La cantidad de especies preseleccionada es proporcional a la riqueza (a mayor riqueza mayor cantidad de especies a registrar en las listas). Una especie solo puede ser anotada una sola vez en cada lista, pero puede ser registrada en listas subsecuentes, dentro de un hábitat en particular. Las comparaciones solo son válidas entre muestreos donde se escogió la misma cantidad de especies. El número ideal de listas por sitio puede variar entre 10-15. Se debe tener cuidado de no muestrear los mismos sitios.

La elaboración de una curva de descubrimiento o aparición de especies implica el graficar el número acumulado de especies contra el número de individuos (Figura 2). La abundancia relativa para cada especie, para cada sitio, es equivalente a la fracción de la lista en que la especie fue registrada; así por ejemplo si una especie fue registrada en 8 de 10 listas en el sitio A y en 3 de 15 listas en el sitio B, el índice de abundancia relativa es de 0.8 para el sitio A y de 0.2 para el sitio B. Este índice puede variar entre 0 (ausente) y 1 (especie registrada en todas las listas).

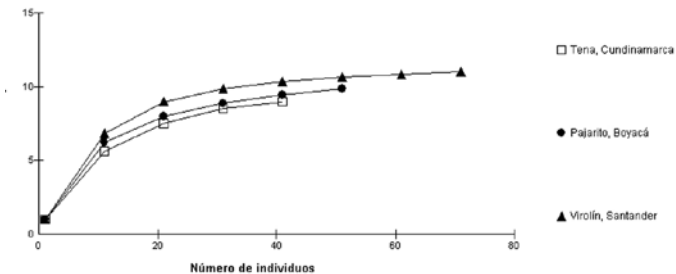


Figura 2. Curvas de rarefacción de anuros para tres bosques de niebla de la cordillera Oriental de Colombia.

### c) Conteos de aparición de especies en el tiempo

Método simple de comparar faunas de áreas extensas mediante muestreos de hábitats representativos. Es una metodología sencilla para derivar un estimador de abundancia relativa. Los datos se registran en una tabla de 6 columnas, correspondientes a 6 intervalos de 10 minutos de duración para muestreos de 1 hora de duración (ver ejemplo en la Tabla 4). El investigador se desplaza lentamente a través del área de estudio por espacio de una hora. Durante los primeros diez minutos de observación se registran, en la primera columna de la tabla, todas las especies avistadas (sin prestar atención al número de individuos). Durante el segundo período, de 10 minutos de duración, se anotan en la segunda columna las especies no registradas previamente y así sucesivamente hasta completar los 60 minutos. El índice de abundancia relativa se basa sobre la presunción

de que entre más común sea una especie, esta podría ser registrada en los primeros intervalos de tiempo de cada conteo y aparecería en muchos más conteos que las especies más raras. Se recomienda realizar un mínimo de 15 muestreos en diferentes partes de cada sitio o utilizar un área de 1 km<sup>2</sup> para cada conteo. Al realizar cada conteo el investigador inspecciona de manera intencional todos los hábitats y microhábitats disponibles y se concentra en aquellos lugares donde la actividad de la anfibiofauna es mayor.

Tabla 4. Tabla de conteos de aparición de especies en el tiempo. Cada especie registrada se anota una sola vez en la tabla.

0-10 minutos	10-20 minutos	20-30 minutos	30-40 minutos	40-50 minutos	50-60 minutos
<i>Bufo marinus</i> <i>Bufo granulosis</i> <i>Hyla mathiassoni</i> <i>Scinax rubra</i> <i>Hyla crepitans</i>	<i>Leptodactylus</i> <i>colombiensis</i> <i>Phyllomedusa</i> <i>hypochondrialis</i> <i>Hyla lanciformis</i>	<i>Scinax rostrata</i> <i>Hyla punctata</i> <i>Leptodactylus</i> <i>pentadactylus</i>	<i>Leptodactylus</i> <i>fuscus</i> <i>Lithodytes</i> <i>lineatus</i>	<i>Physalaemus</i> <i>enesefae</i> <i>Phrynohyias</i> <i>venulosa</i>	<i>Elachistocleis</i> <i>ovalis</i>

Para analizar los resultados de la Tabla 4, a cada especie se le asigna una puntuación arbitraria, dependiendo del intervalo de tiempo en que fue detectada, de tal manera que a las especies registradas en el primer intervalo (0-10 minutos) se les asigna un puntaje de 6, a las del segundo intervalo un puntaje de 5 y así sucesivamente, hasta que las especies detectadas en el último intervalo de tiempo tienen un puntaje de 1. El índice de abundancia relativa se obtiene de promediar los puntajes para cada conteo y varía entre un valor máximo de 6 y un mínimo de  $1/n$  (donde  $n$  es el número de conteos realizados; ver Tabla 5).

Las tasas de encuentro, las listas de Mackinnon y los conteos de especies en el tiempo sirven para estimar las abundancias relativas; pero debe tenerse cuidado con las comparaciones dados los sesgos provocados por la detectabilidad de las especies. Las listas de Mackinnon y los conteos de especies en el tiempo subestiman la abundancia de las especies gregarias, puesto que, a diferencia de las tasas de encuentro, no contabilizan el número de individuos registrados, sino más bien la frecuencia de avistamiento de las especies.

## Técnicas para el inventario y muestreo de anfibios

Tabla 5. Análisis de tres conteos de aparición de especies en el tiempo (el primero de ellos se encuentra tabulado acorde con la tabla anterior). Datos derivados de una pequeña charca localizada en los Llanos Orientales de Colombia.

Especies	Puntaje de cada conteo			Puntaje total	Puntaje promedio	Posición de la especie
	1	2	3			
<i>Bufo marinus</i>	6	6	6	18	6	1
<i>Bufo granulatus</i>	6	6	5	17	5.67	2
<i>Hyla mathiaszowi</i>	6	6	6	18	6	1=
<i>Hyla crepitans</i>	6	6	6	18	6	1=
<i>Hyla laevisformis</i>	5	3	4	12	4	6
<i>Hyla punctata</i>	4	3	2	9	3	7
<i>Phyllomedusa hypochondriasis</i>	5	6	4	15	5	4
<i>Scinax rubra</i>	6	4	3	13	4.33	5
<i>Scinax rostrata</i>	4	6	6	16	5.33	3
<i>Ptychocheilus venulosus</i>	2	3		5	1.67	9
<i>Physalaemus encyffae</i>	2	3	4	9	3	7=
<i>Leptodactylus colombiensis</i>	5	4	3	12	4	6=
<i>Leptodactylus fuscus</i>	3	4	6	13	4.33	5=
<i>Leptodactylus pentadactylus</i>	4	3		7	2.33	8
<i>Litobates lineatus</i>	3		1	4	1.33	10
<i>Elachistocleis oralis</i>	1			1	0.33	11

#### IV) Muestreos de parcelas o cuadrantes

Consiste en buscar de manera intensiva los anfibios en polígonos de formas y tamaños diversos. Para la implementación de esta metodología se recomienda el empleo de parcelas cuadrangulares de 8 x 8 m, en lugares seleccionados de manera aleatoria dentro de un hábitat, y se inspeccionan exhaustivamente en busca de anfibios y reptiles. Es una técnica muy útil para especies (anfibios y lagartijas pequeñas) que viven sobre hojarasca dentro de un área relativamente homogénea. Las parcelas, además de ser dispuestas aleatoriamente en el área, deben ser muestreadas en una secuencia aleatoria para minimizar los efectos de cambios temporales de corto plazo en la actividad de las especies. Igualmente, es preferible no cambiar a los observadores a lo largo del estudio; el mismo equipo analizará todas las muestras. Se recomienda repetir los muestreos bajo las mismas condiciones climáticas y en el mismo período de tiempo. Un mínimo de 50 cuadrantes brindan datos suficientes para análisis estadísticos.

El método de las parcelas sirve para monitorear cambios a través del tiempo, para medir las diferencias entre diversas áreas (o tipos de hábitats) en un tiempo dado. Este tipo de muestreo ha sido empleado con éxito en las selvas tropicales para determinar densidades, diversidad de especies y abundancias relativas (LIEBERMAN 1986, SCOTT 1976). Si se dispone un gran número de cuadrantes de manera aleatoria, los resultados no se ven comprometidos por efecto de la heterogeneidad de hábitats, aún en ambientes muy fragmentados. El muestreo por cuadrantes resulta útil para detectar patrones espaciales, determinar el reparto de los diferentes microhábitats y acopiar datos importantes acerca de la historia de vida de cada especie.



### V) Muestreo por transectas de banda estrecha (2 m) o de banda fija (la longitud y el ancho de cada transecta son pre-establecidos por el investigador)

Mediante este procedimiento se realizan recorridos a lo largo de una línea (por lo general recta) predeterminada, efectuados a una velocidad constante y durante los cuales se intenta detectar la presencia de individuos (o grupos) de anfibios. Los recorridos se seleccionan a través de un procedimiento aleatorio, y se contabilizan todos los anfibios escuchados u observados dentro de una línea prefijada (2 m para la banda estrecha u otro valor) perpendicular a la línea. Un índice que se emplea con regularidad se basa en el número de individuos registrados (vistos u oídos) durante una transecta, el cual normalmente se expresa como el número de animales observados por kilómetro de recorrido (GUINART & RUMIZ 1999). Es aconsejable que para el empleo de esta técnica se dispongan, de manera aleatoria, 10 transectas rectas de 100 m de longitud y 2 m de ancho en cada tipo de hábitat y se revisen minuciosamente (por grupo de 2 personas) en busca de anfibios; en algunas situaciones (terrenos muy agrestes, colinas muy empinadas, etc.), se recomienda dividir cada transecta en 100 subsecciones de 1 x 2 m y muestrear aleatoriamente 10 de ellas. Las transectas deben ser muestreadas en secuencias aleatorias para minimizar los efectos de cambios temporales de corto plazo. En general, cuanto mayor sea el número de replicaciones de las transectas, menor será la posibilidad de cometer un error estadístico tipo II; es decir aceptar una hipótesis nula falsa. Para garantizar la independencia de las muestras se recomienda ubicar cada transecta a una distancia mínima de 250 m, una de la otra.

En caso de la prospección de un curso de agua o un bosque ripario, la configuración de las transectas puede ser paralela o perpendicular dependiendo del estudio. En el muestreo por transectas de banda estrecha, la precisión se incrementa cuando éstas se emplazan de acuerdo al gradiente de mayor variabilidad. Por ejemplo, deben orientarse perpendicularmente a una corriente de agua y no paralelamente. Deben estar dispuestas en contra de la pendiente, en lugar de seguir las cotas de nivel. Las transectas proporcionan mayor precisión que las parcelas cuando las distribuciones animales son más

agregadas. Un error común consiste en establecer las transectas a lo largo de los caminos. Los caminos y senderos nunca son establecidos al azar, y por lo regular están dispuestos siguiendo la topografía, y no cruzándola. La fauna puede estar influenciada positiva o negativamente por la presencia de caminos.

Esta técnica se emplea para monitorear cambios, en un área determinada, a lo largo del tiempo o para evaluar diferencias faunísticas, entre áreas, en un tiempo dado. Este método es útil para monitorear especies no muy móviles que no huyen durante el período de muestreo y con distribución en parches. Una modificación consiste en realizar un conteo por puntos: caminar a lo largo de una transecta determinada y registrar todos los anfibios observados durante un período de tiempo predeterminado (10 minutos), para luego moverse a otro punto seleccionado de manera aleatoria o sistemática y repetir la operación.

### VI) Transectas de bandas auditivas

Se fundamenta en las vocalizaciones emitidas por los machos adultos durante la época reproductiva, las cuales son específicas para cada especie. Esta técnica consiste en contar los machos que cantan a lo largo de una transecta de una longitud predeterminada, por lo regular 1 km de longitud, cuyo ancho varía de acuerdo con la distancia de detección del canto de la especie focal; es decir, la distancia máxima a la cual el animal puede ser escuchado por el observador. Se recomienda muestrear entre 2 y 5 transectas con una frecuencia de 6-9 revisiones por transecta. Mediante este método se puede determinar la abundancia relativa de machos cantando, la abundancia relativa de todos los adultos (si se conoce la relación de sexos), la composición de especies de un lugar dado, el uso del microhábitat, la distribución de las especies y la fenología reproductiva de las especies.

Esta técnica es muy útil en ecosistemas complejos como las selvas tropicales donde existe una elevada riqueza, varios estratos verticales y muchos microhábitats potenciales; sin embargo, resulta inapropiada para muestrear hábitats lineares como quebradas y arroyos (dado el ruido del agua que opaca el canto de los anfibios), al igual que para estimar las abundancias de especies que se reproducen de manera

explosiva y que cantan durante un corto período de tiempo. Se debe tener cuidado con el sesgo que se introduce cuando se contabilizan coros de más de 10 individuos vocalizando al unísono, dada la superposición de los cantos. En este caso, la abundancia de los machos en los coros debe ser cuantificada visualmente, o cuantificar cada coro como un individuo. Es casi imposible contabilizar ejemplares en coros grandes, dado que es muy difícil discernir los cantos individuales en esta algarabía. Resulta útil definir un índice de vocalizaciones bajo la siguiente jerarquía: 1 un macho audible, 2 un coro conformado por 2-5 machos, 3 coro de 6-10 machos y 4 coro de más de 10 machos (ver en LIPS *et al.* 2001).

Este es un método eficiente, muy poco dispendioso, en donde se registran con la misma facilidad las especies arborícolas, las crípticas, las fosoriales y de la hojarasca, y puede ser realizado por un solo investigador. Se recomienda caminar las transectas desde el atardecer hasta 3 horas después de oscurecer.

Las transectas pueden ser dispuestas en línea o en banda; en la primera de ellas el observador estima la distancia perpendicular entre cada individuo detectado visual o auditivamente y la línea media de la transecta, en tanto que en la segunda se registran todos los individuos que se encuentren dentro de un ancho de banda predeterminado. Algunos de los supuestos principales de este método son que todos los individuos de la línea o dentro de la banda pueden ser detectados, cada macho es contabilizado una sola vez, dentro de la transecta se detectan todos los individuos, y todos los hábitats son muestreados dentro de la región de estudio.

En los relevos visuales el observador debe encontrar los individuos y su capacidad para detectarlos varía en función del tamaño, la coloración, el clima, el tipo de movimiento, la habilidad del observador, etc.; en tanto que en los relevos auditivos los animales advierten su presencia.

### VII) Muestreo con cercas de conducción en línea recta y trampas de foso o trampas de puerta unidireccional

Esta técnica hace uso de barreras cortas (de 5-8 m de longitud y 0.8-1 m de altura) que interceptan a los individuos y los conducen a

una trampa de caída, usualmente recipientes de 5 galones (Figuras 3, 4 y 5) o trampas de puerta unidireccional en donde los ejemplares penetran con facilidad pero no pueden salir, debido a que la puerta se mantiene cerrada por fuerza de la gravedad (para más detalles remítase a VOIGT & HINE 1982); se emplean como trampas de captura viva (marcado y recaptura). El muestreo con cercas en línea recta y trampas de pozo es útil para el monitoreo de especies terrestres y semifosoriales. Sirve para determinar riqueza, pero solo captura especies con escasa capacidad trepadora o escaladora. Los arreglos de las barreras y trampas deben seguir un diseño aleatorio dentro del área de interés; la estratificación del hábitat podría incrementar la representatividad del muestreo. Es importante que la disposición de las barreras y trampas tomen en consideración la distancia a las fuentes de agua y la intersección de corredores de dispersión. También es importante revisar las trampas regularmente, y sobre todo inmediatamente después de una fuerte lluvia, dado que los animales atrapados (anfibios, reptiles, pequeños mamíferos e invertebrados) podrían ahogarse en exceso de agua. Igualmente se recomienda perforar agujeros en la base de los recipientes, para permitir la salida del agua (Figura 6). También es importante que los agujeros excavados en el suelo para albergar las trampas sean un poco más hondos que el recipiente, y que tengan topes (por ejemplo, piedras) entre el recipiente y el suelo, para que el agua pueda ser eliminada eficientemente (Figura 7). Finalmente, el colocar un poco de hojarasca o algunas rocas en el fondo del recipiente, así como una esponja humedecida, les brinda un refugio a los animales capturados y reducen la mortalidad por deshidratación de los anfibios (Figura 8).

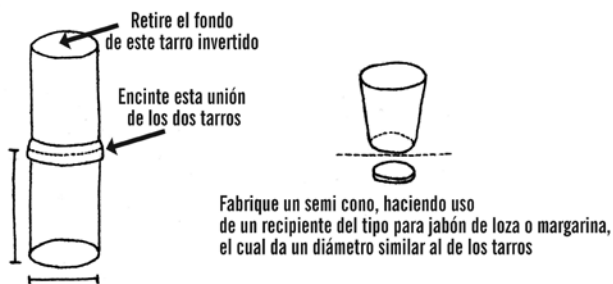


Figura 3a. Construcción y disposición de trampas de pozo.

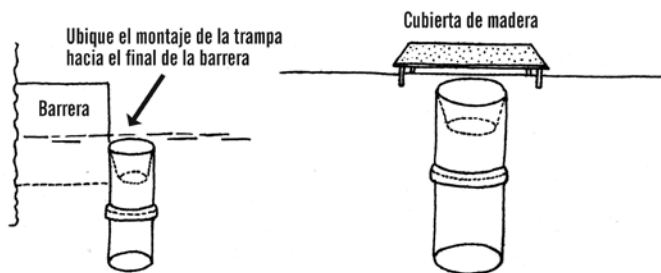


Figura 3b. Construcción y disposición de trampas de pozo.

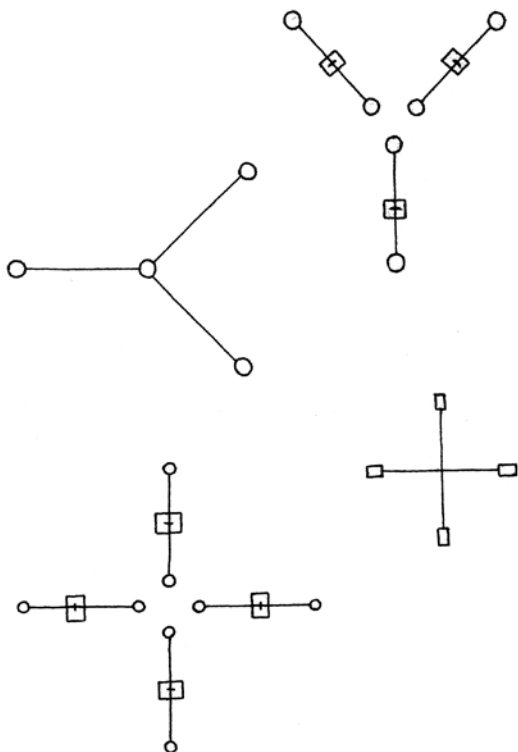


Figura 4. Vista aérea de disposición de las cercas en línea recta y trampas de pozo.

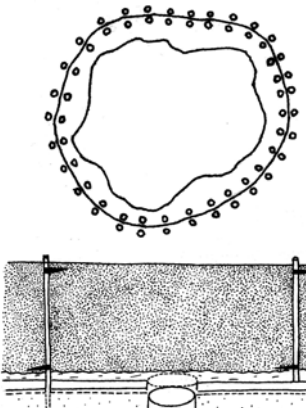


Figura 5. Ejemplo de la disposición de las cercas en línea recta en función de las trampas.



Figura 6. Disposición de los agujeros en la base de los recipientes que funcionan como trampas de pozo.



Figura 7. Disposición de los topos en la base del agujero, para permitir la eliminación del exceso de agua.



Figura 8. Disposición de las hojas en la base de la trampa de caída.

El empleo de trampas de caída, trampas de embudo y la disposición de las cercas en línea es bastante dispendioso por lo que requiere

mucho trabajo y esfuerzo físico, además de personal, para disponer un número representativo de las mismas; por ello su empleo se suele restringir a lugares relativamente planos, de suelos arenosos o franco-arenosos, fáciles de cavar y bien drenados y en programas de monitoreo a largo plazo, de tal manera que se justifique el tiempo invertido en disponer las trampas. Algunos de los grupos de anfibios que pueden ser trampeados con mayor éxito incluyen bufónidos, dendrobátidos, leptodactílidos (como por ejemplo, *Leptodactylus engystomops*, algunos *Eleutherodactylus terrestres*), microhílidos, salamandras terrestres y cecilias. El éxito de las cercas depende de que el plástico o el material que se utilice quede semienterrado a una profundidad de unos 25 cm y bien tensionado. La disposición de cercas de 5 m de longitud, dispuestas en tríadas con trampas de embudo o caída en sus extremos ha resultado adecuada en la mayor parte de los estudios. Las trampas deben permanecer tapadas durante los periodos que no están siendo monitoreadas y requieren ser revisadas diariamente, teniendo cuidado con serpientes venenosas, escolopendras y alacranes que también suelen ser atrapados con estos dispositivos.

### VIII) Muestreo de estadios larvales

Diversos tipos de aparejos se utilizan para la captura de los renacuajos de muchas especies de anfibios dentro de los que se destacan el uso de nasas, redes de arrastre en superficie, redes de arrastre de fondo, y trampas de clausura en las que los renacuajos se atrapan dentro de un cilindro o envase de un volumen determinado de agua. Estos métodos se utilizan para determinar la riqueza de renacuajos de un determinado cuerpo de agua y establecer el tamaño de la población larval. Por lo regular, la mayor parte de los métodos no producen lesiones, ni alteraciones en el comportamiento de los renacuajos, por lo que se recomiendan para la prospección de especies raras y amenazadas.

Dado que los estimativos de población exigen el cumplimiento de algunas premisas básicas como el que todos los renacuajos tengan la misma probabilidad de ser capturados, y que el esfuerzo de colecta sea igual, se deberán diseñar métodos de muestreo aleatorios y efectuar los cálculos mediante procedimientos de remoción o análisis de cuadrantes; las diferencias entre los dos radican en que los diseños



empleados para estimar el tamaño poblacional por remoción no requieren la independencia de las muestras, en tanto que el de los cuadrantes exige la independencia de las muestras.

Como la efectividad de los distintos aparejos de captura de renacuajos varía con el tipo de hábitat utilizado por las larvas, se recomienda emplear los siguientes métodos para los tres tipos generales de ambientes acuáticos en los cuales es factible encontrar renacuajos:

1. Remoción con redes de arrastre en pequeños cuerpos de agua como charcos, estanquillos, oquedades de los árboles, axilas de plantas arrosietadas, etc., en donde se remueve la totalidad de las larvas mediante sucesivos barridos de la red y se registra el número de renacuajos por cada lance hasta que no se capturen animales adicionales; todos los individuos atrapados se mantienen vivos en un recipiente y sólo se reincorporan al agua hasta que se tenga la certeza de haber extraído la totalidad de la población.
2. Muestreo aleatorio estratificado por profundidad y tipo de microhábitat para lagunas y grandes cuerpos de agua permanentes. El muestreo al azar estratificado se utiliza en ambientes heterogéneos y la probabilidad de encontrar los organismos es distinta en diferentes porciones del hábitat. Igualmente para aumentar la precisión y disminuir costos se subdivide el hábitat en estratos (los estratos no se eligen al azar) pero sí lo son las unidades muestrales dentro de cada estrato.

Para un muestreo al azar estratificado se requiere:

- Estimar el tamaño de todos los estratos (en  $m^2$  o  $km^2$ ), no tienen que ser del mismo tamaño
- Una vez definidos los estratos, se muestrea cada estrato por separado mediante un diseño de muestreo aleatorio simple

La cantidad de unidades de muestreo por estrato se determina proporcionalmente al tamaño o representatividad del estrato: Por ejemplo, muestrear una fracción constante en cada estrato (10% de todas las unidades de muestreo en cada estrato), garantizando un mínimo de 2 muestreos (para permitir el cálculo de las varianzas).

En lagunas se pueden seleccionar transectas de 100 m de longitud, dispuestas paralelas a la línea costera y subdividir las en 5 secciones de 20 m de longitud cada una. Las diferentes zonas de profundidad (3 o 4 como máximo) pueden ser establecidas acorde con la máxima profundidad registrada. En cada punto de muestreo (seleccionado de manera aleatoria en cada sección), se debe tomar el mismo número de muestras, y las abundancias deben ser calculadas de manera separada para cada zona y sección. Se sugiere utilizar redes abatibles sobre el fondo en cada punto de muestreo, las cuales consisten en cuadrados de malla de 1 m de lado, dispuestas sobre el fondo y que son izadas de manera vertical en el momento del muestreo.

3. Barrido con nasas y redes de arrastre de fondo para quebradas y corrientes de agua, para lo cual se deben establecer los diferentes tipos de hábitats disponibles para los renacuajos: remansos, corrientes, rápidos, etc., y muestrear por períodos de tiempo equivalentes cada uno de ellos, revolviendo el fondo con las nasas y/o redes.

## Datos asociados

Para la recolección de los datos en el campo es fundamental llevar un equipo compuesto por un mapa topográfico, brújula o GPS, altímetro, una grabadora de alta fidelidad, linterna, cámara fotográfica y un termómetro, entre otros. Durante el desarrollo de la fase de campo es importante registrar una serie de datos asociados a los inventarios, que tienen una profunda incidencia en los tipos de análisis que se podrían realizar después y los cuales deberán ser anotados en hojas o protocolos de campo preparados para el efecto (ver Anexo 1, como ejemplo).

## Datos geográficos mínimos

La descripción geográfica y política de los sitios de muestreo debe ser lo más precisa posible e incluir, como mínimo, información relativa a:

1. País, estado o departamento, municipio o división política terciaria, flanco o ladera de una cordillera y sistema hidrográfico principal.

*Colombia, departamento del Meta, municipio de Villavicencio, flanco este de la cordillera Oriental, cuenca del río Guatiquía.*

1. Localidad específica: precisar con el mayor detalle posible la localidad de muestreo; así por ejemplo:

*Vereda Las Amarillas, finca El Retoño, quebrada La Miel, km 3 por carretera en dirección NE de la cabecera municipal.*

1. Coordenadas geográficas: la latitud y longitud se deben anotar en grados, minutos y segundos y evitar el empleo de decimales.
2. Altura: la altitud sobre el nivel del mar debe ser expresada en metros y medida de preferencia con un altímetro y no con el GPS o puede ser estimada y registrarla como tal.
3. Fecha: señalar el día, mes y año en que se realizó el muestreo; también resulta útil indicar la temporada climática prevaleciente durante el muestreo.
4. Observadores: indicar el nombre de cada uno de los participantes y su función dentro del estudio.

## Datos sobre el hábitat

1. Clasificación general del hábitat: para proporcionar una caracterización general de la vegetación o de la cobertura vegetal en la zona de muestreo, se sugiere elaborar o contar con un mapa a una escala de 1:2000, donde se señalen los principales tipos de vegetación, los senderos, caminos, arroyos, pantanos y cualquier accidente topográfico. Además se deberán ubicar los puntos de muestreo y las cercas en línea, trampas de foso, etc.
2. Se deberá indicar la categoría general del hábitat (selva, bosque nublado, pradera, bosque caducifolio, sabanas arboladas,

etc.) y realizar una descripción general de la cobertura, el número de estratos, la abundancia de bromelias y plantas arrossetadas, el grado de epifitismo y abundancia de musgos. Así mismo se deberán señalar los principales tipos de impactos que atentan contra la estabilidad del hábitat.

3. Para los hábitats acuáticos se deberá indicar el tipo de hábitat: lótico, léntico, marisma, fitotelmatas (lago, laguna, estanque, pantano, charco efímero, quebrada, riachuelo, arroyo, etc.), estimar su superficie y profundidad, caudal, el tamaño del espejo de agua, los tipos de vegetación: emergente, flotante, ribereña. El tipo de fondo (lodo, limo, arena, roca, etc.) o sustrato y algunos parámetros físico-químicos como temperatura, turbidez, acidez, y oxígeno disuelto.
4. Distancia de una fuente de agua, tipo de agua, vegetación ribereña, etc.
5. Medición de condiciones climáticas básicas: se recomienda registrar las condiciones meteorológicas mínimo dos veces, al día: al comenzar y al finalizar los muestreos.
6. Tiempo: puede aplicar la siguiente simbología, lluvia, llovizna, aguacero, niebla (si se presentan dos condiciones simultáneas, emplear la de mayor jerarquía, así por ejemplo, si hay lluvia y niebla, se debe registrar lluvia). Para describir la nubosidad utilizar: cubierto, cuando más del 90% del cielo está oculto por nubes; nuboso, del 50 al 90% nublado; disipado, 10-50% de nubosidad y despejado, menos del 10% de nubosidad.
7. Dirección y velocidad del viento: registre con un anemómetro estas variables, exprese la dirección del viento en dieciseisavos de brújula (N, NNE, NE, etc).
8. Presión atmosférica: medirla con un barómetro.
9. Temperatura: registrar la temperatura a la sombra y a una altura constante del piso (2 m) y expresarla en grados Celsius. Igualmente se recomienda registrar la temperatura mínima y máxima diaria.

10. Humedad relativa: medirla con un higrómetro.

11. Precipitación: utilizar un pluviómetro y expresarla en mm.

En ausencia de equipos de precisión se pueden anotar los datos de clima que sean perceptibles, de la siguiente manera: frío, calor, viento, calma, lluvia, llovizna, etc.

### Consideraciones generales

1. Hora del día: los muestreos deberán efectuarse durante las horas de mayor actividad de la(s) especie(s) focales, las cuales varían de acuerdo con el grupo zoológico, dado que en general las familias de actividad diurna (la mayor parte de los dendrobátidos, algunos bufónidos, ciertos leptodactílidos), son muy activos durante las mañanas soleadas que hayan sido precedidas de llovizna; igualmente suelen permanecer más activos en días húmedos posteriores a días muy secos y calurosos.
2. Algunos microhílicos y leptodactílidos suelen permanecer activos o vocalizan tan solo durante cortos períodos de tiempo durante las horas crepusculares del día: al amanecer o atardecer; otros pueden permanecer activos durante el día y la noche (algunos Eleutherodactylinae, algunos Leptodactylinae), sin embargo la mayor parte de los anfibios (hílicos, centrolénidos, ránidos, bufónidos) poseen períodos de actividad nocturna y suelen encontrarse entre las 19-23 horas.
3. Períodos de muestreo: se recomienda realizar los inventarios de anfibios cuando la tasa de detección para las especies es más estable y se tiene mayor posibilidad de encontrarlos, tal como unos días después del inicio de la temporada de lluvias o durante el veranillo (período de disminución de las precipitaciones, intermedio entre la temporada invernal), durante luna nueva, o menguante, pero nunca en luna llena o creciente tardía (3/4) por su efecto adverso sobre la actividad de las especies nocturnas. Se considera que el mejor período para el muestreo de anfibios es el primer mes de las lluvias (DUELLMAN 1978, MORALES & McDIARMID 1996).

4. Condiciones atmosféricas: tenga en cuenta que las lluvias intensas disminuyen la actividad de muchas de las especies de anfibios, al igual que el frío y las sequías extremas. Las nieblas constantes y permanentes pueden sesgar negativamente la detectabilidad de las especies.
5. La Tabla 6 proporciona un resumen de los usos, ventajas y desventajas asociados a los métodos de inventario anteriormente expuestos.

Tabla 6. Resumen de usos, ventajas y desventajas de algunos métodos de inventario

Método	Usos	Ventajas	Desventajas
<b>Lista simple especies</b>	Determinar riqueza	Simple y sin análisis	No se pueden realizar comparaciones entre sitios y muestreos
<b>Curva de aparición especies</b>	Comparar riqueza entre sitios Estimar la riqueza total	Permite comparación de riqueza para el mismo sitio o sitios diferentes	Empleo de programas de computación para graficar
<b>Tasa de encuentros</b>	Determinar riqueza con índices de abundancia relativa basada sobre el número de encuentros de individuos por bloque de tiempo	Comparaciones gruesas de la abundancia de especies en un sitio y la abundancia de la misma especie en sitios diferentes	Sujeta a sesgos por la diferente detectabilidad de las especies. El requerimiento de contar todos los individuos de todas las especies es difícil de cumplir
<b>Listas Mackinnon</b>	Determinar riqueza con índices de abundancia relativa basada sobre el número de encuentros de individuos por bloque de esfuerzo Permite búsqueda libre	Comparaciones gruesas de la abundancia de especies en un sitio y la abundancia de la misma especie en sitios diferentes No produce sesgos por habilidad de observadores y períodos de baja actividad	Sujeta a sesgos por la diferente detectabilidad de las especies. Subestima las agregaciones o coros
<b>Conteos de especies en el tiempo</b>	Determinar riqueza con índices de abundancia relativa basada sobre el número de encuentros de individuos por bloque sopesado de tiempo Permite búsqueda libre	Comparaciones gruesas de la abundancia de especies en un sitio y la abundancia de la misma especie en sitios diferentes	Subestima las agregaciones o coros

En el Anexo 1 se presenta un ejemplo de una planilla de campo para la realización de transectas. Los tipos de datos que se muestran son frecuentemente datos típicamente colectados en transectas; sin embargo, hay algunos tipos de datos que variarán según las necesidades de la investigación.

## Muestreo de poblaciones

Para estimar el tamaño de las poblaciones animales se recurre al recuento de los individuos o sus productos en una serie de muestras representativas de la población. Muchas veces resulta imposible contar a todos los miembros de una población (censo), por lo que se recurre a técnicas de muestreo que resultan menos onerosas, más rápidas y exactas. La exactitud es una medida de cuán cerca se halla una estimación de su valor real (=paramétrico); en tanto que la precisión es una medida de cuán cerca se halla una estimación de su valor esperado; a mayor variabilidad entre observaciones, menor precisión. Otra distinción importante es entre los términos sesgo y error de muestreo. El **sesgo** priva una estimación de su representatividad, distorsionándola sistemáticamente. Por ejemplo, una estimación basada en la proporción de los sexos tendrá un sesgo a favor de los machos si estos son más conspicuos que las hembras. Por el contrario, los errores de muestreo distorsionan los resultados pero no siempre en la misma dirección y por lo tanto tienden a compensarse al extraer promedios. El sesgo es la diferencia entre el valor real y el estimado en promedio.

Todo censo o estimación se hace dentro de una unidad tal como hectárea, hora, estado, etc., por tanto el resultado es una proporción, aunque algunas veces se omite el denominador. De esta manera tenemos ranas vistas por metro cuadrado, caimanes asoleándose por hora, etc. Estas proporciones no son índices; un índice es un recuento de un objeto relacionado de alguna manera con la abundancia de los animales como las heces, huellas, cantos, etc. El objeto relacionado debe ser estudiado para determinar su proporción con la población focal.

El objetivo de un programa de muestreo es proveer una estimación poblacional con la mayor exactitud posible con relación a la cantidad de esfuerzo de muestreo invertido. No existe un diseño de muestreo perfecto, sino que cada problema requerirá su propio diseño adaptado a la distribución y ciclo de vida del organismo en cuestión. Por lo

tanto, es condición indispensable estar profundamente familiarizado con el organismo que vamos a estudiar. El muestreo de poblaciones animales permite conocer la forma como estos se distribuyen en el espacio, su abundancia, su dinámica en el tiempo y sus posibles interacciones con factores ambientales y fuentes de alimento.

Para medir la abundancia de las poblaciones animales podemos hacer estimaciones de densidad absoluta o densidad relativa. Las estimaciones de densidad absoluta indican el número de individuos por unidad de superficie o volumen. En general, aunque se han considerado superiores a las estimaciones de densidad relativa, son más difíciles de obtener y no ofrecen muchas ventajas sobre estas últimas, sobre todo si se han violado los supuestos básicos en que descansa toda la formulación matemática de los modelos. A menudo es difícil e innecesario determinar la densidad absoluta de una población en un lugar y tiempo determinados. Es más útil e interesante establecer comparaciones entre poblaciones en diferentes lugares o en diferentes tiempos. Nos interesa, por ejemplo, conocer si un hábitat contiene poblaciones más altas que otro, o si una población aumenta o disminuye a través de los años. En ambos casos es posible utilizar estimaciones de abundancia absoluta o índices de abundancia relativa. La Tabla 7 ofrece una relación de los métodos disponibles para estimar densidades de poblaciones animales.

Tabla 7. Métodos disponibles para estimar densidades relativas y absolutas.

Métodos para estimar densidades relativas y absolutas (Caughley 1977)	
Densidad relativa	Densidad absoluta
<b>Índices lineales:</b>	Conteos totales
Conteos de animales por unidad de esfuerzo	Suposiciones
Conteos por signos (huellas, heces, etc.)	Conteos muestrales
Captura por unidad de esfuerzo	Adiciones y remociones selectivas (Kelker)
<b>Índices no lineares:</b>	Adiciones y remociones no selectivas (Leslie)
Medidas de frecuencia (presencia/ausencia)	Índices corregidos
Vecino más cercano	Captura-recaptura (Petersen, Schnabel, etc.)
Clases de densidad / animales por grupo	



Para que una estimación del tamaño poblacional sea útil y confiable debe estar acompañada de una medida de precisión que indique la probabilidad de que nuestra estimación sea correcta. La obtención de la estimación y de su grado de precisión se logra a través de un **muestreo aleatorio**.

### Clasificación de los métodos de muestreo

Los métodos de muestreo pueden ser clasificados según el tipo de selección:

#### 1. Probabilísticos

Permiten realizar inferencias, cada elemento de la población tiene una probabilidad conocida de formar parte de la muestra. Los componentes de la muestra entran a formar parte de ella independientemente de la voluntad del investigador.

- a) Muestreo aleatorio simple
- b) Muestreo sistemático
- c) Muestreo aleatorio estratificado
- d) Muestreo adaptativo
- e) Muestreo secuencial
- f) Muestreo por conglomerados (“clusters”)

#### 2. No probabilísticos

El proceso de selección a priori de los componentes de la muestra depende de la voluntad del investigador.

- a) Conveniencia
- b) Cuotas
- c) Discrecional
- d) Bola de nieve

Existen dos tipos básicos de errores de muestreo, los que se pueden dar en cualquiera de los casos mencionados anteriormente, el 1) error aleatorio o muestral y 2) el error ajeno al muestreo. El error aleatorio o muestral está provocado por el método de muestreo, la muestra representa sólo una parte de la población; y este error puede disminuirse aumentando el tamaño de la muestra. Por otro lado, el

error ajeno al muestreo es distinto al aleatorio, y puede presentarse en alguna de las etapas de la investigación por causas tan variadas como la definición defectuosa de la población, un diseño pobre, errores de medición, etc., lo cual trae como consecuencia que la muestra no sea representativa de la población.

### a) Muestreo aleatorio simple

Todas las unidades muestrales tienen la misma probabilidad de ser seleccionadas. Lo que verdaderamente importa es el proceso de selección aleatorio más que el propio resultado; por ejemplo, es posible que luego de un muestreo aleatorio en un campo un 80% de las muestras provengan de una de las mitades del campo, lo cual no invalida el muestreo, si bien puede alterar la representatividad de las muestras seleccionadas. La ubicación de las muestras se selecciona con números al azar extraídos de una tabla o mediante un programa de computador, o en su defecto se pueden utilizar dados, monedas o papeletas.

Para su aplicación es necesario conocer el tamaño de la muestra y disponer de una lista completa de los individuos que forman la población.

El muestreo aleatorio simple presenta varios inconvenientes. En zonas heterogéneas el error de muestreo es considerable; algunas porciones de la zona pueden resultar sub o sobre representadas, o caer en sitios inaccesibles o muy degradados. Por ello, el muestreo aleatorio simple es excluido para el estudio de zonas muy extensas y heterogéneas, ya que no se obtiene información sobre variaciones entre sus subdivisiones homogéneas, dado que se promedian todos los datos. Además, cuando se trabaja con muestras pequeñas, es posible que no represente a la población adecuadamente.

### b) Muestreo sistemático

Modificación del muestreo aleatorio simple donde la primera muestra se escoge al azar y para la selección de las siguientes se fija un intervalo sistemático, de forma que el primer elemento seleccionado determina la muestra completa. En el muestreo sistemático las unidades muestrales se ordenan de acuerdo con algún criterio espacial o temporal del 1 a N, se toma al azar una unidad entre las primeras  $k$  ( $=N/n$ ), y luego se extrae un nuevo elemento repetidamente cada  $k$  unidades hasta

completar la muestra de tamaño  $n$  (ver Procedimiento). El principal inconveniente del muestreo sistemático es que inadvertidamente el  $k$  puede coincidir con algún patrón regular del ambiente o de los organismos (lo cual es difícil que suceda), dando como resultado una estimación sesgada. El muestreo sistemático no es al azar y por eso es frecuentemente criticado bajo argumentos de pureza estadística, dado que no existe confiabilidad en la estimación del error estándar. Sin embargo, con este tipo de muestreo se incrementa la representatividad de toda el área de estudio y se reducen los costos de los estudios en relación con el muestreo aleatorio simple.

Procedimiento:

- Conseguir un listado ordenado de los  $N$  elementos de la población (no siempre necesario)
- Determinar el tamaño muestral  $n$ .
- Definir el tamaño del salto sistemático  $k=N/n$
- Elegir un número aleatorio,  $r$ , entre 1 y  $k$  ( $r =$  arranque aleatorio)
- Seleccionar los elementos de la lista:  $r, r + k, r = 2k, \dots, r + (n-1)k$ .

Si  $k$  no es un número entero se debe definir el tamaño del salto sistemático,  $k$ , como el entero más cercano a  $N/n$  y se asume entonces que la lista es circular en donde el elemento  $N+1$  coincide con el elemento 1.

Por ejemplo, supongamos que deseamos realizar un muestreo sistemático a lo largo de una quebrada que tiene una longitud de 1500 m., y definimos un tamaño de muestra de 30 (para garantizar una alta representatividad de los ambientes disponibles para los anfibios).

Calculamos el tamaño del salto sistemático, el cual viene definido por  $k=N/n$ , en donde  $k=1500/30, k=50$ ; luego seleccionamos un número aleatorio comprendido entre 1 y 50, (para este procedimiento y en ausencia de un computador, o una tabla de números aleatorios, podemos utilizar el sistema de sorteo con fichas o papeletas (de igual tamaño, forma) numeradas del 1 al 50 y extraídas de una urna. Supongamos que la papeleta extraída correspondió al número 5, lo cual indica que el primer punto de muestreo se debe ubicar a los 5

m del inicio de la quebrada, el segundo punto de muestreo estaría ubicado en el punto 55, el tercero en el 105 y así sucesivamente.

### c) Muestreo aleatorio estratificado

Este tipo de muestreo busca incrementar la eficiencia del muestreo dividiendo la zona de estudio en áreas más pequeñas y homogéneas, o estratos. La precisión de una estimación depende de la intensidad del muestreo y de la variabilidad entre las unidades de muestreo. Los estratos deben ser más homogéneos que el área total, reduciéndose de esta manera la variabilidad. Los estratos pueden tener tamaños diferentes, caso en el cual se reparten las unidades muestrales proporcionalmente al tamaño de cada estrato. Para los muestreos de fauna, a menudo se escogen los tipos de vegetación o tipos de hábitats como diferentes estratos. Los estratos no se eligen al azar, pero sí la selección de las unidades de muestreo en cada estrato. En general, se subdivide el área de estudio de forma tal que se minimiza la varianza de la densidad de individuos dentro del estrato, y por lo tanto se maximizan las diferencias entre estratos. Generalmente es suficiente usar entre 3 y 6 estratos.

El muestreo al azar estratificado se utiliza en ambientes heterogéneos, en donde la probabilidad de encontrar los organismos es diferente en distintas porciones del hábitat. Igualmente, para aumentar la precisión y disminuir costos, se subdivide el hábitat en estratos (los estratos no se eligen al azar), pero sí lo son las unidades muestrales dentro de cada estrato. La elección sobre qué aspecto utilizar para estratificar se basa en el sentido común y en una apreciación de los factores que pueden afectar la magnitud de la variable que se estudia.

Para un muestreo estratificado se requiere:

- Estimar el tamaño de todos los estratos (en  $m^2$  o  $km^2$ ), no tienen que ser del mismo tamaño
- Una vez definidos los estratos, se muestrea cada estrato por separado mediante un diseño de muestreo aleatorio simple

Existen varias razones que justifican un muestreo por estratos, entre las más notables:

- Estimar la media e intervalos de confianza para cada subpoblación

- Obviar problemas de muestreo
- Incrementar la precisión en los estimadores de los parámetros de la población
- Reducir costos por conveniencia administrativa

¿Cómo estimar la cantidad de unidades de muestreo por estrato?

- A fijación simple: consiste en un reparto a partes iguales de la muestra entre el número de estratos conocidos.
- Proporcional al tamaño o representatividad del estrato: muestrear una fracción constante en cada estrato (10% de todas las unidades de muestreo en cada estrato), garantizando un mínimo de 2 (para permitir el cálculo de las varianzas).
- Distribución óptima: se fundamenta en la necesidad de que los diferentes estratos tengan la misma representatividad y variación. Para ello debemos conocer la dispersión en cada estrato. Si se conoce la varianza en cada uno de los estratos, se puede realizar un reparto de la muestra proporcional con la varianza y el tamaño de cada uno de los estratos.

### **d) Muestreo adaptativo**

Tipo de muestreo especialmente útil para el estudio de poblaciones de especies raras con distribución agrupada. Una vez que una muestra, seleccionada de manera aleatoria, contiene el organismo de interés, se adicionan nuevas muestras en la vecindad de la muestra original. El propósito del muestreo adaptativo es tomar ventaja de la distribución espacial de la población para obtener estimaciones más precisas de la abundancia poblacional.

### **e) Muestreo secuencial**

Procedimiento en el cual se toman las unidades de muestreo en forma sucesiva y en cada observación los datos acumulados permiten tomar decisiones sobre los parámetros que se estiman en la población, o sea que no se requiere fijar un tamaño de muestra previo al proceso. La principal ventaja de este esquema es que se minimiza el tamaño de la muestra, con lo cual se economiza tiempo y dinero.

El muestreo secuencial es una herramienta de uso rápido y confiable para la erradicación de especies invasoras y plagas, en especial cuando

se requiere clasificar en categorías la densidad de una plaga o sus daños y cuando las observaciones son costosas en tiempo o recursos.

### f) Muestreo por conglomerados (“clusters”)

En este modelo cada unidad muestral tomada al azar es en realidad un grupo (o “cluster”) de ítems en lugar de un único ítem. En el muestreo por conglomerados se seleccionan grupos heterogéneos de elementos llamados conglomerados para pertenecer a la muestra, en lugar de usar los elementos individuales de la población para seleccionar la muestra. A diferencia de la formación de estratos, en este caso se trata de que los elementos dentro de un conglomerado sean heterogéneos, y los conglomerados homogéneos entre sí. Este método permite disminuir costos, dado que es menos oneroso muestrear varios ítems próximos entre sí, que si estos ítems se hallan distantes entre sí. Por ejemplo, si se quiere muestrear de manera aleatoria una especie de planta en un bosque que ocupa 30 x 50 km utilizando cuadrados muestrales de 10 x 10 m, es del todo posible que arribar a cada sitio de muestreo para tomar sólo una muestra demande gran cantidad de tiempo e incremente los costos.

El defecto principal del muestreo por conglomerados es que las unidades dentro de cada conglomerado frecuentemente no son independientes entre sí; es decir, es muy probable que sean más similares entre sí que aquellas que se encuentran más alejadas, y la desviación suele ser mayor y compleja de calcular que en los otros métodos de muestreo. En general, es de esperar que el muestreo por conglomerados sea más preciso que un muestreo aleatorio simple para un cierto costo de muestreo. El muestreo de conglomerados o sus unidades (en cualquiera de sus etapas), puede realizarse por muestreo aleatorio simple, muestreo sistemático o muestreo estratificado. El lector puede también referirse al capítulo de Diseño Experimental y Análisis Estadístico en este manual para más información acerca del muestreo por conglomerados.

## Tipos de distribución espacial de los organismos

Teóricamente, los patrones de distribución espacial de los organismos pueden ser de tres tipos: al azar, uniforme y agregada. Estos patrones de dispersión pueden ser cuantificados si se toman muestras

representativas de la población y se calcula la media y la varianza de las mismas.

### *1. Disposición al azar*

Repartición aleatoria de los individuos en el espacio. Este tipo de distribución exige el cumplimiento de dos supuestos: a) todos los puntos en el espacio tienen igual probabilidad de ser ocupados por los organismos, y b) la presencia de un individuo no afecta la ubicación de otro individuo; situación que rara vez se logra cumplir en la naturaleza. Este tipo de distribución posee la media igual a la varianza ( $\mu = \sigma^2$ ).

### *2. Disposición regular o uniforme*

Además de que todos los puntos del espacio tienen la misma probabilidad de ser ocupados por los individuos, estos presentan una interacción negativa o de competencia por un determinado recurso. Este tipo de distribución tampoco es muy frecuente en la naturaleza. Si los individuos de una población se distribuyen de manera uniforme, entonces la varianza es igual a cero y es menor que la media.

### *3. Disposición contagiosa o agregada*

Distribución aglomerada de los individuos alternada con sitios donde el número de individuos es intermedio o nulo. En esta disposición se supone que el medio es heterogéneo y no todos los puntos tienen la misma probabilidad de ser ocupados por un individuo. Es factible que se presente en ambientes homogéneos pero con la existencia de una interacción positiva entre los individuos; por ejemplo, agrupaciones con fines reproductivos y alimenticios. En las poblaciones con este tipo de disposición, la probabilidad de encontrar un individuo se incrementa si ya se ha detectado otro en un espacio dado. La varianza es mayor que la media ( $\sigma^2 > \mu$ ).

## Anexo 2. Transformación de los datos\*

En algunos casos (con muestras demasiado pequeñas o datos con distribuciones muy irregulares o multimodales), se requiere transformar

\* Tomado y modificado de STILES, G. 1998. Una "guía de campo" de la estadística para estudiantes de ecología. ICN-Universidad Nacional de Colombia 153pp.

los datos originales para que se ajusten a una distribución normal y se puedan realizar de esta manera las pruebas paramétricas de estimación y contraste. Normalmente cuando los datos son conteos de objetos o eventos en unidades de muestreo definidos a su vez bajo algún criterio de muestreo, las distribuciones no son uniformes sino del tipo aleatorio, agrupadas o uniformes; caso en el cual se pueden transformar los datos para utilizar la potencia de las pruebas paramétricas, que suponen una distribución de probabilidad normal.

Dentro de las diferentes pruebas existentes para verificar el ajuste de los datos a una distribución de probabilidad, las más utilizadas son la del contraste de  $\chi^2$  de Pearson, la prueba de Kolmogorov-Smirnov y la de Shapiro-Wilks.

Cuando se rechaza la hipótesis de normalidad y la distribución es unimodal y asimétrica, la solución más simple y efectiva, consiste en recurrir a transformar los datos vía:

### 1) La transformación logarítmica

Por lo regular las distribuciones de las poblaciones naturales poseen un sesgo positivo y son del tipo agrupadas o contagiosas, por lo que la media queda a la derecha de la moda e incluso esta última podría quedar por fuera del rango  $\pm 1$  desviación estándar (es decir se tiene una distribución asimétrica); en estos casos se recurre a una transformación logarítmica de los datos (en cualquier base) y se realiza una prueba de normalidad con los datos transformados. Esta transformación es válida cuando la desviación típica de los datos es proporcional a la media o cuando el efecto de los factores multiplicativo, en vez de aditivo. Si existen datos de valor cero, o incluso si existen valores muy pequeños, se acostumbra utilizar la transformación  $\log(x+1)$ , porque no existe logaritmo de cero. Los datos con valores negativos no pueden transformarse de esta forma. El efecto de esta transformación es ampliar la cola izquierda de la distribución para hacerla más simétrica.

### 2) La transformación raíz cuadrada

Cuando los datos siguen una distribución aleatoria o de POISSON (datos procedentes de recuentos), en donde la varianza es similar



o igual al promedio, se recomienda efectuar la transformación de la raíz cuadrada o su variante  $\sqrt{x_i+0.5}$ , cuando los datos incluyen valores muy bajos o ceros. Este tipo de transformación se utiliza cuando la probabilidad de ocurrencia de un fenómeno es muy baja. Con esta transformación se busca hacer las varianzas relativamente independientes de las medias. El efecto principal de la transformación consiste en incrementar la precisión con la cual podemos medir las diferencias entre medias pequeñas. En general, los datos sometidos a transformación de raíz cuadrada no violan los supuestos del análisis de varianza casi tan dramáticamente como los datos que requieren una transformación logarítmica.

Estas dos transformaciones comprimen los valores elevados de los datos y expanden los pequeños en sentido creciente en el siguiente orden:  $\sqrt{x_i}$  (la que menos). Si la concentración de datos está, en el lado de la derecha y la cola en la izquierda, se sugiere utilizar la transformación  $x^2$ , que comprime la escala para los valores pequeños y la expande para los valores altos.

### 3) La transformación angular o arcoseno

Cuando se trabaja con datos expresados en la forma de proporciones y porcentajes de una distribución binomial, las diferencias con una distribución normal son más acusadas para valores pequeños o grandes de las proporciones, por lo que se recurre entonces a realizar la transformación arcoseno ( $\arcsen \sqrt{p}$ ) de los datos, de la siguiente manera:

- Si los datos son porcentajes, convertirlos a proporciones (es decir dividirlos por 100);
- Tomar la raíz cuadrada de cada dato;
- Obtener el arcsen de cada raíz cuadrada (el ángulo cuyo sen es el valor de esta raíz);
- Efectuar todos los cálculos con estos arcosenos;

Para calcular los límites del intervalo de 95% de confianza, retransformar los datos tomando el cuadrado del sen para cada dato transformado.





*Epipedobates habneli*

# Preparación y preservación de material científico

*Claudia Cortez F<sup>1</sup> Ángela M. Suárez-Mayorga<sup>2</sup> &  
Francisco José López-López<sup>3</sup>*

## Introducción

Las colecciones biológicas son muy valiosas en la investigación científica, por ser las depositarias de la variabilidad de la naturaleza; son equivalentes a una biblioteca de la biodiversidad y a un banco de material genético. Si bien las fotografías pueden dar una buena idea de esta variabilidad, sólo los especímenes físicos pueden confirmar la identificación taxonómica de un organismo, informar sobre su historia natural (alimentación, biología reproductiva, enfermedades y parásitos, entre otras), sobre su anatomía interna y composición genética, así como de sus relaciones de parentesco con otros organismos (PÁEZ 2004). Sin embargo, para que una colección pueda emplearse con fines de investigación, los ejemplares en ella depositados deben ser apropiadamente catalogados, preparados y mantenidos de acuerdo con los protocolos estándar para cada tipo de material, de forma tal que se maximice su vida útil (PÁEZ *et al.* 2002) y se facilite a los investigadores obtener el mayor provecho de ellos, esto es, utilizar la información que representan para muchos propósitos y en distintas

---

1 Investigador Asociado a la Colección Boliviana de Fauna, Calle Pedraza, #344, Teléfono 2721152, Casilla # 9179, La Paz- Bolivia. Correo electrónico: mabuyaccf@yahoo.com

2 Investigadora Miembro - Grupo de investigación en taxonomía y sistemática, Instituto de Ciencias Naturales - Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, D.C., Colombia. Correo electrónico: angela.suarezmayorga@gmail.com

3 Fundación Ecohabitats, Grupo de Estudios Ambientales GEA Vicerrectoría de Investigaciones Universidad del Cauca, Calle 2ª #°1 A-25 Tel: (57-2) 8209800 ext. 2607 - 2645 Calle 27 DN # 7- 46 Tel: (57-2) 3008198335 – 8233511, Popayán, Colombia. Correo electrónico: flopez@unicauca.edu.co

oportunidades. De acuerdo con SUÁREZ & TSUTSUI (2004), el papel de las colecciones va mucho más allá de la taxonomía y sistemática tradicional, puesto que proporcionan una herramienta valiosa para monitorear cambios ambientales así como enfocar proyectos de bioseguridad, y sobre todo, evitan la duplicación de esfuerzos y la mala distribución de recursos financieros a los mismos gobiernos. Por lo mismo, una documentación deficiente, y una preparación y conservación inapropiadas de los ejemplares disminuyen el valor científico de la colección y, de alguna manera, contribuyen a avivar el dilema ético de eliminar vidas en pro de la ciencia.

Persiste la percepción de que las colecciones pueden estar aportando a la disminución de las poblaciones objeto de estudio, bien sea por la extracción propiamente dicha, o por la contaminación y la perturbación que los muestreos pueden provocar. Sin embargo, se ha demostrado que la incidencia de las colecciones biológicas sobre la conservación de la diversidad de organismos es mucho más positiva que negativa, tanto por las razones mencionadas anteriormente como por la prevalencia de factores de origen antrópico mucho más degradantes (la transformación de los ecosistemas, la pérdida de cobertura vegetal, la contaminación a gran escala (RUEDA-ALMONACID *et al.* 2004) que disminuyen el impacto relativo de la colección. Desafortunadamente, esto requiere de mayor promoción entre las autoridades ambientales, ya que por lo general la colección se restringe cuando se trata de estudiar organismos amenazados o en riesgo, ubicados en localidades estratégicas o de los que se conoce poco. El hecho es que no se conocerá más si no se colecciona.

### Notas de campo

Con el transcurso de los siglos han existido variaciones sustanciales en la metodología de recolección de datos e información sobre los ejemplares que constituyen las colecciones, desde las descripciones manuscritas, detalladas y extensas de los naturalistas de los siglos XVIII y XIX, hasta los datos estandarizados y codificados que actualmente pueden registrarse directamente en un asistente personal digital. Quienes estudiamos organismos (individuos, poblaciones) y nos preocupamos por su supervivencia, continuamos haciendo lo

mismo que hicieron nuestros predecesores: observamos y consignamos nuestras observaciones sobre tales organismos, usualmente con referencia a un lugar (espacio) determinado y en un momento o lapso definido. Este proceso, que actualmente se conoce como registro biológico (SUÁREZ-MAYORGA *et al.* 2005b), implica el almacenamiento de las observaciones en un medio que garantice su permanencia en el tiempo y que maximice la utilidad futura de las mismas; esto es, la creación de notas de campo. La información que se presenta está ligada a la evidencia física del registro (ejemplar testigo o voucher): un espécimen o lote de ejemplares, una muestra de tejido o de contenido estomacal, una grabación, una foto, parásitos o cualquier combinación de las anteriores; algo tangible que sustente la información que estamos registrando. Dependiendo de su naturaleza, la evidencia física podrá modificarse con el tiempo, perdiendo cualidades que serán irre recuperables si no son adecuadamente consignadas desde el principio, como por ejemplo la coloración de los ejemplares preservados.

Hay dos recomendaciones generales para saber qué escribir en las notas de campo: 1) debe guardarse toda la información que se pueda perder después y 2) no es necesario almacenar en las notas de campo información que puede obtenerse directamente de la evidencia física, como la longitud rostro-cloaca (LRC) (en el caso de ejemplares preservados), el número de individuos en un lote de larvas o la coloración en el caso de las fotografías; sin embargo es recomendable tomar las medidas en campo, dado que con posterioridad a la preservación el tamaño se ve afectado. Lo primero es parcialmente cierto, pues definir qué cantidad de información deben contener las notas de campo, incluso en el ámbito restringido del monitoreo de anfibios y las colecciones de éstos, es poco conveniente, puesto que todo depende de las preguntas de investigación, de los métodos que se utilicen y de las capacidades del investigador. Sin embargo, pueden establecerse unos contenidos mínimos de información estándar, unos óptimos y otros opcionales, que garanticen unos niveles básicos de calidad (entendida como potencial de uso) de la información recolectada; estos niveles fundamentales hacen referencia a la repetitividad —la capacidad de verificar la información o complementarla siguiendo los mismos métodos con los que fue inicialmente obtenida—, la res-

ponsabilidad o el derecho del generador de información de ser citado como fuente de la misma y su deber de asumir las consecuencias de su divulgación, y la aplicabilidad multipropósito —la confianza en que la información podrá utilizarse para propósitos distintos de aquellos para los que fue recolectada y en momentos diferentes—. Así mismo, deben establecerse unas formas de presentación comunes (controladas) para tales contenidos, que faciliten la integración e intercambio de información, enfocados a la resolución de las preguntas que sustentan la producción de este manual.

¿Qué es, entonces, lo mínimo que debe registrarse? Parece existir un consenso respecto a que lo mínimo necesario en el marco del monitoreo de biodiversidad es saber qué hay, cuándo y en dónde está, así como de qué manera se obtuvo la información y la fuente (una persona, una referencia bibliográfica) de la misma (MCDIARMID 1994a, RABINOWITZ 1997, SUÁREZ-MAYORGA *et al.* 2005a). Dado que en este caso particular estamos coleccionando evidencias físicas del registro, es imprescindible también asignarle a cada una por lo menos un identificador único (un número de campo o catálogo), que nos permita relacionarla con las notas de campo y rastrearla después en la colección en que será almacenada, y en las publicaciones posteriores (REYNOLDS *et al.* 1994, SUÁREZ-MAYORGA *et al.* 2005a, b).

¿Y de qué manera debe registrarse la información de las notas de campo? Es allí donde existen las mayores diferencias, nuevamente debido a las preguntas que se pretende responder y a lo que se busca describir, así como a la disposición y costumbre del investigador. En cuanto al medio físico de almacenamiento, puede decirse que a pesar de los avances de la tecnología, las notas de campo en papel siguen siendo la manera más barata y efectiva de consignar las observaciones para la posteridad. En la literatura se recomienda especialmente utilizar para ello papel de algodón, libre de ácido (de difícil y costosa obtención en Latinoamérica y tinta indeleble a prueba de agua. La tinta china es una alternativa que la mayoría de los herpetólogos utiliza, empleando para escribir rapidógrafos o plumas (estilógrafos), o similares; idealmente, la tinta debe ser negra (SCROCCHI & KRETZSCHMAR 1996). Pueden utilizarse también marcadores indelebles o lápices de grafito, pero no es adecuado utilizar bolígrafos. MCDIARMID

(1994a) manifiesta su clara preferencia por las notas de campo escritas en hojas sueltas, perforadas, organizadas en un fólder de argollas, de manera que para cada nueva salida se puede llevar únicamente la cantidad de hojas necesarias, mientras que se mantienen a buen recaudo las notas de campo de salidas anteriores. Además, esta organización facilita la inserción de nuevas hojas, mapas, fotos, etc. y permite agrupar y encuadernar colecciones de hojas que comparten un criterio común (como años, salidas o regiones) y que no necesariamente fue identificado desde un principio. Una opción alternativa y económica es emplear libretas de topografía (se consiguen bajo esta denominación en la mayoría de países de Centro y Suramérica), cuyo papel usualmente está impregnado de una resina que las hace resistentes al agua (y perdurable); además, son de un tamaño fácil de manejar (ver Figura 1). Las desventajas son su poca flexibilidad y la menor seguridad de la información, pues todas las notas de campo que se hayan registrado en una sola libreta pueden perderse en caso de que algo le ocurra a la libreta (McDIARMID 1994a).

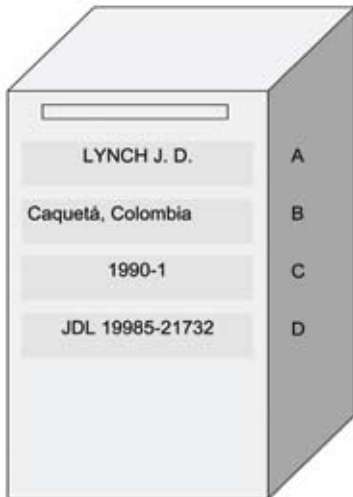


Figura 1. Compilación de notas de campo en libreta de topografía marcada apropiadamente. A: nombre del colector principal, B: lugares de colecta, C: años de colecta y D: números de campo que comprende la compilación.

En cuanto a los contenidos de información, debe ser posible identificar todos los contenidos mínimos en el conjunto de notas de campo. En la Figura 1 se ilustra el compendio de notas de campo de un investigador herpetólogo durante el año 2003 y en la Figura 2, un



registro individual de adultos, huevos y larvas capturados en el Chocó biogeográfico colombiano. Como se observa, la libreta o carpeta de notas debe estar correctamente marcada con el nombre del colector principal (quien lleva la numeración, Figura 1A), el año o los años de colección que comprende el compendio (Figura 1B), las áreas de colecta (Figura 1C) y los números de colección en los que comienza y termina el compendio, incluyendo el **acrónimo** del colector: que son varias letras, normalmente iniciales de su nombre, que se agregan al número consecutivo de las etiquetas de campo y que idealmente deben ser únicas para cada persona que lleve una colección de notas de campo (Figura 1D). Es importante no duplicar los números; la numeración de campo debe comenzar en el primer viaje y continuar en orden secuencial en los viajes posteriores. La etiqueta de campo debe estar

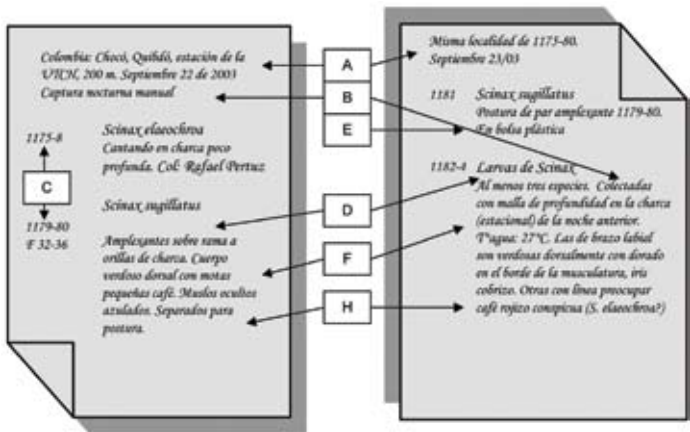


Figura 2. Formato de notas de campo para adultos, huevos y larvas. A: localidad y fecha de colecta, B: técnica de captura, C: número de campo del ejemplar/ identificador de la(s) evidencias, D: identificación del ejemplar, E: referencia a otras evidencias, F: características del hábitat, G: otros colectores, H: información adicional.

vinculada con el ejemplar o lote de ejemplares desde el momento en que son fijados (SCROCCHI & KRETZSCHMAR 1996).

Para el registro de los ejemplares coleccionados se recomienda escribir primero el dónde (el lugar de colección) y el cuándo (la fecha de colección) y agrupar después a todos los ejemplares a partir de

estos criterios, dado que lo normal es encontrar varias especies en una misma localidad durante una misma sesión de muestreo; esto evita repetir el mismo texto para cada ejemplar o grupo de ejemplares capturados (Figura 2A). También se recomienda incluir seguidamente la técnica general de colección (McDIARMID 1994b, VILLARREAL *et al.* 2004) en una frase corta (Figura 2B). A continuación, por cada ejemplar o grupo de ejemplares de la misma especie, postura o lote de larvas, se debe anotar como mínimo, en su orden:

1. Las evidencias con sus identificadores (códigos)—número de campo, número de foto, contador de grabación, referencia a tejidos, entre otros (Figura 2C).
2. La identidad de la evidencia: el nombre científico, idealmente en el nivel de especie. En caso de que no se conozca la especie se deberá registrar la identificación taxonómica preliminar hasta el nivel menos inclusivo (familia, género, grupo de especies) o, en su defecto, un nombre común o vernáculo (Figura 2D) o un texto que permita identificar el ejemplar,
3. Referencias a otras evidencias (Figura 2E)
4. Características del hábitat (McDIARMID 1994a) en que fue encontrado (Figura 2F)
5. Responsables de la colección (si existen y son diferentes del colector que numera (Figura 2G)

Dependiendo de la naturaleza del ejemplar (individuo adulto o juvenil, huevos, larvas), es deseable que se registren otros aspectos, como coloración en vida del cuerpo y el iris, temperatura del agua, temperatura del aire, altura sobre el piso, sustrato, presencia de parásitos y profundidad (si fuera aplicable). Es opcional describir otras características cuya observación resulta incidental, tales como el comportamiento reproductivo o la interacción con otras especies (Figura 2H). En la Tabla 1 se describen en detalle los elementos imprescindibles, importantes y opcionales que podría contener cada uno de los puntos anteriormente mencionados, dentro de las notas de campo para ejemplares preservados.

Aunque normalmente se incluye en los protocolos de mantenimiento de colecciones biológicas, no sobra recordar que el colector debería entregar una copia de sus notas de campo a la colección en la que deposite sus

## Preparación y preservación de material científico

Tabla 1. Contenidos imprescindibles (mínimos, M), importantes (óptimos, O) y opcionales (P) que deben tener las notas de campo, de acuerdo con el tipo de ejemplar preservado

Parte del registro	Información a registrar	Adultos/ juveniles	Larvas	Huevos
<b>Cuándo</b>	Fecha única o rango de fechas	M	M	M
	Hora de los muestreos	O	O	O
	Hora exacta de colección	P	P	P
<b>Dónde</b>	País	M	M	M
	División administrativa	M	M	M
	Ciudad/municipio/población	M	M	M
	Sitio de colección	M	M	M
	Altitud	M	M	M
	Georeferencia (coordenadas de la localidad)	M	M	M
	Topónimos físicos	O	M	O
	Topónimos socioculturales	O	O	O
	Instrucciones de acceso	O	O	O
	Características generales del hábitat <sup>i</sup>	M	M	M
	Temperatura ambiente	O	P	O
	Temperatura del agua <sup>ii</sup>	P	O	P
	Nubosidad <sup>iii</sup>	P	P	P
	Presencia de precipitación	O	P	O
	Altura respecto al suelo	P	P <sup>iii</sup>	P
	Sustrato	P	O	O
	Tipo de aguas (lenguaje controlado) <sup>iv</sup>	P	M	O
Profundidad relativa	-	O	-	
<b>Qué</b>	Tipo de evidencia (lenguaje controlado) <sup>v</sup>	M	M	M
	Código de la evidencia	M	M	M
	Nombre científico	O	O	O
	Nombre común	P	P	P
	Número (individuos/ huevos)	-	P	O
	Estadio <sup>vi</sup>	-	O	O
	Sexo	P	-	-
	Coloración en vida	O	O	O
Presencia de parásitos/enfermedades	O	O	O	
<b>Cómo</b>	Método de colección	O	M	O
<b>Quién</b>	Colector principal (quien numera)	M	M	M
	Otros colectores	M	M	M

i Para McDiarmid (1994a) este punto debería ser obligatorio

ii De acuerdo con Lips *et al.* (2001), en el ámbito del monitoreo de anfibios es óptimo contar con datos sobre estas características ambientales; sin embargo, se registran aquí como opcionales, pues como los mismos autores mencionan, el tomarlas depende de las preguntas específicas que se intente responder.

iii Interesante especialmente en el trabajo con especies que ponen sus huevos/larvas en phytotelmata

iv Aunque existen varias clasificaciones de aguas, como mínimo debería especificarse si son lóxicas, lénticas o phytotelmata, si son temporales o permanentes y, en nuestra área, si son claras, blancas o negras. Para ejemplos véase McDIARMID (1994a).

v Existen tipos de evidencia estandarizados en español en el microtesauro de métodos y atributos del SiB, disponible en línea en [www.siac.net.co/sib/WebModule/tesauros.jsp](http://www.siac.net.co/sib/WebModule/tesauros.jsp)

vi Aunque la mejor manera de describir el estadio de una larva es utilizando la clasificación de GOSNER (1960), es difícil obtener esta información directamente del campo. Se recomienda entonces utilizar los valores “embrión”, “eclosionado”, larva/renacuajo, y metamórfico, según los rangos sugeridos por McDIARMID & ALTIG (1999)

ejemplares (y la colección debería exigirla, pues así se maximiza el potencial de uso de los ejemplares depositados) e idealmente debería mantener también una copia de seguridad de su libreta (física o digital).

### *Casos especiales*

En la sección anterior se identificaron los contenidos mínimos, deseables y opcionales que deberían tener las notas de campo sobre ejemplares de anfibios que se vayan a capturar y preservar. Sin embargo, en el caso especial del monitoreo —considerando que éste por lo general no requiere de la colecta de ejemplares, salvo en casos excepcionales— hay algunas características adicionales que solamente se detectan si los ejemplares están débiles, enfermos o muertos y que deberían ser registradas si se encuentran, puesto que representan una oportunidad de identificar condiciones particulares de las poblaciones bajo situaciones de estrés y de evaluar sus vulnerabilidades y las amenazas que podrían estar surgiendo sobre ellas. BERGER & SPEARE (2002) y LIPS *et al.* (2001) recomiendan evaluar cuidadosamente los ejemplares enfermos o muertos y capturar ejemplares de ambas categorías, a los cuales deberá agregarse la siguiente información:

1. Detalle de si el individuo fue capturado enfermo o muerto, puesto que existe una alta probabilidad de que individuos enfermos mueran durante el transporte, y de que el tratamiento de ambos tipos de muestras sea diferente. La autólisis es muy rápida en anfibios y un ejemplar muerto puede contaminar con hongos y bacterias toda una muestra, por lo que es recomendable mantenerlos separados (ver capítulo “Protocolo de bioseguridad y cuarentena para prevenir la transmisión de enfermedades en anfibios”).
2. Una descripción de las amenazas conocidas o sospechadas para el área de colección: pesticidas, insecticidas, predadores evidentes, uso de la tierra, fenómenos climáticos, características de los cuerpos de agua.
3. Una descripción de la apariencia de los individuos, si ésta no es normal, en la que se detallen su grosor (individuos muy delgados pueden estar seriamente enfermos), coloración y la presencia de lesiones de cualquier tipo o malformaciones

en algún lugar del cuerpo; en el caso de larvas es importante observar con cuidado si presentan condiciones anormales en el disco oral y el extremo **distal** de la cola, entre otras.

4. Si el individuo está vivo, es deseable registrar comportamientos infrecuentes como inmovilidad total o parcial, desorientación o excesiva pasividad, o posturas inusuales como separarse del sustrato elevando el cuerpo.
5. Si el individuo se encuentra muerto, se recomienda pesarlo, medirlo y diseccionarlo, anotando anomalías en los órganos internos y retirando material de piel, dedos, músculos, etc., para la obtención de tejidos. Además, se debe medir la frecuencia de aparición de individuos muertos durante el evento de colección.
6. Si se sospecha la presencia de una enfermedad, resultará útil describir qué tan frecuente es entre la población de esa especie en el área de estudio, qué otras especies puedan estarla padeciendo, cuáles síntomas se presentan, etc.

## Preparación del material científico

### Procedimiento para el sacrificio

Existen muchos métodos estándar para el sacrificio de los anfibios; a continuación haremos referencia a los métodos más comúnmente empleados, tanto en el campo como en el laboratorio, y que mejores resultados presentan sin ocasionar sufrimiento a los ejemplares. En cualquiera de ellos lo más importante es realizar el sacrificio de la manera más rápida, eficaz y sin provocar dolor o sufrimiento a los individuos, permitiendo que estos queden totalmente relajados y flácidos para que puedan ser acomodados de la manera más indicada, y que permita la realización de estudios posteriores (DUELLMAN 1962, McDIARMID 1994b).

Para el sacrificio de anfibios adultos, el método más eficiente y más empleado es sumergirlos en una solución de clorobutanol hidratado (también conocido como cloreton, cloretona, clorotone o cloreto-

ne). Éste se prepara como una solución concentrada, diluyendo una cucharadita de cristales de clorobutanol hidratado en alcohol etílico al 96% (aproximadamente 2 cc de esta solución sirven para 250 cc de agua). Debido a que el clorobutanol se disuelve lentamente, se recomienda llevar al campo un pequeño contenedor de solución de alcohol etílico al 96% saturado de clorobutanol. En caso de requerirlo, según las necesidades de preparación, diluir la cantidad necesaria en agua para el sacrificio de los especímenes. Los cristales de clorobutanol son sustancias controladas en algunos países y los investigadores pueden necesitar permisos especiales para obtenerlos. La solución diluida puede usarse con efectividad por cerca de dos semanas (incluso menos), después pierde su efectividad gradualmente (McDIARMID 1994b).

Las especies tienen respuestas notablemente diferentes a las soluciones de clorobutanol; algunas mueren rápidamente (5 minutos aproximadamente) y otras pueden tardar algo más de tiempo (10 a 15 minutos). Una vez se han sumergido los ejemplares en la solución, su efectividad aumenta con el tiempo, probablemente por la acción de varias secreciones de la piel de otros anfibios muertos en ella. Conviene tener en cuenta que si la solución está muy concentrada, los animales morirán rápidamente y quedarán contraídos y rígidos, dificultando el proceso de montaje y fijación;

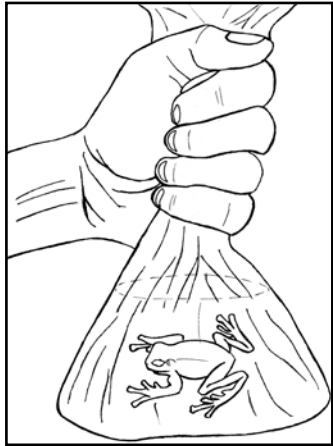


Figura 3. Ejemplo de la forma en que se sumerge al animal en solución clorobutanol.

si la concentración es muy baja los animales tardarán mucho tiempo en morir, ocasionándoles sufrimiento (McDIARMID 1994b, SCROCCHI & KRETZSCHMAR 1996). Si los animales tardan demasiado tiempo en morir (20 ó 30 minutos) puede adicionarse a la solución más clorobutanol o prepararse una nueva, preferiblemente. Una vez muertos no deben dejarse por demasiado tiempo en la solución, puesto que se vuelven rígidos y se dificulta prepararlos apropiadamente.

Otros aspectos importantes que deben tenerse en cuenta son mantener bien cerrados los frascos o contenedores de las soluciones y depositar los animales lo más limpios posible dentro del líquido, para evitar que la solución se contamine con barro, polvo, hojas, ramas, etc., o que se altere su eficacia.

Algunos métodos alternativos, en el caso de no estar disponible el clorobutanol, son sumergir a los ejemplares en agua tibia (43°C o 47° C) o en una solución débil de alcohol etílico al 15 % o 25%, los cuales surten el mismo efecto que el clorotón, aunque su reutilización es menos eficaz. Cualquiera de estas técnicas es efectiva, aunque la primera puede causar algo más de sufrimiento. Otro método ampliamente utilizado es la descerebración de los ejemplares; esta técnica es altamente efectiva pero generalmente causa daños en los especímenes, especialmente en el cráneo (McDIARMID 1994b, SCROCCHI & KRETZSCHMAR 1996), por lo que no es recomendable.

Aplicar anestésicos de uso humano como benzocaína, lidocaína o xylocaína (oral) en la cabeza o el vientre también es bastante eficiente (McDIARMID 1994b), teniendo en consideración que la solución anestésica elegida tenga un pH de 7.0 para evitar el daño de la piel en especies sensibles. Ningún anestésico es eficaz para todos los anfibios.

Otro método que ha dado excelentes resultados tanto en el campo como en el laboratorio por su rapidez, eficiencia y bajo costo es el empleo de una solución concentrada de éter etílico al 96% diluido en alcohol etílico al 96%, en una proporción 1:2. Para prepararla se deben diluir 100 cc de éter etílico al 96% en 200 cc de alcohol etílico al 96%, con lo cual se obtiene la solución base. Posteriormente, se extraen 100 cc de esta solución base y se disuelven en 500 cc de alcohol etílico al 10%, obteniendo 600 cc de solución en la que se sumergirán los ejemplares para ser sacrificados. Los 200 cc restantes de la solución base se pueden guardar en un recipiente sellado herméticamente para posteriores preparaciones. Si se desea aumentar la eficacia de la solución base se puede adicionar 10 cc de lidocaína, benzocaína o xylocaína con epinefrina al 2%.

Esta solución es altamente efectiva, produce la muerte en un corto tiempo (1 a 5 minutos, dependiendo del tamaño de los individuos),

y deja a los ejemplares completamente relajados; además, puede ser almacenada por periodos prolongados de tiempo (más de 6 meses) sin perder su eficacia, siempre y cuando se cierre herméticamente el envase que la contiene (LÓPEZ-LÓPEZ 2005a). También puede prepararse una solución de alcohol etílico al 10% y adicionarle 20 cc de lidocaína, benzocaína o xylocaína con epinefrina al 2%. Esta solución surte los mismos efectos que las anteriores, ocasionando la muerte entre 1 y 5 minutos (LÓPEZ-LÓPEZ 2005b). Para evitar la rigidez en los ejemplares y la pérdida de efectividad de la solución se deben mantener las mismas precauciones que se observan con las soluciones de clorobutanol.

Requieren atención especial los casos en los que ninguno de los procedimientos hasta ahora mencionados puede ser aplicado, como son el sacrificio de ranas de gran tamaño que no pueden ser sumergidas y muertas rápidamente, o de cecilias (*Gymnophiona*). Se sugiere entonces emplear una inyección directamente al corazón con algún anestésico. En caso de tener que sacrificar ranas venenosas o que segregan sustancias tóxicas, como los dendrobátidos (*Dendrobates* spp., *Epipedobates* spp.), algunos hílidos (*Phyllomedusa* spp., *Phrynohyas* spp.) y bufónidos (*Bufo* spp.), es recomendable hacerlo en bolsas o recipientes separados (en la Figura 4 se resumen estos procedimientos especiales).

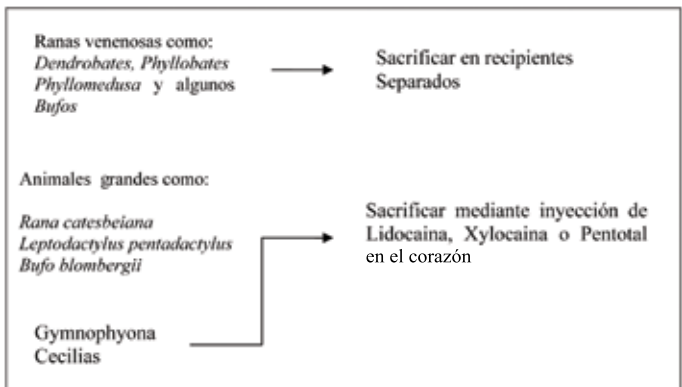


Figura 4. Algunos ejemplos de casos especiales, de cómo deben ser sacrificados algunos ejemplares.



### Procedimiento para la fijación

La fijación es un proceso químico que previene la descomposición y degradación de los tejidos producida por autólisis (SIMMONS & MUÑOZ-SABA 2005).

La preservación de anfibios para estudios científicos es usualmente un proceso que consta de 2 pasos: inicialmente los ejemplares son fijados en un líquido preservativo apropiado, para luego ser transferidos a una solución para su almacenaje. El fijador más común para los anfibios es el formol, formalina o formaldehído (disolución acuosa al 37-40% de aldehído fórmico o metanal), que es de fácil manejo, y viene siendo empleado como fijador histológico por más de 100 años (SIMMONS & MUÑOZ-SABA 2005). Su presentación comercial equivale a 100% de formalina diluida en agua. Una parte de la concentración de este líquido comercial se diluye en nueve partes de agua para hacer una solución al 10%. Esta solución al 10% es estándar para la fijación de ejemplares en el campo y el laboratorio (McDIARMID 1994b, SIMMONS & MUÑOZ-SABA 2005).

El proceso de fijación generalmente es considerado como irreversible, y la tasa de fijación varía de acuerdo con la talla del espécimen, con la naturaleza de los tejidos, y con la temperatura ambiente. La mayoría de los anfibios pequeños son fijados en unas pocas horas, pero los ejemplares grandes requieren de mucho más tiempo (SIMMONS & MUÑOZ-SABA 2005). Usualmente el fijador actúa más rápidamente en clima cálido (com. per. SUÁREZ-MAYORGA).

El formaldehído se oxida formando ácido fórmico, el cual después de un tiempo produce descalcificación de los huesos y decolora los especímenes. Debido a la decoloración excesiva, la descalcificación y la indeseable aclaración, se recomienda amortiguar la solución de formalina con fosfato de sodio monobásico monohidratado y fosfato de sodio dibásico anhidrado para mantener un pH cercano al neutro, el pH óptimo para esta solución de formalina es de 7.2. En ocasiones, el formol o formalina comercial se degrada formando paraformaldehído, un polímero del formaldehído que precipita como un sólido blanco en los envases viejos (McDIARMID 1994b).

Para obtener un litro de formalina amortiguada (“buffer”) al 10% se diluyen 100 cc de formol comercial en nueve partes de agua destilada des-ionizada (900 cc); después se añaden cuatro gramos de fosfato de sodio monobásico monohidratado ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4 + \text{H}_2\text{O}$ ) y seis gramos de fosfato de sodio dibásico anhidrado ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ). Otros buffers alternativos que se emplean (pero menos deseables) son el carbonato de calcio o de magnesio y el bórax, aunque este último tiende a aclarar los ejemplares fijados cuando sirve de amortiguador en las soluciones de formalina (McDIARMID 1994b, PÁEZ & BOCK 2002, SIMMONS & MUÑOZ-SABA 2005).

El formaldehído irrita los ojos, las vías respiratorias y la piel, por lo tanto se recomienda el empleo de guantes y tapabocas para prevenir todo tipo de irritaciones o reacciones alérgicas en la piel y las vías respiratorias; el formaldehído también ha sido reportado como carcinógeno, por esto debe ser empleado en sitios ventilados (McDIARMID 1994b, SCROCCHI & KRETZSCHMAR 1996, SIMMONS & MUÑOZ-SABA 2005).

Si no se tiene formaldehído disponible como fijador, puede emplearse alcohol etílico al 70%; no obstante, Scrocchi y Kretzschmar (1996) sugieren que para ejemplares grandes, fijados inicialmente en alcohol, se realicen pequeños cortes, de tal manera que el fijador penetre aún más. Otro fijador empleado es el glutaraldehído; aunque no es un buen fijador porque no penetra rápido dentro de los tejidos, ayuda a conservar mejor los colores. Existen muchos otros fijadores recomendados para otros grupos taxonómicos como invertebrados marinos, pero no se recomienda su uso puesto que deterioran el ácido desoxiribonucleico, ADN (SIMMONS & MUÑOZ-SABA 2005).

Según PISANI & VILLA (1974), otro método común de fijación es el FAA (Formalina-Alcohol-Ácido Acético). Este se prepara mezclando 10 partes de formalina comercial, 50 de alcohol (etílico o isopropílico) al 95%, 40 partes de agua y dos de ácido acético glacial. Esta solución penetra mejor en los tejidos que el formol solo, por lo que es mejor para preservar ejemplares encontrados muertos o parcialmente descompuestos. Su desventaja es tener que mezclar varios compuestos y la dificultad de conseguir alcohol y ácido acético, además de que es pesado para llevar a campo; dado el caso de no poder conseguir

ácido acético puede emplearse vinagre comercial el cual es fácil de obtener y de bajo costo; no obstante el agua se puede añadir en el campo. En regiones cálidas es recomendable añadir el ácido acético poco antes de usar la solución ya que se evapora rápidamente; para evitar la evaporación pueden enfriarse los recipientes con trapos húmedos y mantenerlos bajo sombra.

En la extrema situación de no contar con algún fijador adecuado y de ser necesaria la preservación de un espécimen, pueden usarse ciertas medidas de emergencia, como guardar la muestra en salmuera fuerte o congelarla hasta obtener el fijador deseado, aunque este último método no siempre es efectivo en ejemplares grandes que siguen corriendo el riesgo de descomponerse. En algunos casos se puede emplear algún licor o bebida, pero debe tenerse en cuenta el porcentaje de alcohol que contiene, de manera que no sea inferior al 30% (PISANI & VILLA 1974). Licores de este estilo serían los aguardientes, el ron, el pisco, el tequila, el vodka y el whisky.

En anfibios grandes se aconseja inyectar el fijador en la cavidad del cuerpo, además por la cloaca y en las extremidades, ya que algunos pueden descomponerse internamente si sólo absorben el fijador por la piel; no obstante, cuando inyecte el formol tenga cuidado de que el líquido no infle al espécimen. Este procedimiento no es necesario en anfibios pequeños ya que por su tamaño el líquido penetra o es fácilmente absorbido por la piel (PISANI & VILLA 1974).

Una vez muerto el espécimen, debe colocarse en un recipiente de plástico con tapa hermética ajustada, sobre el fondo del cual previamente se han extendido una o dos toallas blancas lisas de papel absorbente embebidas en formol con buffer al 10%. Es importante que no se utilicen toallas teñidas y/o con grabados, puesto que pueden colorear los ejemplares y dejar marcas indeseables sobre la piel, que después pueden ser confundidas con características morfológicas de interés; por la misma razón debe cuidarse que no queden arrugas o ampollas en la superficie de las toallas al ser extendidas. Pueden emplearse también paños desechables de los empleados en el aseo de bebés previamente lavados para eliminar el perfume y la sustancia humectante que éstos poseen (com. per. G. ACOSTA). No

es aconsejable el uso de gasa porque por la forma del tejido puede dejar marcas indeseables en la piel de los anfibios.

Cada espécimen es posicionado dentro del recipiente de manera que se faciliten las mediciones y el examen de características distintivas posteriormente en los ejemplares preservados, además de permitir un almacenamiento más efectivo y un mantenimiento de los ejemplares por más tiempo. Se colocan las ranas [o anfibios anuros] de tal forma que el cuerpo esté flexionado de manera natural, las extremidades derechas y los dedos separados para estirar las membranas (Figura 5). No se recomienda posicionar a los especímenes con las extremidades posteriores extendidas, puesto que las etiquetas son removidas con facilidad, las pieles se lastiman y las extremidades se lesionan y se dañan. Una vez que se termina de posicionar a los ejemplares, se cubren con una toalla de papel absorbente humedecida con formalina, y, si se desea, puede llenarse el recipiente con más formalina hasta cerca de un tercio de su profundidad (McDIARMID 1994b).

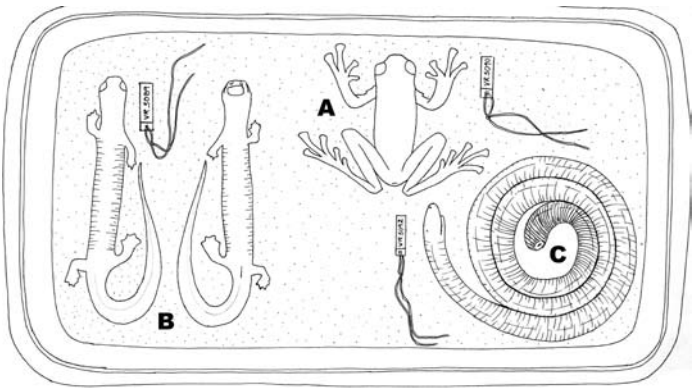


Figura 5. Posición en la que deben ser fijados: A. Anura, B. Caudata, C. Gymnophiona.

Las salamandras deben fijarse rectas, con los miembros apuntando hacia delante, paralelos al cuerpo. Las extremidades se acomodan con las palmas hacia abajo, los dedos y la cola recta; la boca se mantiene abierta con ayuda de un pequeño trozo de madera o de toalla de papel

## Preparación y preservación de material científico

(Figura 5). Las cecilias han de preservarse con el cuerpo derecho o enrollado al tamaño adecuado del frasco, con la boca abierta de la misma forma que se emplea para las cecilias; esto facilita el posterior examen de los dientes (McDIARMID 1994b).

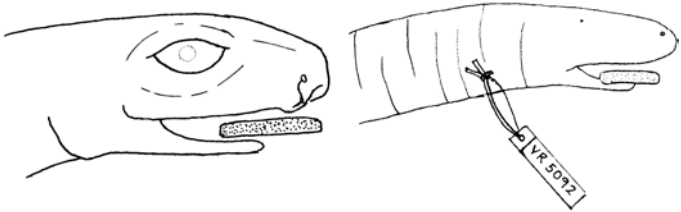


Figura 6. Detalle sobre la forma en que se realiza la fijación de la boca en salamandras y cecilias dentro del recipiente de plástico en el que se muestra el posicionado de los ejemplares.

Después de pocas horas, la mayoría de los ejemplares se endurece lo suficiente para conservar su forma; en este momento se ata la etiqueta cerca de la rodilla en la pierna derecha en las ranas y salamandras grandes, y alrededor del cuello con hilo de algodón 100% en salamandras pequeñas y cecilias (Figura 6). En ejemplares de gran tamaño se recomienda que el proceso de fijación tenga un tiempo de duración mínimo 24 horas. Algunos investigadores prefieren atar las etiquetas al momento de fijarse los ejemplares para evitar confusiones dado el caso de que se muevan los recipientes, esto representa una desventaja puesto que puede interferir con la forma en la que el ejemplar vaya a ser montado. Igualmente la pierna sobre la cual se atan las etiquetas varía según el investigador y la institución.

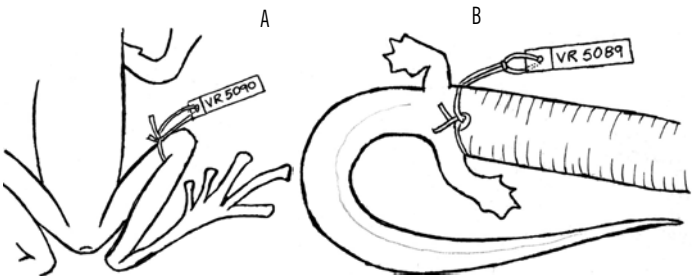


Figura 7. Esquema que muestra dónde debe colocarse la etiqueta de campo:  
A. Anura y B. Caudata.

## Procedimiento para la preservación

Los ejemplares son preservados en sustancias que evitan su degradación y que, a su vez, actúan como germicidas. Existen muchos líquidos preservativos, entre los que se encuentran el alcohol etílico, metílico e isopropílico, pero el alcohol etílico al 70% es el que primero se usó, el más común y el que mayor éxito ha tenido. Este es un buen biocida empleado para matar bacterias que atacan los tejidos, pero es un solvente orgánico y como tal hace que se pierda la coloración de los ejemplares cuando sus pigmentos se disuelven en él, es hidrofílico, por lo tanto causa que los tejidos se encojan y además es costoso (SIMMONS & MUÑOZ-SABA 2005).

Se recomienda alcohol etílico al 70% por ser el que ha dado mejores resultados. La preservación de tejidos para pruebas posteriores de ADN debe hacerse con alcohol analítico; esto es, alcohol etílico al 96% rebajado con agua destilada o desionizada, el cual no causa destrucción de los tejidos y de los enlaces covalentes. Este alcohol no debe contener pirimidinas, benceno o aceites que causen su desnaturalización. El alcohol medicinal o el industrial que comúnmente se vende al 96% contiene alguna de estas sustancias, razón por la cual no debe ser empleado (SIMMONS & MUÑOZ-SABA 2005). El alcohol isopropílico, utilizado en algunas colecciones, no es recomendable, ya que, a la larga, los ejemplares quedan en pobre estado de preservación, lo cual los hace muy delicados, incluso algunos se desmiembran (com. per. E. LA MARCA).

## Preparaciones especiales

### Fijación y preservación de huevos y larvas

De acuerdo con McDIARMID & ALTIG (1999), no se han hecho evaluaciones completas sobre la mejor manera de fijar y preservar anfibios en las primeras etapas de su desarrollo; de hecho, tampoco existen protocolos estandarizados para estos procesos. Sin embargo, de acuerdo con lo que se conoce hasta ahora y nuestra experiencia personal, pueden hacerse algunas recomendaciones para maximizar la permanencia en el tiempo de colecciones de huevos o larvas.

El éxito de una colección de larvas depende en gran medida de la calidad de las mismas en el momento de la fijación y de la información que haya podido obtenerse de ellas antes de preservarlas, dado que en nuestra región existen muy pocas herramientas disponibles para la identificación taxonómica de huevos y larvas, y en muchos de los casos, continúan siendo un misterio. No debe olvidarse que por sus características anatómicas y ecológicas, las larvas son bastante frágiles una vez que se han extraído de su medio natural para ser transportadas y preservadas; por ejemplo, SIMMONS (2002) recomienda manejarlas con cucharillas o cucharas en vez de pinzas (pueden emplearse las cucharillas de teflón, que aunque son costosas, sirven muy bien para este tipo de casos, com. per. F. López). Además, por tener sus tejidos activados en permanente desarrollo, son especialmente sensibles a una rápida descomposición post-mortem. En consecuencia, para garantizar un nivel mínimo de calidad en la colección y preservación de estos ejemplares, recomendamos tener en cuenta los siguientes aspectos:

1. Las larvas no deben tratarse como individuos sino como lotes, sin perjuicio de que un lote esté compuesto por un único individuo. Esto aplica tanto para las notas de campo como para el etiquetado y posterior almacenamiento de las muestras. McDIARMID & ALTIG (1999) son especialmente enfáticos en afirmar que, a diferencia de los adultos, las larvas no deben llevar las etiquetas en su cuerpo, sino en el contenedor en el que se almacenen, que debe estar acorde con su tamaño, su forma y la cantidad de individuos en el lote, puesto que no se etiquetan individualmente (con excepción del caso mencionado anteriormente). En apartados siguientes se detallan los medios de almacenamiento.
2. La experiencia indica que el medio más recomendable para fijar y preservar las larvas de anfibios es el formol (formalina o formaldehído) al 10%, con o sin buffer (SIMMONS 2002). McDIARMID & ALTIG (1999) recomiendan una fórmula amortiguada (con buffer) en la cual cada litro de la solución contendrá los siguientes componentes: 100 cc de formalina comercial (37-40%), 900 cc de agua destilada, 4 g de fosfato de sodio monobásico y 6.5 g de fosfato de sodio dibásico.

No obstante, no está comprobado que la solución buffer cumpla un papel relevante en la calidad y mantenimiento de las larvas preservadas. Dado que éstas se encuentran en medios líquidos, tienden a diluir la concentración de formol rápidamente después de que se han sacrificado. Por lo tanto, se recomienda sacrificarlas y fijarlas en una solución de formalina más concentrada (2 partes de formol por 8 de agua) y transferirlas posteriormente a la solución preservante de formol al 10% (de 4 a 12 horas después). Otras opciones de fijación y preservación son el alcohol etílico al 70%, el alcohol etílico al 96% (especialmente para el procesamiento posterior de tejidos) y un producto comercial denominado S.T.F.® (Streck Tissues Fixative, Laboratorios Streck, E.U.) que se promociona como una alternativa ambientalmente segura para la fijación de tejidos con aplicaciones histopatológicas, está libre de aldehído y alcohol, y se supone que preserva los ácidos nucleicos ([www.streck.com/fixative](http://www.streck.com/fixative)). No obstante, las larvas preservadas en alcohol suelen encontrarse deshidratadas e inconsistentes, aunque se mantiene mejor su coloración original (McDIARMID & ALTIG 1999), mientras que la fijación con S.T.F.® no presenta mayores inconvenientes, salvo algunas diferencias en la consistencia de las larvas preservadas y tiene la ventaja de ser un compuesto menos restringido que el formol en cuanto a transporte y distribución (McDIARMID & ALTIG 1999).

3. Es ideal contar en un lote con larvas de diferentes estadios de desarrollo. Dado que no siempre se presentan así en el momento de la colección, si el tiempo, el tipo de muestreo y la logística lo permiten, se recomienda preservar los individuos en varias etapas. Para ello es necesario contar con un equipo mínimo, además del líquido fijador, consistente en frascos con tapa que se puedan llevar al sitio de colección (los recipientes para tomar muestras de orina o los envases de rollos fotográficos son una solución económica y práctica para el almacenamiento temporal), bolsas plásticas gruesas y una provisión de agua libre de cloro (lluvia o del curso de agua más cercano, preferiblemente sin sedimentos). La preservación por etapas comienza desde el momento mismo



de la colección, cuando una proporción pequeña de cada lote es fijada in situ. Las larvas restantes se deben mantener por un mínimo de 2 días en bolsas plásticas sin cerrar, llenas inicialmente con la misma agua en la que fueron encontradas y posteriormente con agua libre de cloro, cuidando de cambiarla una o dos veces al día. Al cabo de ese tiempo se debe preservar otra proporción de larvas y si es posible, se mantienen unas pocas con alimento artificial (comida para peces o Spirulina, por ejemplo) hasta que se encuentren en estadios premetamórficos, momento en el cual se preservarán. Contar con larvas en estos estadios será muy útil para la identificación taxonómica posterior.

4. Separar las especies o morfotipos justo después de su colección y preservación (cuando no han perdido su coloración in vivo) facilita su identificación, y permite incrementar la coherencia entre la colección y las notas de campo. Si bien inicialmente los lotes se organizan por muestreo o punto de colección, es conveniente subdividirlos de acuerdo con los morfotipos colectados. Cada lote resultante debe llevar un número de campo (etiqueta del colector) propio y debe estar almacenado en contenedores diferentes. En el caso de larvas preservadas por etapas, no se recomienda organizar nuevos lotes para cada etapa; todas las larvas preservadas de esta manera deberían formar parte del mismo lote en el que fueron coleccionadas inicialmente, o de los lotes obtenidos como consecuencia de la división por especies o morfotipos.
5. En caso de que algunos individuos del lote mueran antes de ser sacrificados en formol, es preferible no preservarlos. La experiencia personal muestra que los individuos preservados tras su muerte nunca adquieren los niveles de fijación y consistencia de los ejemplares sacrificados y preservados en formol. Usualmente se deshidratan y arrugan, pierden sus partes bucales y en caso de que se requiera realizar preparaciones especiales (tinciones) sobre ellos, el colorante no actúa eficientemente. Además, pueden contaminar el resto del lote.

6. Finalmente, debe buscarse un equilibrio entre el número de larvas de cada lote y el tamaño del contenedor que las alberga. Demasiadas larvas en un contenedor corren el riesgo de dañarse físicamente y además, de diluir rápidamente el líquido fijador, haciéndolo poco eficiente.
7. Con respecto a la fijación y preservación de huevos, es casi un supuesto común que no hay posibilidades de mantenerlos por largos períodos de tiempo tal y como fueron capturados: la cubierta gelatinosa por lo general cambia de color, de consistencia, acaba desintegrándose y los embriones quedan sueltos en el contenedor. Por lo anterior, las notas de campo y las fotografías cobran especial relevancia en este aspecto. El procedimiento estandarizado de fijación es idéntico al de las larvas (inicialmente en formol al 20-30% y posteriormente en formol al 10%), pero se recomienda fuertemente incluir en las colecciones parte del sustrato en el que estaban adheridos, si es posible (hojas, hierba) y en las notas de campo datos como color de la postura, forma, presencia de parásitos, etc.

### *Preparación de esqueletos*

De acuerdo con SCROCCHI & KRETZSCHMAR (1996), un método ampliamente utilizado y que brinda los mejores resultados es el uso de coleópteros derméstidos, los cuales comen los músculos y, en cantidad suficiente, pueden limpiar un esqueleto en pocas horas. Si se emplea este método es importante considerar que:

1. Los ejemplares deben ubicarse por separado dentro de recipientes individuales en cajas de plástico para evitar que se mezclen los huesos más pequeños.
2. Los esqueletos a limpiar deberán ser colocados dentro de un recipiente cerrado que contenga a los derméstidos.
3. Debe extraerse la piel, las vísceras y los ojos; debe retirarse la mayor cantidad de músculos teniendo cuidado especial en no dañar los huesos (son especialmente delicados el esternón, las costillas y la región de las articulaciones de los

miembros). Una vez retirada la musculatura debe secarse el esqueleto colgándolo al aire, sin olvidar protegerlo de otros insectos tales como moscas y hormigas.

4. Al momento de ubicar los ejemplares junto con los derméstidos, deben ser identificados con una etiqueta, bien sea de metal, plástico o cartón grueso, atada con una cuerda resistente, como por ejemplo el nailon. Usualmente los derméstidos no atacan el cartón o el plástico de las etiquetas, pero suelen ocurrir accidentes que se deben evitar, por ejemplo que los derméstidos devoren las etiquetas o que escapen y causen daño en otras colecciones.
5. Los materiales deben ser revisados periódicamente para evitar que los derméstidos destruyan las piezas más pequeñas.
6. Una vez limpios los esqueletos, se debe retirar o sacrificar a todos los derméstidos que puedan quedar dentro de las cavidades de los mismos, para evitar que dañen otras colecciones; para esto lo mejor es depositar los esqueletos en un congelador a 20°C bajo cero durante unas 48 horas. De no contarse con un congelador de estas características, se recomienda colocar los esqueletos en un congelador convencional durante dos semanas antes de ingresarlos a la colección.
7. Finalmente se deben remover los restos de suciedad del ejemplar, como hebras de algodón, insectos muertos, mudas, etc. Para esto debe emplearse solamente agua limpia y un cepillo. Los ejemplares muy grandes presentan el problema adicional de la médula ósea, la cual debe eliminarse para evitar que se descomponga y dañe los materiales. Esto se logra realizando pequeñas perforaciones en los extremos del hueso con un taladro eléctrico y una broca muy fina y bien afilada; una vez realizadas las perforaciones se debe inyectar agua a presión hasta eliminar todos los restos de médula.

### *Preparación de tejidos*

Actualmente los estudios bioquímicos han permitido contestar muchas preguntas con respecto a la biología, ecología y evolución de las especies. En los últimos años su aporte ha sido crucial a la hora de delinear estrategias de conservación y manejo de los recursos naturales. La genética aplicada a la conservación estudia los factores genéticos que tienen influencia sobre la probabilidad de extinción de las especies y sus poblaciones. Por ello, esta disciplina permite identificar grupos de organismos genéticamente diferenciados que son prioridad en los esfuerzos de conservación, definir sitios geográficos portadores de endemismos genéticos para su protección o monitoreo, delimitar unidades de conservación con el fin de optimizar el uso de recursos económicos en la protección de recursos naturales y planear estrategias de manejo de poblaciones silvestres y en cautiverio (MÉNDEZ 2004).

Para conducir estudios en esta disciplina, son necesarias pequeñas muestras de ADN proveniente de algún tejido. Se pueden obtener tejidos de ejemplares que hayan sido encontrados muertos o de aquellos que se capturaron vivos; éstos servirán para diferentes propósitos tales como un análisis de la variabilidad genética, determinación filogenética, taxonomía, evaluación de contaminación, enfermedades u otros. Aunque se ha logrado extraer ADN de ejemplares fijados en formaldehído y conservados en etanol (SIMMONS 2002), es preferible obtener tejidos de especímenes exclusivamente para este propósito, dado que la tasa de recuperación de ADN en animales preservados hace mucho tiempo es de 5-20% de lo que se puede extraer de un tejido fresco (DESSAUER *et al.* 1996). Aunque es posible desformolizar una muestra, y en la mayoría de los casos se puede realizar una extracción de ADN con los restos que quedan (Gacetilla de Prensa de Córdoba 2004), el tamaño del fragmento suele encontrarse entre 200-300 pares de base (DESSAUER *et al.* 1996), en parte debido a que los puentes formólicos pueden producir roturas en la hélice de ADN, lo cual dificulta los métodos de amplificación por PCR (NAPOLI *et al.* 1995). Las muestras necesarias para este tipo de análisis pueden provenir de distintos tejidos, aunque las más ricas en ADN son las muestras sanguíneas y las de tejido muscular

(MÉNDEZ 2004). Sin embargo, el análisis de estas muestras es caro y no es accesible en todos los países, lo que hace necesario, según el estudio, enviar las muestras a laboratorios externos que precisan que los tejidos estén bien preparados y conservados. A continuación damos algunas pautas recomendadas que siguen a JACOBS & HEYER (1994) y LIPS *et al.* (2001):

1. Asegúrese de que con sus permisos puede obtener muestras de tejidos, dado que en algunos lugares se los considera equivalentes a especímenes, y en otros se puede requerir permisos especiales.
2. Las muestras deben ser tomadas inmediatamente después de la muerte, dada la degradación del ADN.
3. Obtenga la mayor cantidad y tipos de tejidos posibles (sangre, corazón, intestino, riñón, hígado, músculo esquelético y estómago). Cada muestra debería ser por lo menos del tamaño de un borrador de lápiz, esto para el caso de ejemplares de porte mediano a grande. En el caso de especies pequeñas, talvez sea necesaria la remoción de los órganos completos (com. per. E. LA MARCA).
4. Procure minimizar la contaminación de los tejidos: no deben mezclarse los tejidos de un espécimen con los de otro individuo, o con sangre o piel del investigador, debido a que los análisis actuales de ADN (reacción en cadena de polimerasa, PCR) pueden llegar a amplificar diminutas cantidades de ADN y llevar a confusiones.
5. Es importante que se conserven apropiadamente los tejidos procedentes de animales vivos, ya que ellos podrían estar infectados con algún agente de contaminación (virus, bacterias, hongos, etc.); la misma medida de precaución de be tomarse cuando se encuentran animales muertos o moribundos, de tal manera que el agente de la contaminación pueda ser identificado en laboratorio.
6. Procure prevenir y evitar la contaminación cruzada cuando se recojan muestras de más de un individuo.

7. Limite la recolección a los tejidos que puedan ser conservados adecuadamente para futuros análisis.
8. Antes de explicar cómo obtener un tejido, es importante considerar también las siguientes pautas (JACOBS & HEYER 1994, LIPS *et al.* 2001, SIMMONS 2002):
9. El número de ejemplares empleados para la obtención de tejidos depende de la pregunta de la investigación. Por ejemplo, la muestra de ADN de un solo individuo puede ser adecuada para contestar una pregunta filogenética, en cambio, podrían emplearse hasta 30 individuos por población, para un estudio de variación interpoblacional.
10. La muestra de tejido (excepto sangre u otros fluidos), de ser posible, debe incluir tejido normal próximo al anormal, que puede evidenciarse fácilmente.
11. La muestra de tejido de ser posible debe tener aproximadamente 20-25 mm de largo y 5 mm de ancho, de lo contrario es suficiente con obtener una muestra del tamaño de un borrador de lápiz, como se indicó anteriormente.
12. El tejido se debe cortar con un escalpelo muy filoso o tijeras igualmente bien afiladas.
13. Debe escribirse en las notas de campo cuáles tejidos fueron removidos para cada espécimen.
14. Los tejidos deben ser extraídos lo más rápido posible bajo sombra para evitar su degradación.
15. Antes y después de tomar cada muestra de tejido, asegúrese de que las herramientas (tijeras, pinzas, escalpelos), los envases (pequeñas botellas de vidrio o plástico, bolsas), y los reactivos usados para obtener muestras de ADN estén preferentemente esterilizados o muy limpios, para evitar la contaminación de las muestras. La limpieza de las herramientas debe hacerse inmediatamente se realicen los cortes, antes de que la sangre se seque, lavando primero en agua, y luego enjuagando en alcohol etílico al 95%. Alternativamente se

puede emplear también para el lavado un poco de Isodine, Bactrodine o cualquier compuesto a base de Yodo (com. per. F. LÓPEZ). La esterilización puede hacerse flameando cada utensilio mediante un mechero o un encendedor de cigarrillos.

16. La etiqueta para cada muestra de tejido debe ser escrita en papel de algodón y con lápiz o tinta indeleble, asegurándose que la misma esté bien seca antes de añadir el tejido.

### Obtención de tejidos

Dependiendo de qué tipo de tejido se precise, se puede extraer músculo realizando un corte a través de la piel del muslo izquierdo (recuerde que la ficha del museo generalmente se coloca en el muslo derecho), posteriormente se remueve un pedazo de músculo del tamaño de un borrador de lápiz; no corte la arteria femoral, ya que esta irriga la parte posterior y ventral de los músculos del muslo (DUELLMAN & TRUEB 1986). Si el animal es de patas cortas, tome una muestra de músculo cercano a la columna vertebral o del cuello. En el caso de ejemplares muy pequeños se puede tomar al animal entero siempre y cuando se tenga otro de referencia (JACOBS & HEYER 1994, SIMMONS 2002).

Para la extracción de tejidos provenientes de la cavidad abdominal, realice una pequeña incisión lateral en el lado izquierdo, con una pequeña pinza, sujete el hígado y extráigalo a través de la abertura, remueva la pieza, retire y etiquete en un envase apropiado. Proceda de la misma manera para otros órganos (SIMMONS 2002).

También es posible realizar un análisis de ADN con uno o dos dedos del pie de un anfibio adulto, en ejemplares pequeños se puede extraer toda una pata, en ejemplares muy grandes, como algunos hílidos, puede bastar con una falange que incluya el ensanchamiento distal (com. per. E. LA MARCA). En el caso de renacuajos se emplea el renacuajo entero, pero es posible remover solo parte de la cola y así liberar al renacuajo. Sin embargo esto no es lo más aconsejable, ya que la lesión en la cola provee un punto de entrada para infecciones, incluso puede ocasionar un impedimento para que el animal se desplace bien, lo cual favorecería a un depredador (com. per. E.

LA MARCA); es preferible remover al renacuajo de la población. En adultos de Caudata, en o cerca de la edad reproductiva, remover la cola es mejor, dado que varios estudios han indicado que la falta de los dedos del pie puede reducir su supervivencia (JACOBS & HEYER 1994); sin embargo, la obtención del tejido del dedo del pie es biológicamente preferible que tomar el animal entero. Se puede emplear un cortaúñas o unas tijeras, que deben ser limpiados con etanol al 70% durante su uso para cada muestra, para evitar contaminar las muestras (OLSON *et al.* 1997).

### Preservación de tejidos

La forma preferida de conservar muestras de ADN es congelándolas inmediatamente en nitrógeno líquido, esto implica traer al campo un envase apropiado y encontrar algún lugar que provea nitrógeno líquido, lo cual puede ser difícil cuando se está en campo. Los tejidos conservados en nitrógeno líquido deben ser colocados (preferentemente en orden) en criotubos o envueltos en papel de aluminio grueso. Los tejidos podrían también estar colocados en bolsas de polietileno (a las cuales se les extrae el aire), aunque las bolsas plásticas no deben sumergirse en el nitrógeno líquido (SIMMONS 2002). Si es imposible congelar los tejidos en el campo, entonces existen varios preservantes específicos para conservar tejidos; estos pueden ser usados para proveer al material la fijación de todos sus microcomponentes y facilitar el posterior análisis de ADN (JACOBS & HEYER 1994). Existen algunas instituciones, como el Instituto Humboldt de Colombia, el cual inicialmente proporciona el tanque y el nitrógeno líquido, y que proporciona el protocolo de colección una vez que se deposita la muestra en el banco de tejidos de esa institución.

En caso de que no pueda emplear un refrigerante en campo, LIPS *et al.* (2001) sugieren que en faenas de campo cercanas al mar y donde no se disponga de sales de laboratorio, se puede diluir una parte de formaldehído concentrado en 8 partes de agua pura y una de agua salada. Se debe tomar en cuenta que la formalina no diluida provoca cambios en la apariencia del tejido, ocasionando errores en el análisis histológico. Los tejidos deben ser colocados en envases (protegidos de la luz) dentro de un ambiente frío y oscuro lo antes posible. Se debe cambiar la formalina después de 24-72 horas.



También se puede emplear alcohol etílico de la siguiente manera (SIMMONS 2002):

1. Colocar la muestra en alcohol etílico al 95 % por 1-2 horas, cambiar a un nuevo alcohol etílico de 95%.
2. Trasladar a alcohol etílico al 75 % por 1-2 horas, luego nuevamente cambiar a un nuevo alcohol etílico de 75 %.
3. Use al menos dos veces el volumen de alcohol por volumen del tejido.
4. Cortar la muestras en pedazos de 2-4 mm , puede añadir 100  $\mu\text{mol}$  de EDTA (ácido EtilenDiaminoTetraAcético) por litro de alcohol para estabilizar los tejidos.

Los tejidos en alcohol deberían ser colocados en ampollas de vidrio que cierren bien, o se pueden emplear los envases de plástico usados para centrifugadoras, en este caso el tamaño de la muestra es menor, pero puede ser repartida entre varios envases; es recomendable el uso de viales que puedan ser cerrados herméticamente (los de tapa a presión tienden a desecarse en poco tiempo, si no están manufacturados apropiadamente (com. per. E. La Marca). Envuelva la tapa del envase con cinta adhesiva. Proteja los tejidos de la luz, colóquelos en un ambiente oscuro y fresco tan pronto como sea posible.

Para muestras sanguíneas, tejido muscular, piel, etc., lo más recomendable es sumergirlas en etanol al 96% en una proporción 3:1 o 4:1, las muestras deben guardarse en recipientes sellados. Preferentemente, las muestras deben ser refrigeradas a temperaturas entre los 6°C y 4°C, o congeladas, aunque la eficiencia de la extracción de ADN no se ve afectada por mantener las muestras a temperatura ambiente por períodos de semanas. Alternativamente, las muestras de sangre y músculo pueden ser preservadas inmersas en EDTA, pero aquí la refrigeración es imprescindible.

El uso de DMSO (dimetil sufoxido) no es recomendable para la colección o almacenamiento de tejidos, dado que no provee estabilidad por periodos largos de tiempo (SIMMONS 2002). El DMSO es un producto ampliamente usado en veterinaria y medicina; hay controversia en el uso de este, ya que hace más permeables las membranas de

las células, permitiendo el ingreso de otros agentes contaminantes por accidente (virus o bacteria). Su uso y efecto también depende de las concentraciones que se están empleando ([http://expertos.conabio.gov.mx/\\_asp/foro4.asp?uid=226](http://expertos.conabio.gov.mx/_asp/foro4.asp?uid=226)). Debe tenerse cuidado con el manejo del DMSO ya que se impregna rápidamente en la piel y puede ser irritante a la piel, ojos, y el sistema respiratorio. La solución salina saturada/DMSO no es inflamable, y puede guardarse indefinidamente a la temperatura del ambiente. Los tejidos como ya se mencionó pueden guardarse en etanol al 70-95%, o en una concentración similar de isopropanol, en lugar del DMSO (ECKERT *et al.* 2000). Si desea trabajar con DMSO recuerde además que este es un crioprotector (DESSAUER *et al.* 1996), lo cual ayuda a preservar las células durante el proceso de congelamiento y descongelamiento, en concentraciones apropiadas.

### Mantenimiento de la muestra

Como se había mencionado antes cada muestra de tejido debe ser cambiada nuevamente a un envase apropiado, etiquetado. Las muestras de tejido pueden guardarse en ampollas o frasquitos de vidrio o plástico esterilizado, con etanol al 95% o en nitrógeno líquido (OLSON *et al.* 1997). Luego de etiquetar la muestra, estas deben guardarse en una colección pública adecuada (museo o universidad, por ejemplo), de tal manera que estén disponibles para investigaciones.

JACOBS & HEYER (1994) indican que los tejidos congelados en hielo normal (agua sólida) no son adecuados para la mayoría de las pruebas bioquímicas estándar de proteínas o ADN. El hielo seco puede guardarse en una bolsa plástica sellada o en una caja, excepto si se evapora rápidamente (cerca de 2-3 kg/día). El tiempo máximo de campo para emplear el hielo seco es cerca de una semana. El hielo seco generalmente está disponible en la industria química para el suministro a firmas o distribuidores de alimentos congelados (como helados). El tanque de nitrógeno líquido o refrigerador es usado en el campo para congelar y almacenar tejidos. El término común entre usuarios para este tipo de envase es tanque o, raramente frasco o termo Dewar; sin embargo, el término comercial es refrigerador. Los tanques vienen en una gran variedad de tamaños con capacidad de 3 a 34 l. El nitrógeno debe estar en cantidad suficiente para mantener

guardados los tejidos congelados por varios meses en el campo. Un tanque que contiene nitrógeno líquido debe ser conservado en posición vertical y bajo sombra el mayor tiempo posible. El nitrógeno líquido no está disponible generalmente (usualmente menos disponible que el hielo seco; algunos vendedores requieren 48 horas para llenar la capacidad de un tanque), pero a menudo puede ser encontrado en ciudades industriales, dado que tiene diversos usos en la industria y en aplicaciones agrícolas. Los tejidos conservados en nitrógeno líquido en el campo, pueden ser transportados al museo en nitrógeno líquido o en hielo seco (CO<sub>2</sub> sólido). Esto es legal siempre y cuando esté correctamente etiquetado, y el envase de nitrógeno líquido no se presurice. Sin embargo, muchos empleados de aerolíneas son renuentes al embarque de nitrógeno líquido; por eso es necesario conocer bien las reglas particulares del transporte aéreo que elija. Es útil, también, indicar en el envase que este nitrógeno líquido puede ser enviado con toda seguridad y legalmente. Una estrategia útil, para tejidos que no estén en tránsito por más de 24 horas, es vaciar el tanque de nitrógeno líquido antes de subir al avión y colocar en su lugar bolitas de hielo seco. Los tejidos en un tanque con hielo seco permanecerán congelados por 3 a 4 días (JACOBS & HEYER 1994).

Al igual que en el caso de la preservación de tejidos, éstos también pueden ser mantenidos en alcohol; en este caso en etanol al 95%, colocándolos en ampollas de vidrio o plástico esterilizadas que cierran herméticamente y envolviendo la tapa del envase con cinta adhesiva. Proteja el tejido de la luz, colocándolo en un ambiente oscuro y fresco tan pronto como sea posible (SIMMONS 2002).

En el laboratorio, las muestras de tejidos deben guardarse en un congelador frío o ultrafrío (-20 C, -70°C a -150°C), en hielo seco, o en nitrógeno líquido (JACOBS & HEYER 1994, SIMMONS 2002).

### Diafanización (transparentado) y tinciones

Además de lo que se ha mencionado con anterioridad sobre las formas de preservación y mantenimiento de ejemplares en colecciones biológicas, existen preparaciones especiales (como esqueletos o coloraciones diferenciales) que resultan de utilidad para evaluar características no evidentes en los individuos coleccionados, como es el caso

de su conformación ósea, muscular, o la presencia de enfermedades. Existe un buen compendio de referencias sobre las “recetas” para preparar los individuos de cada una de estas formas en el boletín sobre procedimientos de colecciones de la Sociedad Americana de Ictiólogos y Herpetólogos (McELMAN *et al.* 1987) que, sin ser reciente, identifica una serie de publicaciones cuyas técnicas ya han sido probadas durante varios años con buenos o regulares resultados. Para los propósitos de este manual, sin embargo, solamente se describirán dos técnicas que podrían contribuir en la identificación de características de interés, tales como malformaciones, presencia de patógenos o problemas neurológicos; además, su uso ha sido bastante difundido y los reactivos que emplean son relativamente fáciles de obtener. Estas son: a) la coloración diferencial con diafanización/transparentado para cartílago y hueso (DINGERKUS & UHLER 1977) modificada por SONG & PARENTI (1995) para permitir la identificación de nervios y b) la preparación con lugol para la identificación de músculos (BOCK & SHEAR 1972). Tejidos preparados bajo una coloración diferencial de hematoxilina-eosina pueden ser empleados para la diagnosis de hongos Chytridiomycetes (Berger *et al.* 1999). Dada la extensión de este procedimiento, referimos al lector a la fuente original.

### a) Identificación de cartílago, hueso y nervio

#### Reactivos:

1. Agua destilada suficiente (dependiendo de la cantidad y el tamaño del material a colorear).
2. 100 cc de solución de azul de alcian (“alcian blue”): 10 mg de azul de alcian 8GN, 80 cc de etanol al 95% y 20 cc de ácido acético glacial.
3. Etanol suficiente, en concentraciones de 95%, 75%, 60%, 50% y 30%.
4. Solución de tripsina (100 cc): 30 cc de borato de sodio saturado, 70 cc de agua destilada y 1 g de tripsina (pancreatina x 4).
5. Solución de KOH al 0.5%, suficiente para lavar y mezclar

6. Solución de rojo de alizarina: se prepara añadiendo rojo de alizarina a una solución de KOH 0.5% hasta que ésta se ponga de color púrpura.
7. Solución blanqueadora: se añaden 4 gotas de peróxido de hidrógeno (agua oxigenada) a 100 cc de KOH al 0.5%.
8. Solución de Sudán negro: preparar una solución saturada de Sudán negro en etanol 70%, filtrarla y luego disolverla en siete o cinco partes de etanol para obtener concentraciones de 30% a 50%.
9. Solución de KOH-glicerina en concentraciones 70-30% y 30-70%.
10. Glicerina pura.

Procedimiento: partiendo de ejemplares preservados en formol, lávelos en cambios sucesivos de agua destilada por dos o tres días. No les retire la piel ni las vísceras si va a colorear los nervios, puesto que hay muchas terminaciones nerviosas que se conectan con estos órganos. Colóquelos posteriormente en la solución de azul de alcian por uno o dos días y una vez adquieran color azul intenso, transfíralos a una sucesión de soluciones de etanol, iniciando en 95% (dos cambios sucesivos), siguiendo con 75%, 50% y hasta llegar a 30%; permita dos o tres horas en cada cambio. Colóquelos luego en agua destilada (dos a tres cambios) hasta que el espécimen se hunda. A continuación proceda a la diafanización/transparentado, sumergiendo los ejemplares en la solución de tripsina el tiempo que sea necesario para que los músculos se vuelvan transparentes; durante ese lapso cambie la solución cada dos o tres días o cuando ésta parezca contaminada. Transfiera ahora los individuos a la solución blanqueadora y luego, a soluciones de etanol en concentraciones sucesivas de 30%, 50% y 70%, dejando que el espécimen permanezca alrededor de 30 minutos en cada una de ellas. Proceda entonces a teñir el nervio, sumergiendo los ejemplares en Sudán negro; el tiempo de permanencia dependerá del tamaño y la constitución del individuo, pero no debe ser inferior a una noche. Seguidamente, destiña los ejemplares sumergiéndolos en dos baños de etanol (70% y 60%) por espacio de 30 a 180 segundos

cada vez y en un baño final de etanol al 50%; luego transfíralos a una solución de KOH 0.5% durante una noche completa y almacénelos definitivamente en las concentraciones sucesivas de KOH- glicerina. Algunos autores recomiendan agregar a la glicerina 100% (en la que se preservan los individuos diafanizados/transparentados) algunos cristales de timol ( $C_{10}H_{14}O$ ), a fin de prevenir el crecimiento bacteriano o fúngico (DINGERKUS & UHLER 1977). Sin embargo, si utiliza el procedimiento para triple coloración no agregue timol, puesto que se ha comprobado que destiñe los nervios.

### *b) Preparación con lugol*

#### **Reactivos:**

Solución de lugol (variación de Weigert, 100 cc): mezclar y agitar vigorosamente 1.0g de yoduro, 2.0g de yodato de potasio y 100 cc de agua destilada.

Procedimiento: dependiendo del área que se desee estudiar o del tamaño del ejemplar, simplemente sumérgalo en la solución de lugol o aplique con un gotero una cantidad suficiente de solución sobre el área de interés. Casi inmediatamente las fibras musculares tomarán un color pardo rojizo que permite diferenciarlas claramente. Esta coloración es temporal, se elimina con agua y funciona en ejemplares preservados tanto en formol como en alcohol. El único inconveniente es que en el trabajo con larvas se deben efectuar aplicaciones sucesivas puesto que la tintura se disuelve tanto en agua como en alcohol o formol.

## Embalaje de ejemplares científicos

Una vez que los ejemplares han sido fijados correctamente debe procederse a su embalaje, para ser trasladados a un laboratorio, colección científica o museo, donde se realizará su almacenaje definitivo. Es importante evitar mezclar animales vivos y muertos, o animales de distintas especies en el mismo recipiente, excepto si se trata de animales muertos de varias especies que sí pueden ser colocados en el mismo frasco con formol (LIPS *et al.* 2001). El proceso de embalaje descrito puede ser aplicado para el envío de ejemplares al exterior con fines de identificación, préstamo o donación.

### Muestras vivas

Si se piensa llevar o trasladar anfibios vivos desde el campo al laboratorio o museo, pueden emplearse bolsas de tela de algodón humedecidas, suplementadas con ramas y hojas que generen un espacio interno y mantengan la humedad (es importante asegurarse de que permanezcan húmedas). Esto en el caso de poblaciones sanas o localidades donde se sepa que no hay patógenos. No obstante, el uso de bolsas de tela no es muy recomendable por la posibilidad de contaminación y propagación de patógenos, por lo que se recomienda el uso de bolsas de plástico, asignando una bolsa por individuo (ver capítulo sobre bioseguridad en este manual). Además de bolsas de plástico gruesas, también pueden emplearse frascos cuyas tapas deben estar agujereadas, esto en el caso de anfibios terrestres, de tal manera que se permita una constante oxigenación. Se recomienda que los agujeros se abran hacia fuera, para evitar el deterioro de los animales que se acerquen a la tapa, o puede ser sustituida por gasa (com. per. E. LA MARCA). Dependiendo del tiempo de viaje de los ejemplares, se recomienda que para periodos de más de un día se empleen los frascos, ya que permitirán que los especímenes vivos estén más seguros y cómodos. Algunas personas utilizan los envases “cartones” de leche, sin embargo es recomendable usar los envases de plástico de forma cuadrada (com. per. E. LA MARCA). Si se trasladan anfibios acuáticos es necesario asegurarse de que haya suficiente oxígeno en cada recipiente, dejando una amplia superficie de agua en contacto con el aire. Coloque vegetación acuática, hojas o musgo, incluso toallas de papel (no blanqueadas) humedecidas pero no empapadas, a cada uno de los recipientes; no use esponjas, muchas son tóxicas para los anfibios acuáticos y terrestres (LIPS *et al.* 2001).

### Muestras conservadas

Para ejemplares preservados en medio líquido, tome en cuenta que una vez que hayan sido fijados en el formaldehído, pueden ser embalados para su envío. En campo la manera más fácil y rápida de trasladar muestras es colocándolas en un recipiente o frasco de tapa hermética que contenga alcohol al 70%, esto para adultos, mientras que las larvas y huevos se colocan en frascos o bolsas gruesas

que contengan formol al 10%. Sin embargo, lo más aconsejable es trasladar los especímenes de la misma manera que para el envío o préstamo de muestras en museos.

Se debe proceder a envolverlos en una gasa, cubriéndolos con toallas de papel (puede emplear más de una capa) por completo, que ayuda a que las muestras no se sequen, reteniendo mejor la humedad; cuide que los dedos o el espécimen en sí esté bien colocado para que no se deforme. Luego se humedece este paquete con el preservante adecuado o correspondiente, para ser introducido en una bolsa de plástico resistente o gruesa la cual es sellada (PISANI & VILLA 1974, McDIARMID 1994b). Cuando se está en campo se pueden sellar las bolsas con cinta adhesiva o embalar en bolsas tipo Wilpack® o Ziploc®, verificándose que estén bien selladas. Cada paquete debe estar etiquetado y bien sellado, no debe existir exceso de preservante, ya que puede dañar el envase de envío. Las bolsas de polietileno que se empleen en laboratorio pueden ser amarradas o selladas con calor, el polietileno más grueso proporciona mayor protección a los ejemplares. Cuando se envían muestras al exterior, no deben cerrarse las bolsas con pegamento o gomas, ya que se deterioran al estar en contacto con el preservante; tampoco han de emplearse bolsas con alambre o tipo cremallera puesto que éstas no sellan bien ni resisten la tensión durante el viaje (SIMMONS 2002).

Este primer paquete puede ser introducido dentro de otro sellado al vacío y finalmente colocado en una caja gruesa, etiquetada y rellena con material de embalaje. Los paquetes no deben estar en contacto directo con la caja. Los ejemplares deben ser embalados poco antes del envío y ser desempaquetados inmediatamente al ser recibidos, para evitar riesgos de deshidratación de los mismos; no obstante las muestras bien embaladas pueden permanecer varias semanas en el paquete (McDIARMID 1994b, SIMMONS 2002).

En el caso de no tener formol para el embalaje, puede emplearse alcohol etílico al 70%, y como segunda opción alcohol isopropílico (40-50%). El alcohol metílico no es un preservante satisfactorio (Simmons 2002). En el caso de no contar con ninguna de las anteriores opciones, véase Preservación para otras alternativas.



Las larvas y huevos deben ser transportadas en líquido (generalmente formol, pero nunca en soluciones de alcohol) dentro de frascos de su tamaño, de tal manera que no se deformen por el movimiento. Llene el frasco totalmente con el líquido y asegure la tapa firmemente para prevenir derrames. Envuelva los frascos con toallas de papel, e introdúzcalas en un bolso plástico. Al llegar al destino, inmediatamente transfiera las larvas a frascos más grandes y a una solución fresca de formol al 10%. En algunos casos donde el traslado sea de no más de 12 horas, el formol puede ser sustituido por agua, pero inmediatamente al llegar las muestras deben ser retornadas al formol 10% (PISANI & VILLA 1974, McDIARMID 1994B, SIMMONS 2002).

En caso de tener muestras secas, se debe emplear una caja gruesa libre de ácidos, o una caja de polietileno acolchada libre de fibras de poliéster. Los huesos pequeños se deben colocar en una cápsula de gelatina o vidrio, para que no se pierdan. En el caso de ejemplares diafanizados/transparentados, éstos deben ser enviados en frascos que contengan glicerina y que sean adecuados al tamaño de la muestra. En ambos casos, no deje que los paquetes o frascos toquen la caja; utilice material para que se mantengan firmes en su lugar, pero no emplee las bolitas biodegradables de embalaje, dado que se elaboran de maicena, y esto puede atraer parásitos. Etiquete cada paquete y las cajas (SIMMONS 2002), es importante adjuntar dentro de la caja o paquete una copia de la “hoja de préstamo”, y de ser posible otra copia en la parte externa del mismo, para oficiales de inspección de correos.

### Muestras congeladas

Cuando se congela un espécimen, el frío causa la ruptura de las células debilitando el tejido. Por esto es importante recordar que si se decide congelar una muestra, considere que posteriormente no se la podrá retornar a una preservación en líquido. Ni los fijadores ni los preservantes pueden penetrar los tejidos mientras la muestra esté congelada. Los ejemplares congelados se deberían preparar como esqueletos. Si es realmente necesario pasar a medio líquido un espécimen congelado, se lo debe introducir en una solución buffer de formalina al 10%, inyectándosela en los lugares que sea posible. (SCOTT & AQUINO-SHUSTER 1989, SIMMONS 2002).

Para el envío de muestras congeladas en nitrógeno líquido o hielo seco, revise el subtítulo de Mantenimiento de la muestra (bajo Preparación de tejidos). Los paquetes o envases que contienen las muestras deben ser empaquetados junto con bolsas de refrigerante artificial previamente congeladas (hielo seco) para mantenerlos fríos; las bolsas de refrigerante son mejores que el hielo (agua), porque esta última causa condensación y se derrite. Coloque todo esto en una caja de hielo con paredes de plástico resistente o de poliuretano especialmente diseñadas para hielo seco, y luego para reforzar la protección se puede introducir la caja en otra de cartón (LIPS *et al.* 2001).

### Otras consideraciones

Si los anfibios están vivos, empaque el recipiente de modo que el aire pueda circular. Coloque papel de periódico arrugado, o algún material absorbente similar, dentro de la nevera o caja, con las bolsas, para reducir el movimiento así como para aislar y absorber los líquidos. Cierre las neveras o cajas con cinta de embalaje; no utilice la cinta de papel (que tiene pegamentos sensibles a la humedad), ni tirro, cinta o masking tape (que tienen pegamentos débiles), ni amarre con cintas (que se deterioran rápidamente con la edad y la exposición a UV) (SIMMONS 2002).

En caso de transportar ejemplares preservados, colóqueles las etiquetas con todos los datos necesarios, indicando, además, que se trata de “ejemplares científicos de museo, sin ningún valor comercial”. En el caso de enviarse un espécimen fuera del país, verifique la norma existente al respecto para obtener los permisos correspondientes, tanto en el país de donde se realizará el envío, como en el que se recibirá el paquete (PISANI & VILLA 1974, LIPS *et al.* 2001).

El envío de los ejemplares por avión siempre ayuda a ahorrar tiempo, y tras la llegada de estos, deben ser inmediatamente desembarcados y preparados para su almacenamiento permanente (SIMMONS 2002).

## Almacenamiento de ejemplares

Este tema se basa en los trabajos de PISANI & VILLA (1974), SCROCCHI & KRETZSCHMAR (1996), LIPS *et al.* (2001), ETHERIDGE (2002) y SIMMONS (2002).

La conservación de colecciones herpetológicas comienza con las técnicas de captura y con los productos químicos para eutanasia, fijación y preservación de los ejemplares, continuando con el ambiente de almacenaje de la colección y cómo se utilizarán los ejemplares. Es importante considerar dónde serán almacenadas las muestras, dado que éste debe ser un lugar confiable (museos o colecciones), que asegure la preservación a largo plazo, así como de sus datos, y la disponibilidad de estos para cualquier investigador que desee estudiarlos.

Tanto el ambiente de almacenaje como la condición física de los ejemplares debe ser supervisado regularmente, por lo que es necesario establecer procedimientos estandarizados. Se sugiere tener un documento que explique qué tipo de conservación se realiza en una institución, y cómo se realiza, para asegurar que los ejemplares se traten con el mejor procedimiento posible y estándar todo el tiempo.

### Condiciones físicas del ambiente de almacenaje

El ambiente seleccionado para el almacenaje no debe tener ventanas y debería ubicarse de modo práctico para el personal. La estantería y la carga sobre el suelo debe ser la adecuada; se puede emplear estantería móvil para maximizar el uso del espacio. Se sugiere escoger armarios de madera que puedan soportar mucho peso, con puertas y fondos, que proveen una protección adicional contra la luz y el polvo. Los armarios metálicos no son recomendables dado que la mayor parte de las colecciones herpetológicas son preservadas en líquidos, y su derrame provoca su oxidación y destruye la pintura; si se emplean estantes de metal deben ser de acero inoxidable, sin ningún tipo de aplicación como pintura, y deben resistir el movimiento de los envases de los ejemplares o en caso extremo un suceso ambiental como un sismo, por lo que se recomienda su anclaje en el piso y en el techo. Esta es una elección según la factibilidad del museo. Es importante recordar no mezclar las muestras conservadas en fluidos con muestras secas; estas últimas deben estar separadas en diferentes ambientes.

Los interruptores deben ser ubicados selectivamente para encender las luces en cada pasillo, de modo que sólo quede iluminada el área

donde se está trabajando. Se sugiere instalar filtros ultravioletas en las fuentes de luz que producen radiación ultravioleta (incrementa la pérdida de color) en todos los ambientes donde se trabaje con ejemplares, como áreas de almacenaje, laboratorio y oficinas. Las muestras preservadas se deben mantener en oscuridad, fuera de la exposición de luz natural o artificial, siempre que no se estén usando. Las luces en el almacén deben ser apagadas cuando no están en uso, y deben estar ubicadas de tal manera que se ilumine al interior de los estantes (esto facilitará el trabajo y ubicación de los ejemplares).

Es necesario tomar medidas de seguridad tanto para los ejemplares como para el personal que se encuentre trabajando en estos ambientes. Deben tomarse en cuenta los reglamentos de seguridad de manejo de sustancias químicas y en caso de incendios. Es necesario tener extinguidores de fuego en lugares estratégicos que así lo requieran y letreros que señalen que está prohibido fumar. Además se deben tener ventiladores (los envases con ejemplares conservados en fluidos sólo deben ser abiertos en ambientes ventilados). Es necesario que el lugar de almacenaje de este tipo de muestras cuente con suficiente circulación de aire para prevenir la acumulación de humos provenientes de los líquidos preservativos. Los gases evaporados del alcohol se acumulan al nivel del piso, así que el sistema de ventilación debe funcionar a este nivel también.

Es necesario mantener estable la temperatura (18-21°C), al igual que la humedad relativa (47-55%), siendo las condiciones óptimas de 18°C de temperatura y 50% de humedad relativa. Las temperaturas elevadas causan que las muestras se deterioren más rápido, y las temperaturas más bajas pueden causar problemas con la calidad preservativa. Las colecciones se deben proteger contra fluctuaciones de temperatura y humedad relativa. Se sugiere supervisar la humedad relativa y la temperatura en el área de la colección a lo largo del año con un graficador higrotérmico o un registrador de datos (datalogger).

Cuando se trabaje con formol, es necesario hacerlo en un área bien ventilada, preferiblemente delante de un colector del humo o campana. Se deben proteger los ojos y usar guantes resistentes a este líquido.

El lugar de almacenaje debe tener los envases ordenados alfabéticamente por familia, dentro de cada orden. Dentro de cada familia, las muestras se deben arreglar alfabéticamente por género y especie. Dentro de cada especie, los ejemplares se deben arreglar por lugar geográfico y por orden numérico. Los ejemplares identificados sólo hasta nivel de familia se dejan en un estante aparte. En algunas colecciones se emplea el arreglo filogenético, pero no lo recomendamos; el uso de un sistema alfabético simplifica la búsqueda de ejemplares en la colección. Es preferible no dividir las muestras de un taxón entre dos estantes, a menos que los envases de este taxón ocupen más de un estante. Los envases que contienen a los ejemplares deben ubicarse de forma adecuada, de tal manera que se permita el crecimiento de la colección, para evitar el cambio a tarros masivos o el reordenamiento de los estantes.

### Condiciones de preservación de los ejemplares para su almacenaje

#### *Preservación según su estado de preparación*

##### **Colecciones húmedas**

En el caso de muestras preservadas en fluidos, se debe considerar:

1. 1. La calidad de la fijación o de la preservación inicial
2. 2. El proceso de la post-preservación
3. 3. El ambiente de almacenaje

El cambio al preservante en el caso de ejemplares fijados con formol debe ser máximo a las 48 horas y en el caso de ejemplares fijados en alcohol en una semana. De manera general, el conservante más empleado es el alcohol etílico al 60-75%. El segundo preservante común es el alcohol isopropílico, que es menos costoso y más fácil de obtener, pero que posee la desventaja de que vuelve frágiles a los ejemplares con el paso del tiempo (com. per. E. La Marca); el tercer preservante común es el formaldehído. El alcohol metílico (alcohol de madera) es inadecuado para su uso como preservante.

Dependiendo del país, el costo del alcohol etílico varía, y su uso se rige a ciertas normas; además, su manipulación plantea un riesgo

potencial de incendio. Se ha indicado que el uso de alcohol isopropílico es más favorable porque es menos costoso, más fácil de obtener, y que los ejemplares permanecen flexibles. Sin embargo, su uso plantea un riesgo alto de incendios, es dos veces más tóxico que el alcohol etílico, y mucha gente encuentra su olor desagradable. Hay que prestar especial atención a la condición de flexibilidad en los ejemplares, porque puede ser una señal de su deterioro. El uso del alcohol isopropílico como preservativo hace ejemplares inadecuados para la mayoría de los tipos de preparación histológica. Es difícil medir la densidad de las soluciones del alcohol isopropílico, particularmente con un alcoholímetro, pues su densidad está cerca de la del agua. El alcohol isopropílico es difícil de mezclar con agua y propenso a formar capas en los envases. En el almacenamiento de larga duración, se ha demostrado que ablanda los huesos (incluir cita específica). Todas estas razones lo hacen poco adecuado para su uso en las colecciones. Aquellas colecciones que poseen ejemplares en isopropanol pueden hacer el cambio a etanol a través de una serie de cambios en alcohol etílico.

La mayoría de los herpetólogos creen que la fijación con formaldehído es necesaria para la preservación a largo plazo de los ejemplares, pero esto no ha sido demostrado, aunque su uso es necesario para muchas preparaciones histológicas.

En el caso de las larvas, es recomendable organizarlas por especie y región geográfica en frascos grandes, dentro de los cuales se sumergen tubos de vidrio individuales para cada lote (o número de colección), llenos a su vez de formol y bien tapados. Cuide que los tubos o los frascos estén acordes con el tamaño de las larvas, correctamente etiquetados en la parte externa del frasco con el nombre de la especie y la procedencia, llenos de suficiente líquido preservante. Los frascos pequeños contentivos de dichas larvas deben ser tapados con algodón o gasa, y colocados con la abertura hacia abajo. Esta modalidad es muy útil para ejemplares post-metamórficos pequeños mantenidos en alcohol; de esta manera se evita que se desequen rápidamente cuando se evapora algo de líquido (com. per. E. LA MARCA). Las larvas deben ser colocadas con la cabeza abajo o recostadas completamente para evitar dañar la cola.

Los ejemplares preservados en glicerina deben ser tratados con el mismo cuidado que los preservados en fluidos. La glicerina es higroscópica, así que absorbe la humedad del aire. Si los envases no están bien cerrados y las condiciones son de alta humedad, la glicerina absorbe la suficiente agua para rebosar el envase, y convertirse en una solución peligrosamente diluida. La glicerina absorbe además agentes contaminadores y los contaminantes atmosféricos, causando que la solución se torne ácida o alcalina. Los ejemplares diafanizados/transparentados son muy frágiles, por lo que deben estar en frascos individuales, con etiquetas externas. Si emplea timol como bactericida o fungicida en la glicerina, utilícelo con mucho cuidado, solamente debajo de una campana de gases, puesto que es un producto muy tóxico.

Los contenidos estomacales, tejidos, la piel, el aparato hyoideo, y otros, son preservados en fluidos; para estos es importante la correspondencia entre el número de catálogo del ejemplar al cual pertenecen y su propia etiqueta. Deben ser colocados en frascos con alcohol al 70%, dentro de las colecciones húmedas, y no mezclados con colecciones secas. Para más detalles revise los subtítulos correspondientes a estos tópicos.

### **Transferencia de ejemplares**

Existe una gran variedad de métodos descritos por diversos autores, pero seguiremos el método recomendado por SIMMONS & MUÑOZ-SABA (2005), por considerar que es uno de los que mejor se adapta a las condiciones de nuestro medio tropical.

Es común sacar los ejemplares de la solución fijadora y lavarlos durante 24 horas en agua bien sea corriente o destilada y posteriormente colocarlos en el líquido preservante. Esto realmente no es una buena medida, puesto que permite que los procesos de degradación comiencen a presentarse, además que produce un cambio osmótico fuerte para los ejemplares. La mejor solución es realizar un proceso por etapas entre el fijador y el preservante en diferentes concentraciones, con una duración máxima de 10 minutos entre cada una de estas (Figura 8).

Cuando el líquido preservante se encuentra muy deteriorado y es nocivo para la conservación del ejemplar, éste debe ser cambiado.

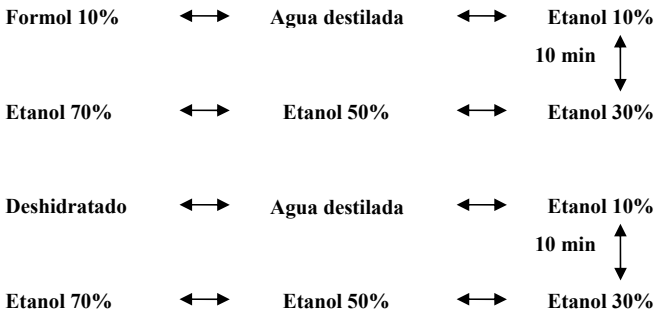


Figura 8. Procedimiento para la transferencia del fijador al preservante de los ejemplares conservados en líquido. Tomado de SIMMONS & MUÑOZ-SABA (2005)

De igual forma, debe tenerse sumo cuidado si el líquido preservante se evapora ya que ocasionaría la deshidratación del ejemplar. Un proceso inverso ocurre cuando se adiciona nuevamente líquido al envase donde está el ejemplar, ya que éste se hidrata produciéndole daños a sus tejidos; estos procesos de deshidratación e hidratación ocasionan daños a los tejidos de los ejemplares, debido al rompimiento de los enlaces covalentes.

Si el alcohol preservante se evapora, debe añadirse alcohol al 96% y no al 70% como suele hacerse de manera equivocada, para de esta forma equilibrar las concentraciones del preservante, puesto que el que se encuentra en el recipiente presenta una concentración mucho más baja del 70%, debido a que primero se evapora el alcohol y luego el agua.

#### Colecciones secas

Los esqueletos, pieles y ejemplares desecados son susceptibles al ataque de parásitos, lo que hace necesario supervisarlos regularmente. La mayoría de los problemas de parásitos se pueden prevenir sin el uso de productos químicos. Los esqueletos no se deben hervir, exponer a tratamientos de amoníaco, consolidantes o blanqueadores (estos causan el envejecimiento prematuro de los huesos, y puede interferir con ciertos análisis químicos, como en la extracción de ADN). Cuando existen problemas de grasa, limpie la superficie del hueso solamente con una tela de poliéster o un paño suave y limpio



empapado en una solución de alcohol etílico al 95%. Se recomienda marcar el hueso con el número de catálogo que le corresponde. Estas muestras deben ser guardadas en ambientes protegidos, dentro de frascos o envases plásticos (preferiblemente transparentes) que pueden contener bolas de algodón que protejan a los huesos cuando son pequeños, además de estar bien cerrados y etiquetados. Se pueden colocar en los armarios bolitas de naftalina (“alcanfor blanco”) para evitar la presencia de polillas y otros insectos; sin embargo la exposición prolongada a este compuesto químico produce anemia hemolítica (com. per. E. LA MARCA).

### Holotipos y paratipos

Los ejemplares tipo (o “tipos”, aquellos empleados en la descripción original de la especie) se deben mantener en un área separada y segura dentro de la zona de almacenaje de la colección. Deben ser ordenados alfabéticamente por género y especie, sin consideraciones a la familia. Con ellos se debe tener un cuidado extremo y constante. Deben presentar etiqueta, indicando si se trata de un Holotipo, Paratipo, Sintipo o Lectotipo. El nombre científico en la etiqueta del holotipo es el nombre original que se le dio a la especie. Las etiquetas para los paratipos pueden llevar el nombre científico actual mientras la etiqueta indique paratipo, marcando el nombre original. Se sugiere que los envases de los holotipos se marquen con una cinta roja visible, externa, mientras que los de los paratipos deben estar marcados con la cinta azul. Algunas colecciones grandes (por ej. KU), los paratipos se colocan en los estantes junto con ejemplares no tipo (com. per. E. LA MARCA).

### Otras consideraciones

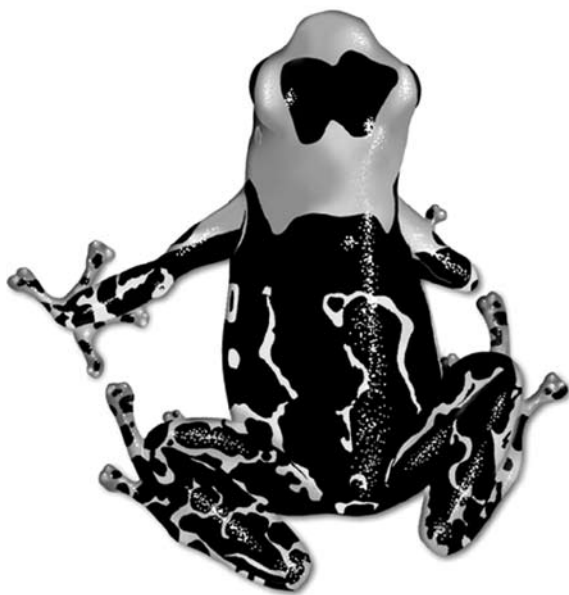
Es importante considerar el tipo de envase que se va a emplear, ya que estos deben cerrarse adecuadamente y ser guardados en la estantería y etiquetados correctamente. Una cantidad pequeña de evaporación del preservante ocurre constantemente (colecciones húmedas), o por el gas que se escapa de los envases debido a los cambios en temperatura y la presión de aire, o cuando los envases se abren para tener acceso a los ejemplares.

Las muestras en líquido deben mantenerse en cristal, acero inoxidable, o envases de polietileno de alta densidad con buen cierre. Cuando los ejemplares estén preservados en alcohol y se extraigan para ser examinados, deben ser sumergidos en una bandeja con el mismo preservante. No coloque los ejemplares preservados en agua para su examen, pues la tensión extrema causa la absorción del agua por el espécimen y diluirá el preservativo en el envase cuando dicho espécimen retorne. La absorción del agua y la deshidratación subsiguiente en el preservativo dañarán a los ejemplares preservados. Cualquier espécimen que flote en el envase o la presencia de gases es un indicativo de que la muestra no se está preservando correctamente.

Los esqueletos, las diapositivas, los negativos, las fotografías, las transparencias de color, los discos compactos, y las cintas con sonidos, deben ser protegidos contra el polvo y las fluctuaciones ambientales, en envases bien cerrados y apropiadamente numerados, descritos y relacionados con otras evidencias físicas. Muchas partículas de polvo son ácidas o abrasivas, que combinadas con la humedad del aire o con el humo (que es aceitoso), ocasionan que el polvo tome la forma de una capa que es difícil para ser lavada.

Pueden colocarse cantidades razonables de muestras dentro de un frasco para ahorrar costos y espacio. Las desventajas de esta práctica incluyen la posibilidad de que ejemplares más pequeños o frágiles puedan deteriorarse por el peso de aquellos más grandes, y que la presencia de más ejemplares implica más tiempo para localizar el espécimen que sea necesario revisar. No mezcle diversas especies, ni mezcle los ejemplares provenientes de diferentes localidades o de la misma localidad en diferentes años en el mismo envase, y no ponga muchas muestras en un mismo envase. Al asignar ejemplares a los envases, mantenga un cociente de por lo menos dos veces el volumen del líquido por volumen de ejemplares. La etiqueta del envase debe incluir información del número de catálogo de cada espécimen, familia, género y especie, lugar, estatus del tipo (si lo hay), así como el tipo de preservante empleado, en el caso de existir o haberse usado más de uno. También debe indicar la procedencia geográfica de los ejemplares. Los catálogos de campo y de las colecciones se constituyen en la fuente primaria de información de los

museos. Ambas deben ser guardadas en gabinetes cerrados, lejos del acceso de personal ajeno a su curatoria, y en lo posible debe existir una copia en papel o digital.



*Dendrobates fantasticus*

# Monitoreo de anfibios

*César Molina<sup>1</sup>, Andrés Acosta<sup>2</sup>,  
Jonh Jairo Mueses Cisneros<sup>3</sup> & Sandy Arroyo<sup>3</sup>.*

## Introducción

El monitoreo, como definimos en este manual, es la estimación periódica y estandarizada de la riqueza y/o abundancia de una o más poblaciones, ensambles, comunidades o gremios de especies de anfibios, a lo largo de un período de tiempo con el objeto de observar la dinámica de cambios o tendencias, sean estos naturales o asociados a actividades antrópicas (p. ej. un plan de manejo predeterminado). Este concepto se puede extender a la estimación de la riqueza y/o abundancia a lo largo de diferentes hábitats con el fin de detectar patrones en la distribución y abundancia de especies.

El monitoreo es de suma importancia para los estudios de ecología, conservación y manejo de la vida silvestre, ya que el detectar los cambios ocurridos en las poblaciones, ensambles, comunidades o gremios resulta clave para la comprensión de sus dinámicas temporales – espaciales y de las causas (bióticas, abióticas, naturales o de origen antrópico) de las mismas, así como para evaluar la eficiencia de cualquier tipo de manejo que se haya aplicado para controlar o aumentar poblaciones de especies focales, e incluso para evaluar el uso del hábitat por una o más especies consideradas (WALKER *et al.* 2000).

---

1. Oficina Nacional de Diversidad Biológica, Ministerio del Ambiente, Centro Simón Bolívar, Torre Sur, piso 6, Of. 611, Caracas, Venezuela. Correo electrónico: cesar.molinarodriguez@gmail.com

2. Laboratorio de Herpetología, Facultad de Ciencias, Pontificia Universidad Javeriana, Edificio 52 laboratorio 110 b, Bogotá, Colombia. Correo electrónico: andres.acosta@javeriana.edu.co

3. Laboratorio de anfibios, Instituto de Ciencias Naturales, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, Colombia. Correo electrónico: jjmueses@gmail.com y sbarroyos@unal.edu.co

Este capítulo no pretende en ningún caso ser exhaustivo, sólo quiere llamar la atención sobre puntos importantes a la hora de diseñar e implementar un programa de monitoreo, de allí su generalidad. Consecuentemente cada investigador debe profundizar en los detalles propios de su(s) objeto(s) de estudio(s) a fin de que su diseño e implementación de un programa de monitoreo resulte en datos estadísticamente robustos que puedan llevar a conclusiones válidas dentro del escenario del problema planteado inicialmente en su investigación.

### Tipos de monitoreo

Una primera distinción de los tipos de monitoreo viene dada por la presencia o no de efectos que causen cambios sobre nuestros objetos de estudio (población, ensamble y comunidad); así tenemos dos posibilidades:

1. Monitoreo en ambientes no perturbados: nos ayuda a observar la dinámica espacial y temporal de los objetos de estudio (especie, ensambles, comunidades y gremios) y las variables que las explican.
2. Monitoreo en ambientes perturbados o por perturbarse: permite observar la dinámica espacial y temporal de los objetos del estudio, una vez expuestos a una actividad de perturbación y las variables que las explican. En situaciones en las que se tiene un enfoque anterior y posterior de la actividad de perturbación, es posible detectar el efecto que ésta tiene sobre la dinámica espacial y temporal de los objetos de estudio. Para ver detalles de este tipo de estudio revisar Vilella & Fogarty (2005).

En términos espaciales y temporales podemos tener las siguientes posibilidades:

1. Monitoreo en un solo sitio en diferentes períodos de tiempo: genera información sobre la estabilidad y/o cambios de los objetos de estudio (abundancia poblacional de las especies consideradas, riqueza y composición de especies en el nivel de ensambles, comunidades o gremios), con la posibilidad

---

de conocer el o los micro-hábitats para cada especie considerada. Adicionalmente, se pueden obtener datos sobre los cambios temporales del ambiente del sitio de muestreo.

2. Monitoreo en muchos sitios en varios periodos de tiempo: arroja mejores resultados que el tipo anterior ya que algunas especies son difíciles de detectar aún cuando estén presentes en un sitio particular, de allí que con un mayor número de sesiones de muestreo las probabilidades de detección aumentan y como consecuencia, las evaluaciones de la estabilidad y/o cambios en la composición de especies, así como las distribuciones geográficas y usos de hábitat y microhábitat para cada especie o nivel de organización considerada son más sólidas y resultan en una posibilidad real de tener estimados poblacionales más confiables que con la estrategia anterior. Adicionalmente, se pueden obtener datos comparativos sobre la dinámica ambiental de los sitios de muestreos (ejemplos de esta situación han sido señalados por RÖDEL & ERNST 2004).

En términos temporales podemos tener las siguientes categorías de acuerdo con su duración, pero con frecuencias variables de muestreo (semanal, mensual, bimensual, trimestral, semestral y anual):

1. A corto plazo: Estudios menores o iguales a un año (FUNK *et al.* 2003).
2. A mediano plazo: Estudios comprendidos entre 1 y 5 años (ALLMON 1991, MOLINA 2003).
3. A largo plazo: Estudios mayores de 5 años (MEYER *et al.* 1998).

Finalmente, podemos tener combinaciones factibles de realizar, al considerar si el sitio o hábitat está o no perturbado, si los muestreos se realizan en uno o más sitios en diferentes tiempos y si la duración del monitoreo es a corto, mediano o largo plazo.

## Diseño de estudios de monitoreo

Importancia del diseño del programa de monitoreo y su relación con la aleatorización/sistematización, replicación/pseudo replicación y tamaño de la muestra.

Podemos definir al diseño como el resultado de un proceso de planificación del estudio para recolectar información apropiada, que pueda ser analizada utilizando métodos estadísticos de los cuales resulten conclusiones válidas y objetivas. En cualquier estudio, el análisis, los resultados y conclusiones que pueden obtenerse dependen, en gran parte, de la forma en que los datos fueron recopilados.

Muchos de los datos de monitoreos están o han sido recolectados sin el establecimiento explícito de hipótesis de trabajo y con pocas, si no inexistentes, consideraciones sobre el diseño (experimental u observacional); como consecuencia de ello se obtienen datos que no permiten establecer conclusiones robustas sobre un fenómeno observado (INGER 2003). Muchas de las discrepancias observadas entre el diseño del monitoreo y las hipótesis de interés limitan el poder de cualquier análisis y por consiguiente la confiabilidad de sus conclusiones. Estas diferencias comúnmente se originan de tres maneras: a) diseño inapropiado para la hipótesis de trabajo, b) imposibilidad de establecer de manera explícita la hipótesis de trabajo y c) datos que habiendo sido recabados para un propósito son utilizados para otro (ROSE & SMITH 1992).

Cualquier toma de datos debe responder a un diseño experimental que involucre la evaluación de una o más hipótesis, algunas muy claras o explícitas y otras más sutiles. Adicionalmente, deben tenerse en cuenta muchos factores sobre el diseño en sí, tales como ubicación y número de las localidades de muestreo, frecuencia de los muestreos y selección de técnicas de muestreo (ROSE & SMITH 1992) y otras no menos importantes como el financiamiento, personal y equipo (GALINDO-LEAL 1999). Es una gran pérdida de tiempo, de energía y de dinero el emprender un programa de monitoreo sin tener en cuenta las consideraciones de diseño experimental y de muestreo.

En este manual consideraremos al muestreo como el conjunto de métodos para seleccionar y observar una muestra o parte de la población

---

o universo con el fin de hacer inferencias acerca de toda la población. Bajo ciertas condiciones, con el análisis de una muestra representativa tomada de una población, bajo un proceso de selección, se pueden hacer deducciones o inferencias acerca de la magnitud de las mismas características en la respectiva población (KISH 1995).

Otra distinción importante a tomar en cuenta ocurre entre los términos sesgo y error de muestreo. Por ejemplo, una estimación basada en la proporción de los sexos tendrá un sesgo a favor de los machos si estos son más conspicuos que las hembras, tal como lo son los machos vocalizantes de muchas especies de ranas. Por el contrario, los errores de muestreo distorsionan los resultados pero no siempre en la misma dirección, y por lo general tienden a compensarse al extraer promedios.

Los detalles del diseño de un estudio de abundancia poblacional de anfibios dependerán marcadamente de los objetivos -uno de ellos es proveer una estimación poblacional con la mayor exactitud posible con relación a la cantidad de esfuerzo de muestreo invertido-; de allí la importancia de especificar dichos objetivos *a priori* y luego ajustar el estudio a los mismos. El paso inicial en el desarrollo del estudio debe ser, entonces, la especificación de los objetivos y la forma en que los datos de riqueza y/o abundancia serán utilizados para alcanzarlos.

Por otra parte, la importancia de tener un diseño explícito es que el procedimiento de monitoreo pueda ser repetido por otros investigadores, además de asegurar que los resultados sean comparables con otros resultados, tanto en el mismo sitio como en otros.

No existe un diseño de muestreo perfecto, sino que cada problema requerirá su propio diseño adaptado a la distribución y ciclo de vida del organismo en estudio, entre otros aspectos. Por lo tanto, es condición indispensable estar profundamente familiarizado con el organismo que se va a investigar.

Con relación a la ubicación de las localidades de muestreo, el diseño del estudio debe incluir un método que considere la variación espacial en la distribución de la población de la(s) especie(s) de anfibio(s) bajo estudio. El muestreo espacial típicamente involucra dividir el área de interés en unidades de muestreo potenciales y seleccionar algunas para ser muestreadas. Entre los métodos más utilizados



está el muestreo aleatorio simple, el cual implica la selección al azar de las unidades de muestreo (probabilidad de selección semejante para todas las unidades de muestreo). Los métodos de muestreo no probabilísticos no garantizan la representatividad de la muestra y por lo tanto no permiten realizar inferencias sobre la población. En algunos casos, con base en el conocimiento de la historia natural de la(s) especie(s) de anfibio(s) considerada(s), por ejemplo los requerimientos de hábitat, podría ser preferible dividir el total del área de interés en diferentes estratos (hábitats) homogéneos a priori que difieran con respecto a determinadas características del hábitat o con respecto a la densidad de la(s) especie(s) que tienen influencia sobre la variabilidad de los datos. Dentro de cada estrato, las unidades son incluidas en la muestra seleccionándolas al azar a los fines de la representatividad del muestreo, considerando que la intensidad de muestreo (la proporción de unidades de muestreo seleccionadas dentro de cada estrato) puede diferir entre los estratos basados en su extensión. Otros diseños de muestreo también son posibles; éstos incluyen muestreo sistemático (se inicia en un punto seleccionado al azar, a partir del cual las muestras son obtenidas por un método sistemático aleatorio o no aleatorio) y muestreo agrupado (muestreos de segmentos homogéneos del objeto de estudio; en otras palabras, cada unidad muestral es un grupo) (KISH 1995, WALTER *et al.* 2000; ver también RUEDA-ALMONACID *et al.* 2006, en este manual).

En algunos casos, algunas poblaciones de anfibios (SJÖGREN 1994) están estructuradas en términos espaciales como una meta-población. La misma se puede distinguir de otros tipos de poblaciones en función de la tasa de dispersión de la especie que la conforma. Si la tasa es muy alta, entonces los individuos que viven en parches separados forman una población. Por el contrario, si la dispersión es muy baja, cada parche representa una población distinta y separada. Con tasas intermedias de dispersión se tiene una meta-población (HANSKI 1991, HANSKI & GILPIN 1991).

Si este es el caso, los patrones espaciales de muestreo se deben dar tanto en lo interno de cada parche poblacional como en todos los parches que potencialmente pueden albergar a dicha especie, a fin de ver la dinámica de extinciones y colonizaciones de los mismos

---

y el resultado en la persistencia regional de la especie (HECNAR & M'CLOSKEY 1996).

Para que se puedan aplicar algunas pruebas estadísticas y poder extender los resultados obtenidos, hay que determinar a priori el número de muestras y/o de localidades a evaluar. Para ello se necesita conocer de antemano cuál es la imprecisión (error) que se puede tolerar en los estimados poblacionales y cuán variables son los muestreos con relación a dichos estimados; esto último requiere de al menos un muestreo piloto, lo cual puede no ser viable en muchas ocasiones. Por otra parte, los factores tiempo, dinero y personal pueden condicionar el tamaño de la muestra. La literatura está llena de formas de estimar los tamaños de muestreo para métodos específicos de estimación (SEBER 1982). El otro enfoque utilizado implica la determinación a posteriori de la representatividad del muestreo realizado y su poder o potencia.

En muchas ocasiones, algunas características (por ejemplo, sexo y/o edad) no son detectadas por nuestras técnicas de muestreo; sin embargo, ello no significa que no estén presentes en el sitio de muestreo. Esto quiere decir que existe una probabilidad de detección que varía entre 0 y 1 y es dependiente de las características de las especies relacionadas con el tamaño corporal, coloración, la capacidad y características de la vocalización -si es el caso- y el uso del hábitat, así como la estación climática, la cantidad y frecuencia de precipitación, la humedad relativa, la topografía y otras variables del paisaje (BAILEY *et al.* 2004, HYDE & SIMONS 2001, WILLIAMS & BERKSON 2004), sin olvidar la experiencia del investigador, entre otras. De allí que, en muchas ocasiones, debemos considerar este hecho al momento de diseñar nuestros estudios, con el objeto de conocer cuál deberá ser la frecuencia y el número de muestreos necesarios para: a) asegurar que contamos con una alta probabilidad de detectar una especie o reducir las falsas ausencias (WILLIAMS & BERKSON 2004) en un ensamble, comunidad o gremio y b) si nos será posible comparar directamente los índices de abundancia, ya que este tipo de comparación en tiempo y/o espacio requiere que la detectabilidad de los individuos o especies sea igual en los períodos o lugares a contrastar (HYDE & SIMONS 2001).

Una técnica de muestreo por sí sola, desafortunadamente, no puede rendir estimados de riqueza y/o abundancia; por lo general, se deben utilizar varios métodos complementarios, dado que cada uno de ellos está diseñado -o limitado físicamente- para muestrear un subconjunto del total de especies y/o individuos y/o hábitats (HAMMOND 1994, HEYER *et al.* 1994). De allí que si queremos obtener datos lo más completos posibles que brinden conclusiones sólidas, debemos estar seguros que estamos muestreando de manera eficaz y lo más completa posible, dentro de las limitaciones logísticas y los objetos de nuestro estudio.

Un elemento a considerar en el diseño es la enorme variabilidad espacial observada en la naturaleza, de allí que el diseño de todos los estudios de monitoreo deben considerar este punto con sumo cuidado (DUTILLEUL 1993, LEGENDRE 1993, LICHSTEIN *et al.* 2002).

Dado que la información sobre la variabilidad espacial de los objetos de estudio así como del conjunto de variables explicativas es, por lo general, desconocida, los investigadores han enfocado la mayoría de sus estudios con muestreos al azar o sistemáticos, y han considerado la obtención de un elevado tamaño de muestras (JOHNSON 2002) con el objeto de obtener estimados confiables -sin o con poco sesgo- a pesar de la variabilidad encontrada en sus objetos de estudio. No obstante, si esta variabilidad se conoce *a priori*, se le puede sacar ventajas con diseños que la incluyan dentro de los mismos (DUTILLEUL 1993, LEGENDRE 1993, LICHSTEIN *et al.* 2002).

Por otra parte, hay que tener en cuenta que muchos estudios no se pueden replicar por motivos logísticos y éticos; por ejemplo, los estudios de impactos ambientales naturales o catastróficos son experimentos que rara vez se replican. Esto no significa que este tipo de estudios carecen de valor, pero hay que recordar que no son muy útiles para hacer inferencias.

Otro elemento del diseño para considerarse es la pseudoreplicación, lo cual implica el no cumplimiento del precepto central de la replicación: que las muestras deben ser independientes. Esta es una de las restricciones más importantes en diseño experimental frecuentemente no tomada en cuenta por muchos investigadores (GALINDO-LEAL

---

1999). Ejemplos clásicos de pseudo replicación suceden cuando nos encontramos en estas situaciones de campo:

1. Animales móviles que tienen probabilidad de ser encontrados más de una vez en una misma transecta.
2. La captura de un macho en un coro afecta la actividad de vocalización del coro, lo que puede dificultar o facilitar la captura de otros individuos.
3. El seguimiento temporal de una muestra de renacuajos en una poza o charca es probablemente dependiente de si la población es pequeña, ya que hay una alta probabilidad de que los mismos renacuajos sean evaluados en repetidas ocasiones.

Sin embargo, en los casos en que ocurran autocorrelaciones espaciales entre las muestras, se han diseñado algunas técnicas que permiten enfrentar este problema (LEGENDRE 1993). Para un análisis general de algunos métodos para diseñar estudios de campo ver EBERHARDT & TOMAS (1991).

Con todo lo anterior en mano podemos realizar un diseño “ideal”, aunque el mundo real nos provee de restricciones que debemos considerar para obtener un diseño factible, entre las que se cuentan: a) tiempo, b) dinero, c) número y experiencia de los investigadores, d) equipos de mediciones y registros e) imprevistos (catástrofes, accidentes y alteraciones climáticas inusuales). De allí que los diseños estadísticos siempre implican transacciones entre lo deseable y lo posible (KISH 1995).

Recapitulando, lo primero que hay que hacer antes de iniciar un estudio de monitoreo o cualquier otro tipo de trabajo de campo, es tener claro cuál o cuáles son las preguntas de investigación; seguidamente es necesario familiarizarse con lo que se conoce sobre los objetos de estudio, de las condiciones climáticas, geográficas y del paisaje del área de muestreo. En segundo lugar, hay que considerar el diseño basado en los parámetros de interés para el estudio y de los métodos para obtenerlos. En tercer lugar, prever los posibles escenarios de logística basados en las características del sitio y de

las costumbres de sus habitantes; estos dos puntos nos permiten asegurar que el estudio propuesto sea factible técnicamente y pueda ser completado con los recursos disponibles para el momento de su ejecución. Finalmente, no hay que olvidarse de los contratiempos debidos a la naturaleza (fenómenos meteorológicos imprevistos) y las fallas humanas (olvido de implementos de trabajo, accidentes no intencionales) que, aunque no deseados, por lo general son más frecuentes de lo esperado.

### Generalidades acerca de la(s) hipótesis a evaluar

La palabra hipótesis ha sido utilizada indiscriminadamente para definir tres conceptos diferentes y no sinónimos, lo cual dado su parecido ha conducido a muchas confusiones, como son teoría, postulado e hipótesis.

Las hipótesis deben ser construidas como respuestas a la pregunta de investigación, de allí que deben ser establecidas de forma que sean evaluables empíricamente, con el objeto de distinguir si la evidencia disponible la refuta o no. Por esto debemos tener cuidado al construir nuestras hipótesis de trabajo de manera de no hacerlo prematuramente y por sobre todas las cosas cuidarnos de intentar evaluarlas con pocos datos y de dudosa calidad.

La evaluación apropiada de una hipótesis es un tema de mucho debate en ecología. De acuerdo con los estudios de la psicología cognitiva, el sesgo de la confirmación (tendencia a buscar evidencias confirmatorias) ejerce influencias negativas sobre el problema de resolver y probar hipótesis, interviniendo frecuentemente con las pruebas de hipótesis alternativas efectivas (LOEHLE 1987, citado por HAWKINS & MACMAHON 1989).

Otro punto importante es la significación estadística y la biológica. El principal problema de las pruebas estadísticas de contraste de hipótesis radica en que la decisión de rechazar o no la hipótesis de igualdad, descansa en el tamaño de la muestra, además del valor de significación asignado. Así, una diferencia muy pequeña puede ser estadísticamente significativa si la muestra es suficientemente grande; por el contrario, una diferencia de magnitud relevante puede no llegar a ser estadísticamente significativa si la muestra es pequeña. Aquí es

---

donde entra en juego el concepto de significación biológica frente al de significación estadística. El hecho de que el valor de probabilidad ( $p$ ) de una prueba en particular resulte significativo no implica la existencia de significación biológica. De la misma manera, un valor de  $p$  no significativo, indica que no pudieron encontrarse diferencias, lo cual no implica que necesariamente no existan; en otras palabras, la significación biológica y la estadística no son siempre equivalentes. Esto pone de relieve que lo importante no es demostrar que existen diferencias sino que éstas son importantes.

### ¿Qué monitorear?

Monitoreo de diferentes niveles de organización (especies, ensambles, comunidades o gremios), especie de interés (amenazadas o bioindicadoras), genes (diversidad y variabilidad genética).

Una pregunta importante antes de comenzar cualquier programa de monitoreo es conocer con certeza qué se va a monitorear y cuáles son las características que pueden influenciar los resultados del estudio de monitoreo, ya que estos datos nos pueden condicionar el dónde, cómo y con qué frecuencia monitorear.

Se puede trabajar con diferentes niveles de organización taxonómica, a saber:

1. Especie: en el contexto de este manual consideraremos el concepto biológico de especies, entendido como un conjunto de poblaciones que real y potencialmente pueden reproducirse entre sí, pero que están aisladas de otros grupos similares.
2. Población: conjunto de organismos de la misma especie que conviven en tiempo y espacio. Los organismos de una misma especie que conviven, pueden intercambiar natural y espontáneamente sus características genéticas, comparten un pasado evolutivo común y, lo más importante, constituyen una unidad evolutiva con un destino común.
3. Ensamble: grupo de especies relacionadas filogenéticamente que usan un conjunto similar de recursos dentro de una comunidad (FAUTH *et al.* 1996).

4. Comunidad: grupo de especies que interactúan en un lugar y tiempo determinado.

Estos últimos niveles de organización implican algunos retos metodológicos, por ejemplo, muchas especies que presentan abundancias bajas, otras que habitan sitios poco accesibles (dosel del bosque) y/o son de hábitos poco notorios y por ende son difíciles de detectar por las metodologías estándares de monitoreo (LIPS *et al.* 2001).

Alternativamente, podríamos trabajar con algunos de los tipos de especies de las señaladas por Noss (1990):

1. Especies indicadoras: especies cuya respuesta es diferencial ante cambios ambientales particulares o cuya respuesta es representativa de las respuestas de otras especies dentro de un hábitat, ensamble, comunidad o gremio. Sin embargo, esto último no siempre funciona de manera tan directa, ya que la mayoría de las especies que concurren en un mismo tiempo y lugar difieren en sus requerimientos de hábitat y en sus historias de vida y, por consiguiente, pueden responder de manera independiente a los cambios ambientales. Esto último implica que en muchos casos una especie pueda no ser buena indicadora de un ensamble o comunidad, de allí que una alternativa sea considerar a un conjunto multi-específico de indicadores (CANTERBURY *et al.* 2000, KREMEN 1992, 1994). KREMEN (1992) y LEGENDRE *et al.* (1997) presentan procedimientos estadísticos para seleccionar a posteriori una o un conjunto de especies indicadoras de sitios con características particulares.
2. Especies clave: especie que influye de manera significativa en la estructura y/o funcionamiento de una comunidad.
3. Especies paraguas: especies con grandes requerimientos de área, que si son conservadas protegen a un enorme número de otras especies dentro de dichas áreas.
4. Especies banderas: especies populares y/o carismáticas.
5. Especies vulnerables: especies que son raras, empobrecidas genéticamente o por alguna razón propensas a la extinción

(ver más abajo para un categorización de este tipo de especies).

Mientras que en términos funcionales tendríamos la siguiente proposición:

1. Gremios: conjunto de especies que explotan la misma clase de recursos de una manera similar ROOT (1967). Bajo este criterio, especies individuales pueden funcionar como indicadores de la situación o respuesta de un gremio particular del ensamble o comunidad, siempre que las respuestas gremiales a un cambio ambiental sean similares. Específicamente los gremios, por concentrarse en grupos específicos de especies con relaciones funcionales particulares, facilitan los estudios comparativos comunitarios, debido a que usualmente es imposible estudiar todas las especies constituyentes de una o varias comunidades y/o ecosistemas.

En términos de conservación podríamos trabajar, por ejemplo, sólo con aquellas especies que estén bajo alguna de las categorías de las listas rojas de la UICN (2006: de las cuales las tres primeras son consideradas como amenazadas <http://www.iucn.org/themes/ssc/redlistindex.htm>).

1. En Peligro Crítico: existe el riesgo de extinción extremadamente alto de sus poblaciones en vida silvestre en el futuro inmediato.
2. En Peligro: sin estar en situación crítica, el taxón enfrenta un riesgo muy alto de extinción en vida silvestre en el futuro cercano.
3. Vulnerable: enfrenta un alto riesgo de extinción en vida silvestre a mediano plazo.
4. Casi amenazado: cerca de ser considerado en una de las categorías de amenaza anteriores en el futuro cercano.
5. Preocupación menor: taxón abundante y/o de amplia distribución.
6. Datos Insuficientes: taxón que por falta de información



adecuada no puede ser asignado a las categorías anteriormente expuestas.

### 7. No evaluado: taxón no evaluado.

En nuestros países andinos son categorías importantes de trabajar las de “Datos Insuficientes” y las “No Evaluadas” además de las amenazadas, ya que pueden representar en la mayoría de los casos más del 50% de las especies conocidas (ver <http://www.globalamphibians.org>).

Considerando un nivel de organización menor de heterogeneidad biológica, debemos tener en cuenta a la diversidad genética, entendida como la variación genética dentro y entre individuos, poblaciones y especies, la cual puede variar geográficamente.

La poca o mucha variabilidad genética viene dada por la cantidad y tipos de alelos diferentes que tenga una especie o población o por los caracteres que estos diferentes alelos codifiquen en el organismo, cuyo conjunto es llamado variabilidad fenotípica.

La diversidad genética es una característica necesaria para mantener la viabilidad de las especies y/o poblaciones, ya que como un depositario de variabilidad, permite la adaptación ante cambios ambientales y por consiguiente la supervivencia y reproducción. En otras palabras, sin variación genética, la transformación y/o adaptación de las especies a través de la selección natural no es posible. Por otra parte, el empobrecimiento genético – producto de pérdida y fragmentación del hábitat entre otras cosas- junto con la aleatoriedad demográfica, son factores que aumentan la probabilidad de extinción local de aquellas poblaciones pequeñas y poco variables genéticamente.

Medir el grado de variabilidad genética dentro y entre poblaciones de una especie requiere de técnicas moleculares de avanzada (minisatélites, microsátélites, poliformismo de ADN amplificados al azar, secuenciación de ADN -nuclear o mitocondrial- para algunos sitios de interés dentro del genoma, entre otras técnicas (LAMPERT *et al.* 2003, LOUGHEED *et al.* 1999, MÉNDEZ *et al.* 2004, MONSEN & BLOUIN 2003).

Una alternativa más asequible, que mide el fenotipo, son los análisis de diferencias en constitución proteica por medio de electroforesis

(análisis de isoenzimas) que permiten estimar las frecuencias de genes y genotipos dentro y entre poblaciones de una o más especies, los métodos inmunológicos y los estudios morfométricos clásicos cuyos datos son fácilmente obtenibles, tanto en el campo como en colecciones zoológicas.

A nivel infraespecífico, es importante conocer la estructura genética y variación geográfica, tanto natural como en aquellos casos en que por efectos antrópicos se produce una fragmentación del hábitat, la cual genera una disminución del tamaño poblacional efectivo, incrementando así la probabilidad de apareamiento entre individuos emparentados que conducen a una disminución de la variabilidad genética, o la deriva génica, que a su vez pueden conducir a una reducción de la variabilidad genética y a un aumento en la probabilidad de extinción de las subpoblaciones sobrevivientes en los fragmentos. Este conocimiento permite una adecuada planificación de las medidas de conservación efectivas a implementar. Por ejemplo, podría pasar que algunas subpoblaciones aisladas puedan poseer adaptaciones específicas a condiciones locales o regionales; el no considerarlas en la determinación de los planes de conservación puede resultar en la pérdida de adaptaciones únicas, reduciendo el potencial evolutivo de la especie (MONSEN & BLOUIN 2003).

### **Monitoreo de diferentes estadios del ciclo de vida y de categorías de sexo y edad (premetamórficos y/o postmetamórficos; machos y/o hembras; adultos, juveniles y crías)**

Una vez que tenemos lo que vamos a monitorear, debemos hacer otra selección de mayor detalle, la cual dependerá de los objetivos de nuestro estudio, y de nuestras capacidades logísticas y financieras.

Dado que la mayoría de los anfibios difieren del resto de los vertebrados en tener un ciclo de vida con un estado larval adaptado para un crecimiento relativamente rápido (premetamórfico), y un estado terrestre adaptado para la dispersión (postmetamórfico) y conociendo que la fase larval experimenta la mayor vulnerabilidad (HEYER 1973, WILBUR 1980), resulta extraño, en primera instancia, que sean pocos los estudios que han abordado la composición taxonómica de ensamblajes (LAJMANOVICH 2000, PELTZER & LAJMANOVICH 2004)

y/o la dinámica poblacional de los individuos premetamórficos y los factores que la regulan (KEHR & BASSO 1990, GASCON 1991, LAJMANOVICH 2000, MOLINA 2003) a pesar de que trabajar con los renacuajos puede ser fácil y muchas veces resultan la única evidencia de la presencia de una especie en un lugar particular (HEYER *et al.* 1994). Sin embargo, la escasez de estudios neotropicales sobre estadios larvales puede deberse a la dificultad en la identificación taxonómica de los renacuajos (HERO 1990).

Por otra parte, en muchas ocasiones el monitoreo de un solo estadio del ciclo de vida (huevos, larvas o adultos) puede dar lugar a una opinión sesgada sobre la viabilidad de una población, aún en aquellos casos en que se evalúe la población a largo plazo (WASSERSUG 1991). De allí la necesidad de estudiar la dinámica de cada uno de los estadios del ciclo de vida, para tener una visión más real de la dinámica de una especie, ensamble, comunidad o gremio. Aunque en primera instancia, por ejemplo, pareciera haber una relación directa entre la dinámica poblacional de las larvas y la de los adultos, dado que ocurre reclutamiento de un estadio a otro, debido a la autonomía ecológica entre los diferentes estadios del ciclo de vida en anuros (WASSERSUG 1975), raramente la abundancia premetamórfica garantiza la abundancia postmetamórfica, tanto en las zonas templadas (WASSERSUG 1991) como en las tropicales (MOLINA 2003).

Por todo lo anterior, la primera gran escogencia debe originarse del hecho de si deseamos trabajar con individuos premetamórficos o postmetamórficos o ambos (esto último es lo más aconsejable). Si queremos mayor detalle podemos trabajar con algunas variables demográficas asociadas a estos estadios del ciclo de vida, entre las que se cuentan:

### 1. Premetamórficos

1. Presencia o ausencia
2. Abundancia
3. Tamaño
4. Estadios de desarrollo (GOSNER 1960)

---

## 1. Postmetamórficos

1. Presencia o ausencia
2. Abundancia
3. Tamaño
4. Edad (juvenil o adulto)
5. Sexo (macho o hembra)
6. Condición reproductiva (activa o inactiva)

En algunas ocasiones puede ser posible trabajar sólo con adultos, ya que los juveniles pueden tener hábitos poco notorios o desconocemos los microhábitats que usan, o en el caso de renacuajos de algunos Centrolenidae, por ejemplo, son difíciles de detectar dado que se entierran en el sustrato de sus sitios de crecimiento. En otras circunstancias, los machos vocalizantes -fenómeno común- son muy conspicuos y por lo tanto se hace fácil y productivo trabajar con ellos (por ejemplo, machos de *Epipedobates pictus* en bosques lluviosos tropicales).

Finalmente, debemos considerar que dependiendo de lo que queramos monitorear (presencia o ausencia de diversas especies, de su abundancia relativa o absoluta, de sus características demográficas como crecimiento, supervivencia, reproducción, inmigración y emigración, de su estructura de edades y sexos, entre otras), el detalle y la intensidad de los muestreos puede aumentar considerablemente (GALINDO-LEAL 1999).

### ¿Dónde monitorear?

*Monitoreos regionales, nacionales, locales, de paisajes, hábitat y microhábitat*

El ámbito espacial del monitoreo es particularmente importante, ya que el mismo dictará aspectos metodológicos, logísticos y financieros.

En el monitoreo, se debe estar claro sobre el universo que se está monitoreando. Si, por ejemplo, monitoreamos las ranas del género *Eleutherodactylus* en el bosque nublado de los alrededores del sitio de Rancho Grande en el Parque Nacional Henri Pittier (Cordillera de la Costa al norte de Venezuela), uno no puede señalar que se está monitoreando adecuadamente las poblaciones de este género en dicho parque, dado que el mismo alberga diferentes pisos altitudinales con tipos de vegetación característicos y, en consecuencia, con diferentes especies de ranas pertenecientes a este taxón no compartidas con el bosque nublado (MANZANILLA *et al.* 1995).

Nos podemos valer de esta propuesta de ordenamiento jerárquico de los ámbitos espaciales para realizar un estudio de monitoreo, a saber:

1. Mundiales
2. Regionales (Países Andinos)
3. Nacionales (Venezuela)
4. Subnacionales (Serranía del Interior, en la Cordillera de la Costa)
5. Locales (Parque Nacional Henri Pittier)
6. Paisajes (Montañas)
7. Hábitats (Bosque nublado)
8. Microhábitats (Estratificación vertical del mismo definiendo: desde el suelo hasta el dosel, quebradas, fitotelmatas, hojarasca sobre el suelo, dosel del bosque)

Un buen ejemplo de monitoreo en un ámbito nacional es la propuesta The Amphibian Research and Monitoring Initiative (<http://armi.usgs.gov>), diseñada e implementada en los Estados Unidos de Norteamérica (MUTHS *et al.* 2005) y cuyos objetivos persiguen: a) establecer una red oficial para monitorear el estatus y los cambios en la distribución y abundancia de las especies de anfibios; b) recabar información sobre las condiciones ambientales que afectan a los

anfibios; c) comprender el ámbito y la severidad de las declinaciones de anfibios; d) conducir investigaciones sobre las causas de las declinaciones y cambios poblacionales, malformaciones y enfermedades, y e) proveer de información para sustentar acciones de manejo que mitiguen esas causas de las declinaciones y cambios poblacionales, malformaciones y enfermedades.

En términos de dónde muestrear y al detalle de microhábitats podemos notar el ejemplo señalado por DUELLMAN (1997) para los sitios de percha o de vocalización de los anfibios de La Escalera, localidad ubicada al sureste de Venezuela, en donde dicho autor determina claramente una primera segregación de las especies, aquellas que están asociadas a charcas en zonas abiertas y las de charcas del interior del bosque; dentro de ambas algunas especies se observan al borde de estos cuerpos de agua ya sea sobre el suelo o sobre la vegetación baja circundante, y otras en el agua. Por otra parte, otras especies perchán o vocalizan en los estratos medios (10-20 m) del bosque.

### *Selección de los sitios*

Para seleccionar los sitios o estaciones de muestreo, es aconsejable tener una idea de cómo están distribuidos los organismos objetos del estudio de monitoreo y si es posible, qué factores (abióticos, bióticos o históricos) están detrás de ellos. Este conocimiento espacial nos permite establecer pautas para el diseño muestral. Los tipos básicos de distribución son:

1. **Al azar:** los individuos están dispuestos de manera aleatoria en el espacio. Este tipo de distribución implica el cumplimiento de lo siguiente: a) todos los puntos en el espacio tienen igual probabilidad de ser ocupados por los organismos, y b) la presencia de un individuo no afecta la ubicación de otro individuo. En términos estadísticos, en este tipo de distribución la media es igual a la varianza ( $\mu = \sigma^2$ ).
2. **Regular o uniforme:** los individuos están dispuestos de manera regular en el espacio, producto de interacciones negativas (competencia, depredación, etc.). Bajo este esquema de distribución la varianza es igual a cero y menor que la media ( $\sigma^2 = 0 < \mu$ ).

- 3. Contagiosa o agregada:** los individuos se distribuyen de manera aglomerada, lo cual supone que el medio es heterogéneo y no todos los puntos tienen la misma probabilidad de ser ocupados por un individuo. ALLMON (1991) encontró que los juveniles de un ensamble de especies asociados a la hojarasca presentaban un patrón más agregado que los adultos. Sin embargo, este tipo de patrón es factible que se presente en ambientes homogéneos, pero con la existencia de una interacción positiva entre los individuos; por ejemplo, agrupaciones con fines reproductivos (coros de machos vocalizantes de *Mannophryne berminae*). En este tipo de disposición espacial la varianza es mayor que la media ( $\sigma^2 > \mu$ ).

Por otro lado, es recomendable saber si el tipo de distribución de una especie está asociado a variables particulares de topografía, hábitat y/o micro-hábitat, clima, microclima, vegetación. Tanto el tipo de distribución como su asociación con variables físicas determinará la ubicación y el número de los muestreos, así como las técnicas del mismo; esto sin tomar en cuenta que la influencia de estos factores puede variar temporalmente.

Una pregunta importante de hacerse en determinados estudios de monitoreo es, por ejemplo, ¿son representativos los hábitats en donde haremos las evaluaciones? Para responder a esta pregunta, por lo menos requerimos conocer la heterogeneidad espacial (distribución desigual o no aleatoria) de algunas variables, principalmente la vegetación; sin embargo, hay que ir con cuidado ya que aún en áreas relativamente homogéneas a simple vista, como lo pueden ser algunos bosques lluviosos tropicales, la composición y la estructura de la vegetación está modificada por múltiples factores (TUOMISTO *et al.* 1995, GALINDO-LEAL 1999).

Otro detalle a considerar es si el sitio es prístino, está perturbado o lo será en el futuro cercano. Por otra parte, otro factor en el proceso de escogencia de la escala y de los sitios de muestreo es la accesibilidad a los mismos en los períodos de muestreo y los costos de llegar a ellos.

## Cuándo, cuánto y con qué frecuencia monitorear

### *Cuándo monitorear con relación a los períodos y picos de actividad de los objetos de estudio (ritmo circadiano y estacional)*

Una vez que se tenga claro qué se va a monitorear, la respuesta a estas interrogantes es mucho más fácil de resolver. El “cuándo” es una pregunta que involucra varios aspectos que se deben precisar antes de iniciar un monitoreo y estará en función de las especies que se quiere investigar, de su ecología y de los hábitos de estos animales en un ciclo diario y/o anual, así como de algunos aspectos climáticos relacionados con sus ciclos de vida, tales como precipitación, humedad relativa y temperatura, entre otros. Uno de ellos consiste en los hábitos que poseen las especies bajo estudio, es decir si son diurnos (la gran mayoría de Dendrobatidae, por ejemplo) o nocturnos (por ejemplo, la mayoría de los Hylidae y Leptodactylidae) o algunas de las especies nocturnas pueden tener actividad diurna en días de fuerte precipitación (por ejemplo algunas especies de *Leptodactylus* grupo *marmoratus* = *Adenomera*) o *Eleutherodactylus*; DUELLMAN 2005); incluso aquellas especies que muestran variación durante un mismo período de actividad. Lo anterior es válido para los renacuajos (WILD 1996). Este aspecto condiciona el diseño para la toma de datos, y su desconocimiento puede conducir a estimados o conclusiones sesgados en nuestros estudios. Por ejemplo, en la Figura 1 se observa que si un investigador desea muestrear efectivamente las especies “a” y “e”, debe hacerlo durante las horas de la mañana (6:00 – 9:00 horas), y si quiere muestrear a todas las especies nocturnas “b”, “c” y “d”, debe muestrear en un intervalo restringido de tiempo (19:00 – 20:00 horas).

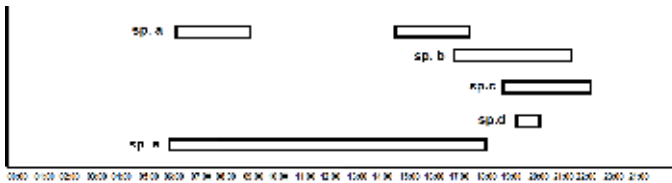


Figura 1. Horas de actividad a lo largo de un ciclo diario de cinco especies hipotéticas de un ensamble o comunidad.



Si nuestro objetivo es monitorear un sitio o región en particular, se recomienda realizar principalmente, búsquedas nocturnas con varias sesiones de muestreo a diferentes horas de la noche, acompañadas de muestreos diurnos, igualmente con varias sesiones de muestreo espaciadas temporalmente y cubriendo diferentes tipos de cobertura vegetal asociadas al o a los ecosistemas presentes. Mientras que si enfocamos nuestros esfuerzos sobre una o más especies en particular, se debe conocer o tener alguna evidencia parcial de si son diurnas, nocturnas o crepusculares, para realizar así las búsquedas en el momento apropiado.

Algunas especies están presentes en una localidad a lo largo del año, especialmente en climas no estacionales (INGER 2003), pero la gran mayoría de las especies presentan mayor actividad y/o abundancia en determinadas temporadas o meses del año asociados con los patrones de precipitación y temperatura (ALLMON 1991, ARZABE 1999, DUELLMAN 1995, 2005, INGER 2003, TOFT 1980, TOFT *et al.* 1985, WATANABE *et al.* 2005), generalmente por hacerse más conspicuos durante su actividad reproductiva (machos vocalizando en coros o de manera individual). Un patrón semejante ocurre con los individuos premeta-mórficos (LAJMANOVICH 2000, WILD 1996). Estos fenómenos se ven incrementados cuando existe una marcada estacionalidad climática en el lugar del estudio (ARZABE 1999, DUELLMAN & TRUEB 1986).

De manera general, muchas de las especies de anfibios son activas de forma diferencial en las distintas estaciones climáticas (ALLMON 1991) y dentro de ellas (PONSSA 2004), particularmente se hacen más activas en la temporada de lluvias; mientras que otras especies son activas a lo largo del ciclo anual, sin importar cambios en la precipitación sean estos estacionales o no (ALLMON 1991). Por ejemplo, en la Figura 2 se observa que en el caso particular de la especie c, si el monitoreo se desarrolla entre los meses VI y X, podemos concluir erróneamente, que esta especie está ausente del sitio del estudio, cuando sólo es cierto temporalmente.

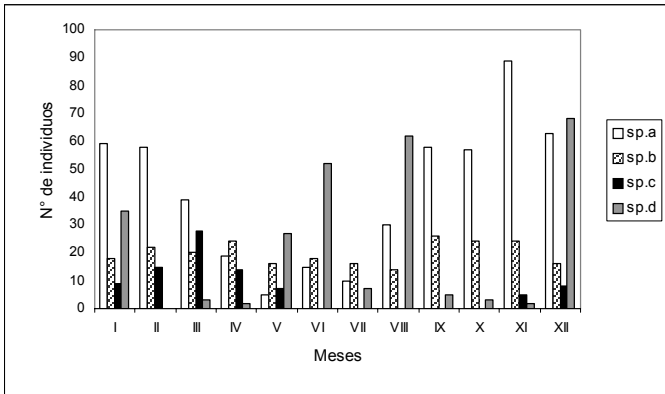


Figura 2. Número de individuos de las especies a, b, c y d registradas a lo largo de un ciclo anual en una localidad particular.

Cuando estamos ante este tipo de situaciones, se tienen dos opciones, dependiendo de los objetivos, de la logística y el financiamiento:

1. Mantener el esfuerzo de muestreo durante todo el año con la finalidad de conocer las diferencias estacionales, dadas o no por la estacionalidad climática.
2. Intensificar el muestreo durante los meses de mayor probabilidad de encuentros (temporada reproductiva, generalmente asociada con la precipitación; ver PONSSA 2004).

En programas de monitoreo anuales, es recomendable iniciar el estudio con alta intensidad de muestreo en términos temporales, para ir reduciendo la misma una vez que se conoce el patrón de estacionalidad del fenómeno de interés y por tanto se hace posible escoger las mejores temporadas para hacer el monitoreo anual (GALINDO-LEAL 1999).

Frecuentemente, la actividad de una o más especies puede estar condicionada por la ocurrencia de eventos de precipitación (DUELLMAN 1995), ya sea antes y después de los mismos, en esos casos la planificación debe hacerse in situ. También hay que considerar la variación temporal del inicio del período de lluvias en los sitios en que se realizarán los estudios de monitoreo.

De todo lo anterior se puede destacar lo importante de conocer la climatología del área de estudio, o en algunos casos resulta productivo establecer comunicación con los lugareños donde se desarrollará el monitoreo, para el diseño y planificación de las sesiones de muestreos en términos temporales. Incluso en muchas áreas silvestres, durante la temporada de lluvias el acceso se dificulta o se hace imposible, y por otro lado, los cursos de agua en su desborde estacional pueden inundar algunas de las zonas de trabajo.

Por lo general, el disponer de datos climatológicos no suele ser difícil en algunas zonas geográficas de nuestros países; sin embargo, otras carecen de ellos o presentan datos deficientes, por lo que una opción es utilizar los datos fiables procedentes de las localidades más cercanas con un mismo patrón climático.

### *Duración del estudio (corto, mediano y largo plazo)*

“Cuánto” monitorear es otra de las inquietudes a resolver ya que, dependiendo de los objetivos del monitoreo y de las facilidades logísticas y de fondos, el mismo puede ser a corto, mediano o largo plazo. En general, la duración mínima recomendada para establecer un estudio de monitoreo es de al menos un año, a fin de tener una idea de la dinámica del objeto de estudio; pero siempre que se tenga la oportunidad, es recomendable continuar el seguimiento por el mayor período de tiempo que se pueda dada la disponibilidad de recursos con que se cuente para el momento, para lograr datos de intervalos de tiempo largos. A mayor tiempo de monitoreo, mayor posibilidad de evaluar de manera más certera las posibles causas que influyen en mayor o menor grado sobre los cambios observados en nuestra población, ensamble, comunidad o gremio.

### *Periodicidad de los muestreos*

El muestreo debe ser realizado de forma sistemática y regular con una frecuencia que permita identificar los factores de variabilidad que gobiernan el sistema bajo estudio. Es recomendable que durante el primer año de muestreo se trabaje semanalmente o mensualmente en el seguimiento, mientras que para los años siguientes (si se tienen fondos se puede seguir de la misma manera), se puede conducir los

---

muestreos de manera bimensual, trimestral o en aquellos meses en que la población despliega sus valores más altos. Sin embargo, la frecuencia y el espaciado temporal de los muestreos, por lo general, vienen dados por algunos aspectos de la ecología de la especie -temporadas de vocalización y reproducción- y del patrón climático de la zona de estudio. Por otra parte, dada la variabilidad climática que actualmente observamos, hay que diseñar y aplicar esquemas flexibles de monitoreo a fin de poder adaptarse a los cambios.

Adicionalmente, la periodicidad de las evaluaciones depende del detalle con el que queramos conocer las tendencias y de cuán cerca queramos que nuestros estimados estén de la realidad y de la certidumbre de los pronósticos.

## ¿Cómo monitorear?

### *Métodos*

Una vez que se tiene claro qué, cómo, dónde, cuánto y con qué frecuencia monitorear, todo ello enmarcado dentro de un diseño particular, debemos seleccionar las técnicas de muestreo que nos permitan alcanzar los objetivos de nuestro programa de monitoreo con los recursos humanos, técnicos, logísticos y financieros disponibles.

Existe una amplia gama de métodos para inventariar y monitorear la anfibiafauna de un lugar (HEYER *et al.* 1994); sin embargo, la variedad de historias de vida que muestran los anfibios en el neotrópico plantea importantes retos metodológicos que hacen necesario replantear y ajustar dichos métodos, e incluso ser creativos, en el entendido de que una sola técnica, por lo general, no es adecuada para todas las especies, gremios, hábitat, u objetivos (HEYER *et al.* 1994, RÖDEL & ERNST 2004). Aunque el propósito de este capítulo no es hacer un compendio de métodos, citamos algunos de los métodos más frecuentes empleados para realizar estudios de monitoreo de anfibios.

Algunas de las técnicas más usadas se basan en la obtención de datos directos, los cuales se refieren a aquellos en donde se tiene contacto visual y/o auditivo con el animal, lo cual implica su presencia en ese lugar y en ese momento (HEYER *et al.* 1994). Por otra parte, las técnicas menos utilizadas son aquellas por las cuales la obtención

de datos es por vía indirecta; por ejemplo, el número de masas de huevos (MEYER *et al.* 1998) o de nidos de espuma (MOLINA 2004) puede ser, en ciertas ocasiones, la única evidencia de la presencia y/o abundancia de una especie en un lugar, aunque destacan por su poca utilización.

### Métodos directos

1. Inventario completo de especies (búsqueda libre)
2. Relevamiento sistemático
3. Relevamiento por encuentros visuales
4. Muestreo por parcelas o cuadrantes
5. Muestreo por transectos de banda fija o variable
6. Transecta de bandas auditivas
7. Muestreo con trampas de caída y cercas de desvío
8. Muestreo de estadios larvales (mallas de mano, electricidad y rotenona)
9. Marcado recaptura

### Métodos indirectos

1. Conteo de masas de huevos y nidos de espuma
2. Transecto auditivo

Recomendamos consultar, en este mismo manual, el capítulo técnicas de inventario y muestreo de anfibios: una compilación, donde se describen muchas de estas técnicas. Adicionalmente, podemos considerar también las siguientes:

1. Muestreos con mallas de mano

Esta técnica consiste en hacer barridos con la malla en un número de replicas dependiente de la extensión de los cuerpos de agua a monitorear. En cuerpos de agua grandes, se puede utilizar un número de barridos que sea proporcional al tamaño del cuerpo de agua

(SZATATECSNY *et al.* 2004) o trabajar con transectas con puntos de muestreo dentro de ellas (WILD 1996). En cuerpos de agua pequeños, tales como pozas, es posible obtener todos los renacuajos presentes en ellas (SHAFFER *et al.* 1994).

Un ejemplo del uso de la técnica de mallas de mano puede ser ilustrado mediante los resultados obtenidos por MOLINA (2003) para los renacuajos de *Mannophryne herminae* (Anura: Dendrobatidae) los cuales permitieron evaluar la fenología de la presencia de renacuajos a lo largo del período de muestreo; el tamaño poblacional y su variación por mes y estación climática (Figura 3), así como la dinámica de la estructura de tamaño y estadios de desarrollo. Para ahondar en este tipo de estudios y sus técnicas ver HEYER (1979) y TURNIPSEED & ALTIG (1975).

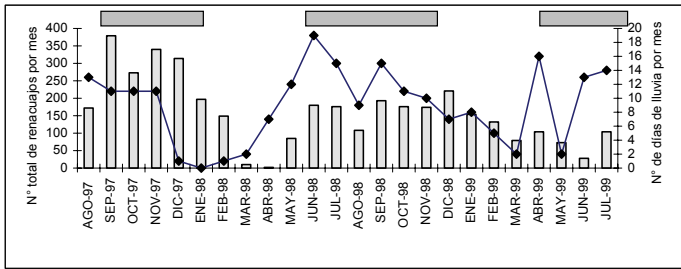


Figura 3. Población de renacuajos (barras) y número de días con lluvias por mes (línea) durante el período de estudio. Durante el mes de marzo ocurrieron inundaciones. La barra gris representa los meses de lluvia, el resto de los meses son secos.

### 1. Electropesca

Un procedimiento para muestrear renacuajos, en algunos casos, podría ser la electropesca (la misma consiste en introducir electricidad directamente en el agua, a través de equipos especialmente diseñados para tal fin), la cual aturde o mata a los vertebrados acuáticos y facilita su recolección. El problema con esta técnica, para el caso de estudios de monitoreo en el mismo sitio, es que hay que dosificar la descarga de tal manera que no mate a los organismos. Esta técnica es muy utilizada en peces, aunque ha sido poco utilizada en el muestreo de

anfibios, para los cuales destaca el trabajo realizado con salamandras acuáticas (FITCH 1959, SHOOP 1965, WILLIAMS *et al.* 1981). Sin embargo, el uso de esta técnica está restringido a cuerpos de agua poco profundos y su efectividad, al menos para peces, varía entre especies debido a la resistencia del tejido, tamaño, comportamiento, hábitat, tipo de sustrato y conductividad del agua (REYNOLDS 1983).

### 1. Marcado-recaptura

La comprensión de la dinámica poblacional de una especie va más allá de conocer solamente el tamaño de la población y su estructura de sexos y edades; por el contrario, se hace necesaria la evaluación de parámetros poblacionales claves, tales como son las tasas de nacimientos, de muertes, de inmigración, de emigración y de crecimiento (CAUGHLEY 1977).

Estimar las densidades absolutas y/o relativas, además de los parámetros demográficos en poblaciones de especies móviles, y no siempre visibles, requiere de inferencias estadísticas provenientes de datos de marcado-recaptura (LEBRETON *et al.* 1992, POLLOCK *et al.* 1990). Este método consiste en el marcado de una proporción de la población bajo estudio y su liberación posterior, para luego de un período de tiempo particular re-muestrear la misma población y mirar la proporción de animales marcados sobre el total de la segunda o más muestras. Además de permitir la estimación de parámetros poblacionales, el mismo ha sido sugerido como la mejor alternativa ante otras técnicas de monitoreo (FUNK *et al.* 2003, SCHMIDT 2004), y permite indagar sobre los patrones de uso del espacio (áreas de vivienda, territorios y utilización del espacio).

Los métodos de marcado y recaptura permiten estimar parámetros demográficos a partir de datos sobre el número de animales marcados y recapturados o avistados durante las sesiones de captura o avistamiento, y sus procedimientos son relativamente simples. Para cada animal avistado y capturado se debe determinar el sexo, medir (longitud total: punta del hocico hasta el extremo posterior de la cloaca (con un apreciación de  $\pm 0.1$  mm); y marcado individualmente por medio de la amputación de algunas falanges distales (no más de dos dedos por miembro) siguiendo el sistema propuesto por HERO

(1989). Este sistema de marcado no modifica el comportamiento de las especies, ni produce regeneración, ni afecta la supervivencia a largo plazo (JUNCA 1994, MOLINA 2003, ROITHMAIR 1992, 1994, WELLS 1980a,b).

Todos los métodos se basan en el siguiente argumento para un estudio de dos muestras: una muestra inicial de  $n_1$  animales es capturada en el primer período "1", todos estos animales son marcados y liberados en la población. Posteriormente, en otra sesión de muestreo se captura una fracción de  $n_2$  animales de la población, de los cuales  $m_2$  estarán marcados de la primera sesión de recaptura. La probabilidad de captura asociada con el primer muestreo es  $n_1 / N$ , donde "N" es el total de la población. Si se mantiene que los animales se mezclan de manera homogénea y no hay pérdidas de individuos ni entradas a la población, entonces la proporción de animales marcados en la segunda muestra,  $m_2/n_2$ , debería estimar tanto la proporción de animales marcados en la población como la probabilidad de captura del período 1:

$$m_2/n_2 = n_1 / N$$

Si re-arreglamos esta ecuación, obtendremos el estimador de Lincoln-Petersen (SEBER 1982) para el tamaño poblacional:

$$N = n_1 n_2 / m_2$$

Chapman (en HEYER *et al.* 1994) generó el siguiente estimador que presenta un sesgo menor cuando hay pocas recapturas:

$$N = \{(n_1 + 1)(n_2 + 1)/(m_2 + 1)\} - 1$$

Las suposiciones para ambos estimadores son: a) la población es cerrada, es decir no hay adiciones (nacimientos o inmigración) ni pérdidas (muertes o emigración) entre los dos muestreos; b) todos los animales tienen las mismas probabilidades de ser capturados en cada muestreo; y c) las marcas no se pierden ni se identifican erróneamente (SEBER 1982).

Generalmente las poblaciones son abiertas (con adiciones y/o pérdidas), las probabilidades de captura de los animales son heterogéneas -aunque se puede estratificar por sexo, edad o tipo de comportamiento- y muchos animales pueden perder sus marcas.



Las violaciones a la primera suposición sesgan el valor estimado de  $N$ . Si sólo ocurren pérdidas entre los muestreos, la ecuación modificada de CHAPMAN (en HEYER *et al.* 1994) sólo estima el número de animales en el primer muestreo, si sólo ocurren adiciones únicamente se estima el tamaño poblacional en el segundo periodo.

La suposición dos es muy importante ya que su violación produce mayores sesgos, por ejemplo si hay animales con alta probabilidad de captura ellos aparecerán con mayor frecuencia que el resto de los animales en los dos muestreos, de manera que  $m_2/n_2$  sobrestimarán la población de animales marcados en la población al momento del segundo muestreo, lo cual causa un sesgo negativo sobre  $N$ , tendiendo a que este sea más pequeño que el valor verdadero. Otra violación a esta suposición viene del hecho que algunos animales se hacen propensos o difíciles de ser recapturados. En el primer caso  $N$  tiende a ser más pequeño que el valor real de  $N$  y en el segundo caso el valor estimado es más grande que el real.

Para la tercera suposición, se tiene que si algunos animales pierden sus marcas entonces  $m_2$  se hará pequeño y el valor de  $N$  se sobrestimarán.

Muchos estimadores del tamaño poblacional y otros parámetros poblacionales basados en datos de marcado y recaptura han sido diseñados principalmente para enfrentar buena parte de la problemática de cumplir con las suposiciones necesarias de muchos de los estimadores, ya sea tanto para poblaciones cerradas y abiertas, como para diferentes condiciones de heterogeneidad en las probabilidades de captura y pérdida del marcaje (CAUGHLEY 1997, SEBER 1982). Para una revisión de los múltiples modelos, ver CAUGHLEY (1977), DONNELLY & GUYER (1994), LEBRETON *et al.* (1992), NICHOLS (1992), OTIS *et al.* (1978), POLLOCK *et al.* (1990) y SEBER (1982).

Una alternativa válida cuando se tiene el tiempo y los recursos para realizar un estudio detallado de marcado y recaptura con fines de monitoreo, es el «diseño robusto» propuesto por POLLOCK (1982), el cual combina modelos de poblaciones cerradas y abiertas dentro del mismo estudio. Este diseño incluye  $l$  muestreos secundarios dentro de cada  $k$  muestreo primario. El intervalo de tiempo entre muestreos secundarios sucesivos dentro de un período primario debe ser corto

---

para permitir la aplicación de modelos de poblaciones cerradas (OTIS *et al.* 1978). Los períodos primarios consecutivos deben estar separados por lapsos de tiempo relativamente largos para permitir que los datos sean analizados a través de modelos de poblaciones abiertas.

El origen de este diseño obedece a que los estimados poblacionales basados en modelos abiertos pueden estar altamente sesgados si las suposiciones fundamentales del modelo no se cumplen; mientras que muchos modelos cerrados permiten la estimación del tamaño poblacional en la presencia de varias fuentes de variaciones en las probabilidades de captura (NICHOLS 1992). Por otra parte, los estimados de tasas de supervivencia provenientes de modelos abiertos son relativamente robustos (relativamente poco sensibles a desviaciones de las suposiciones fundamentales; NICHOLS 1992, SEBER 1986). Por estas razones, POLLOCK (1982) recomienda estimar el tamaño poblacional utilizando las historias de capturas de los períodos secundarios por medio de modelos cerrados, mientras que las estimaciones de las tasas de supervivencia deben provenir de los datos obtenidos en los períodos primarios a través de modelos abiertos. Por su parte, el número de reclutas nuevos que ingresa a la población se puede obtener utilizando las tasas de supervivencia estimadas con modelos abiertos y los tamaños poblacionales estimados con modelos cerrados (NICHOLS 1992).

Entre la amplia variedad existente de modelos cerrados para estimar el tamaño poblacional se deben considerar algunos de los propuestos por OTIS y colaboradores (1978). Debido a que la heterogeneidad de captura y la respuesta al trampeo son características muy comunes en este tipo de estudios, los modelos  $M_h$  y  $M_{bh}$  parecen ser los más apropiados (SEBER 1986). El subíndice «b» significa que las probabilidades de captura varían debido a respuestas de comportamiento hacia la captura y el «h» significa que cada animal tiene la misma probabilidad de captura entre muestreos, pero las probabilidades varían entre individuos. Para estimar la supervivencia y la tasa de reclutamiento, una buena selección sería el método estocástico de Jolly-Seber (SEBER 1982).

Finalmente debemos señalar que entre los métodos indirectos están los conteos de masas de huevos o nidos de espuma (para aquellas

especies que los construyen), los que permiten establecer un estimado de al menos la población de hembras reproductivamente activas ya sea ésta expresada en términos absolutos o como densidades (MOLINA 2004).

### Variables asociadas al monitoreo

*Efecto sobre el monitoreo de variables asociadas al clima y al ambiente. Efectos de la experiencia de los investigadores y de las herramientas de registros*

Una de las metas principales de la ecología es descubrir y comprender los factores que gobiernan la distribución y abundancia de las especies; es por ello que los estudios de monitoreo de riqueza y/o abundancia de una o más poblaciones, ensambles, comunidades o gremios de especies de anfibios son más productivos cuando se han tomado un conjunto de mediciones asociadas a variables que sabemos *a priori* o pensamos que pueden afectar los valores de nuestros estimados poblacionales o los patrones de distribución geográfica, entendiendo que dichas variables están asociadas a las historias de vida de las especies con que nos topamos en nuestro trabajo de campo. Es decir, la presencia y/o abundancia de una especie puede venir determinada por diversos factores bióticos y abióticos, incluyendo sus interacciones, de allí que debemos registrar un grupo de variables que las midan, a los efectos de utilizar herramientas estadísticas que nos relacionen dicha presencia y/o abundancia y sus cambios espacio-temporales, con este conjunto de variables explicativas. Las variables deben estar relacionadas con la localización de individuos dentro de sus hábitats, ya sean estos terrestres y/o acuáticos (coordenadas geográficas, altitud, tipo de hábitat y su localización dentro de éste), el clima y/o microclima (temperatura del aire y del agua, precipitación, humedad relativa, presión barométrica, evapotranspiración, etc.), parámetros fisicoquímicos (pH, oxígeno disuelto, nutrientes) estructura del hábitat (tipo de vegetación, número de estratos, altura, cobertura y/o abundancia para cada estrato, porcentaje de hojarasca en el suelo, tipo de cuerpo de agua, etc.), interrelaciones bióticas (presencia y/o abundancia de depredadores, competidores o parásitos); sitios de reproducción (hojarasca, vegetación, fitotelmatas, pozas o charcas, quebradas y ríos,

etc.) y sus características (profundidad, volumen, velocidad y caudal del cuerpo de agua, tipo de sustrato del fondo, turbiedad, etc.). Para un análisis más detallado sobre las variables asociadas a un estudio de monitoreo, véase CRUMP (1994) y a los efectos de ver ejemplos prácticos, véase ALLMON (1991) LAJMANOVICH (2000), PELTZER & LAJMANOVICH (2004) y SZATATECSNY *et al.* (2004).

A continuación, se profundiza un poco más en algunas variables importantes de considerar en los estudios de monitoreo:

#### 1. Precipitación

En general, hay una relación directa entre el número y/o abundancia de anfibios observada y la precipitación (ALLMON 1991, ARZABE 1999); sin embargo, el incremento en la actividad de los anuros está correlacionado mayormente con los picos de lluvias y no con el total de precipitación dentro de un período de muestreo (DUELLMAN 1995).

#### 1. Temperatura

Por lo general, temperaturas altas y bajas reducen la actividad de la mayoría de las especies (DUELLMAN 1986, 2005) y afectan algunas características de las vocalizaciones (ZWEIFEL 1959, 1968).

#### 1. Humedad relativa

Valores bajos de esta variable disminuyen la actividad de las especies y pueden condicionar la presencia de las mismas (observación personal).

#### 1. Tipos de hábitat y microhábitat

La estructura de la vegetación condiciona el número de nichos disponibles así como el tipo y calidad de los recursos disponibles (refugios, alimento, sitios de reproducción) (DUELLMAN 2005).

#### 1. Variables fisicoquímicas

El pH, la conductividad y el oxígeno disuelto del agua pueden condicionar la presencia o abundancia de especies,

ya sea por vía directa o indirecta -baja disponibilidad de recursos (SZATATECSNY *et al.* 2004).

### 1. Nivel y caudal del agua

El nivel y el caudal de un cuerpo de agua condicionan tanto la presencia o no de una especie, como su abundancia (WILD 1991). Sin embargo, esto no siempre es así; por ejemplo, para los renacuajos de la especie *Mannophryne herminae* se reportó que el tamaño poblacional no está relacionado con la precipitación ni con el caudal promedio mensual de la quebrada (MOLINA 2003).

### 1. Fases lunares

En algunas situaciones, las fases lunares (particularmente la luna llena) restringen la posibilidad de registrar a los anuros (DUELLMAN 2005), dado que la actividad reproductiva o alimentaria de algunas especies disminuye o su avistamiento se hace más difícil.

### 1. Especies asociadas (competidoras, depredadoras y parásitas)

La presencia o ausencia de determinadas especies puede y de hecho condiciona la distribución, presencia y/o la abundancia de una o más especies focales de estudio (SZATATECSNY *et al.* 2004). Un ejemplo en ambientes neotropicales es el de *Mannophryne trinitatis* de Trinidad, la cual no se reproduce en sitios donde hay peces y/o camarones (DOWNE *et al.* 2001). Estos fenómenos han sido documentados incluso para renacuajos (AZEVEDO-RAMOS & MAGNUSON 1999, AZEVEDO-RAMOS *et al.* 1999, ÉTEROVICK & SAZIMA 2000, HERO *et al.* 2001).

*Efectos de la experiencia de los investigadores y de las herramientas de registros.*

Dado que cada observador tiene una capacidad distinta que se modifica con la experiencia, es fundamental que el investigador tenga experiencia previa en la toma de datos del mayor número de variables posibles, así como de la(s) especie(s) que va a monitorear a los fines de obtener medidas de calidad de las variables asociadas con el monitoreo, lo cual redundará en la obtención de resultados válidos y

---

robustos. De allí que una buena estrategia para aquellos que se inician en estudios de monitoreo, es conformar un equipo que incluya por lo menos una persona experimentada en el trabajo de campo y en la aplicación de las técnicas de medición.

Por otra parte, el registro de las variables es dependiente del tipo, calidad y precisión de los equipos de medición con que se hacen las medidas, de allí que si hay recursos disponibles debemos obtener equipos adecuados a nuestros requerimientos y cuya precisión sea la mayor posible.

## Análisis de datos

El análisis de los datos obtenidos en los estudios de monitoreo, principalmente una lista de especies, sus abundancias y la dinámica de cambios temporales, es una de las fases más importantes dentro del proceso de investigación a fin de comunicar los resultados (LIPS 2001).

Al diseñar un programa de monitoreo, es fundamental tener una idea clara sobre el tipo de análisis estadístico y de los supuestos de los modelos para asegurarse que los datos sean obtenidos en forma apropiada para el método elegido. En muchas ocasiones, nos damos cuenta después de varios años de monitoreo que nuestros diseños no cumplían con las suposiciones necesarias, o que carecen de elementos indispensables para ser analizados (GALINDO-LEAL 1992).

Por otra parte, los investigadores deben tener claro cuáles son los objetivos del monitoreo, a la hora de decidir si usan un estimado del tamaño poblacional, la densidad poblacional, o si producen un índice para detectar cambios poblacionales. La razón de ello es que para estimar la abundancia o densidad partiendo de un índice se requiere de estudios adicionales donde se relacionen las densidades o números poblacionales reales con el índice a través de un modelo estadístico, en el entendido que estas relaciones funcionales pueden cambiar con cada conjunto de variables ambientales en los cuales se producen los estimados (ENGEMAN 2003).

### *Abundancia*

Para efectos de este manual, hemos basado la siguiente discusión en los artículos de SCHMIDT (2003) y WALTER *et al.* (2000) sobre la estimación de abundancia de poblaciones de mamíferos. Casi todos

los métodos utilizados para evaluar poblaciones animales involucran la obtención de alguna clase de estadísticos de conteo directo o indirecto. Los conteos directos implican la obtención del número de animales capturados o registrados por cualquiera de los métodos disponibles. Por su parte, los conteos indirectos implican la obtención del número de alguna clase de evidencia producida por el animal de interés, como podrían ser las masas de huevos observadas en las unidades de muestreo.

La obtención de estadísticas de conteo con el objetivo de hacer inferencias sobre variación de abundancia animal en el espacio y/o tiempo requiere que consideremos dos importantes fuentes de variación e incertidumbre: espacial, y la variación en la relación entre el estadístico de conteo y la abundancia real (LANCIA *et al.* 1996).

Los individuos de una población generalmente no están distribuidos uniformemente en el espacio. La incertidumbre debida a la variación espacial surge comúnmente cuando el investigador no puede aplicar técnicas de relevo o monitoreo en la totalidad del área para la cual se harán inferencias. En este caso deben seleccionarse áreas de muestreo dentro de la totalidad del área de interés y aplicar el esfuerzo de muestreo sólo a aquellas áreas. Los resultados de esas áreas muestreadas son usados luego para hacer inferencias sobre toda el área de interés.

Cuando las estadísticas de conteo son basados en conteos directos, la incertidumbre debida a variaciones en la relación entre la estadística y el tamaño poblacional real se debe a que los métodos de muestreo no detectan, de manera general, a todos los animales presentes en un área particular. Esta variación es la llamada probabilidad de detección o de captura.

Cuando las estadísticas de conteo son conteos indirectos, la variación en la relación entre la estadística de conteo y la abundancia real incluye al menos dos componentes. Primero, puede haber diferencias en la tasa de producción de la evidencia entre individuos, o en el mismo individuo en diferentes tiempos o sitios. Segundo, la detectabilidad de la evidencia puede variar entre tiempos o sitios.

Las estimaciones de abundancia poblacional deben considerar estas fuentes de variación e incertidumbre. En particular, comenzaremos con la relación entre estadísticas de conteo y abundancia real.

Cualquiera sea el tipo de conteo usado en los estudios, es razonable considerar a las estadísticas de conteo como variables aleatorias, lo cual significa que si la estadística de conteo pudiera ser obtenida múltiples veces exactamente en la misma situación (mismos animales expuestos al esfuerzo de muestreo, mismas condiciones ambientales, etc.), no se obtendría el mismo conteo cada vez, sino que variaría hasta cierto grado entre las réplicas. El valor esperado del estadístico de conteo puede ser visto como el valor promedio que obtendríamos si repitiéramos el conteo una y otra vez exactamente en la misma situación, y puede ser expresado (LANCIA *et al.* 1996) como:

$$E(C) = Np \quad (1)$$

Donde E es el valor esperado, C es la estadística de conteo, N es la abundancia real (la cantidad de interés) y p es el coeficiente que relaciona C y N. En el caso de conteos directos, p representa la probabilidad de detección (la probabilidad de que un miembro de N aparezca en la estadística de conteo). En el caso de conteos indirectos, p representa la tasa de producción de la evidencia y su probabilidad de detección.

Si tenemos un estimador de p asociado con la estadística de conteo, con base en (1) podemos estimar la abundancia como:

$$\overline{N} = C/p \quad (2)$$

Donde el sombrero denota estimadores.

Prácticamente todos los métodos para estimar abundancia de animales (SEBER, 1982) siguen la forma general de (2) (ver LANCIA *et al.* 1996, WILSON *et al.* 1996). Hay dos formas de utilizar estadísticas de conteo para hacer inferencias sobre la variación de abundancia en el espacio o el tiempo: una es tratar a las estadísticas de conteo como “índices” y la otra es obtener datos auxiliares en conjunción con los conteos que permitan la estimación de la probabilidad de detección.

Un índice es una medida (conteo incompleto o conteo indirecto de evidencias) que está correlacionada con la abundancia animal (CAUGHLEY 1977). El uso de índices para estudiar variaciones en



la abundancia de animales en el espacio o tiempo que sean válidas requiere que la relación entre el índice y la abundancia poblacional real sea constante —el  $p$  de la ecuación (1) debe ser constante en el espacio y tiempo— (LANCIA *et al.* 1996).

El empleo de índices asume que existe una relación funcional entre el índice y el parámetro de interés, pero casi siempre esta relación es desconocida o, si se conoce, es poco probable que ésta sea constante a través del tiempo, espacio, especies o incluso observadores; así los estimadores directos son la mejor opción, y dentro de ellos, captura-recaptura es el que ofrece un mayor poder para detectar cambios, debido a su precisión y bajo sesgo (FUNK *et al.* 2003).

Por ejemplo, si uno desea comparar dos conteos (índices) no ajustados de dos estimados poblacionales en dos tiempos diferentes, tenemos que dicha comparación entre  $C_1$  y  $C_2$ , basada en la ecuación 1, viene dada por:

$$C_1/C_2 = N_1p_1/N_2p_2$$

Si  $C_1 = C_2$  no se sabe si lo son los valores de  $N$  o de  $p$ , o ambos. Por ejemplo, si  $C_1 > C_2$ , uno asume que la población disminuyó, sin embargo puede ser que la probabilidad de detección fue más baja en el segundo periodo de muestreo.

Los datos de conteos que no son ajustados por el valor de  $p$  son problemáticos, ya que tanto el valor de  $N$  como su variación temporal o geográfica son de real interés biológico, aunque el valor de  $p$  y sus variaciones no lo sean. Variación en el valor de  $p$  puede generar variación en  $C$  sin que  $N$  varíe, lo cual complica la interpretación de datos de conteos no ajustados por la probabilidad de detección. Hay considerable evidencia de que los valores de detección son variables en el tiempo y en el espacio (FULLER 1991, KENDALL *et al.* 1997, NICHOLS 1986). Por lo tanto, es muy riesgoso utilizar datos basados en suponer igualdad de probabilidades de detección o coeficientes de índices en programas de monitoreo o estudios ecológicos.

Frecuentemente los investigadores que usan índices estandarizan los métodos para obtener estadísticas de conteo, esperando que esto garantice que las probabilidades de detección o los coeficientes de índices sean iguales para todos los tiempos o lugares en que se

hacen comparaciones. En algunos casos, la obtención de medidas de índices es acompañada por la medición de un número pequeño de co-variables (p. ej., variables de clima o de estructura del hábitat) que se supone influyen sobre la probabilidad de detección. Bajo el supuesto de que esas co-variables influyen sólo sobre las probabilidades de detección o los coeficientes de índices (y no a la abundancia), las co-variables pueden ser incorporadas a los análisis que usan las estadísticas de índices para obtener inferencias sobre la abundancia. Desafortunadamente, en todos los relevos basados en conteos, suelen existir muchas fuentes de variación en  $p$  que no están asociadas con co-variables observables, y que incluso podemos no reconocer o comprender. Estas fuentes de variación no pueden ser consideradas a través de la estandarización o la medición de co-variables.

Un enfoque más riguroso para el uso de estadísticas de conteo como índices es poner a prueba el supuesto sobre igualdad de probabilidad de detección o coeficientes de índices. Las pruebas formales de la hipótesis  $p_1 = p_2$  son consideradas generalmente ejercicios de validación o calibración de índices. Si la hipótesis de igualdad de los  $p_i$  no es rechazada, entonces el índice es considerado válido, lo que significa que provee estimadores aproximadamente no sesgados para la comparación de interés. Este supuesto puede ser puesto a prueba usando un método de regresión en el que estimadores no sesgados de abundancia son usados, tales como la variable independiente, y la estadística de conteo como la variable dependiente (EBERHARDT & SIMMONS 1987). Si un estudio de validación provee evidencia de igualdad de los valores de  $p_i$  para las comparaciones de interés, suele existir la tentación de usar las estadísticas de conteo como índices en estudios futuros y en distintos sitios. Este enfoque podría ser razonable en algunos casos, pero debe tenerse en cuenta que se está asumiendo una aplicabilidad amplia de las inferencias sobre probabilidad de detección o coeficientes de índices, más allá del lugar y tiempo del estudio en que se validaron.

Debido a que es poco deseable tener que basarse en supuestos restrictivos, generalmente es preferible intentar incorporar a los estudios de abundancia de animales la obtención de datos adicionales para estimar los  $p_i$  asociados con la estadística de conteo. Existen muchos

métodos para estimar las probabilidades de detección asociadas con conteos directos de animales, y la selección de un método apropiado depende de la clase de conteos usados. Los métodos basados en la observación de animales pueden usar técnicas de doble observador (COOK & JACOBSON 1979) o muestreo de distancias (BUCKLAND *et al.*, 1993) para estimar la probabilidad de detección (SOUTHWELL 1996). Se han desarrollado muchos modelos para estimar probabilidad de captura a partir de datos de captura-recaptura y remoción (OTIS *et al.* 1978, POLLOCK *et al.* 1990, SCHMIDT 2003, SEBER 1982).

### *Tasa de cambio per cápita de cambio poblacional*

Un parámetro importante a tomar en cuenta en los estudios de dinámica poblacional es la tasa de cambio per capita de cambio poblacional, la cual nos permite observar la ausencia o la presencia de cambios en la población. Dicha tasa fue definida por TURCHIN & OSTFELD (1997) como:

$$r_t = 1/T \ln N_{t+T}/N_t$$

Donde  $N_T$  es la densidad poblacional al tiempo  $t$ , y  $T$  es el intervalo finito de tiempo donde se evalúa el cambio poblacional.

Un ejemplo de la utilización de este parámetro viene del trabajo con post-metamórficos de la rana dendrobátida *Mannophryne herminae* en Venezuela, realizado por MOLINA (2003). Este autor caracterizó la variación mensual en dicho parámetro y realizó comparaciones entre sexos y edades y entre estaciones, por medio de una prueba paramétrica  $t$  de Student (ZAR 1999). Sus resultados señalan que la tasa de cambio poblacional fue variable en el tiempo y en algunos períodos, los cambios en tales tasas son considerables. Sin embargo, siempre osciló alrededor del valor cero, cambiando de valores positivos a negativos y viceversa. Este hecho demuestra que la población estuvo regulada, al menos parcialmente, por efectos denso-dependientes.

Al descomponer el comportamiento temporal de la tasa per cápita de cambio poblacional por clases de edad, se observó en primer lugar que los cambios siguen oscilando alrededor del valor de  $r_t = 0$ , pero las mayores fluctuaciones y amplitudes del cambio poblacional la muestran los juveniles, mientras que los adultos presentan pocas variaciones en dicha tasa. En términos estacionales, la ausencia de

cambios temporales en la tasa per cápita de cambio poblacional observado en este estudio, es contrario a lo esperado. Las poblaciones, por lo general, tienen tasas de cambio positivas en la temporada de mayores recursos (lluvia), mientras en la estación de menores recursos (sequía) las tasas de cambios en las poblaciones presentan valores negativos (TURCHIN & OSTFELD 1997). Lo observado en esta población de *M. berminae* sugiere que la misma no experimentó ningún tipo de estacionalidad en los recursos durante el tiempo del estudio.

### *Denso-dependencia y denso-independencia*

Una pregunta que se debe hacer bajo el marco de un estudio de monitoreo es si nuestra población está regulada por factores denso-dependientes (DENNIS & TAPER 1994) o denso-independientes (ANDREWARTHA & BIRCH 1954). La importancia relativa de ambos tipos de factores varía dentro de una especie y entre especies, y depende, entre otras cosas, de la estrategia de historia de vida (HANSKI *et al.* 1993), la localidad geográfica (TURCHIN & HANSKI 1997), el tipo de hábitat (STUBS 1977), la estacionalidad (KAUFMAN *et al.* 1995, REID *et al.* 1997) y la estructura comunitaria (TURCHIN & HANSKI 1997).

Aunque se considera que los procesos de regulación poblacional ocurren ampliamente en poblaciones naturales, la detección y medida de este fenómeno ha resultado complicada dada la complejidad de las interacciones entre los factores denso-dependientes (interacciones intra e inter-específica) y denso-independientes (HIXON *et al.* 2002, MURDOCH 1994).

Una forma de evaluar si la regulación poblacional es o no un proceso denso-dependiente, es realizar una regresión lineal (ZAR 1999) entre la tasa per capita de cambio poblacional ( $rt$ ) ya definida anteriormente y el  $\log_{10} NT$ . Una regresión lineal negativa entre  $rt$  y el  $\log_{10} NT$  indica efectos denso-dependientes en la población. Otros métodos han sido desarrollados por DENNIS & TAPER (1994). Paralelamente, se puede tomar el valor de  $rt$  como la variable respuesta (dependiente) en un análisis de regresión lineal múltiple (ZAR 1999) contra variables ambientales (precipitación, temperatura, caudal de la quebrada, etc.) para evaluar posibles efectos densoindependientes en la población.

En el mismo estudio con post-metamórficos de *Mannophryne berminae* (MOLINA 2003) se determinó un proceso de regulación poblacional

denso-dependiente parcial, ya que la densidad poblacional sólo explicó un tercio de la variación ( $R^2 = 0.29$ ) en la tasa per cápita de variación poblacional ( $rt$ ).

Un punto importante luego de que se ha determinado la presencia de efectos denso-dependientes en la dinámica poblacional de una especie, es dilucidar cuáles son los mecanismos que producen dicha retroalimentación denso-dependiente. La competencia, la depredación (HIXON *et al.* 2002), las interacciones sociales y el comportamiento espacial (GORDON 1997, STENSETH *et al.* 1996) pueden ser mecanismos de denso-dependencia que pueden actuar sobre la supervivencia, reproducción y migración (GILL 1979, HIXON *et al.* 2002, SAITOH *et al.* 1999, WOLFF 1997).

La territorialidad puede ser un factor regulador en poblaciones naturales (RODENHOUSE *et al.* 1997, WOLFF 1997). En algunas especies de anfibios (*Atelopus varius* y *Rana virgatipes*, por ejemplo) se ha detectado que la territorialidad puede ser una de las causas que regulan la densidad, por medio de una limitación del espacio disponible (ZUG *et al.* 2001). En *M. berminae* se sabe que ambos sexos mantienen territorios y que muestran agresión intraespecífica (SEXTON 1960), lo cual hace suponer que ambos factores pueden actuar como mecanismos de denso-dependencia en esta especie.

Otra fuente de variación puede ser producto de la estocasticidad demográfica, de errores de observación, o de influencias ambientales (DUELLMAN & TRUEB 1986, TURCHIN & OSTFELD 1997).

En el estudio de MOLINA (2003), la variación ambiental, medida como el efecto denso-independiente de la precipitación y del caudal de la quebrada, explicó cada una de ellas, entre el uno y el cinco por ciento de la variación total en la tasa per cápita de variación poblacional.

### *Diversidad*

Los estudios de biodiversidad se han centrado en la búsqueda de parámetros que permitan representarla como una de las propiedades emergentes de los ensambles, comunidades o gremios.

Por lo general se usa la riqueza de especies, en su expresión más sencilla, es decir el número de especies distintas de una comunidad, como un sinónimo de diversidad. Sin embargo, el concepto de di-

---

versidad no sólo contempla el número de especies, sino también su uniformidad, es decir, cómo están repartidos los individuos de las diferentes especies.

Para describir objetivamente estos dos factores, se han diseñado índices numéricos para representar la riqueza de especies y/o sus abundancias. Por ejemplo, consideremos dos comunidades de 100 individuos y cada una compuesta de 10 diferentes especies. Una de estas comunidades tiene 10 individuos de cada especie y la otra, 9 especies con un individuo y 91 individuos en una décima especie. ¿Cuál de las dos comunidades es más diversa? Aunque poseen el mismo número de especies distintas (su riqueza es similar), la dominancia de una especie sobre el resto, en la segunda comunidad, la hace menos diversa.

Hay una enormidad de este tipo de medidas, pero la más conocida viene a ser el índice de Shannon-Wiener (no paramétrico) el cual ha sido el más usado para medir la diversidad (JANZEN & SCHOENER 1968, ZUCCARO & BULLA 1985). En general, la selección de este índice se ha hecho con poco criterio y desconociendo sus propiedades (MOLINARI 1989). Otros índices no paramétricos han sido poco utilizados, como por ejemplo los números de la serie de HILL (1973) en especial N1 y N2. Estos números, especialmente N2, son preferidos por diversos autores (ALATALO & ALATALO 1977, PEET 1974, ROUTLEDGE 1979). Esta preferencia es consecuencia de que ellos satisfacen algunos criterios que, según MOLINARI (1989), son: sencillez (dependen de una sola variable), coherencia (unidades en número de especies), interpretabilidad (escala aritmética) y valor heurístico. Existen diferentes índices matemáticos para calcular la diversidad y los biólogos usan una combinación de distintos índices para aprovechar las ventajas de cada uno y lograr un entendimiento más completo de la comunidad. Esta situación amerita la realización de consultas detalladas para cada situación y un buen comienzo es leer a MAGURRAN (1988).

La diversidad beta entre sitios es definida como el grado de reemplazo de especies a lo largo de un gradiente ambiental (MAGURRAN (1988). La misma puede ser medida de varias formas, pero una de las más usadas son los índices de similitud, los cuales pueden trabajar

con datos de presencia - ausencia (p. ej., índice de Jaccard) o datos de abundancia (p. ej., .MORISITA-HORN).

En aquellos casos en que examinamos los cambios en la diversidad de uno o más sitios de muestreo, es necesario compararlos en el tiempo y en el espacio, a fin de comparar la similitud entre el o los sitios de estudio, con la finalidad de obtener una aproximación a la heterogeneidad temporal y/o espacial existente. Sin embargo, las comparaciones deben hacerse entre aquellos sitios o comunidades que estén muestreadas lo suficientemente para estar seguros que los datos que comparamos representan a la comunidad real, de allí que debemos asegurarnos esta representatividad y la manera más fácil es utilizar curvas de acumulación de especies o estimadores de máxima diversidad, las cuales pueden ser obtenidas con el programa Estimates (COLWELL 2000).

El manejo de los datos de las variables asociadas al monitoreo, ya sea para presencia o ausencia de especies, implica la utilización de modelos de regresión logísticos mientras que para datos de abundancia se pueden utilizar regresiones múltiples y otros métodos como el análisis de correspondencia simple y el análisis de correspondencias canónicas, entre otros (ver capítulo de Diseño experimental y análisis estadístico).

Dado que la diversidad genética puede detectarse directamente a escala molecular (ADN) o indirectamente en las proteínas que codifican genes específicos (isoenzimas), incluso a través de la medición de la variación morfológica de caracteres cuantitativos (MÉNDEZ *et al.* 2004), es importante conocer algunas maneras de medirla y expresarla. Así, para los datos moleculares y de isoenzimas, se utilizan una variedad de índices, por ejemplo, la heterocigosidad promedio, la proporción de loci polimórficos, el total o el promedio del número de alelos por locus y distancia genéticas y de Nei, entre otros (LAMPERT *et al.* 2003, MÉNDEZ *et al.* 2004; MONSEN & BLOUIN 2003). Para datos morfológicos cuantitativos hay una enorme variedad de métodos basados en estadística univariada y multivariada (MÉNDEZ *et al.* 2004).

# Literatura citada

- Aguirre, A.A. 1994. Declining toad populations. *Conservation Biology* 8:7.
- Aguirre, A.A. y D. Green. 2001. Analysis of mortality causes in amphibians. In: Lips, K.R., J.K. Reaser, B.E. Young y R. Ibañez (eds.). *Amphibian Monitoring in Latin America: A Protocol Manual. Monitoreo de Anfibios en América Latina: Manual de Protocolos*. Society for the Study of Amphibians and Reptiles. *Herpetological Circular* N. 30. Pp. 23-26, 66-70.
- Aguirre, A.A., R.S. Ostfeld, G.M. Tabor, C.A. House y M.C. Pearl (eds.). 2002. *Conservation Medicine: Ecological Health in Practice*. Oxford University Press, Nueva York, 407 pp.
- Alatalo, R. & R. Alatalo. 1977. Components of diversity: multivariate analysis with interaction. *Ecology* 58:900-906.
- Allmon, W. D. 1991. A plot study of forest floor litter frogs, Central Amazon, Brazil. *Journal of Tropical Ecology* 7:503-522.
- Amézquita, A. y W. Hödl. 2004. How, when, and where to perform visual displays? The case of the Amazonian frog *Hyla parviceps*. *Herpetologica* 60: 420-429.
- Anderson, D.R. 2001. The need to get the basics right in wildlife field studies. *Wildlife Society Bulletin* 29:1294-1297.
- Andrewartha, H.G. & L.C. Birch. 1954. *The Distribution and Abundance of Animal*. University of Chicago Press, Chicago, Illinois, USA. 782 pp.
- Angulo, A. 2004. The evolution of the acoustic communication system in members of the genus *Adenomera* (Anura: Leptodactylidae): A comparative approach. Tesis doctoral, Universidad de Toronto, Toronto, 232 pp.
- Angulo, A., R.B. Cocroft y S. Reichle. 2003. Species identity in the genus *Adenomera* (Anura: Leptodactylidae) in southeastern Peru. *Herpetologica* 59(4):490-504.
- Annis, S.L., F.P. Dastoor, H. Ziel, P. Daszak y J.E. Longcore. 2004. A DNA-based assay identifies *Batrachochytrium dendrobatidis* in amphibians. *Journal of Wildlife Diseases* 40: 420-428.
- Arzabe, C. 1999. Reproductive activity patterns of anuran in two different altitudinal sites within the Brazilian Caatinga. *Revista Brasileira de Zoologia* 16:851-864.
- Augustin, N.H., M.A. Mugglestone y S.T. Buckland. 1996. An autologistic model for the spatial distribution of wildlife. *Journal of Applied Ecology* 33: 339-347.
- Azevedo-Ramos, C. & W. Magnuson. 1999. Tropical tadpole vulnerability to predation: association between laboratory results and prey distribution in an Amazonian savanna. *Copeia* 1999:58-67.
- Azevedo-Ramos, C. Magnuson, W. E. & P. Bayliss. 1999. Predation as the key factor structuring tadpole assemblages in a savanna area in central Amazonia. *Copeia* 1999:22-33.
- Bailey, L.L., Simons, T.R. & K.N. Pollock. 2004. Spatial and temporal variation in detection probability of Plethodon salamanders using the robust capture-recapture design. *Journal of Wildlife Management* 68:14-24.



- Baillie, J.E.M., C. Hilton-Taylor, y S.N. Stuart. 2004. 2004 IUCN Red List of Threatened Species. A Global Species Assessment. UICN, Gland, Suiza y Cambridge, Reino Unido.
- Barr, G.E. y K.J. Babbitt. 2002. Effects of biotic and abiotic factors on the distribution and abundance of two-lined salamanders (*Eurycea bislineata*) across spatial scales. *Oecologia* 133:176-185.
- Barrio-Amorós, C.L. 2004. *Atelopus mucubajiensis* still survives in the Andes of Venezuela: Preliminary report. *Froglóg* 66: 2-3.
- Bass, A.H. y C.W. Clark. 2003. The physical acoustics of underwater sound communication. Pp. 15-64. In: Simmons, A. M., A. N. Popper y R.R. Fay (eds.). *Acoustic Communication*. Springer, Nueva York.
- Bell, B.D., S. Carver, N.J. Mitchell, y S. Pledger. 2004. The recent decline of a New Zealand endemic: how and why did populations of Archey's frog *Leiopelma archeyi* crash over 1996-2001. *Biological Conservation* 120: 189-199.
- Bennet-Clark, H.C. 1999. Which Qs to choose: Questions of quality in bioacoustics? *Bioacoustics* 9:351-359.
- Berger, L., R. Speare, P. Daszak, D.E. Green, A.A. Cunningham, C.L. Goggin, R. Slocombe, M.A. Ragan, A.D. Hyatt, K.R. McDonald, H.B. Hines, K.R. Lips, G. Marantelli, y H. Parkes. 1998. Chytridiomycosis causes amphibian mortality associated with population declines in the rainforests of Australia and Central America. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* 95:9031-9036.
- Berger, R. y R. Speare. 2002. What to do with dead or ill frogs. Recurso electrónico en internet: <http://www.jcu.edu.au/school/phtm/PHTM/frogs/pmfrog.htm>.
- Berger, R., R. Speare y A. Kent. 1999. Diagnosis of chytridiomycosis in amphibians by histologic examination. Recurso electrónico en internet: <http://www.jcu.edu.au/school/phtm/PHTM/frogs/histo/chhisto.htm>.
- Bianchinotti, M.V. 2001. Comunidades fúngicas asociadas a ramas y ritidoma troncal de *Geoffroea decorticans* (Gill. ex Hook. et Arn.) Burkart (FABACEAE). *Gayana Botanica* 58:1-12.
- Bibby, C., M. Jones & S. Marsden. 1998. *Expedition Field Techniques. Birds Surveys*. Royal Geographic Society. London.
- BirdLife International 2004. *State of the World's Birds: Indicators for our Changing World*. BirdLife International, Cambridge, Reino Unido.
- Blaustein, A.R., D.G. Hokit, R.K. O'Hara, y R.A. Holt. 1994b. Pathogenic fungus contributes to amphibian losses in the Pacific Northwest. *Biological Conservation* 67:251-254.
- Bock, W.J. y C.R. Shear. 1972. A staining method for gross dissection of vertebrate muscles. *Anatomischer Anzeiger* 130:222-227.
- Bosch, J., I. Martínez-Solano, y M. García-París. 2001. Evidence of a chytrid fungus infection involved in the decline of the common midwife toad (*Alytes obstetricans*) in protected areas of central Spain. *Biological Conservation* 97: 331-337.
- Boyle, D. G., D. B. Boyle, V. Olsen, J. A. T. Morgan y A. D. Hyatt 2004. Rapid quantitative detection of chytridiomycosis (*Batrachochytrium dendrobatidis*) in amphibian samples using real-time Taqman PCR assay. *Diseases of Aquatic Organisms*, 60: 141-148.

- Buckland, S.T., Anderson, K.P., Burnham, K. P. & J. L. Laake. 1993. Distance sampling: Estimating abundance of biological populations. Chapman Hall, London, England, 464 pp.
- Burrowes, P.A., R.L. Joglar, y D.E. Green. 2004. Potential causes for amphibian declines in Puerto Rico. *Herpetologica* 60: 141-154.
- Canterbury, G.E., T.E. Martin, D.R. Petit, L.J. Petit & D.F. Bradford. 2000. Bird communities and habitats as ecological indicators of forest condition in regional monitoring. *Conservation Biology* 14:544-558.
- Caughley, G. 1977. Analysis of Vertebrate Populations. John Wiley & Sons, Chichester. 234 p.
- Colwell, R.K. 2000. EstimateS: Statistical estimation of species richness and shared species from samples. Version 6.01b. published at <http://viceroy.eeb.uconn.edu/estimates>.
- Conroy, M.J. & J.D. Nichols. 1996. Recommendations. Pp. 226-228. En: Wilson, D.E.; F.R. Cole, J.D. Nichols, R. Rudran y M. Foster, eds.). *Measuring and Monitoring Biological Diversity. Standard Methods for Mammals*. Smithsonian Institution Press, Washington, D.C., 409 pp.
- Cook, R.D. & J.O. Jacobson. 1979. A design for estimating visibility bias in aerial surveys. *Biometrics* 35:735-742.
- Crump, M.L. 1994. Keys to a successful project Associated Data and Planning. Climate and environment. Pp: 41-73. En Heyer W.R., M.A. Donnelly, R.W. McDiarmid, L.C. Hayek & M.S. Foster (eds.). *Measuring and Monitoring Biological Diversity. Standard Methods for Amphibians*. Smithsonian Institution Press, Washington, D.C., 364 pp.
- Cunningham, A.A., T.E.S. Langton, P.M. Bennett, J.F. Lewin, S.E.N. Drury, R.T.E. Gough, y S.K. MacGregor. 1996. Pathological and microbiological findings from incidents of unusual mortality of the common frogs (*Rana temporaria*). *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B* 351:1539-1557.
- Czechura, G.V. y G. Ingram. 1990. *Taudactylus diurnus* and the case of the disappearing frogs. *Memoirs of the Queensland Museum* 29: 361-365.
- Daniel, W. 1977. Bioestadística. Base para el Análisis de las Ciencias de la Salud. Editorial Limusa. México, 111 pp.
- Daszak, P., A. Cunningham, y A. Hyatt. 2003. Infectious disease and amphibian population declines. *Journal of Diversity and Distributions* 9:141-150.
- Daszak, P., A. Strieby, A.A. Cunningham, J.E. Longcore, C.C. Brown y D. Porter. 2004. Experimental evidence that the bullfrog (*Rana catesbeiana*) is a potential carrier of chytridiomycosis, an emerging fungal disease of amphibians. *Herpetological Journal* 14:201-107.
- Daszak, P., L. Berger, A.A. Cunningham, A. D. Hyatt, D. E. Green, y R. Speare. 1999. Emerging infectious diseases and amphibian population declines. *Emerging Infectious Diseases* 5:735-748.
- Dennis, B. & M.L. Taper. 1994. Density dependence in time series observations of natural population: estimation and testing. *Ecological Monographs* 64:205-224.
- Dessauer, H., C. J. Cole y M. Hafner. 1996. Collection and storage of tissues. Pp. 29-41. En: Hillis, D.M. , C. Moritz y B.K. Mable. *Molecular Systematics*. Segunda edición. Sinauer Associates, Inc. Publishers. Sunderland, Massachusetts.

- Dingerkus, G. y L.D. Uhler. 1977. Enzyme clearing of alcian blue stained whole small vertebrates for demonstration of cartilage. *Stain Technology* 52(4): 229-232.
- Dixon, P.M. 1993. The bootstrap and the jackknife: Describing the precision of ecological indices. Pp. 290-318. In: Scheiner, S.M. y J. Gurevitch, (eds.). *Design and Analysis of Ecological Experiments*. Chapman & Hall, Nueva York.
- Donnelly, A.M. & C. Guyer. 1994. Estimating population size. Pp: 183-205. En Heyer, W.R., M.A. Donnelly, R.W. McDiarmid, L.C. Hayek, & M.S. Foster (eds.). *Measuring and Monitoring Biological Diversity. Standard Methods for Amphibians*. Smithsonian Institution Press, Washington, D.C., 364 pp.
- Downie, J.R., S.R. Livingstone, & J.R. Cormack 2001. Selection of tadpole deposition sites by male Trinitarian stream frogs, *Mannophryne trinitatis* (Dendrobatidae): an example of anti-predator behaviour. *Herpetological Journal* 11:91-100.
- Drost, C.A. y G.A. Fellers. 1996. Collapse of a regional frog fauna in the Yosemite area of the California Sierra Nevada, USA. *Conservation Biology* 10: 414-425.
- Duellman, W. E.. 1978. The biology of an ecuatorial herpetofauna in Amazonian Ecuador. University of Kansas, Museum of Natural History. Miscellaneous publication 65:1-352.
- Duellman, W. E. & L. Trueb. 1986. Morphology. p 402. *Biology of Amphibians*. McGraw-Hill, Nueva York. 669 pp.
- Duellman, W. E. 1962. Directions for preserving amphibians and reptiles. Pp. 37-40 In: Hall, E. R. *Collecting and Preparing Study Specimens of Vertebrates*. Univ. Kansas Mus. Nat. Hist. Misc. Publ. 30:1-46.
- Duellman, W. E. 1995. Temporal fluctuations in abundances of anuran amphibians in a seasonal Amazonian rainforest. *Journal of Herpetology* 29:13-21.
- Duellman, W. E. 1997. Amphibians of La Escalera region, southeastern Venezuela: Taxonomy, ecology, and biogeography. *Scientific Papers, Natural History Museum, University of Kansas* 2:1-52.
- Duellman, W.E. 2005. *Cusco Amazonico. The Lives of Amphibians and Reptiles in a Amazonian Rainforest*. Comstock Publishing Associates. 433 p.
- Duellman, W. E. y R. A. Pyles. 1983. Acoustic resource partitioning in anuran communities. *Copeia* 1983(3):639-649.
- Duellman, W.E., & L. Trueb. 1986. *Biology of Amphibians*. McGraw-Hill, New York, 670 pp.
- Dufrene, M. & P. Legendre. 1997. Species assemblages and indicator species: The need for a flexible asymmetrical approach. *Ecological Monographs* 67:345-366.
- Dutilleul, P. 1993. Spatial heterogeneity and the design of ecological field experiments. *Ecology* 74:1646-1658.
- Eberhardt, L. L., & J. M. Thomas. 1991. Designing environmental field studies. *Ecological Monographs* 61:53-73.
- Eberhardt, L. L., & M. A. Simmons. 1987. Calibrating population indices by double sampling. *Journal of Wildlife Management* 51:665-675.
- Ecological Monographs* 54:187-211.
- Engeman, R. M. 2003. More on the need to get the basic right: Population indices. *Wildlife Society Bulletin* 31:286-286.

- Eterovick, P. C. & I. Sazima. 2001. Structure of an anuran community in a montane meadow in southeastern Brazil: effects of seasonality, habitat, and predation. *Amphibia-Reptilia* 21:439-461.
- Eterovick, P.C., A.C.O.Q. Carnaval, D.M. Borges-Nojosa, D.L. Silvano, M.V. Segalla, e I. Sazima. 2005. Amphibian declines in Brazil: an overview. *Biotropica* 37: 166-179.
- Etheridge, R. 2002. Methods for preserving amphibians and reptiles for scientific study (adapted for the WWW and updated by M. O'Brien and G. Schneider, May 1996). Recurso electrónico en internet: <http://www.ummz.lsa.umich.edu/herps/herpinstr.htcc>
- Ewing, A.W. 1989. *Arthropod Bioacoustics: Neurobiology and Behaviour*. Comstock Publishing Associates, Cornell University Press, Ithaca, Nueva York, 260 pp.
- Fauth, J.E., J. Bernardo, M. Camara, W.J. Resertaris, J.V. Buskirk & S.A. Mc Collum. 1996. Simplifying the jargon community ecology: A conceptual approach. *The American Naturalist* 147:282-286.
- Fernández, O.F.J. 2002. El uso del Análisis de Correspondencia Simple (ACS) como ayuda en la interpretación del dato en arqueología. Un caso de estudio. *Boletín Antropológico* 55: 1325-2610.
- Fitch, K.L. 1959. Observations on the life history of the salamander *Necturus maculosus* Rafinesque. *Copeia* 1959:339-340.
- Fletcher, N.H. 1992. *Acoustic Systems in Biology*. Oxford University Press, Oxford, 333 pp.
- Ford, E.D. 2000. *Scientific Method for Ecological Research*. Cambridge University Press. Cambridge, U.K. 564 pp.
- Fouquette, M.J. Jr. 1960. Isolating mechanisms in three sympatric frogs in the Canal Zone. *Evolution* 14:484-497.
- Fox, S.F., P.A. Shipman, R.E. Thill, J.P. Phelps, y D.M. Leslie. 2004. Amphibian communities under diverse forest management in the Ouachita Mountains, Arkansas. In: Guldin, J.M. Ouachita and Ozark Mountains symposium: ecosystem management research, Hot Springs, Arkansas, October 26-28, 1999. General Technical Report No. SRS-74. Asheville, NC: U.S. Department of Agriculture, Forest Service, Southern Research Station.
- Fuller, T.K. 1991. Do pellet counts index white-tailed deer numbers and population change? *Journal of Wildlife Management* 55:393-396.
- Funk, W.C., D. Almeida-Reinoso, F. Nogales-Sornosa & M.R. Bustamante. 2003. Monitoring population trends of Eleutherodactylus frogs. *Journal of Herpetology* 37:245-256.
- Gacetilla de Prensa. 2004. La Agencia Córdoba Ciencia negó adulteraciones en exámenes de ADN. Agencia Córdoba Ciencia. Recurso electrónico en internet: <http://web2.cba.gov.ar/web/News.nsf/0/cc739e8ce3c094903256f4a0073ed92?OpenDocument>.
- Galindo-Leal, C. Diseño y análisis de proyectos para el manejo y monitoreo de la diversidad biológica. <http://www.stanford.edu/group/CCB>.
- Galindo-Leal, C. 1999. Monitoreo Biológico En Carr III, A. & A.C. Stoll (eds.) *Monitoreo Biológico en la Selva Maya*. Ed. Carr III, A. y Stoll, A. C. US Man and the Biosphere Program/ Tropical Ecosystem Directorate y Wildlife Con-

- ervation Society. <http://www.afn.org/~wcsfl/selva/monbioesp.pdf>.
- Gascon, C. 1991. Population and community level analysis of species occurrences of central Amazonian rainforest tadpoles. *Ecology* 72:1731-1746.
- Gerhardt, H.C. y F. Huber. 2002. Acoustic Communication in Insects and Anurans. Common Problems and Diverse Solutions. The University of Chicago Press, Chicago, 531 pp.
- Gill, D. E. 1979. Density dependence and homing behavior in adult red-spotted newts *Notophthalmus viridescens* (Rafinesque). *Ecology* 60:800-813.
- Glade, A. 1993. RedList of Chilean Terrestrial Vertebrates. Corporación Nacional Forestal (CONAF). Santiago, Chile.
- Heyer, W.R., A.S. Rand, C.A.G. Cruz y O.L. Peixoto. 1988. Decimations, extinctions, and colonizations of frog populations in southeast Brazil and their evolutionary implications. *Biotropica* 20: 230-235
- González-García, F. 2004. Técnicas para la grabación de sonidos de aves. Biblioteca de Sonidos de las Aves de México. Instituto de Ecología, A.C. Xalapa, Veracruz, México. Recurso electrónico en internet: [www.ecologia.edu.mx/sonidos](http://www.ecologia.edu.mx/sonidos)
- Gordon, D. M. 1997. The population consequences of territorial behavior. *Trends in Ecology. & Evolution*. 12:63-66.
- Gosner, K. L. 1960. A simplified table for staging anuran embryos and larvae with notes on identification. *Herpetologica* 16: 183 – 190.
- Gurtler, R. 2004. Estimación de abundancia. Parte 1. Introducción al muestreo de poblaciones. Trabajo práctico 3. Ecología General, Departamento de Ecología, Genética y Evolución, FCEyN-UBA.
- Hair, J.F., R.E. Anderson, , R.L. Tatham y W.C. Black. 1995. *Multivariate Data Analysis*. Prentice Hall, Nueva Jersey, 730 pp.
- Hall, DE. 1987. *Basic Acoustics*. Harper & Row, Nueva York, 345 pp.
- Hammond, P. M. 1994., Practical approaches to the estimation of the extent of biodiversity in speciose groups. *Philosophical. Transactions of the. Royal. Society. London B* 345:119-136.
- Hand, D.J. 1981. *Discrimination and Classification*. John Wiley and Sons, Nueva York, 218 pp.
- Hanselmann, R., A. Rodriguez, M. Lampo, L. Fajardo-Ramos, A.A. Aguirre, A.M. Kilpatrick, J.P. Rodriguez and P. Daszak. 2004. Presence of an emerging pathogen of amphibians in introduced bullfrogs (*Rana catesbeiana*) in Venezuela. *Biological Conservation* 120:115-119.
- Haven, W. & Ranft, R. 2005. Equipment review: Portable audio recorders. *Bioacoustics* 15: 207-216
- Hanski, I. & M. Gilpin. 1991. Metapopulation dynamics: brief history and conceptual domain. *Biological Journal of the Linnean Society* 42:3-16.
- Hanski, I. 1991. Single-species metapopulation dynamics: concepts, model and observation. *Biological Journal of the Linnean Society* 42:73-88.
- Hanski, I., I. Woiwod & J. Perry. 1993. Density dependence, population persistence, and largely futile arguments. *Oecologia* 95:595-598.
- Hawkins, C.P. & J.A. MacMahon. 1989. Guilds: The multiple meanings of a concept. *Annual Review of Entomology* 34:423-451.

- Hayek, L.-A. C. 1994. Analysis of amphibian biodiversity data. Pp. 207-269. In: Heyer, R.W., M.A. Donnelly, R.W. McDiarmid, L.-A.C. Hayek, y M.S. Foster. (eds.) *Measuring and Monitoring Biological Diversity: Standard Methods for Amphibians*. Smithsonian Institution Press, Washington, 364 pp.
- Hecnar, S.J. & R.T. M'Closkey. 1996. Regional dynamics and the status of amphibians. *Ecology* 77:2091-2097.
- Heffner, R.A., M.J.I Butler y C.K. Reilly. 1996. Pseudoreplication revisited. *Ecology* 77: 2558-2562.
- Hero, J.M. 1989. A simple code for toe clipping anurans. *Herpetological Review* 20:66-67.
- Hero, J.M. 1990. An illustrated key to tadpoles occurring in the Central Amazon rainforest, Manaus, Amazonas, Brazil. *Amazoniana* 11:201-262.
- Hero, J.M., W.E. Magnusson, C.F.D. Rocha & C.P. Catterall. 2001. Antipredator defences influence the distribution of amphibian prey species in the central Amazon rain forest. *Biotropica* 33:131-141.
- Heyer, W. R., M. A. Donnelly, R. McDiarmid, L. C. Hayek y M. Foster (eds). 2001. *Medición y monitoreo de la diversidad biológica. Métodos estandarizados para anfibios*. Editorial Universitaria de La Patagonia. Argentina.
- Heyer, W. R. 1994. Grabaciones de cantos de anuros. Pp. 275-277 In: W.R. Heyer, M.A. Donnelly, R.W. McDiarmid, L.C. Hayek y M. S. Foster (eds.). *Measuring and Monitoring Biological Diversity*. Smithsonian Institution Press, Washington, 364 pp.
- Heyer, W. R. 1973. Ecological interaction of frog larvae at a seasonal tropical location in Thailand. *Journal of Herpetology* 7:337-361.
- Heyer, W. R. 1979. Annual variation in larval amphibian populations within a temperate pond. *Journal of Washington Academy of Science* 69:65-74.
- Heyer, W.R., M.A. Donnelly, R.W. McDiarmid, L.C. Hayek y M.S. Foster. 1994. *Measuring and Monitoring Biological Diversity*. Smithsonian Institution Press, Washington, 364 pp.
- Hill, M.O. 1973. Diversity and evenness: a unifying notation and its consequences. *Ecology* 54:427-432.
- Hixon, M.A., S.W. Pacala & S.A. Sandin. 2002. Population regulation: historical context and contemporary challenges of open vs. closed systems. *Ecology* 83:1490-1508.
- Hoening, J.M. & D.M. Heisey 2001. The abuse of power: the pervasive fallacy of power calculation for data analysis. *Journal of American Statistical Association* 55:19-24.
- Houlahan, J.E., C.S. Findlay, B.R. Schmidt, A.H. Meyer y S.L. Kuzmin. 2000. Quantitative evidence for global amphibian declines. *Nature* 404: 752-755.
- Hulbert, S. H. 1984. Pseudoreplication and the design of ecological field experiments. *Ecological Monographs*. 54: 187-211.
- Hyde, E. J. & T.R. Simons. 2001. Sampling Plethodontid salamanders: Source of variability. *Journal of Wildlife Management* 65:624-632.
- Inger, R. F. 2003. Sampling Biodiversity in Bornean Frogs. *The Natural History Journal of Chulalongkorn University* 3:9-15.
- Jacobs, J.F. y W.R. Heyer. 1994. Collecting tissue for biochemical analysis. Pp. 299-300. In: Heyer, W.R., M.A. Do-

- nnelly, R.W. McDiarmid, L.C. Hayek y M.S. Foster (eds.). *Measuring and Monitoring Biological Diversity. Standard Methods for Amphibians*. Smithsonian Institution Press, Washington, 364 pp.
- Jancovich, J. K., E. W. Davidson, J.F. Morado, B.L. Jacobs, y J.P. Collins. 1997. Isolation of a lethal virus from the endangered tiger salamander *Ambystoma tigrinum stebbinsi*. *Diseases of Aquatic Organisms* 31:161-167.
- Janzen, D. H. & T. W. Schoener. 1968. Differences in insect abundance and diversity between wetter and drier sites during a tropical dry season. *Ecology* 49:96-110.
- Johnson, D. 2002. The importance of replication in wildlife research. *Journal of Wildlife Management* 66:919-932.
- Johnson, K. 2003. *Acoustic and Auditory Phonetics*. Segunda Edición. Blackwell Publishing. Primer capítulo disponible como recurso electrónico en internet: [http://www.blackwellpublishing.com/content/BPL/Images/Content\\_store/Sample\\_chapter/1405101237/001.pdf](http://www.blackwellpublishing.com/content/BPL/Images/Content_store/Sample_chapter/1405101237/001.pdf)
- Johnson, M.L. Berger, L. Philips, L. and R. Speare. 2003. Fungicidal effects of chemical disinfectants, Uv light, desiccation and heat on amphibian chytrid *Batrachochytrium dendrobatidis*. *Disease of Aquatic Organisms* 57, 255-260.
- Jolliffe, I.T. 1986. *Principal Component Analysis*. Springer-Verlag, Nueva York, 487 pp.
- Juncá, F.A. 1994. *Ecologia e biologia reproductiva de duas espécies simpátricas de Colostethus (Anura: Dendrobatidae) da região de Manaus, Amazônia Central*. Dissertação de Mestre em Zoologia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 84 pp.
- Kagarise Sherman, C. y M.L. Morton. 1993. Population declines of Yosemite toads in the eastern Sierra Nevada of California. *Journal of Herpetology* 27(2): 186-198.
- Kaufman. D.W., G.A. Kaufman & E.J. Finck. 1995. Temporal variation in abundance of *Peromyscus leucopus* in wooded habitats of eastern Kansas. *American Midland Naturalist* 133:7-17.
- Kehr, A. I. y Basso, N. 1990. Consideraciones sobre la estructura de edades, supervivencia y tiempo de metamorfosis en los estados larvales de *Hyla pulchella pulchella* (Anura: Hylidae). *Acta Zool. Lilloana* 41:125-33.
- Kendall, W.L., J.D. Nichols & J.E. Hines. 1997. Estimating temporary emigration using capture-recapture data with Pollock's robust design. *Ecology* 78:563-578.
- Kiesecker, J.M., y A.R. Blaustein. 1995. Synergism between UV-B radiation and a pathogen magnifies amphibian mortality in nature. *Proceedings of the National Academy of Science, USA* 92:11049-11052.
- Kish, L. 1995. *Diseño Estadístico para la Investigación*. Monografía del Centro de Investigaciones Sociológicas. 146: i-xxii - 1-353.
- Knapp, S.M., S.A.S. Haas, D.N. Harpole y R.I. Kirkpatrick. 2003. Initial effects of clearcutting and alternative silvicultural practices on terrestrial salamander abundance. *Conservation Biology* 17:752-762.
- Koenig, W.D. 1998. Spatial autocorrelation in California land birds. *Conservation Biology* 12: 612-620.
- Koenig, W.D. 1999. Spatial autocorrelation of ecological phenomena. *Trends in Ecology & Evolution* 14: 22-26.
- Krebs, C.J. 1999. *Ecological methodology*. 2 ed. Univ. British Columbia.

- Addison-Welsey Educational Publishers, Inc. 620 pp.
- Kremen, C. 1992. Assessing the indicator properties of species assemblages for natural areas monitoring. *Ecological Applications* 2:203-217.
- Kremen, C. 1994. Biological inventory using target taxa: a case study of the butterflies of Madagascar. *Ecological Applications* 4:407-422.
- Krinshna, S.N., Krinshna, S.B. & K.K. Vijayalaxmi. 2005. Variation in anuran abundance along the streams of the Western Ghats, India. *Herpetological Journal* 115:167-172.
- Kroodsma, D.E., B.E. Byers, E. Goodale, S. Johnson, y W.Liu. 2001. Pseudoreplication in playback experiments, revisited a decade later. *Animal Behaviour* 61: 1029-1033.
- Kroodsma, D.E., G.F. Budney, R.W. Grotke, J. M.E. Vieliard, S.L.L. Gaunt, R. Ranft y O.D. Veprintseva. 1996. Natural sound archives: guidance for recordists and a request for cooperation. Pp. 474-486. In: Kroodsma, D.E. y E.H. Miller (eds.). *Ecology and evolution of Acoustics Communication in Birds*. Comstock Publishing Associates, Cornell University Press, Ithaca, Nueva York.
- La Marca, E. y H.P. Reinthaler. 1991. Population changes in *Atelopus* species of the Cordillera de Mérida, Venezuela. *Herpetological Review* 22(4):125-128.
- La Marca, E., K. Lips, S. Lötters, B. Young, R. Puschendorf, C. Marty, J.V. Rueda-Almonacid, R. Schulte, F. Castro, M. Bustamante, E. Toral, J. Manzanilla-Puppo, J.E. García-Pérez, L. Coloma, A. Merino-Viteri, R. Ibañez, S. Ron, F. Bolaños, G. Chaves y A. Pounds. 2005. Catastrophic population declines and extinctions in neotropical harlequin frogs (Bufonidae: *Atelopus*). *Biotropica* 37(2):190-201.
- Lajmanovich, R.F. 2000. Interpretación ecológica de una comunidad larvaria de anfibios anuros. *Interciencia* 25:71-79.
- Lampert, K.P., A.S. Rand, U.G. Mueller & M.J. Ryan. 2003. Fine-scale genetic pattern and evidence for sex-biased dispersal in the Tungara frog, *Physalaemus pustulosus*. *Molecular Ecology* 12:3325-3334.
- Lancia, R.A., J.D. Nichols & K.H. Pollock. 1996. Estimating the number of animals in wildlife populations. Pp. 215-253. En: Bookhout, T.A (ed.). *Research and Management Techniques for Wildlife and Habitats*. The Wildlife Society, Bethesda, Maryland, 740 pp.
- Laurance, W.F., K.R. McDonald y R. Speare. 1996. Epidemic disease and the catastrophic decline of Australian rain forest frogs. *Conservation Biology* 10:406-413.
- Lebreton, J.D., K.P. Burnham, J. Clobert, & D.R. Anderson. 1992. Modeling survival and testing biological hypotheses using marked animals: A unified approach with case studies. *Ecological Monographs* 62:67-118.
- Legendre, P. 1993. Spatial autocorrelation: Trouble or new paradigm? *Ecology* 74: 1659-1673.
- Legendre, P., M.R.T. Dale, M. Fortin, J. Gurevitch, M. Hohn & D. Myers. 2002. The consequences of spatial structure for the design and analysis of ecological field surveys. *Ecography* 25:601-615.
- Lichstein, J.W., T.R. Simons, S.A. Shriener & K.E. Franzreb. 2002. Spatial autocorrelation and autoregressive models



- in ecology. *Ecological Monographs* 72:445-463.
- Lieberman, S.S. 1986. Ecology of the leaf litter herpetofauna of a Neotropical rain forest: La Selva, Costa Rica. *Acta Zoológica Mexicana* 15:1-72.
- Lips, K.R. 1998. Decline of a tropical montane amphibian fauna. *Conservation Biology* 12: 106-117.
- Lips, K.R. 1999. Mass mortality and population declines of anurans at an upland site in western Panama. *Conservation Biology* 13: 117-125.
- Lips, K.R., J.K. Reaser, B.E. Young y R. Ibáñez. 2001. Amphibian Monitoring in Latin America: A Protocol Manual. *Monitoreo de Anfibios en América Latina: Manual de Protocolos. Herpetological Circular* No. 30, Society for the Study of Amphibians and Reptiles.
- Lips, K.R., J.R. Mendelson III, A. Muñoz-Alonso, L. Canseco-Márquez, y D.G. Mulcahy. 2004. Amphibian population declines in montane southern Mexico: resurveys of historical localities. *Biological Conservation* 119: 555-564.
- López-López, F.J. 2005a. Métodos para la caracterización de la Herpetofauna en la Serranía de Minas. Ministerio de Ambiente, Vivienda y Desarrollo Territorial. Unidad Administrativa Especial del Sistema de Parques Nacionales Naturales, Programa de Naciones Unidas Para el Desarrollo-PNUD Col/01/G31 Proyecto de Conservación del Macizo Colombiano-Biomacizo. Informe no publicado.
- López-López, F.J. 2005b. Anfibios y Reptiles de la Serranía de Minas. Ministerio de Ambiente, Vivienda y Desarrollo Territorial, Unidad Administrativa Especial del Sistema de Parques Nacionales Naturales, Programa de Naciones Unidas Para el Desarrollo-PNUD Col/01/G31 Proyecto de Conservación del Macizo Colombiano-Biomacizo. Informe no publicado.
- Lötters, S., R. Schulte, J.H. Córdova, y M. Veith. 2005. Conservation priorities for harlequin frogs (*Atelopus* spp.) of Perú. *Oryx* 3: 343-346.
- Lougheed, S.C., Gascon, C., D.A. Jones, J. P. Bogart & P.T. Boag. 1999. Ridges and River: a test of competing hypotheses on Amazonian diversification using a dart-poison frog (*Epipedobates femoralis*). *Proceeding of Real Society of London*, B 266:1929-1835.
- Lowe, W.H. y D.T. Bolger. 2002. Local and landscape-scale predictors of salamander abundance in New Hampshire headwater streams. *Conservation Biology* 16:183-193.
- Lynch, J.D. y T. Grant. 1998. Dying frogs in western Colombia: catastrophe or trivial observation? *Revista de la Academia Colombiana de Ciencias* 22: 149-152.
- Macaulay Library, Cornell Lab of Ornithology. 2004. Field recording equipment. Recurso electrónico en internet: <http://content.ornith.cornell.edu/UEWebApp/data/bin/RecordingEquipment.pdf>
- Magin, C. 2003. Dominica's frogs are croaking. *Oryx* 37: 406.
- Magurran, Anne E. 1988. *Ecological diversity and its measurement*. Princeton, New Jersey. Princeton University Press. 179 pp.
- Manzanilla, J. y E. La Marca. 2004. Museum records and field samplings as source of data pointing to population crashes for *Atelopus cruciger*, a proposed critically endangered species from the

- Venezuelan coastal range. Memoria de la Fundación La Salle de Ciencias Naturales 62(157): 5-29.
- Manzanilla, P.J., F.A. Badillo, E. La Marca & G.R. Visbal. 1995. Fauna del Parque Nacional Henri Pittier, Venezuela: Composición y distribución de los anfibios. Acta Científica Venezolana 46:1-9.
- Marsh, D.M. 2001. Behavioral and demographic responses of Túngara frogs to variation in pond density. Ecology 82:1283-1292.
- McDiarmid, R.W. 1994a. Keys to a successful project: associated data and planning. Data standards. Pp. 57-60. In: Heyer W.R., M.A. Donnelly, R.W. McDiarmid, L.C. Hayek y M.S. Foster. (eds.). Measuring and Monitoring Biological Diversity. Standard Methods for Amphibians. Smithsonian Institution Press, Washington, 364 pp.
- McDiarmid, R.W. 1994b. Preparing amphibians as scientific specimens. Pp. 289-296. In: Heyer W.R., M.A. Donnelly, R.W. McDiarmid, L.C. Hayek y M.S. Foster (eds.). Measuring and Monitoring Biological Diversity. Standard Methods for Amphibians. Smithsonian Institution Press, Washington, 364 pp.
- McDiarmid, R.W. y R. Altig. 1999. Research: Materials and techniques. P. 7 - 23. In: McDiarmid, R.W. y R. Altig. Tadpoles, the biology of anuran larvae. The University of Chicago Press, Chicago, 444 pp.
- McElman J.F., K.J. Sulak y L. Van Guelpen. 1987. References for the preparation of ichthyological specimens. American Society of Ichthyologists and Herpetologists (ASIH) Curatorial Newsletter 9: 6-14.
- McPeck, M.A. y S. Kalisz. 1993. Population sampling and bootstrapping in complex designs: Demographic analysis. Pp. 232-252. In: Scheiner, S.M. y J.Gurevitch. (eds.). Design and Analysis of Ecological Experiments. Chapman & Hall, Nueva York.
- Mendez, M. 2004. Genética y reintroducción. Anexo 7. En: Parera, A. Fauna del Iberá: Composición, Estado de Conservación y Propuestas de Manejo. Fundación Biodiversidad. Provincia Corrientes. Argentina, 101 pp. Recurso electrónico en internet: [http://www.ecosibera.org/informes/biodiversidad/FaunaIbera\\_principal.pdf](http://www.ecosibera.org/informes/biodiversidad/FaunaIbera_principal.pdf).
- Méndez, M.A., E.R. Soto, C. Correa, A. Veloso, E. Vergara, M. Sallaberry & P. Iturra. 2004. Morphological and genetic differentiation among Chilean populations of *Bufo spinulosus* (Anura: Bufonidae). Revista Chilena de Historia Natural 77:559-567.
- Meyer, A.H., B.R. Schmidt & K. Grosenbacher. 1998. Analysis of three amphibian population with quarter-century long time-series. Proceeding of Royal Society. London. B 265:523-258.
- Michelsen, A. 1983. Biophysical basis of sound communication. Pp. 3-38. En: Lewis, B. (ed.). Bioacoustics. A Comparative Problem. Academic Press, Londres.
- Molina, C. 2003. Ecología de *Mannophryne berminae* (Boettger 1893) (Anura: Dendrobatidae) en la Cordillera de la Costa, Venezuela. Tesis doctoral, Postgrado de Ecología, Facultad de Ciencias, Universidad Central de Venezuela, Caracas, 204 páginas.
- Molina, C. 2004. Reproducción de *Pleurodema brachyops* (Anura: Leptodactylidae) en los llanos del Estado Apure, Venezuela. Memoria de la Fundación La

- Salle Ciencias Naturales 158:117-125. Blackwell Publishing Ltd.
- Molinari, J. 1989. La diversidad ecológica: un enfoque unificado, conceptual y metodológico, para su cuantificación. Tesis doctoral, Facultad de Ciencias, Universidad Central, Venezuela, 164 pp.
- Monsen, K.J. & M.S. Blouin. 2003. Genetic structure in a montane ranid frog: restricted gene flow and nuclear-mitochondrial discordance. *Molecular Ecology* 12:3275-3285.
- Morales, V. R. y R.W. McDiarmid. 1996. Checklist of Amphibians and Reptiles of Pakitza, Manu Reserved Zone, with comments of the Herpetofauna of Madre de Dios, Perú. 495-514. In: Manu: The biodiversity of Southeastern Peru. Wilson, D. & A. Sandoval (eds). *Off. Biodiver. Prog. Nation. Mus. Nat Hist. Smith. Inst. Washington, D.C., U.S.A.*
- Morris, W. F., y D. F. Doak. 2002. *Quantitative Conservation Biology. Theory and practice of population viability analysis.* Sinauer Associates, Inc. Publishers. USA. 480 pp.
- Murdoch, W. W. 1994. Population regulation in theory and practice. *Ecology* 75:271-287.
- Muths, E., E.J. Jung, L.L. Bayley, M.J. Adams, P. S. Corn, C. K. Dodd, G. M. Feller, W.J. Sadinski, C.R. Schwalbe, S.C. Walls, R. N. Fisher, A.. L. Gallant, W.A. Battaglin & D.E. Grenn. 2005. Amphibians Research and Monitoring Initiative (ARMI): A successful start to a national program in the United States. *Applied Herpetology* 2:655-371.
- Napoli, D., D. Navacchia, J.G. Casas y J. Happa. 1995. Recuperación de tejidos desecados. Recurso electrónico en internet: [www.fmed.uba.ar/museos/mpatologia/Invest2b.htm](http://www.fmed.uba.ar/museos/mpatologia/Invest2b.htm).
- Nichols, J.D. 1986. On the use of enumeration estimators for interspecific comparisons, with comments on a "trappability" estimator. *Journal of Mammalogy* 67:590-593.
- Nichols, J.D. 1992. Capture-recapture models. Using marked animals to study population dynamics. *BioScience* 42:94-102.
- Noss, Reed F. 1990. Indicators for monitoring biodiversity: a hierarchical approach. *Conservation Biology*. 4(4): 355-364.
- Olson, D., W. Leonard y R. Bury. 1997. Sampling amphibians in lentic habitats. Northwest Fauna Number 4. Society for Northwestern Vertebrate Biology. 134 pp.
- Otis, D.L., K.P. Burnham, G.C. White & D.R. Anderson. 1978. Statistical inference from capture data on closed animal populations. *Wildlife Monographs* 62:1-135.
- Páez, V. 2004. El valor de las colecciones biológicas. *Actualidades Biológicas* 2004(2): Editorial.
- Páez, V., B. Bock y P. Gutiérrez. 2002. Guía de Campo de Algunas Especies de Anfibios y Reptiles de Antioquia. *Conciencias, Universidad de Antioquia y Universidad Nacional de Colombia Sede Medellín.* Medellín, 136 pp.
- Palmer, W.M. 1993. Putting things in even better order: the advantages of canonical correspondence analysis. *Ecology* 74: 2215-2230.
- Pechmann, J. H. y H.M. Wilbur. 1994. Putting declining amphibian populations in perspective: natural fluctuations and human impacts. *Herpetologica* 50: 65-84.
- Peet, R.K. 1974. The measurement of species diversity. *Annual Review of Ecology and Systematics* 5:285-307.

- Peltzer, P. & R.C. Lajmanovich. 2004. Anuran tadpole assemblages in riparian areas of the Middle Parana River, Argentina. *Biodiversity and Conservation* 13:1833-1842.
- Peña, D. 2002. Análisis de datos multivariantes. McGraw-Hill, Madrid, 539 pp.
- Pisani, G.R. y J. Villa. 1974. Guía de técnicas de preservación de anfibios y reptiles. Society for the Study of Amphibians and Reptiles. Miscellaneous Pub. Herpetological Circular No 2.
- Pollock, K., J.D. Nichols, C. Brownie & J.E. Hines. 1990. Statistical inference for capture-recapture experiments. *Wildlife Monographs* 107:1-97.
- Pollock, K.H. 1982. A capture-recapture design robust to unequal probability of capture. *Journal of Wildlife Management* 46:757-760.
- Ponssa, M. L. 2004. Utilización espacial y temporal de una comunidad de anuros de Kent's Marsh (Gamboa, Panamá). *Revista Española de Herpetología* 18:5-18.
- Pounds, J.A., M.P.L. Fogden, J.M. Savage y G.C. Gorman. 1997. Tests of null models for amphibian declines on a tropical mountain. *Conservation Biology* 11: 1307-1322.
- Pounds, J.A., y M.L. Crump. 1994. Amphibian declines and climate disturbance: the case of the golden toad and the harlequin frog. *Conservation Biology* 8: 72-85.
- Rabinowitz, A.R. 1997. *Wildlife Field Research and Conservation Training Manual*. Wildlife Conservation Society, New York. 281 pp.
- Rand, A.S. 1988. An overview of anuran acoustic communication. Pp. 415-431. In: Fritsch, B., M.J. Ryan, W. Wilczynski, T.E. Hetherington y W. Walkowiak (eds.). *The Evolution of the Amphibian Auditory System*. John Wiley and Sons, Nueva York.
- Reid, D.G., C.J. Krebs & A.J. Kenney. 1997. Patterns of predation on non-cyclic lemmings. *Ecological Monographs* 67:89-108.
- Reynolds, J.B. 1983. Electrofishing. Pp. 147-163. En: Nielson, L.A. & D.L. Johnson (eds.). *Fisheries Techniques*, American Fisheries Society, Bethesda, MD. 468 p.
- Reynolds, R.P., R.I. Crombie y R.W. McDiarmid. 1994. Voucher specimens. Pp. 67 – 71. In : Heyer W.R., M.A. Donnelly, R.W. McDiarmid, L.C. Hayek y M.S. Foster. *Measuring and Monitoring Biological Diversity. Standard Methods for Amphibians*. Smithsonian Institution Press, Washington, 364 pp.
- Rödel, M.O. & R. Ernst 2004. Measuring and monitoring amphibian diversity in tropical forests. I. an evaluation of methods with recommendations for standardization. *Ecotropica* 10: 1–14.
- Rodenhouse, N.L., T.W. Sherry & R.T. Holmes. 1997. Site-dependent regulation of population size: a new synthesis. *Ecology* 78: 2025-2042.
- Roithmair, M.E. 1992. Territoriality and male mating success in the dart-poison frog *Epipedobates femoralis* (Dendrobatiidae, Anura). *Ethology* 92:331-343.
- Roithmair, M.E. 1994. Field studies on reproductive behaviour in two dart-poison frogs species (*Epipedobates femoralis*, *Epipedobates trivittatus*) in Amazonian Peru. *Journal of Herpetology* 4:77-85.
- Ron, S.R., W.E. Duellman, L.A. Coloma y M.R. Bustamante. 2003. Population decline of the Jambato toad *Atelopus ignescens* (Anura: Bufonidae) in the Andes of Ecuador. *Journal of Herpetology* 37: 116-126.

- Root, R.B. 1967. The niche exploitation pattern of the Blue-gray Gnatcatcher. *Ecological Monographs* 37:317-350.
- Rose, K.A. & E.P. Smith. 1992. Experimental design: The neglected aspect of environmental monitoring. *Environmental Management* 16:691-700.
- Rosenberg, P. y S. Palma. 2003. Cladóceros de los fiordos y canales patagónicos localizados entre el golfo de Penas y el estrecho de Magallanes. *Investigaciones Marinas* 31: 15-24.
- Routledge, R.D. 1979. Diversity indices: which ones are admissible?. *Journal of Theoretical Biology* 76:503-515.
- Rueda-Almonacid J.V., J.D. Lynch y A. Amézquita. 2004. Libro Rojo de los Anfibios de Colombia. Serie Libros Rojos de las Especies Amenazadas de Colombia. Conservación Internacional Colombia, Instituto de Ciencias Naturales-Universidad Nacional de Colombia, Ministerio del Medio Ambiente. Bogotá, Colombia, 384 pp.
- Ryan, M.J. 1988. Constraints and patterns in the evolution of anuran acoustic communication. Pp. 637-677. In: Fritsch, B., M. J. Ryan, W. Wilczynski, T.E. Hetherington y W. Walkowiak (eds.). *The Evolution of the Amphibian Auditory System*. John Wiley and Sons, Nueva York.
- Saitoh, T., O.N. Bjørnstad & N.C. Stenseth. 1999. Density dependence in voles and mice: a comparative study. *Ecology* 80:638-650.
- Scott, N. J. Jr. 1993. Postmetamorphic death syndrome. *Froglóg* 7:1-2.
- Scott, N. J., Jr. 1976. The abundance and diversity of the herpetofaunas of tropical forest litter. *Biotropica* 8:41-58.
- Scott, N.J. Jr. y A.L. Aquino-Shuster. 1989. The effects of freezing on formalin preservation of specimens of frogs and snakes. *Collection Forum* 5 (2): 41-46.
- Scrocchi, G. y S. Kretzschmar. 1996. Guía de métodos de captura de anfibios y reptiles para estudios científicos y manejo de colecciones herpetológicas. Miscelanea 102. Fundación Miguel Lillo. 45pp.
- Schmidt, B. R. 2004. Declining amphibian populations: the pitfalls of count data in the study of diversity, distributions, dynamics, and demography. *Herpetological Journal* 14: 167-174.
- Schmidt, B.R. 2003. Count data, detection probabilities, and the demography, dynamics, distribution, and decline of amphibians. *C. R. Biologies* 326: S119-S124.
- Seaman, J.W. y R.G. Jaeger. 1990. *Statisticae Dogmaticae: A Critical Essay on Statistical Practice in Ecology*. *Herpetologica* 46: 337-346.
- Seber, G.A.F. 1982. *The Estimation of Animal Abundance and Related Parameters*. 2d ed. MacMillan, New York, 672 pp.
- Seber, G.A.F. 1986. A review of estimating animal abundance. *Biometrics* 42:267-292.
- Sexton, O.J. 1960. Some aspects of behavior and of the territory of a dendrobatid frog, *Prostherapis trinitatis*. *Ecology* 41:107-115.
- Shaffer, H.B., R.A. Alford, B.D. Woodward, S.J. Richards, R.G. Altig, & C. Gascon. 1994. Quantitative sampling of amphibian larvae. Pp 130-141. En Heyer, W.R., M.A. Donnelly, R.W. McDiarmid, L.C. Hayek, & M.S. Foster (eds.). *Measuring and Monitoring Biological Diversity. Standard Methods for Amphibians*. Smithsonian Institution Press, Washington, D.C., 364 pp.

- Shoop, C.R. 1965. Aspects of reproduction in Louisiana *Necturus* populations. *American Midland Naturalist* 74: 357-367.
- Siegel, S. 1989. *Nonparametric Statistics for the Behavioral Sciences*. McGraw-Hill, Nueva York, 312 pp.
- Simmons, J.E. 2002. *Herpetological Collecting and Collections Management*. Herpetological Circular No 31. Society for the Study of Amphibians and Reptiles. 46pp.
- Simmons, J.E. y Y. Muñoz-Saba. 2005. *Cuidado, Manejo y Conservación de las Colecciones Biológicas. Serie Manuales de Campo. Conservación Internacional, Andes CBC, Bogotá*, 288 pp.
- Sjögren, G. P. 1994. Distribution and extinction patterns within a northern metapopulation of the pool frog, *Rana lessonae*. *Ecology* 75:1357-1367.
- Sokal, R.R. & F.J. Rohlf. 1981. *Biometry*. New York, Freeman.
- Song, J. y L.R. Parenti. 1995. Clearing and staining whole fish specimens for simultaneous demonstration for bone, cartilage and nerves. *Copeia* 1995(1): 114-118.
- Southwell, C. 1996. Estimation of population size and density when counts are incomplete. Pp. 193-210. En: Wilson, D.E., F.R. Cole, J.D. Nichols, R. Rudran & M.S. Foster (eds.). *Measuring and Monitoring Biological Diversity. Standard Methods for Mammals*. Smithsonian Institution Press, Washington, D.C., 409 pp.
- Speaks, C.E. 1996. *Introduction to Sound. Acoustics for the Hearing and Speech Sciences*. Second edition. Singular Publishing Group Inc., San Diego, California, 348 pp.
- Speare, R. 2003. Survival of *Batrachochytrium dendrobatidis* in water: quarantine and disease control implications. *Emerging Infectious Diseases*
- Stattersfield, A.J., M.J. Crosby, A.J. Long, y D.C. Wege. 1998. "Endemic Bird Areas of the World: Priorities for Biodiversity Conservation". *Birdlife Conservation Series No. 7*. Cambridge, Reino Unido.
- Steel, R.G.D. y J.H. Torrie. 1988. *Bioestadística: Principios y Procedimientos*. Segunda Edición. McGraw-Hill Interamericana de México, Mexico, D. F., 622 pp.
- Stenseth, N.C., O.N. Bjørnstad & W. Falck. 1996. Is spacing behavior coupled with predation causing the microtine density cycle? A synthesis of current process-oriented and pattern-oriented studies. *Proceedings of the Royal Society of London B* 263:1423-1435.
- Stuart, S.N., J.S. Chanson, N.A. Cox, B.E. Young, A.S.L. Rodrigues, D.L. Fischman y R.W. Waller. 2004. Status and trends of amphibian declines and extinctions worldwide. *Science* 306: 1783-1786.
- Stubs, M. 1977. Density dependence in the life-cycles of animals and its importance to K- and r-strategies. *Journal of Animal Ecology* 59:677-688.
- Suárez, A.V. y N.D. Tsutsui. 2004. The value of museum collections for research and society. *BioScience* 54(1): 66-74.
- Suárez-Mayorga, A. M., H. F. Rivera-Gutiérrez, A. Varón Londoño y N. A. Ramón. 2005b. Estándar para la documentación de registros biológicos, versión 5.0. Instituto de Investigación de Recursos Biológicos Alexander Von Humboldt, Bogotá, 64 pp.
- Suárez-Mayorga, A.M., R. Bernal y L.D. Cárdenas. 2005a. Estándar para

- intercambiar información sobre biodiversidad al nivel de organismos. Instituto de Investigación de Recursos Biológicos Alexander Von Humboldt, Bogotá, 26 pp.
- Swanson, B.J. 1998. Autocorrelated rates of change in animal populations and their relationship to precipitation. *Conservation Biology* 12: 801-808.
- Sztatecsny, M., R. Jehle, B.R. Schmidt & J.W. Arntzen. 2004. The abundance of premetamorphic newts (*Triturus cristatus*, *T. marmoratus*) as function of habitat determinants: An a priori model selection approach. *Herpetological Journal* 14:89-97.
- Ter Braak, C.J.F. 1985. Correspondence analysis of incidence and abundance data: Properties in terms of a unimodal responses model. *Biometrics* 41: 859-873.
- Ter Braak, C.J.F. 1986. Canonical Correspondence Analysis: A new eigenvector technique for multivariate direct gradient analysis. *Ecology* 67: 1167-1179.
- Thomas, C.D., A. Cameron, R.E. Green, M. Bakkenes, L.J. Beaumont, Y.C. Collingham, B.F.N. Erasmus, M.Ferreira de Siqueira, A. Grainger, L. Hannah, L. Hughes, B. Huntley, A.S. van Jaarsveld, G.F. Midgley, L. Miles, M.A. Ortega-Huerta, A. Townsend Peterson, O.L. Phillips, y S.E. Williams. 2004. Extinction risk from climate change. *Nature* 427: 145-148.
- Thomas, L. & F. Juanes. 1996. The importance of statistical power analysis: an example from Animal Behaviour. *Animal Behaviour* 52:856-859.
- Thompson, S. K. 2002. Sampling. Wiley series in probability and statistics. A Wiley-Interscience publication. John Wiley & Sons, Inc. 367 pp.
- Thompson, W., G.C. White & C. Gowan. 1998. Monitoring vertebrate populations. Academic Press, INC.
- Toft, C. A., Rand, A. S. y Clark, M. 1985. Population dynamics and seasonal recruitment in *Bufo typhonius* and *Colostethus nubicola* (Anura). En Leigh, E. G. Jr., Rand, A. S. y Windsor, D. M. (eds.) *The Ecology of a Tropical Forest. Seasonal Rhythms and Long-term Changes*. Smithsonian Institution Press, Washington.
- Toft, C.A. 1980. Seasonal variation in populations of Panamanian litter frogs and their prey: a comparison of wetter and drier sites. *Oecologia* 47:34-38.
- Tuomisto, H., K. Ruokolainen, R. Kalliola, A. Linna, W. Danjoy & Z. Rodríguez. 1995. Dissecting amazonian biodiversity. *Science* 5220:63-66.
- Turchin, P. & I. Hanski. 1997. An empirically based model for latitudinal gradient in vole population dynamics. *American Naturalist* 149:842-874.
- Turchin, P. & R.S. Ostfeld. 1997. Effects of density and season on the population rate of change in the meadow vole. *Oikos* 78:355-361.
- Turnipseed, G. & R. Altig. 1975. Population density and age structure of three species of hylid tadpoles. *Journal of Herpetology* 9:287-291.
- UICN – Comisión para la Supervivencia de las Especies, Center for Applied Biodiversity Science- Conservación Internacional y NatureServe. 2004. IUCN Global Amphibian Assessment. Recurso electrónico en internet: <http://www.globalamphibians.org>
- UICN – Unión Mundial para la Naturaleza. 2004. IUCN Red List of Threatened Species. Recurso electrónico en internet: <http://www.iucnredlist.org>

- Urbina, C.J.N. y M.M.C. Londoño. 2003. Distribución de la comunidad de herpetofauna asociada a cuatro áreas con diferentes grados de perturbación en la Isla Gorgona, Pacífico colombiano. *Revista de la Academia Colombiana de Ciencias* 27: 105-113.
- Vilella, F.J. & J.H. Fogarty. 2005. Diversity and Abundance of Forest Frogs (Anura: Leptodactylidae) before and after Hurricane Georges in the Cordillera Central of Puerto Rico. *Caribbean Journal of Science* 41:157-162.
- Villareal, H.M., M. Álvarez M., S. Córdoba, F. Escobar, G. Fagua, F. Gast, H. Mendoza, M. Ospina y A.M. Umaña. 2004. Manual de métodos para el desarrollo de inventarios de biodiversidad. programa de inventarios de biodiversidad. Instituto de Investigación de Recursos Biológicos Alexander Von Humboldt. Bogotá, Colombia, 235 pp.
- Vogt, R.C., y R. L. Hine. 1982. Evaluation of techniques for assessment of amphibian and reptile population in Wisconsin. Pp. 201-217. In: Scott, N. J., Jr. (ed.). *Herpetological communities: a symposium of the Society for the study of amphibians and reptiles and the Herpetologists' League*, August 1977. U.S. Fish & Wildlife Research Report 13, Washington, D.C., 239 pp.
- Waldron, J.L., D.C. Kenneth. Y J.D. Corser. 2003. Leaf litterbags: Factors affecting capture of stream-dwelling salamanders. *Applied Herpetology* 1: 23-36.
- Walker, R.S., A.J. Novarro & J.D. Nichols. 2000. Consideraciones para la estimación de abundancia de poblaciones de mamíferos. *Journal of Neotropical Mammalogy*. 7:73-80.
- Wassersug, R.J. 1975. The adaptive significance of the tadpole stage with comments on the maintenance of complex life cycles in anuran. *American Zoologist* 15:405-417.
- Wassersug, R.J. 1991. On assessing environmental factors affecting survivorship of premetamorphic amphibians. Pp 53-59. En Bishop, C.A. & K.E. Pettit (eds.). *Declines in Canadian Amphibian Populations: Designing a National Monitoring Strategy*. Occasional Papers of the Canadian Wildlife Service N° 76.
- Watanabe, S., N. Nakanishi & M. Izawa. 2005. Seasonal abundance in the floor-dwelling frog fauna on Iriomote Island of the Ryukyu Archipelago, Japan. *Journal of Tropical Ecology* 21: 58-91.
- Weldon, C. y L.H. du Preez. 2004. Decline of the Kihansi Spray Toad, *Nectophrynoides asperginis*, from the Udzungwa Mountains, Tanzania. *Froglog* 62: 2-3.
- Wellington, R. & R. Hearing. 2001. Hygiene protocol for the control of disease in frogs. Information Circular Number 6. NSW NPWS. Hurstville NSW.
- Welsh, H.H. y A. Lind. 1996. Habitat correlates of the Southern Torrent Salamander, *Rhyacotriton variegatus* (Caudata: Rhyacotritonidae), in northwestern California. *Journal of Herpetology* 30: 385-398.
- Welsh, H.H. y A.Lind. 1995. Habitat correlates of the Del Norte Salamander, *Plethodon elongatus* (Caudata: Plethodontidae), in northwestern California. *Journal of Herpetology* 29: 198-210.
- Wells, H.H. y L.M. Olliver. 1998. Stream amphibians as indicators of ecosystem stress: a case study from California's redwoods. *Ecological Applications* 8: 1118-1132.



- Wells, K.D. 1980a. Social behavior and communication of a dendrobatid frog (*Colostethus trinitatis*). *Herpetologica* 36:189-199.
- Wells, K.D. 1980b. Behavioral ecology and social organization of dendrobatid frogs (*Colostethus inguinalis*). *Behavioral Ecology and Sociobiology*.6:199-209.
- Wickstrom, D.C. 1982. Factors to consider in recording avian sounds. Pp. 1-52. In: Kroodsma, D. E., E. H. Miller y H. Ouellet. (eds.). *Acoustic Communication in Birds*. Academic Press, Nueva York.
- Wilbur, H.M. 1980. Complex life cycles. *Annual Review of Ecology and Systematics* 11:67-93.
- Wild, E.R. 1996. Natural history and resource use of four Amazonian tadpole assemblages. *Occasional Papers of Natural History Museum of University of Kansas* 176:1-59.
- Wilson, D.E., F.R. Cole, J. Nichols, D.R. Rudran & M. Foster. 1996. *Measuring and Monitoring Biological Diversity. Standard Methods for Mammals*. Smithsonian Institution Press, Washington, D.C., 409 pp.
- Williams, A.K. & J. Berkson. 2004. Reducing false absences in survey data: Detection probabilities of Red-backed Salamanders. *Journal of Wildlife Management* 68:418-428.
- Williams, R.D., J.E. Gates & C.H. Hocutt. 1981. An evaluation of known and potential sampling techniques for Hellbender, *Cryptobranchus alleganiensis*. *Journal of Herpetology* 15:23-27.
- Wolff, J.O. 1997. Population regulation in mammals: an evolutionary perspective. *Journal of Animal Ecology* 66:1-13.
- Wright, K.M. y B.R. Whitaker. 2001. *Amphibian Medicine and Captive Husbandry*. Krieger Publishing Company, Malabar, Florida, 499 pp.
- Young, B.E., K.R. Lips, J.K. Reaser, R. Ibáñez, A.W. Salas, J.R. Cedeño, L.A. Coloma, S. Ron, E. La Marca, J.R. Meyer, A. Muñoz, F. Bolaños, G. Chaves y D. Romo. 2001. Population declines and priorities for amphibian conservation in Latin America. *Conservation Biology* 15:1213-1223.
- Zar, J.H. 1999. *Biostatistical Analysis*. Prentice Hall, New Jersey. 663 pp.
- Zucarro, G. & L. Bulla. 1985. Estudio comparativo de la entomofauna en cuatro sabanas venezolanas. *Acta Científica Venezolana* 36:365-372.
- Zug, G.R., L.J. Vitt & J.P. Caldwell. 2001. *Herpetology. An Introductory Biology of Amphibians and Reptiles*. Academic Press, San Diego. 630 p.
- Zweifel, R.G. 1959. Effect of temperature on call of the frog, *Bombina variegata*. *Copeia* 1959:322-327.
- Zweifel, R.G. 1968. Effects of temperature, body size, and hybridization on mating calls of toads, *Bufo a. americanus* and *Bufo woodhousii fowleri*. *Copeia* 1968: 269-285.

# Recursos/fuentes de información de Internet

## Estado global de los anfibios

AmphibiaWeb <http://elib.cs.berkeley.edu/aw/>

Amphibian Species of the World <http://research.amnh.org/herpetology/amphibia/index.php>

Declining Amphibian Populations Task Force (DAPTF) <http://www.open.ac.uk/daptf/index.htm>

Evaluación Global de los Anfibios (GAA) <http://www.globalamphibians.org/>

Red de Análisis para los Anfibios Neotropicales Amenazados (RANA) <http://rana.biologia.ucr.ac.cr/>

Unión Mundial para la Naturaleza (UICN) <http://www.uicn.org/>

## Bioacústica

### General:

Acoustical Society of America [http://asa.aip.org/ani\\_bioac/](http://asa.aip.org/ani_bioac/)

Biblioteca de Sonidos de las Aves de México <http://www.ecologia.edu.mx/sonidos/>

Bioacoustics <http://www.zi.ku.dk/zi/bioacoustics/homepage.html>

Borror Laboratory of Bioacoustics <http://blb.biosci.ohio-state.edu/>

Cornell Laboratory of Ornithology <http://birds.cornell.edu/brp/>

Mannell, R. 2004. Speech Acoustics. Basic Acoustics Main Page. [www.ling.mq.edu.au/speech/acoustics/basic\\_acoustics/whatisound.html](http://www.ling.mq.edu.au/speech/acoustics/basic_acoustics/whatisound.html)

### Grabaciones en campo y equipo:

The British Library <http://www.bl.uk/collections/sound-archive/wiltrain.html>

Macaulay Library <http://www.birds.cornell.edu/MacaulayLibrary/Contribute/>

Naturesongs <http://www.naturesongs.com/Sounds.html>

Università degli Studi di Pavia [http://www.unipv.it/cibra/edu\\_equipment\\_uk.html](http://www.unipv.it/cibra/edu_equipment_uk.html)

Nature Recordists [naturerecordists@yahoo.com](mailto:naturerecordists@yahoo.com)

### Monitoreo acústico:

Digital froglogger <http://froglogger.coquipr.com>

M.-O. Rödel & R. Ernst [http://www.biozentrum.uni-wuerzburg.de/zoo3/MO\\_Roedel/Standard\\_Methods%20web\\_Dateien/standard\\_methods\\_for\\_monitoring.htm](http://www.biozentrum.uni-wuerzburg.de/zoo3/MO_Roedel/Standard_Methods%20web_Dateien/standard_methods_for_monitoring.htm) (tiene una sección acerca de monitoreo acústico, el tema general son métodos estandarizados para monitorear comunidades de anuros en bosques tropicales)

TEAM Initiative [http://www.teaminitiative.org/application/resources/pdf/acoustic\\_11\\_04\\_04.pdf](http://www.teaminitiative.org/application/resources/pdf/acoustic_11_04_04.pdf)

United States Geological Service [http://cars.er.usgs.gov/posters/Herpetology/Automated\\_Acoustic\\_Sampling/automated\\_acoustic\\_sampling.html](http://cars.er.usgs.gov/posters/Herpetology/Automated_Acoustic_Sampling/automated_acoustic_sampling.html)

University of Georgia <http://uga.edu/srel/logger.htm>

### Teoría:

Blackwell Publishing [http://www.blackwellpublishing.com/content/BPL/Images/Content\\_store/Sample\\_chapter/1405101237/001.pdf](http://www.blackwellpublishing.com/content/BPL/Images/Content_store/Sample_chapter/1405101237/001.pdf)

Davide Rocchesso <http://www.faqs.org/docs/sp/index.html>

Macquarie University [http://www.ling.mq.edu.au/speech/acoustics/basic\\_acoustics/whatisound.html](http://www.ling.mq.edu.au/speech/acoustics/basic_acoustics/whatisound.html)

Marshall Chasin <http://www.chass.utoronto.ca/linguistics/LIN323H1F/Lecture%201.pdf>

Sydney VisLab <http://oldsite.vislab.usyd.edu.au/CP3/Four1/node3.html>

Algunos de los programas más utilizados:

Adobe Audition (ex Cool Edit, PC) <http://www.adobe.com/products/audition/main.html>

Audacity (freeware, PC, Mac, Linux) <http://audacity.sourceforge.net>

Avisoft (versión freeware, PC) <http://www.avisoft-saslab.com/>

Canary (Mac) <http://birds.cornell.edu/brp/CanaryInfo.html>

DADiSP (PC) <http://www.dadisp.com/products.htm>

Praat (freeware, PC, Mac, Linux) <http://www.fon.hum.uva.nl/praat/>

Raven (PC y Mac) <http://birds.cornell.edu/brp/Raven/Raven.html>

Signalyze (Mac) <http://www.signalyze.com/>

Sound Edit Pro (PC) <http://www.audioutilities.com/sound-edit/sound-edit.htm?souce=gg>

Sound Ruler (freeware, PC) <http://soundruler.sourceforge.net/>

Syrinx (freeware, PC) <http://syrinxpc.com/>

Varios (página de Steve Hopp) <http://eebweb.arizona.edu/faculty/hopp/sound.htm>

Varios <http://www.measure.demon.co.uk/software.html>

Cardiff University <http://www.cs.cf.ac.uk/Dave/Multimedia/node149.html>

eFunda [http://www.efunda.com/designstandards/sensors/methods/DSP\\_nyquist.cfm](http://www.efunda.com/designstandards/sensors/methods/DSP_nyquist.cfm)

SuperLogics <http://www.superlogics.com/signal-conditioning-anti-alias-filtering/27.htm>

Sygnalyze <http://www.signalyze.com/documentation/antialiasingNotice.html>

Tontechnik-Rechner <http://www.sengpielaudio.com/calculator-waves.htm>

Wikipedia [http://en.wikipedia.org/wiki/Nyquist-Shannon\\_sampling\\_theorem](http://en.wikipedia.org/wiki/Nyquist-Shannon_sampling_theorem)

## Algunos de los proveedores de equipo más utilizados:

AKG [http://www.akg.com/akg\\_structurtree/powerslave,id,1,\\_language,EN.html](http://www.akg.com/akg_structurtree/powerslave,id,1,_language,EN.html)

Brüel & Kjær [http://www.bkhome.com/bk\\_home.asp](http://www.bkhome.com/bk_home.asp)

Daqarta <http://www.daqarta.com/>

DST <http://www.peerless.dk/>

Larson Davis <http://www.lardav.com/>

Marantz [http://www.marantz.com/index\\_he.htm](http://www.marantz.com/index_he.htm)

Nagra <http://www.nagraaudio.com/>

Racal <http://www.racalstruments.com/>

Radio Shack <http://www.radioshack.com/>

Sennheiser <http://www.sennheiser.com/sennheiser/icm.nsf>

Shure <http://www.shure.com/>

Sony <http://www.sony.com/>

Sound Devices <http://www.sounddevices.com/>

Tascam <http://www.tascam.com>

Telinga <http://user.bahnhof.se/~telinga/>

Tucker-Davis Technologies <http://www.tdt.com/>

Uher <http://www.uher.com/>

## Preparación, preservación y material científico

Diccionario. [www.uc.cl/quimica/agua/glos2.htm](http://www.uc.cl/quimica/agua/glos2.htm).

The Dictionary of Ecology and Environmental Science. 1993. Henry W. Art (ed).

Publicado por Henry Holt y Compañía, Inc. Pownal, Vermont. [biology.usgs.gov/s+t/noframe/z999.htm](http://biology.usgs.gov/s+t/noframe/z999.htm)

Echeverry, W. 2000. Docencia Nacional Cruz Roja Colombiana.

[docenc.tripod.com/primeros\\_auxilios/glosario.htm](http://docenc.tripod.com/primeros_auxilios/glosario.htm)

EducarChile, portal de educación. Glosario. [www.educarchile.cl/eduteca/bdrios/sitio/glosario/glosario.htm](http://www.educarchile.cl/eduteca/bdrios/sitio/glosario/glosario.htm)

Fuentes, J.L., P. Torres-García y M. Frías. El océano IX. La pesca. [omega.ilce.edu.mx:3000/sites/ciencia/volumen2/ciencia3/081/htm/sec\\_18.htm](http://omega.ilce.edu.mx:3000/sites/ciencia/volumen2/ciencia3/081/htm/sec_18.htm)

Glosario. [www.terra.es/personal7/jjdeharo/entomologia/dicc.htm](http://www.terra.es/personal7/jjdeharo/entomologia/dicc.htm)

Glosario. [www.cucaiba.gba.gov.ar/Glosario.htm](http://www.cucaiba.gba.gov.ar/Glosario.htm)

Instituto de Investigación de Recursos Biológicos Alexander Von Humboldt. Glosario.

<http://www.humboldt.org.co/chmcolombia/servicios/jsp/glosario/ListarTerminos3.jsp?termino=lectotipo&desde=0&hasta=10>

- Instituto Químico Biológico. Diccionario. [www.iqb.es/diccio/t/tabla.htm](http://www.iqb.es/diccio/t/tabla.htm)
- International Development Research Centre. Glosario. [web.idrc.ca/es/ev-30231-201-1-DO\\_TOPIC.html](http://web.idrc.ca/es/ev-30231-201-1-DO_TOPIC.html)
- Monaca. Cocina. [www.monaca.com.ve/recetas/glosario.asp](http://www.monaca.com.ve/recetas/glosario.asp)
- Pan American Health Organization. Dictionary. [www.paho.org/Spanish/AD/THS/EV/labs-CGC-MOD6.pdf](http://www.paho.org/Spanish/AD/THS/EV/labs-CGC-MOD6.pdf)
- Real Academia Española (RAE). 2001. Diccionario de la lengua española, vigésimo segunda edición. [www.rae.es](http://www.rae.es)
- Sistema de información sobre la biodiversidad de Colombia. [www.siac.net.co/sib/WebModule/tesauros.jsp](http://www.siac.net.co/sib/WebModule/tesauros.jsp)
- Wikipedia enciclopedia libre. Glosario. [www.ieg.csic.es/tutorvr/glosario.htm](http://www.ieg.csic.es/tutorvr/glosario.htm)

## Diseño experimental & Análisis estadístico

Compilación de recursos para análisis estadísticos en ecología:

<http://www.rsmas.miami.edu/personal/djones/ecol.htm>

Compilación general de recursos para análisis estadísticos:

<http://soldzresearch.com/statisticsresources.htm>

Manuales electrónicos de estadística básica o avanzada:

<http://abacus.bates.edu/~ganderso/biology/resources/statistics.html>

<http://davidmlane.com/hyperstat/>

<http://www.statsoft.com/textbook/stathome.html>

Pierre Legendre (programas para el análisis de datos ecológicos)

[www.bio.umontreal.ca/legendre/index.html](http://www.bio.umontreal.ca/legendre/index.html)

Programas no gratuitos para el análisis estadístico de datos circulares (p.ej. hora del día, azimuth, mes del año):

<http://www.rockware.com/catalog/pages/oriana.html>

<http://www.pazsoftware.com/VectorRose.html>

Programas de distribución gratuita para el análisis estadístico de datos:

<http://members.aol.com/johnp71/javasta2.html>

<http://freestatistics.altervista.org/stat.php>

Proyecto R (ambiente de programación gratuito para el análisis estadístico)

<http://www.r-project.org/>

## Técnicas para el inventario y muestreo de anfibios: una compilación

Amphibian Diseases Home Page <http://www.jcu.edu.au/dept/PHTM/frogs/am-pdis.htm>

Bibliography of Amphibian Diseases <http://www.jcu.edu.au/school/phtm/PHTM/frogs/bibliog.htm>

- Declining Amphibian Populations Task Force [http://www.open.ac.uk/OU/Academic/Biology/J\\_Baker/JBtxt.htm](http://www.open.ac.uk/OU/Academic/Biology/J_Baker/JBtxt.htm)
- Department of the Environment and Heritage, Australia <http://www.biodiversity.environment.gov.au/threaten/information/frogs/frogs.pdf>  
<http://www.deh.gov.au/biodiversity/invasive/publications/c-disease/>
- National Biological Information Infrastructure: Frogweb <http://frogweb.nbi.gov/>
- UC Berkeley Briggs NIH Group (protocolo de toma de muestra de frotis) [http://elib.cs.berkeley.edu/aw/chytrid/swab\\_instruction.pdf](http://elib.cs.berkeley.edu/aw/chytrid/swab_instruction.pdf)
- United States Geological Survey [www.mesc.usgs.gov/research/rarmi/rarmi\\_amphibdisease.asp](http://www.mesc.usgs.gov/research/rarmi/rarmi_amphibdisease.asp)  
<http://www.iespana.es/naumkreiman/anexo.htm>
- Graphpad Software  
<http://www.graphpad.com/quickcalcs/randomN1.cfm>
- Partnership for Kentucky Schools  
[http://www.pfks.org/toolkits/tutv/iii\\_e.html](http://www.pfks.org/toolkits/tutv/iii_e.html)
- Research Randomizer  
<http://www.randomizer.org/form.htm>
- Marcado de ejemplares con elastómeros biocompatibles fluorescentes  
<http://www.nmt-inc.com>

## Monitoreo de anfibios

- Center for Conservation Biology (CCB) Stanford University <http://www.stanford.edu/group/CCB/Eco/resources.htm>
- Ecological Assessment and Monitoring Network (EMAN) Environment Canada. Protocols for monitoring organisms of terrestrial ecosystems <http://www.cciw.ca/eman-temp/research/protocols/terrestrial>
- The Amphibians Research and Monitoring Initiative (ARMI). <http://armi.usgs.gov>  
 Biodiversity Monitoring--Status and Trends, <http://www.pwrc.nbs.gov/stbi03.htm>
- The North American Amphibian Monitoring Program (<http://www.pwrc.usgs.gov/naamp>)
- MAYAMON. Maya Forest Anuran Monitoring Project. Proyecto de Monitoreo de los Anuros de la Selva Maya [http://fwie.fw.vt.edu/mayamon/maya\\_home.html](http://fwie.fw.vt.edu/mayamon/maya_home.html)
- Moreno, C.E. 2001. Métodos para medir la biodiversidad. M&T--Manuales y Tesis SEA, vol.1. Zaragoza, 84 pp. <http://entomologia.rediris.es/sea/manytes/metodos.pdf>
- United States Geological Survey (USGS). Patuxent Wildlife Research Center. Power analysis and monitoring <http://www.im.nbs.gov/powcase/powcase.html>
- En el sitio web <http://www.stanford.edu/group/CCB/Eco/popest.htm> se pueden obtener algunos programas sobre métodos para estimar poblaciones vegetales y animales y varios programas de computación para facilitar los cálculos.

# Glosario

- Abundancia relativa:** Representación proporcional de las especies en una muestra.
- Abundancia:** En términos generales, una estimación cuantitativa de la cantidad de individuos de una especie que se encuentran en un área determinada. La restricción de área implica que en la mayoría de estudios, abundancia y densidad sean considerados sinónimos. La abundancia de una especie puede ser una característica inherente a su historia natural, o la consecuencia de cambios en las condiciones ambientales.
- Acrónimo:** (Etimología: del griego akros, punta o extremo y ónoma, nombre). Palabra formada por las iniciales, y a veces por más letras, de otras palabras. Ej: RENFE: Red Nacional de Ferrocarriles Españoles([www.rae.es](http://www.rae.es)).
- Adenocarcinoma renal de Lucké:** Es un tumor maligno que afecta principalmente al complejo rana leopardo Rana pipiens y que es causado por un herpesvirus.
- ADN:** Es un ácido nucleico que transporta la información genética en la célula y es capaz de auto replicarse y de sintetizar ARN (ácido Ribonucleico) ([www.cert-id.com/es/industry\\_industry\\_glossary.htm](http://www.cert-id.com/es/industry_industry_glossary.htm)).
- Aeromonas:** Un género de bacteria Gram negativa, motil y con flagelos bipolares, común en ambientes acuáticos. *Aeromonas hydrophila* is muy ubicua en ambientes acuáticos y puede ser considerada como un patógeno primario, pero principalmente es secundario y de gran importancia en anfibios y peces.
- Agente infeccioso:** Cualquier agente de origen viral, bacteriano o parasitario capaz de ser transmitido y causar enfermedad.
- Alcohol etílico:** Es el alcohol que se encuentra en las bebidas alcohólicas. Es un líquido incoloro e inflamable con un punto de ebullición de 78°C. Se mezcla con agua en cualquier proporción y da una mezcla antrópica con un contenido de aprox. el 96% de etanol. Su fórmula química es C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>OH (es.wikipedia.org/wiki/Alcohol\_et%C3%ADlico).
- Alcohol metílico:** Es el alcohol más sencillo, y es un líquido ligero, volátil, incoloro, inflamable y tóxico que se emplea como anticongelante, disolvente y combustible. Su fórmula química es CH<sub>3</sub>OH. Su estructura molecular es: H | H-C-OH | H (es.wikipedia.org/wiki/Alcohol\_met%C3%ADlico).
- Aleatorio:** Variable que puede tomar un valor cualquiera de un conjunto especificado, con una probabilidad que expresa, para este valor particular, la fracción del número total de valores en que puede presentarse.
- Aleatorización:** Se refiere al proceso mediante el cual se eligen individuos (objetos, unidades de análisis, datos) de entre grupos, de manera tal que cada uno de los objetos tiene la misma probabilidad de ser elegido. Entre los procedimientos que permiten la escogencia aleatoria se encuentran el uso de datos, cartas, tablas de números aleatorios, calculadoras (función rnd o rn), o computadores.
- Alelos:** Formas o variantes de un gen, que pueden variar en sus secuencias o diferir en sus funciones.
- Amplitud:** Desplazamiento que una partícula del medio experimenta en relación al nivel de presión normal.

**Anestésico:** Un anestésico es cualquier supresor del dolor ([es.wikipedia.org/wiki/Anest%C3%A9sico](http://es.wikipedia.org/wiki/Anest%C3%A9sico)).

**Antrópico:** Este término engloba cualquier acción humana sobre el medio natural. (factor antrópico, causa antrópica, intervención antrópica) ([www.ieg.csic.es/tutorvr/glosario.htm](http://www.ieg.csic.es/tutorvr/glosario.htm)).

**Arteria femoral:** La arteria femoral es una arteria del muslo. Proviene y es continuación de la iliaca externa, que se convierte en femoral después de pasar el ligamento inguinal. Se distribuye por la porción inferior de la pared abdominal, porción superior del muslo, genitales, rodilla y pierna ([es.wikipedia.org/wiki/Arteria\\_femoral](http://es.wikipedia.org/wiki/Arteria_femoral)).

**Atenuación:** Disminución de la intensidad de una señal con el incremento de la distancia de transmisión de la misma.

**Autólisis:** Rompimiento químico de la célula, generalmente bajo la influencia de enzimas, o por la reproducción de virus dentro de la célula ([omega.ilce.edu.mx:3000/sites/ciencia/volumen2/ciencia3/081/htm/sec\\_18.htm](http://omega.ilce.edu.mx:3000/sites/ciencia/volumen2/ciencia3/081/htm/sec_18.htm)).

**Bacteremia:** Circulación de la bacteria patógena en sangre del huésped causando enfermedad.

**Biocida:** Compuesto venenoso que daña o mata a organismos vivos ([www.educarchile.cl/eduteca/bdrios/sitio/glosario/glosario.htm](http://www.educarchile.cl/eduteca/bdrios/sitio/glosario/glosario.htm)).

**Biodiversidad:** Es la variedad y variabilidad de los organismos vivos, tanto silvestres como domésticos, y los ecosistemas de los que forman parte, es un concepto que se ha impuesto en el campo de la conservación por su carácter globalizador, dada la necesidad de tratar a la naturaleza como un todo y de mantener la totalidad de sus compo-

nentes ([www.terra.es/personal7/jdeharo/entomologia/dicc.htm](http://www.terra.es/personal7/jdeharo/entomologia/dicc.htm)).

**Bioseguridad:** Todos aquellos procedimientos utilizados para intentar prevenir la exposición a patógenos (vehiculados a través de la sangre y fluidos contaminados) por vía parenteral, mucosas y piel no intacta, aplicados a todos los pacientes ([www.cucaiba.gba.gov.ar/Glosario.htm](http://www.cucaiba.gba.gov.ar/Glosario.htm)).

**Bondad de ajuste:** Se refiere al conjunto de pruebas estadísticas cuyo principal propósito es establecer si la distribución de un conjunto de datos se ajusta suficientemente bien a otra distribución, teórica o práctica.

**Campos cercanos:** Campos inmediatos al generador de sonido, donde la onda se transmite de manera compleja.

**Campos lejanos:** Campos a una longitud de onda o más del generador de sonido, donde el comportamiento de la onda suele ser más sencillo que en campos cercanos.

**Campos libres:** Campos acústicos donde no hay sonidos redireccionados.

**Capacitancia:** Es la razón de la magnitud de la carga en uno u otro de dos conductores de signos opuestos con la diferencia de potencial resultante entre ambos conductores ([http://www.itlp.edu.mx/publica/tutoriales/electymagnet/tem3\\_2\\_.htm](http://www.itlp.edu.mx/publica/tutoriales/electymagnet/tem3_2_.htm)).

**Capilaria:** Parásito nemátodo con ciclo directo que habita la piel de varias especies de anfibios y que puede causar alta morbilidad y mortalidad en colecciones en cautiverio.

**Cavidad celómica o celoma:** Cavidad en todos los animales superiores a los celenterados y ciertos gusanos primitivos, formada por la división del mesodermo en dos capas. En ma-



míferos forma la pleura, el peritoneo y el pericardio.

**Ciclo de vida:** La secuencia de estadios de desarrollo por las cuales pasan los organismos vivos.

**Confusión de efectos:** Se trata de un problema en el análisis de experimentos en el que la variación en una característica (p.ej. tasa de crecimiento de una planta) es atribuida a un supuesto factor (p.ej. adición o no de un nutriente) cuando es perfectamente atribuible a otro factor (p.ej. la calidad del suelo) que covarió con el primero.

**Contaminación:** Fenómeno de introducción de una sustancia con efectos nocivos en un medio dado.

**Coproparasitoscópico:** Examen de laboratorio que identifica parásitos adultos y sus fases larvarias en heces fecales.

**Criotubo:** Son tubos para congelar muestras en los cuales se guardan muestras biológicas (suero, sangre, cepas, células) dentro de congeladores ([www.paho.org/Spanish/AD/THS/EV/labs-CGC-MOD6.pdf](http://www.paho.org/Spanish/AD/THS/EV/labs-CGC-MOD6.pdf)).

**Cuadrantes:** Cada una de las unidades espaciales, usualmente en forma de cuadrado o rectángulo, que se delimita y utiliza para realizar un muestreo o medir características del microhábitat. Aunque su uso más frecuente es en relación con el suelo o el lecho de cuerpos de agua, el concepto puede extenderse en la dimensión vertical para muestrear áreas en forma de cubo.

**Cutánea:** Relacionado a la piel.

**Chytridiomycete:** Los miembros del filo Chytridiomycetes (Chytridiomycota) son considerados parientes cercanos de los oomicetes. En algunos sistemas de clasificación se incluyen en el reino Protistas, en lugar de situarlos

con los hongos. Pequeñas formas de vida simple ([es.wikipedia.org/wiki/Chytridiomycetes](http://es.wikipedia.org/wiki/Chytridiomycetes)).

**Datalogger:** Transcriptor de datos digital de humedad y temperatura, que puede ser acoplado a una computadora.

**Densidad absoluta:** Número de organismos o su biomasa por unidad de área o volumen. La densidad absoluta puede ser cruda, cuando se refiere a una unidad espacial cualquiera habitable o no, o puede ser específica, si se refiere a una unidad de espacio habitable.

**Densidad relativa:** El número de organismos de una población relativo al número de organismos de otra población (por ejemplo, 1 salamandra por cada diez ranas).

**Deriva génica:** Fuerza evolutiva estocástica que actúa alterando la frecuencia de los alelos y la predominancia de los caracteres de los miembros de una población, puede actuar en conjunto con la selección natural. Su acción se ve acentuada en poblaciones pequeñas.

**Dermatitis:** Inflamación de la dermis, una de las capas de la piel.

**Derméstidos:** Coleópteros de la familia Dermestidae.

**Descalcificación:** Proceso de pérdida de calcio.

**Diafanización/Transparentado:** Proceso de aclaración, donde el tejido se torna transparente o claro en el xileno, esto se debe a que cambia su índice de refracción.

**Disminución:** Reducción o decremento.

**Distal:** Dícese de las áreas más separadas (distantes) del centro del cuerpo. Lejos de la articulación de una extremidad al tronco; lejos del punto de origen,

las falanges son distales de los huesos carpianos ([www.iqb.es/diccio/t/tabla.htm](http://www.iqb.es/diccio/t/tabla.htm)).

**Distorsión:** Alteraciones indeseadas en una señal acústica.

**Distribución (geográfica):** La extensión o área ocupada por un grupo de organismos.

**Distribución normal:** Curva matemáticamente definida, en forma de campana, resultante de la marcación de las frecuencias de ocurrencia de valores de un elemento (eje de las Y) contra la amplitud de los valores del elemento (eje de las X). Una distribución normal se describe únicamente por su media y su desviación estándar.

**Diversidad:** Cantidad y proporción de los diferentes elementos biológicos que contenga un sistema. En forma operativa puede ser definida como una medida de la heterogeneidad de un sistema.

**Duración del canto:** Tiempo transcurrido desde el inicio de la señal hasta su término, cuando regresa a niveles base de sonido ambiental.

**Duración del pulso:** Tiempo transcurrido desde el inicio del pulso hasta su término.

**Ectoparásito:** Parásito externo, principalmente un ácaro, garrapata o piojo que afecta a los anfibios.

**Edema:** Presencia de grandes cantidades anormales de líquido en los espacios intercelulares de los tejidos del cuerpo.

**EDTA:** Ácido EtilenDiaminoTetraAcético. Puede coordinar a metales de transición de forma reversible. Puede coordinar por cuatro posiciones acetato y dos amino, lo que lo convierte en un ligando hexadentado,

y el más importante de los ligandos quelatos. Se utiliza en algunos medios de cultivo unido al hierro, para liberar éste lentamente en el medio, y también en algunos análisis cuantitativos ([es.wikipedia.org/wiki/EDTA](http://es.wikipedia.org/wiki/EDTA)).

**Efecto de borde:** El conjunto de los efectos de la matriz sobre el fragmento se conoce como “efecto de borde”, el cual se puede manifestar en cambios al interior del fragmento, principalmente en su perímetro. El efecto de borde puede definirse como el resultado de la interacción de dos ecosistemas adyacentes o cualquier cambio en la distribución de una variable dada que ocurre en la transición entre hábitats

**Endémico:** Restringido a una región o localidad específica, en su hábitat natural; aplica a organismos y ecosistemas ([www.educarchile.cl/eduteca/bdrios/sitio/glosario/glosario.htm](http://www.educarchile.cl/eduteca/bdrios/sitio/glosario/glosario.htm)).

**Endemismo:** Especie cuya ocurrencia se restringe a una única localidad.

**Endoparásito:** Parásito interno que se aloja en cualquier sistema de un organismo tal como lo son los helmintos, que incluyen nemátodos (gusanos redondos), céstodos (gusanos planos), tremátodos (sanguijuelas) y acantocéfalos.

**Enlace covalente:** Fuerza que mantiene unido a dos o más átomos compartiendo sus electrones ([www.uc.cl/quimica/agua/glos2.htm](http://www.uc.cl/quimica/agua/glos2.htm)).

**Epidemiología:** Rama de las ciencias biomédicas que estudia las relaciones de los factores que determinan la frecuencia y distribución de un proceso infeccioso, enfermedad o estado fisiológico de una comunidad humana o animal.

**Epidermis:** Capa externa de la piel formada por queratina.

- Epinefrina:** La adrenalina, también llamada epinefrina, es una hormona vasoactiva secretada por las glándulas suprarrenales en situaciones de alerta. Se diferencia de la norepinefrina o noradrenalina en que ésta es un neurotransmisor, por lo tanto su efecto es más rápido y corto (es.wikipedia.org/wiki/Epinefrina).
- Eritema:** Enrojecimiento de la piel causada por incremento del flujo sanguíneo en los capilares.
- Eritrocítico:** Relacionado a los eritrocitos, los glóbulos rojos de la sangre.
- Error de muestreo:** Toda variación en una característica (atributo, variable) atribuible a errores durante el proceso de muestreo por el hecho de seleccionar una muestra “representativa” de la población. Puede disminuirse aumentando el tamaño de la muestra.
- Error Tipo I:** También mal llamado error tipo alfa (alfa es la probabilidad de que ocurra este error), es el error que se comete cuando el investigador rechaza la hipótesis nula ( $H_0$ ) siendo ésta verdadera en la población. Es equivalente a encontrar un resultado falso positivo, porque el investigador llega a la conclusión de que existe una diferencia entre las hipótesis cuando en realidad no existe.
- Error Tipo II:** También llamado error tipo beta (aunque beta es la probabilidad de que exista éste error), se comete cuando el investigador no rechaza la hipótesis nula siendo ésta falsa en la población. Es equivalente a la probabilidad de un resultado falso negativo, ya que el investigador llega a la conclusión de que ha sido incapaz de encontrar una diferencia que existe en la realidad. Se acepta en un estudio que el valor del error beta debe estar entre el 5 y el 20%.
- Error:** En la jerga estadística, se refiere a toda aquella variación en una característica (atributo, variable) que no puede ser explicada por las variables predictoras incluidas en el estudio.
- Esfuerzo de muestreo:** Trabajo, costo o tiempo invertido en efectuar un muestreo.
- Espectro de poder:** Representación gráfica que permite observar la relación entre amplitud (eje de las  $y$ ) y frecuencia (eje de las  $x$ ).
- Espectrograma:** Representación gráfica que permite observar la descomposición de las diferentes frecuencias de una señal (eje de las  $y$ ) en el transcurso del tiempo (eje de las  $x$ ).
- Estadio larval:** Fase juvenil de desarrollo en el ciclo de vida de un organismo con metamorfosis.
- Estandarizar:** Establecer un modelo estándar, normalizar, unificar.
- Estimador:** Parámetro característico de una población entre la que se ha efectuado un muestreo.
- Estrato:** Porción de terreno, hábitat o un subconjunto de características homogéneas.
- Exactitud:** Medida de cuán cerca se halla una estimación de su valor real.
- Ex-situ:** Removido de su localidad de presencia original; en el caso de conservación ex situ, se trata de la preservación de especies biológicas fuera de su ambiente natural.
- Extinción:** Proceso de pérdida de especies.
- Exudado:** Conjunto de elementos extravasados en el proceso inflamatorio, que se depositan en el intersticio de los tejidos o cavidades del organismo. Provoca el edema inflamatorio, dife-

renciándose del trasdado por la mayor riqueza de proteínas y células.

**Factor de calidad o valor Q:** Ancho de la frecuencia dominante a 3 o 10 dB bajo el pico de máxima amplitud.

**Factor:** Se refiere a las variables categóricas, usualmente cuando son manipuladas en un experimento para establecer su efecto sobre otras variables.

**Factores denso-dependientes:** Aquellos cuyos efectos son dependientes de la densidad (Dennis & Taper 1994).

**Factores denso-independientes:** Aquellos cuyos efectos son independientes de la densidad (Andrewartha y Birch 1954).

**Familia:** Categoría taxonómica superior, entre las categorías mayores de Orden y Género.

**Filaria:** Fase larvaria de parásitos nemátodos.

**Filogenia:** La filogénesis es el proceso del origen de comunidades próximas en la naturaleza por la bifurcación de una especie troncal común respectivamente a cada una de las comunidades descendientes. La filogénesis hace referencia a un proceso particular, mientras que la sistemática filogenética es la ciencia que estudia los procesos y sus resultados, y una filogenia viene a ser una hipótesis de parentescos entre un grupo de organismos.

**Filtro “pasa-alta”:** Filtro que permite el paso de frecuencias altas y bloquea a las bajas. Filtro “pasa-baja”: Filtro que permite el paso de frecuencias bajas y bloquea a las altas.

**Filtro:** Mecanismo o aparato que permite el paso o transmisión de determinadas frecuencias mientras bloquea a otras.

**Frecuencia de Nyquist:** Frecuencia igual al valor de la mitad de la tasa de muestreo.

**Frecuencia dominante:** La frecuencia que contiene la mayor cantidad de energía en el canto.

**Frecuencia fundamental:** La nota producida por una estructura vibratoria que irradia sonido, cuya frecuencia dependerá de sus dimensiones físicas y su tensión.

**Frecuencia:** Número de ciclos de vibración completados por segundo, expresados en Hertz (Hz).

**Germicida:** Agente o sustancia que tiene la propiedad de hacer destruir los gérmenes ([docencianacional.tripod.com/primeros\\_auxilios/glosario.htm](http://docencianacional.tripod.com/primeros_auxilios/glosario.htm)).

**Grados de libertad:** Los grados de libertad son una cantidad que permite introducir una corrección matemática en los cálculos estadísticos para restricciones impuestas en los datos.

**Hábitat:** Ambiente apropiado para que viva un organismo.

**Harmónicos:** Frecuencias más altas que son múltiplo de la frecuencia fundamental.

**Helminto:** Cualquier gusano parásito que afecta primordialmente a los humanos y animales.

**Hemorragia equimótica:** Coloración en forma de mancha azulada que se debe a la ruptura de un vaso sanguíneo bajo la superficie de la piel.

**Hemorragia petequiral:** Pequeñas manchas en la piel en forma de puntos, debidas a efusión interna de sangre.

**Herpesvirus:** Cualquier virus de la familia Herpesviridae, la cual es ADN con viriones de 102-200 nm de diámetro y con 4 componentes y más de 20 polipéptidos estructurales, los que afectan a una gran variedad de especies.

**Heterogeneidad:** Compuesto de partes de diversa naturaleza.

**Hipermia:** Abundancia extraordinaria de sangre en cualquier parte del cuerpo.

**Hipótesis Alternativa:** La hipótesis alternativa es la afirmación que se acepta, si se rechaza la hipótesis nula. Esta hipótesis, también llamada hipótesis de investigación, se simboliza con  $H_a$ . La hipótesis alternativa es aceptada si la evidencia proporcionada por la muestra es suficiente para afirmar que la  $H_0$  es falsa.

**Hipótesis Nula:** La hipótesis nula, la cual se simboliza como  $H_0$  es aquella que nos dice que no existen diferencias significativas entre los grupos. Una hipótesis es un intento de explicación o una respuesta "provisional" a un fenómeno. Su función consiste en delimitar el problema que se va a investigar según algunos elementos tales como el tiempo, el lugar, las características de los sujetos, etc.

**Hipótesis:** Planteamiento y/o supuesto que se pone a prueba ya sea para corroborarse o refutarse mediante la observación, siguiendo las normas establecidas por el método científico (Ford 2000).

**Histopatología:** Estudio microscópico de la estructura y forma de los tejidos.

**Holotipo:** Un único espécimen tipo designado como el portador del nombre de una especie o subespecie cuando fue establecida, o el espécimen único en el que un taxón fue basado cuando no se especificó tipo ([www.terra.es/personal7/jjdeharo/entomologia/dicc.htm](http://www.terra.es/personal7/jjdeharo/entomologia/dicc.htm)).

**Hotspot:** Área geográfica que alberga una alta diversidad biológica.

**Independencia:** Es una propiedad de un conjunto de unidades de análisis

(objetos, datos) sobre los cuales se quiere hacer una inferencia estadística. Se refiere al hecho de que la variación entre cualquiera de los atributos (variables) no estudiados, esté distribuida de manera aleatoria entre los objetos. Así, un experimento en el que se analiza el efecto de una sustancia química sobre el crecimiento de un grupo de renacuajos puede tener problemas de independencia si algunos de los renacuajos son hermanos entre sí y otros no.

**Índice:** Medida que se halla relacionada de alguna manera con la abundancia real de una población, por ejemplo el número de ranas avistadas por hora/ de esfuerzo de muestreo.

**Inferencias:** En el contexto del diseño experimental, se refiere al uso de técnicas estadísticas aplicadas a una muestra de datos para extraer conclusiones acerca del universo (es decir, la totalidad) de los objetos de donde se obtuvo la muestra.

**Inmunodepresión:** Estado en el que la capacidad de respuesta del sistema inmunológico del cuerpo se ve disminuida.

**Intensidad del sonido:** Cantidad de energía transmitida por segundo en un área de un metro cuadrado.

**Intervalo entre cantos:** Tiempo transcurrido entre canto y canto.

**Iridovirus:** Cualquier virus que pertenece a la familia Iridoviridae la cual es ADN con viriones de 125-300 nm, que consisten de una envoltura lipídica modificada por subunidades proteicas que rodean un nucleocápsido icosaédrico. La mayoría de estos virus afectan insectos, pero algunos son patógenos de anfibios y peces.

**Itraconazol:** Droga utilizada en el tratamiento de infecciones causadas por hongos.

**Lectotipo:** Sintipo designado como el único ejemplar portanombre después del establecimiento de una especie o subespecie nominal (excepto en el caso de hapantotipos [art. 73.3]) (Artículo 74.1. International Code of Zoological Nomenclature) (<http://www.humboldt.org.co/chmcolombia/servicios/jsp/glosario/ListarTerminos3.jsp?termino=lectotipo&desde=0&hasta=10>).

**Lista Roja:** Lista de especies amenazadas propuesta por la UICN donde se provee información sobre el estado de conservación, así como de taxonomía y distribución de organismos que hayan sido evaluados utilizando los criterios y categorías establecidos por la UICN.

**Longitud de onda ( $\lambda$ ):** Es la distancia cubierta por una onda sinusoidal durante un periodo de vibración o la distancia entre dos puntos idénticos en dos ciclos adyacentes.

**Metamorfosis:** Transformación que implica un dramático cambio de fisonomía en algunos organismos; en anfibios suele darse en la etapa transitoria entre la forma larval y la forma adulta.

**Meta-población:** Conjunto de poblaciones locales dentro de un área más extensa con patrones dinámicos de extinciones locales, recolonizaciones, flujo genético y migración limitada entre subunidades que ayudan a evitar la extinción de todo el conjunto de subpoblaciones (Hanski 1991, Hanski & Gilpin 1991).

**Microsporidia:** Son parásitos de animales, ahora considerados hongos extremadamente reducidos. La mayoría infecta a insectos, pero también

son responsables de causar enfermedades en crustáceos y peces y otros grupos animales, incluyendo anfibios y humanos.

**Monitoreo:** Un proceso permanente para verificar sistemáticamente que las actividades o procesos planificados se llevan a cabo según lo esperado o que se está progresando en el logro de los resultados planificados ([web.idrc.ca/es/ev-30231-201-1-DO\\_TOPIC.html](http://web.idrc.ca/es/ev-30231-201-1-DO_TOPIC.html)).

**Muestra representativa:** Aquella que contiene las características de interés que existen en la población de la manera más cercana posible. Esta muestra será representativa en el sentido de que cada unidad muestreada representa características de una cantidad conocida de unidades en la población (Kish 1995).

**Muestra:** Subconjunto de la población. Conjunto de mediciones que constituye parte de una población. Se refiere a un grupo de objetos que es incluido en un estudio porque se supone que representa al universo. Por ejemplo, el conjunto de 37 ranas incluidas en un experimento representan una muestra de un universo que podría consistir en la población. Una de las propiedades más importantes de una muestra es su representatividad con respecto a la población.

**Muestras independientes:** Ninguna medida u observación tenga una influencia sobre cualquier otra observación, o en otras palabras, la probabilidad de ocurrencia de un evento no debe modificar la ocurrencia de los otros (Hurlbert 1984).

**Muestreo sistemático:** Muestreo donde la primera muestra se escoge al azar y para la selección de las siguientes

se fija un intervalo sistemático (Hammond, 1994).

**Muestreo:** Se refiere al procedimiento empleado para obtener una o más muestras de una población. Este se realiza una vez que se ha establecido un marco muestral representativo de la población, luego se procede a la selección de los elementos de la muestra aunque hay muchos diseños de la muestra.

**Muestreos al azar:** Todas las unidades de muestreo tienen la misma probabilidad de ser seleccionadas.

**Necropsia:** Examen sistemático de un organismo para determinar causa de muerte, usualmente refiriéndose a un animal y no un humano (autopsia).

**Necrosis:** Muerte de células en un tejido debido a un trauma.

**Nitrógeno líquido:** El nitrógeno normalmente se encuentra en el medio ambiente en forma gaseosa. Para volverse líquido, el gas nitrógeno tiene que liberar grandes cantidades de calor, llegando a temperaturas tan bajas como los 200° C bajo cero. Puede ser aplicado a tejidos enfermos o cancerosos para matar las células. El tejido que ha sido congelado se seca y se desprende del tejido circundante.

**Nivel de presión de sonido (NPS):** Una intensidad de sonido referida a un nivel específico, la que se expresa en decibeles.

**Número de notas/pulsos por canto:** Número de unidades acústicas de un determinado patrón de amplitud reconocido en el canto.

**Onda compleja:** Onda compuesta por dos o más sinusoides que pueden diferir en amplitud, frecuencia y fase (punto de inicio de una onda).

**Onda sinusoidal:** La forma más sencilla de una onda.

**Oscilograma:** Representación visual que denota la variación en amplitud (eje de las y) en el transcurso del tiempo (eje de las x).

**Pápula:** Elevación eruptiva pequeña, sólida y circunscrita a la piel. Ampolla.

**Parámetro:** Característica de las poblaciones estadísticas que adquieren valores fijos como la media, los parámetros son estimados a partir de las muestras.

**Paratipo:** Todo espécimen en una serie típica tipo diferente del holotipo ([www.terra.es/personal7/jjdeharo/entomologia/dicc.htm](http://www.terra.es/personal7/jjdeharo/entomologia/dicc.htm)).

**PCR:** La reacción en cadena de la polimerasa es una técnica (descrita en 1985, por Kary Mullis) de biología molecular, cuyo objetivo es obtener un gran número de copias de un fragmento de ADN particular, partiendo de un mínimo, en teoría, de una única copia de ese fragmento ([es.wikipedia.org/wiki/PCR](http://es.wikipedia.org/wiki/PCR)).

**Período de pulsos:** Tiempo transcurrido entre la emisión de un pulso y el inicio del que le sigue.

**Período:** Inverso a la frecuencia, es el tiempo que se requiere para completar un ciclo de vibración.

**Población:** Grupo de individuos de una misma especie que viven en un área específica y que poseen la capacidad de reproducirse entre sí.

**Poder o potencia:** En una prueba estadística representa la probabilidad de rechazar la hipótesis nula cuando es realmente falsa (Hoening & Heisey 2001, Thomas & Juanes 1996).

**Postulado:** Conjetura o una idea nueva y/o inexplorada, como una propo-

sición (relación ente un conjunto de conceptos).

**Precisión:** Medida de cuan cerca se halla una estimación de su valor esperado.

**Probabilidad:** La probabilidad es la característica de un suceso del que existen razones para creer que se realizará. Los sucesos tienden a ser una frecuencia relativa del número de veces que se realiza el experimento

**Proceso de selección:** Reglas y operaciones mediante las cuales se incluye en la muestra algunos miembros de la población.

**Proporción:** Relación en cuanto a magnitud, cantidad o grado, de una cosa con otra o de una parte con el todo.

**Pruebas no paramétricas:** Pruebas estadísticas que no se basan en ninguna suposición en cuanto a la distribución de probabilidad a partir de la que fueron obtenidos los datos.

**Pruebas paramétricas:** Pruebas que suponen una distribución de probabilidad determinada para los datos.

**Pseudo-replicación:** Condición experimental en la que dos o más objetos (datos, unidades de análisis) no cumplen con el precepto central de la replicación: que las propiedades de los objetos (las variables) varíen entre ellos de manera aleatoria, con excepción de la variable que el investigador quiere manipular o estudiar. Una consecuencia de la pseudo replicación es la falta de independencia entre las unidades de análisis. La otra, es que queda abierta la posibilidad de una confusión de efectos.

**Queratina:** Sustancia albuminoidea, muy rica en azufre, que constituye la parte fundamental de las capas más externas de la epidermis de los vertebrados.

**Quitridio:** Hongo perteneciente a la clase Chytridiomycetes. Por asociación, se ha empleado este término para identificar la especie *Batrachochytrium dendrobatidis*, hongo quitridiomiceto patógeno que se aloja en la piel de los anfibios, y que en la mayoría de los casos puede ocasionarles la muerte.

**Quitridiomycosis:** Enfermedad infecciosa que afecta a los anfibios a nivel global causada por el hongo quitridio *Batrachochytrium dendrobatidis*, que es capaz de causar muerte esporádica en algunos anfibios o causar hasta 100% de mortalidad en otros. La enfermedad se ha implicado como causa de mortalidades masivas y extinciones de anfibios en los últimos 15 años, pero el origen y el verdadero impacto de esta enfermedad en poblaciones de anfibios se desconocen y permanecen bajo investigación.

**Ranavirus:** Es un género de virus perteneciente a la familia Iridoviridae, un grupo de virus ADN de doble helice. Este virus infecta a anfibios, causando lesiones sistémicas.

**Registro biológico:** Es la observación y captura de información de una unidad biológica (gen, organismo, ecosistema) referida a un lugar y, usualmente, en un lapso determinado (Suárez-Mayorga et al. 2005b).

**Relación entre señal y ruido S/N (“signal to noise ratio”):** La relación existente entre señal y ruido en una determinada grabación o en el ambiente. Respuesta de frecuencias: Curva que indica la uniformidad de detección de frecuencias de un instrumento electrónico dentro de un rango de frecuencias.

**Replicación:** Repetición de una prueba o tratamiento estadístico a fin de suministrar una estimación del error



experimental y brindar una medición más precisa de los efectos del tratamiento.

**Representatividad:** Se refiere a la relación que existe entre el conjunto de objetos escogido o utilizado para un estudio (la muestra) y el universo sobre el cual se quieren extraer conclusiones. Para que la muestra represente adecuadamente a la población, los objetos deberían ser escogidos de manera aleatoria entre todos los componentes de la población. Aunque esta situación raramente puede ser garantizada en situaciones de campo, representa una directriz que ayuda a tomar decisiones en diseño experimental.

**Riqueza:** Una de las formas más simples de estimar la biodiversidad de un área. Se refiere al número de especies hallado o estimado, a partir de un esfuerzo de búsqueda conocido y una estrategia cuantitativa de análisis.

**Ruido:** Cualquier sonido que interfiera con la transmisión y recepción de una señal acústica de interés.

**Salmuera:** Preparación líquida muy salada, empleada para conservar ([www.monaca.com.ve/recetas/glosario.asp](http://www.monaca.com.ve/recetas/glosario.asp)).

**Sesgo:** Distorsión en la representatividad de un resultado de una prueba estadística, bien en el proceso de estimación, bien en la selección o en el examen de la muestra. El sesgo es la diferencia entre el valor real y el estimado en promedio.

**Significativo:** Resultado estadístico que indica que la probabilidad de que la variación observada entre algunos parámetros, que pudiera atribuirse a la casualidad, fuera de un 5%. Cuando el resultado estadístico indica que la probabilidad de que la variación observada entre algunos parámetros, que pudiera

atribuirse a la casualidad, fuera menor o igual a 1%, se dice que es altamente significativo.

**Sintipo:** Un sintipo es cualquier espécimen citado en el protólogo cuando ningún holotipo fue designado, o ninguno de los dos o más especímenes simultáneamente fue designado como tipos (Artículo 9.4. International Code of Botanical Nomenclature) (<http://www.humboldt.org.co/chmcolombia/servicios/jsp/glosario/ListarTerminos3.jsp?termino=lectotipo&desde=0&hasta=10>).

**Tasa de canto/tasa de repetición de canto:** Número de cantos emitidos por unidad de tiempo.

**Tasa de muestreo:** La cantidad de veces que un sistema electrónico muestrea puntos por unidad de tiempo dentro de una señal acústica.

**Taxonomía:** La taxonomía es la parte de la biología que estudia la clasificación de los seres vivos, los taxa (o taxones). La clasificación actual de los seres vivos sigue un criterio jerárquico. Del griego taxis (ordenamiento) y nomo (norma) ([es.wikipedia.org/wiki/Taxonom%C3%ADa](http://es.wikipedia.org/wiki/Taxonom%C3%ADa)).

**Teoría:** Conjunto de proposiciones para explicar un fenómeno particular.

**Transductores:** Dispositivos que convierten un tipo de energía (vibratoria/acústica o eléctrica) en otro tipo de energía.

**Transectas en banda:** Método de muestreo que consiste en la búsqueda minuciosa de organismos a lo largo de una senda lineal con un ancho predeterminado.

**Transectas en línea:** Método de muestreo que consiste en la búsqueda minuciosa de organismos a lo largo de una

senda o camino dispuesto linealmente a lo largo de un hábitat.

**Tremátodo:** Sanguijuela. Cualquier gusano plano de la clase Trematoda. Estos parásitos se adhieren al huésped con “chupones” externos y generalmente necesitan de un caracol como huésped intermediario para su ciclo de vida.

**Universo:** Conjunto o conglomerado de individuos, objetos o medidas que poseen algunas características observables en un lugar y en un momento determinado.

**Validez interna:** Es una propiedad de un experimento o estudio que se refiere a la relación que existe entre el atributo o el proceso biológico que se pretende estudiar y las variables que se escogen para describirlo.

**Valor esperado:** En estadística el valor esperado o esperanza matemática (o simplemente esperanza) de una variable aleatoria es la suma de la probabilidad de cada suceso multiplicado por su valor.

**Valor real:** Magnitud real de la variable dependiente.

**Variable “dummy”:** Es una expresión que se utiliza para describir el uso de una variable categórica transformada en un análisis estadístico que originalmente fue diseñado para operar con variables continuas. En un ejemplo simple, la variable categórica Sexo puede ser representada por dos variables “dummies”, una denominada Macho y otra Hembra, cada una de las cuales puede tener valores de 0 ó 1, dependiendo del atributo que corresponda al animal.

**Variable categórica:** Se refiere a una manera de describir los atributos de un objeto en la que se le asigna alguna

de varias condiciones pero no parece existir la posibilidad de asignarle condiciones intermedias. Entre las variables categóricas frecuentemente utilizadas en el contexto que nos interesa están Especie, Sexo, Tipo de hábitat y Modo reproductivo.

**Variable continua:** Se refiere a una manera de describir los atributos de un objeto en la que se le asigna un valor cuantitativo que, teóricamente, podría expresarse con un número infinito de cifras decimales. A manera de ejemplo, son variables continuas la Temperatura, el Peso corporal, la Precipitación mensual, y la Edad.

**Variable ordinal:** Se refiere al caso especial de variable categórica en el que las condiciones que se pueden asignar a un objeto tienen un orden único que no puede ser intercambiado. El uso de las expresiones grande/mediano/pequeño, alto/medio/bajo para describir algún atributo de un objeto de manera no cuantitativa representan ejemplos clásicos del uso de variables ordinales.

**Variable:** Un elemento de una fórmula, proposición o algoritmo que puede adquirir o ser sustituido por un valor cualquiera. Los valores que una variable es capaz de recibir pueden estar definidos dentro de un rango.

**Voucher:** Un espécimen empleado como registro para identificación o para verificar especies ([biology.usgs.gov/s+t/noframe/z999.htm](http://biology.usgs.gov/s+t/noframe/z999.htm)).

**Zoospora:** Espora provista de cilios o flagelos motores, por lo tanto con capacidad de movimiento en medio acuoso.



*Bufo guttatus*