

# MANUAL de técnicas del estudio de la fauna



Sonia  
Gallina Tessaro  
Editora



# MANUAL de técnicas del estudio de la fauna





Primera edición, 2015

D.R. © por Instituto de Ecología, A.C.  
Carretera antigua a Coatepec No. 351,  
El Haya, Xalapa 91070, Veracruz, México

ISBN 978-607-7579-45-8, primera edición

Título: Manual de técnicas del estudio de la fauna

Editora: Dra. Sonia Gallina Tessaro

Impreso en México ~ Printed in Mexico

Publicación en línea:

[http://www.inecol.edu.mx/inecol/libros/Manual\\_de\\_técnicas\\_del estudio\\_de\\_la\\_fauna.pdf](http://www.inecol.edu.mx/inecol/libros/Manual_de_técnicas_del_estudio_de_la_fauna.pdf)

Forma sugerida para citar este libro:

Gallina, S. (ed.) 2015. Manual de técnicas del estudio de la fauna. Instituto de Ecología, A.C. Xalapa, Veracruz, México.

Revisión de estilo, diseño y formación editorial: Instituto Literario de Veracruz, S.C.

Fotografías de Alberto González Gallina con excepción del venado temazate que es de Alejandro González Gallina

D.R. © Ninguna parte de esta publicación, incluyendo el diseño de la cubierta, puede ser reproducida, traducida, almacenada o transmitida en manera alguna ni por ningún medio, ya sea eléctrico, químico, mecánico, óptico de grabación o de fotocopia, sin permiso previo del editor. Párrafos pequeños o figuras aisladas pueden reproducirse, dentro de lo estipulado en la Ley Federal del Derecho de Autor y el Convenio de Berna, o previa autorización por escrito de la editorial.

# MANUAL de técnicas del estudio de la fauna

2015

Sonia Gallina Tessaro  
Editora







**PhD. Martín Ramón Aluja Schuneman Hofer**

**DIRECTOR GENERAL**

**L.A. Rubey Baza Román**

**DIRECTOR ADMINISTRATIVO**

**Dr. Guillermo Ángeles Álvarez**

**SECRETARIO ACADÉMICO**

**M.C. Alberto Rísquez Valdepeña**

**SECRETARIO TÉCNICO**





# Índice

- Índice de Cuadros
- Índice de Figuras
- Introducción
- Lista de Participantes
- **Capítulo 1.** Técnica de colecta, manejo y envío de muestras biológicas de fauna silvestre. Luis M García Feria, Arturo Barbachano-Guerrero y Antonio A. Vásquez Aguilar.
- **Capítulo 2.** Técnicas de campo y laboratorio para el estudio de parásitos. Diego Santiago - Alarcon.
- **Capítulo 3.** Aplicaciones del análisis de isótopos estables para el manejo y conservación de fauna silvestre. Eduardo Nájera Hillman.
- **Capítulo 4.** Métodos estadísticos aplicados al estudio de vertebrados. Dante Alfredo Hernández Silva y Gerardo Sánchez Rojas.
- **Capítulo 5.** Evaluación de la diversidad de especies en ensamblajes de vertebrados: un primer acercamiento midiendo y comparando la riqueza de especies. Eduardo Pineda y Claudia E. Moreno.
- **Capítulo 6.** Análisis de viabilidad poblacional aplicado al manejo de fauna. Salvador Mandujano.
- **Capítulo 7.** Técnicas para estimar la capacidad de carga para herbívoros. Salvador Mandujano y Sonia Gallina.
- **Capítulo 8.** Técnicas para el estudio de murciélagos. Areli Rizo - Aguilar, Luis Gerardo Ávila - Torresagatón, Liliana Fuentes Vargas, Ana Cristel Nuñez Lara, Gabriela I. Flores Nuñez, Sergio Albino Miranda.
- **Capítulo 9.** Métodos de investigación social: fundamentos, técnicas y aportaciones para el entendimiento de las relaciones sociedad - vida silvestre. Alicia Castillo y Juan L. Peña - Mondragón.

# Índice de cuadros

---

## Capítulo 1

- **Cuadro 1.1.** Muestras adecuadas en función del sitio anatómico de estudio.
- **Cuadro 1.2.** Requerimiento de conservación en función del método diagnóstico a utilizar.
- **Cuadro 1.3.** Ejemplos de algunos sistemas de transporte de muestra y su uso final.

## Capítulo 4

- **Cuadro 4.1.** Cuatro tipos de diseños y pruebas estadísticas univariadas.

## Capítulo 9

- **Recuadro 9.1.** Acceso a campo.
- **Recuadro 9.2.** Observación participante.
- **Recuadro 9.3.** ¿Qué incluir en las notas de campo?
- **Recuadro 9.4.** Preparación y conducción de entrevistas individuales.
- **Recuadro 9.5.** Preparación y conducción de grupos focales.
- **Recuadro 9.6.** Preparación y levantamiento de encuestas.
- **Recuadro 9.7.** Preparación y facilitación de talleres (participativos y otros).

# Índice de figuras

---

## Capítulo 1

- **Figura 1.1.** Sistemas comerciales para el transporte de muestras.

## Capítulo 2

- **Figura 2.1.** Poste para sostener la red y tensores de la red que se colocan en el poste
- **Figura 2.2.** Pasos para colocar una red de niebla.
- **Figura 2.3.** Manera correcta de sostener un ave en la mano.
- **Figura 2.4.** Ave en posición para tomar muestra de sangre de la vena del ala y punción de la vena braquial.
- **Figura 2.5a.** Obtención de la sangre usando un tubo microcapilar con heparina.
- **Figura 2.5b.** Material necesario para guardar la muestra de sangre y preparar los frotis sanguíneos.
- **Figura 2.5c.** Estación de trabajo de campo.
- **Figura 2.6.** Preparación de frotis sanguíneos.
- **Figura 2.7.** Cajas para guardar porta objetos con capacidad para 24 muestras (estas se utilizan en el campo, figura izquierda) y para 100 muestras (figura derecha).
- **Figura 2.8.** Método alternativo para guardar los porta objetos utilizando papel.
- **Figura 2.9.** Colorante Giemsa disuelto en buffer salino listo para ser vertido en cajas o contenedores Coplin.
- **Figura 2.10.** Bandeja de secado.
- **Figura 2.11.** Foto de un microscopio óptico.

- **Figura 2.12.** Parásitos del Orden Haemosporida que infectan a las aves.
- **Figura 2.13.** Diagrama general de medidas morfológicas de longitud (arriba) y ancho (abajo) que son usados para la descripción de especies de parásitos haemosporideos.
- **Figura 2.14.** Fotos de células blancas tomadas de frotis sanguíneos de perico.

### Capítulo 3

- **Figura 3.1.** Reacción metabólica simplificada mostrando el fraccionamiento isotópico.
- **Figura 3.2.** Estructura de isotópica de carbono y nitrógeno de un sistema con plantas C3 (arbustos) y C4 (pastos), consumidas por herbívoros ramoneadores y pastadores.
- **Figura 3.3.** Determinación de la proporción de individuos provenientes de localidades de origen geográfica e isotópicamente distintas.

### Capítulo 4

- **Figura 4.1.** La indagación científica se realiza mediante un ciclo dinámico, de dos componentes que están ligados.
- **Figura 4.2.** Distribución de la frecuencia de dos variables aleatorias, la longitud total y el largo total del tamaño de cuerno de los machos del escarabajo *Phaneus adonis* que habita la Barranca de Metztitlán.
- **Figura 4.3.** Representación gráfica de lo que son una población, una muestra y una unidad de observación, utilizando como ejemplo una población de patos, *Anas platyrhynchos diazi*.
- **Figura 4.4.** Representación de los diferentes diseños de estudios.
- **Figura 4.5.** Árbol de decisión para escoger los métodos estadísticos más adecuados en los diseños de estadística univariada más comunes.

## Capítulo 5

- **Figura 5.1.** Ejemplo de un diseño de muestreo considerando un esfuerzo de colecta similar, en cada ambiente y en cada fragmento o parcela que conforman a ese ambiente.
- **Figura 5.2.** Cobertura de la muestra y déficit de la muestra determinadas en función de las abundancias relativas del conjunto de especies que forman el ensamblaje.
- **Figura 5.3.** Ejemplo del formato y arreglo de los valores para calcular la cobertura de la muestra en una hoja de cálculo.
- **Figura 5.4.** Formatos de bases de datos que pueden ser usados como archivos de entrada en el programa EstimateS v. 9.1 para generar curvas de acumulación.
- **Figura 5.5.** Curvas de acumulación de especies de dos ensamblajes en función del número de individuos registrados.
- **Figura 5.6.** Comparación de la riqueza de especies de ocho ensamblajes.

## Capítulo 6

- **Figura 6.1.** Cambios de la abundancia ( $N$ ) de una población a través del tiempo.
- **Figura 6.2.** El efecto vórtice o “vortex”.
- **Figura 6.3.** Componentes o pasos generales de un proceso de análisis de viabilidad poblacional.
- **Figura 6.4.** Cambio en la probabilidad de extinción ( $P_e$ ) o de persistencia ( $1 - P_e$ ) conforme el porcentaje de decline de la población cambia.

## Capítulo 7

- **Figura 7.1.** Clasificación de las tres diferentes aproximaciones y métodos para estimar la capacidad de carga ( $K$ ).
- **Figura 7.2.** Relación hipotética entre la densidad de venados, comportamiento productivo individual, peso corporal y producción/unidad de área.

- **Figura 7.3.** Modelo de cambio en la capacidad de carga (K) en función de la cantidad o superficie de hábitat y de la calidad del hábitat medida a través de algún índice.

## Capítulo 8

- **Figura 8.1.** Partes de una red de niebla.
- **Figura 8.2.** Colocación de redes de niebla en pasos de vuelo y en cuerpos de agua.
- **Figura 8.3.** Equipo necesario para hacer uso de redes de niebla.
- **Figura 8.4.** Oscilograma y espectrograma de los pulsos, de una especie de la familia Molossidae.
- **Figura 8.5.** Interfaz de Sonobat mostrando una secuencia de una especie de la familia Vespertilionidae.
- **Figura 8.6.** Interfaz de Echo Meter Touch con sonogramas de la familia Vespertilionidae.
- **Figura 8.7.** Método directo de estimación de murciélagos (*A. jamaicensis*) en un refugio cavernícola.
- **Figura 8.8.** Sistema de iluminación, grabación de video y detección acústica simultáneo en un refugio cavernícola.
- **Figura 8.9.** Toma de muestra de sangre.
- **Figura 8.10.** Transportadora de murciélagos.

# lista de participantes

**Sergio Albino Miranda.** Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Autónoma del Estado de Morelos (sergio\_am87@hotmail.com).

**Luis Gerardo Ávila-Torresagatón.** Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Autónoma del Estado de Morelos (luis.avila@uaem.mx).

**Arturo Barbachano-Guerrero.** Laboratorio de Medicina de Conservación, Sección de Estudios de Posgrado e Investigación, Escuela Superior de Medicina, Instituto Politécnico Nacional (abarbachanog@gmail.com).

**Alicia Castillo Álvarez.** Instituto de Investigaciones en Ecosistemas y Sustentabilidad, UNAM-Campus Morelia (castillo@cieco.unam.mx).

**Gabriela I. Flores Núñez.** Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Autónoma del Estado de Morelos (giflonu@gmail.com).

**Liliana Fuentes Vargas.** Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Autónoma del Estado de Morelos (fuentesvl2@gmail.com).

**Sonia Gallina Tessaro.** Red de Biología y Conservación de Vertebrados, Instituto de Ecología, A.C., Carretera antigua a Coatepec No. 351, El Haya, C.P. 91070, Xalapa, Ver., México (sonia.gallina@inecol.mx).

**Luis M García Feria.** Red de Biología y Conservación de Vertebrados, Instituto de Ecología, A.C., Carretera antigua a Coatepec No. 351, El Haya, C.P. 91070, Xalapa, Ver., México (luizoo@yahoo.com).

**Salvador Mandujano Rodríguez.** Red de Biología y Conservación de Vertebrados, Instituto de Ecología, A.C., Carretera antigua a Coatepec No. 351, El Haya, C.P. 91070, Xalapa, Ver., México (salvador.mandujano@inecol.mx)

**Claudia E. Moreno.** Centro de Investigaciones Biológicas, Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo. Pachuca, Hidalgo, México (cmoreno@uaeh.edu.mx)..

**Eduardo Nájera Hillman.** COSTASALVAJE A.C. Blvd. las Dunas 160-203, Fracc. Playa Ensenada, C.P. 22880, Ensenada, Baja California, México. Institución donde se llevó a cabo la investigación: Red de Biología y Conservación de Vertebrados, Instituto de Ecología, A.C., Carretera antigua a Coatepec No. 351, El Haya, C.P. 91070, Xalapa, Ver., México (eduardo@costasalvaje.com).

**Ana Cristel Lara Núñez.** Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Autónoma del Estado de Morelos (laranuz@gmail.com).

**Juan L. Peña-Mondragón.** Instituto de Investigaciones en Ecosistemas y Sustentabilidad, UNAM-Campus Morelia (jlpenna@cieco.unam.mx).

**Eduardo Pineda Arredondo.** Red de Biología y Conservación de Vertebrados, Instituto de Ecología, A.C. Xalapa, Veracruz, México (eduardo.pineda@inecol.mx).

**Areli Rizo-Aguilar.** Facultad de Ciencias Biológicas, Secretaría de Investigación, Universidad Autónoma del Estado de Morelos (areli.rizo@uaem.mx).

**Gerardo Sánchez Rojas.** Laboratorio de Conservación Biológica, Área Académica de Biología, Instituto de Ciencias Básica e Ingeniería, Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo (gsanchez@uaeh.edu.mx)

**Diego Santiago Alarcón.** Red de Biología y Conservación de Vertebrados, Instituto de Ecología, A.C., Carretera antigua a Coatepec No. 351, El Haya, C.P. 91070, Xalapa, Ver., México (diego.santiago@inecol.mx).

**Dante Alfredo Hernández Silva.** Laboratorio de Conservación Biológica, Área Académica de Biología, Instituto de Ciencias Básica e Ingeniería, Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo (dal\_silva@prodigy.net.mx).

**Antonio A Vásquez Aguilar.** Red de Biología Evolutiva, Instituto de Ecología, A.C. (assinivas@gmail.com).

**Apoyo Editorial:** Rolando González Trápaga. Red de Biología y Conservación de Vertebrados, Instituto de Ecología, A.C., Carretera antigua a Coatepec No. 351, El Haya, C.P. 91070, Xalapa, Ver., México (rolando.gonzalez@inecol.mx)



# agradecimientos

Agradecemos el apoyo económico brindado por el Instituto de Ecología, A.C. a través de la Secretaría Académica con el Dr. Guillermo Angeles para hacer posible la publicación electrónica de este manual. Además por el apoyo del Director General, Dr. Martín Aluja Schuneman para realizar el Retiro Académico de la Red de Biología y Conservación de Vertebrados en septiembre del 2014 (Proyecto 20035-30844), durante cuya estancia se aprovechó para que dos árbitros revisaran cada capítulo, por lo tanto agradecemos a los investigadores y técnicos de la red, así como a los estudiantes de posgrado que participaron: Salvador Mandujano Rodríguez, Eduardo Pineda Arredondo, Diego Santiago Alarcón, Luis García Feria, Fernando González García, Rolando González Trápaga, Adriana Sandoval Comte, Pilar Carbó Ramírez, Carolina Hernández Lara, Eva López Tello Mera, y en especial a nuestra asistente Rocío Rodríguez por su ayuda en la logística.



# introducción

*El proceso de la edición de un libro, podemos afirmar que es un camino tortuoso que hay que recorrer para llegar a un final satisfactorio cuando se tiene el producto final. ¿Por qué digo que es un camino tortuoso? Porque en un inicio uno concibe la idea a raíz de notar una necesidad de comunicación de la información que se genera a lo largo de años de experiencia, de difundir hacia un público determinado que le pueda servir de ayuda y le sea de provecho. Luego entonces sigue un proceso de reunir, con diversos autores, la información pertinente. Para el proceso de seguimiento, el editor se convierte en una especie de “capataz”, por así decirlo, ya que debe estar persiguiendo a los autores. Esta persecución es la que lleva más tiempo, así por ejemplo, para este manual llevó más de tres años, aunque parezca mentira, y en el camino uno piensa que nunca va a lograr ver el final.*

*Este manual de técnicas que incluye nueve capítulos, fue concebido para estudiantes, técnicos e investigadores que quieren incursionar en este interesante campo de la ecología, y es un complemento del anterior Manual de técnicas para el estudio de la Fauna Silvestre editado por S. Gallina y Carlos López-González, publicado también de forma electrónica en el 2011 por el INECOL y la Universidad Autónoma de Querétaro y una segunda edición con el Instituto Nacional de Ecología y Cambio Climático (INECC) de SEMARNAT.*



# capítulo uno

## Técnicas de colecta, manejo y envío de muestras biológicas de fauna silvestre

*Luis M. García Feria, Arturo Barbachano-Guerrero  
y Antonio A. Vásquez Aguilar*

### RESUMEN

La obtención de muestras biológicas es una de las mayores dificultades para la investigación de especies silvestres. Existen varias formas de obtener muestras biológicas, tanto de manera invasiva como no invasiva; diferentes técnicas han sido desarrolladas para obtener las muestras dependiendo de la especie de estudio y el objetivo del muestreo. En este capítulo, a manera de manual de campo, se describen de forma general las técnicas de captura, toma y manejo de muestras para distintas especies de vertebrados y para distintos objetivos de estudio, desde el muestreo para estudios epidemiológicos infecciosos (macro y microparásitos) como para estudios en aspectos de genética de poblaciones, a partir de animales vivos como de cadáveres.

### INTRODUCCIÓN

El término medicina de la conservación fue acuñado por Kosch, con la premisa de que “la salud conecta a todas las especies del planeta”, al contemplar el aspecto ecológico de la salud que involucra la degradación ambiental, el declive de la biodiversidad y las enfermedades emergentes en humanos y animales (Kosch 1996). En la medicina de la conservación, el trabajo multidisciplinario es lo más factible para obtener excelentes resultados en los planes de control y monitoreo de enfermedades, así como el manejo y la conservación de las especies (Meffe 1999, Osofsky *et al.* 2000, Spear 2000, Deem *et al.* 2001, Mainka 2001, Norris 2001, Aguirre *et al.* 2002, Karesh *et al.* 2005).

Las enfermedades tienen un papel importante en la regulación del tamaño, la densidad, distribución y estructura de las poblaciones, con efectos sutiles y consecuencias visibles a largo plazo (Hamilton y Zuk 1982, May 1983, Robinson y Bolen 1989, Hudson *et al.* 1992, Zuk *et al.* 1998); no obstante, debido a que las poblaciones no pueden estar libres de enfermedades, se intenta realizar la disminución de los riesgos que les producen, así como la transmisión inter e intraespecie. Para la evaluación de dichos riesgos, es necesario conocer a la enfermedad desde un punto de vista de patogenia y ecológico, realizar su vigilancia sanitaria y epidemiológica ya que así se podrá detectar la presencia, recurrencia, emergencia o dispersión de la enfermedad estudiada (Mörner *et al.* 2002), además de las características propias del agente etiológico.

Recientemente, la necesidad de estudiar las interacciones de las enfermedades en un contexto ecológico ha llevado a magnificar el esfuerzo de estas técnicas hacia la toma de muestras de animales silvestres terrestres, arborícolas, acuáticos, voladores, etc. considerando también el agente etiológico de estudio: infecciosos (macroparásitos: metazoarios; microparásitos: virus, bacterias, protozoarios y hongos), alteradores fisiológicos (endocrinos y toxinas) o genéticos.

La toma de muestras para el diagnóstico de patógenos u otros agentes no infecciosos que producen daños y alteraciones en la fisiología y la reproducción (salud) de los seres vivos, en muchos casos, ha sido una de las limitantes cuando se trata de fauna silvestre. Desde hace mucho tiempo se han realizado diferentes técnicas de colecta de muestras, adaptando los métodos desarrollados a partir de las técnicas de muestreo en humanos, animales domésticos o de animales de zoológicos.

Las técnicas de muestreo se pueden clasificar principalmente en dos tipos, las no invasivas y las invasivas. Las técnicas no invasivas son aquellas que no requieren de la contención del animal, mientras que para las muestras invasivas, por el contrario, requieren de la contención del individuo y son las técnicas mayormente usadas para un buen muestreo.

La obtención de muestras pueden realizarse para diferentes objetivos, entre los cuales tenemos el **monitoreo de enfermedades** con el fin de contribuir al conocimiento de la salud ecológica y evaluar el impacto de las actividades humanas en el ecosistema respecto a la aparición de enfermedades emergentes (enfermedades que aumentan su incidencia o aumentan su rango de distribución en un lapso de tiempo corto y actual). Para esto, se debe vigilar la incidencia y prevalencia de la enfermedad en la población silvestre, determinación de rango de posibles vectores (si es que la enfermedad lo requiere) y distribución y densidad poblacional de estos, el riesgo sobre los animales de producción y viceversa, así como el posible riesgo en la salud humana (zoonosis).

En el caso de sospecha de que una enfermedad infecciosa pueda estar causando mortalidad o morbilidad en animales de vida silvestre, es importante conocer los procedimientos para lograr un muestreo adecuado y representativo. Estos procedimientos deben dirigirse a análisis especializados y encontrar información epidemiológicamente relevante, sin que exista una desviación o error que nos pudiera llevar a las conclusiones incorrectas y, peor aún, tomar decisiones erróneas en función de información confusa o no concluyente, que pudiera generar más problemas de los que se pudieran estar presentando por la aparición de un brote infeccioso. Otro factor que debemos tener en cuenta, es la diferencia entre asociación y causalidad; la presencia de un agente reconocido como patógeno en una muestra biológica, no significa definitivamente que generó una patología en el animal de donde proviene la muestra, pues muchas veces están presentes como una consecuencia de alguna otra patología, de manera azarosa, o simplemente no están causando una infección sintomática.

El estudio y diagnóstico de las enfermedades es una rama de investigación bastante profunda y requiere de años de experiencia y técnicas e instrumentación especializada, sin embargo el objetivo de ésta sección no es dar un entrenamiento en diagnóstico, sino adiestrar en un correcto manejo de muestras para que se logre hacer un diagnóstico adecuado. Cabe mencionar que el diagnóstico directo del agente infeccioso consiste en generar evidencia de la presencia del patógeno, sin embargo, en muchas enfermedades tiene suficiente

valor diagnóstico las metodologías indirectas, como son la búsqueda de anticuerpos específicos o metabolitos del patógeno, como toxinas.

Existe una gran diversidad de vertebrados silvestres con los que uno puede tener la necesidad de tomar muestras, y la diversidad de enfermedades infecciosas que pueden adquirir es igualmente grande. La variedad de agentes infecciosos que se han reconocido como causantes de enfermedad en animales (domésticos y de vida silvestre) es sumamente vasta, e incluye organismos acelulares, como los virus, viroides y priones, y organismos celulares, estos últimos pudiendo dividirlos en bacterias y organismos eucariontes (hongos, protozoarios, helmintos, etc.). El conocimiento de la historia de vida de los patógenos, sus vectores y distribución, además del conocimiento y vigilancia epidemiológica, puede ayudar en el desarrollo de programas de recuperación, viabilidad y determinación de amenazas en poblaciones de especies silvestres, así como la planeación de reservas y manejo de poblaciones.

Por otro lado, el crecimiento de la población humana ha llevado a una demanda energética mayor, a la necesidad de producción de más alimento y al control de plagas, y estas “necesidades” conllevan el uso de sustancias para hacer más eficiente la producción. El uso indiscriminado de pesticidas (herbicidas, fungicidas e insecticidas y otros químicos), también llamados **alteradores fisiológicos**, afecta las funciones metabólicas de muchos organismos, incluyendo al humano, y han sido dispersadas en el aire y en el agua por más de 50 años. Por ejemplo, contaminantes inorgánicos en tortuga marinas (Barceló-Vera 2004); contaminantes orgánicos persistentes (COPs) y su relación con hormonas sexuales (González-Jáuregui 2008). Además de los químicos que causan toxicidad en el sistema endocrino, también son considerados alteradores a aquellos que causan daño en el ADN con efectos en el desarrollo. Además del monitoreo de la salud del sistema endocrino en la población, determinando los niveles de diferentes hormonas, es necesaria la evaluación del sistema inmunitario, ya que la presencia de individuos adultos reproductores y jóvenes saludables no necesariamente reflejan la salud de la población.



Los cambios en el hábitat, como la pérdida de continuidad o fragmentación, la consecuente fragmentación de las poblaciones, la disminución de los tamaños poblacionales, efectos climáticos y catástrofes naturales, han resultado en la pérdida de la variabilidad genética de las poblaciones de fauna silvestre. La disminución de la variabilidad genética puede estar reflejada en la adaptación y respuesta a la exposición a patógenos, esto es, a la disminución en la respuesta inmunológica de los individuos, llegando a un potencial epidémico inminente que puede exterminar a una especie local o regionalmente, o en el peor de los casos la extinción definitiva. Bajo este esquema, es de suma importancia verificar y tener un monitoreo de la **salud genética** de las poblaciones silvestres.

Para cada tipo de agente etiológico existen condiciones óptimas de toma, transporte y conservación de muestras, de manera que no existe una técnica universal, pero sí existen patrones básicos que nos ayudarán a que la valiosa muestra que obtengamos mantenga su viabilidad para el diagnóstico de una enfermedad, desequilibrio metabólico u otra etiología. Otro problema con el que nos podemos encontrar, es la dificultad de hacer un diagnóstico presuntivo en campo, por lo que no siempre sabremos cuál es el tipo y manejo óptimo de la muestra. En este capítulo hacemos la descripción de la teoría y las técnicas básicas de manejo de muestras en campo para un exitoso diagnóstico, monitoreo de enfermedades infecciosas, alteradores fisiológicos y estudios genéticos, así como algunas técnicas de diagnóstico que pueden realizarse en campo.

### **Elección de la muestra**

La elección de la muestra dependerá de dos factores principales: la sospecha o diagnóstico presuntivo del agente etiológico, y el conocimiento de la patogénesis de la enfermedad que se buscará. Para el primer factor, es necesario reconocer algún síndrome, comportamiento, diferencia temporal de una prevalencia, hospedero específico o un signo patológico observable que pudiera ser patognomónico o fuertemente asociado con una enfermedad, como por ejemplo: la coloración verdosa de la mucosa del estómago muscular es un signo característico de intoxicación por plomo en aves acuáticas; la aparición de úlceras en encías y pezuñas de bovinos, nos genera la sospecha de fiebre afto-

sa, y podríamos dirigir el muestreo para diagnosticar la presencia del agente que la provoca. Para el segundo factor, requiere conocimientos más especializados sobre los órganos o zonas anatómicas que afecta el agente sospechoso, como en el caso de rabia, sabiendo que el virus sólo se replica levemente en tejido muscular (al comienzo de la infección por inoculación por una mordida) y fuertemente en tejido nervioso, sería incorrecto tomar una muestra de sangre, pues lo más probable es que no se encuentre una carga viral detectable en ese tipo de muestra, a diferencia de una muestra de tejido de la herida fresca o el encéfalo de un animal que ha comenzado a presentar síndrome por rabia. En caso de no sospechar de una enfermedad específica o considerar varios agentes etiológicos como posibles causantes de la patología presentada, es recomendable tomar muestras dirigidas a múltiples enfermedades, de manera que se abarque un espectro amplio sin generar una sobrecarga a la institución encargada del diagnóstico y los costos no sean demasiado elevados.

### **Métodos de colecta de muestras**

Los métodos de colecta de muestras varían de acuerdo a la especie animal de estudio y de las muestras requeridas como se puntualizó anteriormente. Las técnicas que describiremos contemplan la toma de muestras de sangre, muestras de excretas, hisopados (rectal, vagina, oral y nasal), raspado cutáneo y para colecta de ADN.

### **Colecta de sangre**

#### **Aves**

En las aves, los sitios de colecta de sangre cambian de acuerdo al tamaño y tipo de ave. En general, se consideran las venas radiales y la yugular derecha y en ocasiones, la vena tarsal en aves acuáticas. En aves de tamaño pequeño, como Paseriformes y Trochilinae, es difícil la punción y la obtención de volúmenes suficientes para realizar una biometría hemática (Ritchie *et al.* 1994); se considera que entre el uno y el tres por ciento del volumen total de sangre en animales sanos se pueden coleccionar a partir del volumen calculado con la ecuación alométrica  $65(W_{\text{kg}}^{1.02})$ , es decir, si un ave pesa 500 g, tiene un volumen

total calculado de 32.05 ml de sangre y se puede obtener una muestra de entre 0.32 y 0.96 ml de sangre (Sedgwick y Martin 1994). Una regla general, para prevenir el riesgo de hipotensión y falla cardiaca asociada, es que la muestra de sangre nunca deberá exceder de 1 ml por 100 g de peso corporal por mes (Ancrenaz *et al.* 2003).

### ***Mamíferos***

Las técnicas de muestreo en los mamíferos, se ajustan principalmente al tamaño del animal, por ejemplo, en mamíferos pequeños, como algunos roedores, se debe exponer la zona ventral del animal y lograr la extracción de sangre de manera intracardiaca. La aguja debe ser insertada en el 4º o 5º espacio intercostal, al lado izquierdo inmediato del esternón. La succión debe ser lenta, ya que por el tamaño del corazón la presión negativa de la aguja puede colapsar el órgano. También en mamíferos pequeños, la obtención de sangre puede ser de la vena caudal en la zona ventral de la base de la cola; en esta técnica el volumen de sangre comúnmente es bajo, pero fácilmente se pueden llenar tubos capilares. Con ésta misma técnica se puede coleccionar una pequeña cantidad de sangre de murciélagos, pero de la vena superficial radial.

En mamíferos de tamaño mediano, la venopunción se realiza prioritariamente en venas yugulares, radiales, femorales, safenas y/o caudales, sin embargo, cualquier vaso de calibre suficiente para obtener la cantidad de sangre requerida es buena opción. En animales de mayor tamaño se facilita aún más por el calibre de los vasos.

### ***Reptiles***

Pequeñas cantidades de sangre pueden ser coleccionadas en lagartijas de tamaño pequeño a partir de la amputación de alguna de las uñas o de las falanges. También puede puncionarse la vena coccígea ventral, no obstante, se debe tener cuidado, ya que en muchas ocasiones las lagartijas pueden auto-amputarse la cola como reflejo en defensa a la depredación. La opción de punción intracardiaca también es viable, pero sólo se deberá usar en casos de que no haya otra opción. Las venas yugulares son preferidas, al igual que la vena abdominal ventral, en ésta última, si no se efectúa cuidadosamente, se pueden desarrollar hemorragias serias.

En serpientes es de elección la punción cardíaca, buscando el corazón en el primer tercio del cuerpo del animal. En serpientes venenosas se debe contener de manera segura antes de realizar la técnica. Es recomendada en individuos mayores a los 300 gramos. Otra opción de menor riesgo es el seno venoso cocígeo ventral, se debe tener cuidado de no afectar los hemipenes. En animales sedados, principalmente animales venenosos, pueden puncionarse en las venas palatinas y las sublinguales.

La técnica de obtención de sangre en cocodrilos y tortugas marinas básicamente es la misma; la punción se hace cerca de la inserción del cráneo y las vértebras cervicales, en el plexo venoso post-occipital, se pueden obtener un buen volumen de muestra pero puede mezclarse con linfa. En tortugas semiacuáticas, la obtención de muestras sanguíneas de buen volumen se puede hacer en la vena yugular, localizada caudodorsal a la membrana timpánica; las metatarsales, en el plexo venoso braquial; venas cefálicas, en la vena femoral o en la vena dorsal caudal. En ocasiones es de buena elección la punción cardíaca, introduciendo la aguja entre las placas pectorales y abdominales del plastrón sobre la línea media (Mautino y Page 1993). Sin embargo, se debe considerar tranquilizar químicamente al animal.

En tortugas terrestres, se ha considerado las mismas vías que en las semiacuáticas; no obstante, se deben anestesiar a los individuos debido a la gran fuerza que tienen cuando se protegen dentro del caparazón. Por otro lado, pequeñas cantidades de sangre para microhematocrito o para análisis genéticos pueden obtenerse de la punción de los vasos sanguíneos de las falanges (García-Feria *et al.* 2015).

### ***Anfibios***

El método de obtención de sangre en animales del orden Anura, se dirige a la punción intracardiaca, la vena abdominal central (Raphael 1993) y al plexo sublingual (Heatley y Johnson 2009); en salamandras es considerada la vena caudal y la punción cardíaca. En especies de gran tamaño se pueden puncionar los vasos visibles de las extremidades. Dependiendo del tamaño del animal, es seguro coleccionar sangre correspondiente a aproximadamente el uno por ciento del peso corporal en animales sanos (Heatley y Johnson 2009).

Para todos los vertebrados, las muestras sanguíneas podrán servir para obtener sólidos totales, niveles de hematocrito, conteo de total y diferencial para leucocitos. Estos valores variarán dependiendo de la especie, edad, sexo y temperatura. Además, las muestras sanguíneas se pueden usar para el diagnóstico de diversas enfermedades, por ejemplo, al separar el suero se podrán hacer distintas pruebas serológicas como inmunoensayos enzimáticos (ELISA) o pruebas de aglutinación, para la detección de anticuerpos de enfermedades como fiebre del Oeste del Nilo o toxoplasmosis, entre otras. Este tipo de diagnóstico es fácil de realizar *in situ*, siempre y cuando se cuente con un lector de ELISA o un microscopio, ya que venden diversos kits comerciales de diagnóstico rápido para una gran gama de enfermedades.

### **Obtención de Suero**

Para obtener el suero se necesita colocar la muestra de sangre en tubo sin anticoagulantes; estos tubos regularmente se diferencian de los demás por tener un tapón color rojo. Una vez que se tenga la muestra hay dos formas de separar el suero del paquete celular, una es por centrifugación a aproximadamente 4000 rpm con la ayuda de una centrifuga, y la otra es dejando reposar las tubos para que el paquete celular se sedimente. Es recomendable hacerlo lo más pronto posible, pues así se evita la lisis celular y por consiguiente la contaminación del suero con compuestos intracelulares. Una vez que se sedimente el paquete celular, se podrá obtener el suero para realizar las pruebas serológicas *in situ* y el resto del suero se podrá congelar para ser transportado al laboratorio de destino y realizar pruebas posteriores.

### **Obtención de plasma**

Para la obtención de plasma se recomienda el uso de heparina, ya que puede prevenir la hemólisis. Para el almacenaje, existen tubos que se caracterizan por tener un tapón color verde. La heparina se usa a razón de 0.1 a 0.2 mg/ml de sangre total, evitando así la coagulación por neutralización de la trombina; sin embargo, no resulta satisfactoria para recuentos de leucocitos o cuando han de prepararse extensiones de sangre, porque en éste segundo caso, produce un fondo azul en las preparaciones teñidas con el colorante de Wright; no obstante, no afecta el hematocrito ni el tamaño corpuscular. Es importante

la elección del agente anticoagulante, pues algunos métodos moleculares o inmunológicos se ven afectados por ellos.

Una vez obtenida, la muestra es centrifugada o los tubos se mantienen en reposo para que el paquete celular sedimente; posteriormente, se puede medir el hematocrito. Debido al anticoagulante, es factible volver a mezclar el plasma con el paquete celular y se puede tomar muestras de sangre para realizar microhematocrito o frotis sanguíneos, aunque hay que tomar en cuenta las desventajas que se tiene con la tinción de Wright.

### **Pruebas bioquímicas**

Cuando se requiere realizar pruebas químicas de la sangre, se necesita utilizar EDTA como anticoagulante, a menos que se vayan a cuantificar iones de calcio o magnesio; el tubo a utilizar se caracteriza por tener un tapón de color morado. El EDTA evita la coagulación por eliminación del calcio libre de la sangre. La sangre tratada se puede utilizar para preparar extensiones hasta dos horas después de su extracción, para esto, hay que mezclar minuciosamente la sangre si la concentración de EDTA es superior a 2 mg/ml de sangre total. La sangre puede ser almacenada a 4°C durante 24 horas sin efecto aparente sobre la hemoglobina, el hematocrito, el número de leucocitos y de hematíes; si por lo contrario la sangre se almacena durante 4 horas a temperatura ambiente, aparece un valor de hematocrito elevado aún sin afectar los parámetros restantes.

### **Técnica de colecta y manejo de excretas**

La colecta y el manejo de las excretas es básicamente la misma para todas las especies, sin embargo, hay especificaciones dependiendo de la calidad de la muestra. Por ejemplo, cuando se tiene la oportunidad de manipular al animal, se pueden obtener muestras frescas de heces. Las muestras frescas para análisis parasitológico, en caso de no ser estudiadas inmediatamente, pueden ser preservadas en formol al 4%, etanol al 70% o mantenerse en refrigeración a 4°C (Friend y Franson 1999, Marks y Houston 2009). Nunca deben ser congeladas debido a la posible destrucción de componentes diagnósticos, como el estallamiento de los huevos y oocitos de parásitos entéricos.

### **Técnicas de muestreo cutáneo**

El raspado es la técnica de exploración que más se utiliza para la piel. Cuando se sospecha de dermatofitos (hongos o tiñas) es necesario cortar el pelo de la zona afectada, ya sea con tijeras o con máquina. Después se debe limpiar la zona con una gasa limpia humedecida en alcohol 70% o agua estéril, para retirar detritus y los fragmentos de pelo cortado. Posteriormente, el pelo de la periferia de la zona afectada es arrancado con pinzas y colocado en el portaobjetos y con una hoja de bisturí se deben raspar los márgenes de la lesión. La muestra obtenida del raspado es colocada en un portaobjetos y protegida con un cubreobjetos (Mueller 2000, Scott *et al.* 2001).

Cuando se sospecha de acariasis (sarnas), después de que se hace una limpieza de la zona afectada como en la técnica de colecta de dermatofitos, se pellizca la piel para extraer a los ácaros. Después se coloca una o dos gotas de aceite mineral sobre la piel que no escapen los ácaros y coleccionar fácilmente el raspado con la hoja de bisturí tan profundo hasta que salgan pequeñas gotas de sangre de la piel. El material recogido es colocado en un portaobjetos extendiéndolo en una capa delgada y homogénea, luego proteger con un cubreobjetos (Mueller 2000, Ballweber 2001, Scott *et al.* 2001).

### **Técnicas para colecta para estudios fisiológicos**

Actualmente existen varios tipos de técnicas de detección de toxinas y otros elementos que causan alteración fisiológica en los animales. El factor común para el diagnóstico es mantener la muestra colectada en refrigeración o congelación, a partir de animales muertos u otros elementos (p. ej., sedimentos, agua, granos, etc.) (Friend y Franson 1999). Sin embargo, para el diagnóstico *in vivo* de estos agentes etiológicos y/o la alteración fisiológica producida, es necesario la colecta de muestras de suero (Friend y Franson 1999), heces y orina (Hodges y Heistermann 2003, Caney 2010).

La obtención de suero para estos estudios se realiza a partir de sangre completa en tubos sin anticoagulante. Posteriormente es centrifugada a 4000 rpm o se deja reposar para que se separe el paquete celular en dado caso de no contar con una centrífuga (ver detalles en la sección de obtención de suero). El

suero puede mantenerse en refrigeración por periodos cortos, pero es recomendable mantenerlo en congelación.

La orina puede ser colectada en campo con el uso de bandejas, en el caso de especies arborícolas; aspiración con jeringa o pipeta, en el caso de encontrar orina estancada o salpicada en las hojas; o por absorción con papel filtro (Hodges y Heistermann 2003). Si se captura al animal y se mantiene anestesiado, la orina puede obtenerse por cistocentesis (Caney 2010).

Muchas hormonas son relativamente estables a temperatura ambiente por varios días, las formas conjugadas de las hormonas son menos estables, lo ideal es mantener la muestra de orina en refrigeración para traslados cortos y posteriormente congelarla ( $< -10^{\circ}\text{C}$ ). En dado caso que no se cuente con el equipo apropiado, la muestra de orina se puede almacenar en etanol al 20-50% o se puede emplear azida sódica (0.1%) como preservadores; una forma más barata y sencilla es colectar la muestra en papel filtro y almacenarla en seco (Hodges y Heistermann 2003).

La coleta de heces puede ser directamente del suelo, tomando de la superficie que no tuvo en contacto con el suelo una porción de aproximadamente 2 g. Si la excreta es grande, se pueden tomar varias porciones y homogeneizarlas (no más del 30% del volumen total). Para su almacenamiento se recomienda utilizar etanol (40-80%) a temperatura ambiente en una relación peso:volumen de 4:1 (Ziegler *et al.* 2000).

### **Técnicas para colecta de material para ADN**

Las muestras de sangre obtenida de cualquier especie puede utilizarse para la extracción de ADN, ésta puede usarse completa o en el caso de mamíferos centrifugarse para obtener el paquete de células blancas (leucocitos). La sangre puede preservarse en EDTA pero deberá ser refrigerada a  $4^{\circ}\text{C}$ ; una mejor manera de conservarla, cuando no se tiene manera de refrigerar o congelar las muestras, es la utilización de una solución amortiguadora y preservadora de ADN (p.ej., *Lysis buffer*, Longmire *et al.* 1997). Con esta solución, las muestras pueden mantenerse a temperatura ambiente por más tiempo; 250 ul de san-



gre completa por cada 5 ml de solución. Otra opción es la sustancia amortiguadora y preservadora de RNA, principalmente el *RNAlater* (Applied Biosystems-Life Technologies, Van Allen Way, Carlsbad, California), con el cual se pueden mantener las muestras a temperatura ambiente (25°C) por una semana o a 37°C por 24 horas, pudiéndose utilizar también para preservar ADN.

Cuando el origen del ADN son plumas, las muestras frescas pueden mantenerse secas a temperatura ambiente durante dos semanas o hasta por un mes a 4°C y obtenerse ADN de alta calidad (Bello *et al.* 2001). También se pueden almacenar en gel de silica y mantenerse secas a temperatura ambiente para no degradar el ADN (Taberlet *et al.* 1999, Balkiz *et al.* 2007) o preservarse en etanol al 70% (Balkiz *et al.* 2007).

Las muestras de pelo deben tener el folículo y pueden obtenerse de manera no invasiva que arranquen el pelo completo, tomando mayor importancia el folículo piloso (Valderrama *et al.* 1999, Zielinski *et al.* 2006, García-Feria 2008, Améndola-Pimienta *et al.* 2009). El almacenamiento puede ser de la misma manera que para las plumas. Se recomienda que el pelo sea almacenado en bolsas de papel y mantenidas secas (Grossens *et al.* 1998, Woods *et al.* 1999, Sloane *et al.* 2000). El uso del gel de silica o la congelación para el almacenaje de muestras de pelo es la mejor opción, siendo más ventajosa la congelación a -20°C (Roon *et al.* 2003).

Las muestras fecales para estudios de ADN muchas veces no se pueden obtener frescas. Las heces pueden utilizarse tanto frescas (Hoss *et al.* 1992) como secas (Wasser *et al.* 1997, Dalén *et al.* 2004) para obtener las células epiteliales del intestino presentes dentro y en la superficie de la excreta. No obstante, la acción de las nucleasas presentes en la excreta puede degradar el ADN. Para minimizar la degradación por la interferencia de la enzima, se pueden usar diferentes métodos de preservación como la deshidratación por aire seco, almacenamiento en etanol al 70%, congelación a -20°C, o el uso de sustancias amortiguadoras que contengan altas concentraciones de sales (p. ej., DET, Frantzen *et al.* 1998). Distintas formas de colecta de ADN de manera no invasiva son descritas en Piggot y Taylor (2003). Una forma sencilla es la colecta de la excreta, su

secado en papel absorbente y su almacenamiento en viales con gel de silica. Con esta técnica, la muestra puede tener una duración de entre 3 días hasta 4 años a temperatura ambiente antes de la extracción del ADN (Regnaut *et al.* 2006). Si se cuenta con algún preservador y protector de ácidos nucleicos (p.ej., *RNAlater*) la excreta fresca es la mejor elección (Vigilant y Guschanski 2009).

Para todas las muestras realizadas para la extracción de ADN, hay que considerar que deben ser protegidas de la humedad y de la exposición a la luz ultravioleta para que no sea degradado el ADN (Lindahl 1993).

### **Consideraciones para el muestreo de agentes infecciosos**

A continuación se presenta un cuadro donde se enlistan de manera general las muestras adecuadas en función del sitio anatómico donde se replica el agente etiológico del que se sospecha.

La muestra puede ser transferida a un medio de transporte, siempre y cuando tenga las características para conservar organismos anaerobios.

La muestra tomada debe ser representativa y tener un volumen suficiente para el análisis; es necesario tomar en cuenta la cantidad y el tipo de análisis que se realizarán. Las técnicas de biología molecular normalmente requieren volúmenes pequeños para proceder a la extracción de ácidos nucleicos, 1 ml como máximo; para proceder al aislamiento de bacterias, hongos o virus, se recomienda tomar una muestra de 3-5 ml en el caso de que sea líquida, fragmentos de 2 por 2 cm en el caso de que sean fragmentos de tejido, o un hisopado que haya sido presionado contra la zona afectada o donde se espera encontrar el microorganismo y depositarlo en un medio de transporte. Cuando se realizan necropsias, es recomendable para estudios bacteriológicos, seccionar partes de los órganos afectados de manera que al arribar la muestra al laboratorio, se pueda volver a seccionar para exponer zonas del tejido que no han estado en contacto directo con el medio ambiente. Al recolectar heces, es preferible que la muestra no entre en contacto con fuentes de contaminación natural como es el suelo o agua del medio ambiente, sino que sea depositada en un contenedor estéril. En todos los casos se debe proceder a tomar una

**Cuadro 1.1** Muestras adecuadas en función del sitio anatómico de estudio.

SITIO ANATÓMICO	MUESTRA ADECUADA	EJEMPLO DE AGENTE ETIOLÓGICO
Vías respiratorias altas	Hisopado faríngeo, secreciones	Virus de Influenza, <i>Bordetella pertussis</i>
Vías respiratorias inferiores	Aspirados, biopsia	Virus de Newcastle, <i>Streptococcus pneumonia</i>
Tracto urinario	Orina (chorro medio, cateterización o aspirado), hisopado uretral, biopsia de riñón o vejiga	<i>Leptospira</i> spp., <i>Enterococcus</i> spp.
Tracto genital	Hisopado uretral (macho) o vaginal (hembra)	<i>Brucella</i> spp., Citomegalovirus
Heridas superficiales Heridas profundas	Aspirados de pus o secreciones Aspirados, biopsia de tejido necrosado	<i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Clostridium</i> spp.
Piel	Biopsia de piel, secreciones	<i>Erysipelothrix rhusiopathiae</i>
Tracto gastrointestinal	Hisopado rectal, heces, biopsia de tejido intestinal, hígado, estómago	<i>Salmonella</i> spp., <i>Strongyloides</i> spp.
Sistema circulatorio Sistema nervioso	Sangre, biopsia de corazón, bazo, líquido cefalorraquídeo, biopsia de encéfalo, médula espinal	<i>Brucella</i> spp., virus Dengue Virus de la Rabia, virus del Oeste del Nilo
Cavidad ótica, ocular o bucal	Hisopado ótico, ocular, bucal, aspirado de secreciones	Adenovirus, Herpesvirus, <i>Candida</i> spp.

muestra lo más “limpia” posible, es decir, que tenga una baja posibilidad de contaminarse con agentes microbianos que se encuentran en el medio ambiente, evitando de esa manera la obtención de resultados falsos positivos; de igual manera no se deben tomar muestras de animales o tejidos en descomposición, pues la microbiota saprófaga puede enmascarar al patógeno que pudo haber sido responsable de la mortalidad.

## **Conservación de la muestra**

Uno de los factores clave para tener éxito en un procedimiento diagnóstico, es la conservación de la muestra, es decir, evitar la degradación del sustrato a agente que servirá como detectable por un método determinado; la elección de un método de conservación dependerá principalmente del tipo de estudio que se realizará.

La variedad de métodos diagnósticos de enfermedades infecciosas es grande y aumenta continuamente con el desarrollo y el uso de nuevas tecnologías, en especial en las últimas décadas con la aparición de técnicas moleculares cada vez de mayor sensibilidad; sin embargo, existen metodologías sencillas utilizadas desde hace muchos años que siguen siendo la mejor opción, pues combinan características adecuadas en cuanto a sensibilidad, precio, facilidad en análisis y conservación de muestras y representatividad epidemiológica. Los métodos diagnósticos se podrían dividir en función del método requerido de conservación de la muestra (Cuadro 1.2).

La refrigeración o congelación de muestras en campo no siempre será posible, debido a que en muchas ocasiones no se contará con el instrumental suficiente, sin embargo se pueden hacer recomendaciones básicas. Para mantener refrigerada una muestra en campo, se recomienda usar refrigerantes en gel contenidos en bolsas selladas, en el caso de no contar con ellas, se puede usar hielo, teniendo cuidado de no generar una acumulación exagerada de agua en el contenedor de las muestras, que puede mermar su conservación. Las muestras que se requieren congelar, deberán mantenerse en un contenedor con hielo seco el mayor tiempo posible; es necesario recordar que el hielo seco pasa a estado gaseoso continuamente y no deberá ser almacenado en contenedores sellados herméticamente.

A su vez, el método de conservación será diferente dependiendo de la naturaleza del patógeno que se requiere conservar, es decir, virus, bacteria, hongo, protozooario o helminto. Cada uno de ellos tiene diferentes niveles de susceptibilidad a factores del medio ambiente, por lo que existen sistemas óptimos para cada uno de ellos, algunos factores básicos a considerar son los siguientes:

**Cuadro 1.2** Requerimiento de conservación en función del método diagnóstico a utilizar.

REQUERIMIENTO DE CONSERVACIÓN	ESTRATEGIA DE CONSERVACIÓN	MÉTODOS DIAGNÓSTICOS	EJEMPLOS DE CONSERVACIÓN
Conservar viabilidad del organismo	Refrigeración en medio que evite proliferación	Aislamiento o cultivo del organismo patógeno, detección de actividad fenotípica	Hisopado en medio de transporte Stuart en refrigeración
Conservar estructura del organismo	Depósito de la muestra en solución que evite descomposición y no afecte estructura	Observación directa en busca del agente	Heces en solución de formol al 10%
Conservar estructura subcelular del organismo	Congelación de la muestra en una solución que detenga actividad bioquímica de degradación	Detección de ácidos nucleicos, proteínas o lípidos	Hisopado faríngeo en medio de transporte viral en congelación
Conservar metabolitos	Congelación sin diluir	Detección de toxinas o anticuerpos	Suero congelado

Cuando la muestra para hacer diagnóstico viral es líquida, normalmente no requerirá usar medios de transporte, pero cuando sean hisopados o fragmentos de tejido, es necesario sumergirlos en un medio de transporte que los proteja. La resistencia de los virus dependerá de la complejidad de su estructura; las muestras deben ser mantenidas a temperatura de refrigeración, pero si el transporte de la muestra tomará más de 24 horas, se recomienda congelar en hielo seco. Los medios para transporte de virus en general contienen un regulador de pH, proteínas para estabilizar los virus y antibióticos para prevenir el desarrollo de microbiota acompañante.

Las bacterias son un conjunto de organismos con capacidades metabólicas muy diversas, entre ellas podemos encontrar bacterias acidófilas y alcalófilas, aerobias y anaerobias, psicofílicas y termofílicas; esta gran variedad hace

difícil la elección del sistema de conservación. En todos los casos requieren un soporte que permita su viabilidad celular, proteja su maquinaria enzimática para poder metabolizar rápidamente sustratos en el laboratorio y no permita la proliferación de bacterias. Existen hoy en día muchos sistemas comerciales para conservar bacterias según sea el tipo: medios para bacterias anaerobias, aerobias, esporulados y exigentes. No se deben congelar las muestras, pues la célula bacteriana se ve muy afectada con los cristales de agua que se forman al disminuir la temperatura.

Muchos hongos se caracterizan por tener estructuras de reproducción resistentes al medioambiente, sin embargo, algunos son muy sensibles a cambios de temperatura y pierden viabilidad rápidamente, por lo que se recomienda transportar las muestras a temperatura ambiente. Cuando las muestras no serán entregadas para el procedimiento diagnóstico en menos de 24 horas se recomienda refrigerar, para evitar el crecimiento de bacterias acompañantes, a menos que se use un medio con agentes antibacterianos. Los hongos son microorganismos aerobios, por lo que no deben ser transportados o almacenados en contenedores que favorezcan las condiciones reductoras o sean especializados en organismos anaerobios.

Los protozoarios y helmintos normalmente no son diagnosticados por métodos de aislamiento o proliferación, sino que se busca identificar estructuras patognomónicas o movilidad característica. En el caso de preservar las estructuras se recomienda una solución fijadora, como lo puede ser el formol en solución salina; las muestras que se encuentren en el agente fijador, no requieren ser refrigeradas, pues en esa solución no hay actividad metabólica. Cuando se busquen hemoparásitos, es recomendable hacer *in situ* un frotis y fijarlo, de manera que se pueda hacer una técnica de tinción en el laboratorio.

### **Medios de transporte para la muestra**

Un medio de transporte se puede definir como un sistema en el cual se conservarán características seleccionadas de una muestra por un tiempo determinado. La complejidad de estos sistemas dependerá de las características de la muestra que se requiera conservar; en el caso de requerir conservar la estruc-

tura celular o pluricelular de un organismo para observación microscópica, como es el caso de quistes o huevos de algún protozooario o helminto intestinal, se puede adicionar a la muestra un agente que detenga toda actividad metabólica y de degradación de la muestra, sin que modifique la estructura que buscaremos, como puede ser el formol al 10%, sin embargo, esa muestra no será útil para el aislamiento de bacterias entéricas. En el caso de requerir conservar la viabilidad de un agente infeccioso para su aislamiento y amplificación, como el aislamiento de un virus en un sistema de cultivo celular, se requiere conservar la capacidad del organismo de multiplicarse, sin que haya proliferación del agente buscado ni otros organismos que pudieran enmascarar su presencia. Si la metodología que se usará para el diagnóstico es cuantitativa, es estrictamente necesario que la concentración del sustrato a cuantificar no varíe desde la toma de muestra hasta el análisis, como pudiera ser la cuenta viable de bacterias enteropatógenas en heces.

En el caso de ser un medio para transportar muestras cuyo diagnóstico no requerirá la viabilidad del organismo, como es el caso de identificación de estructuras de resistencia (quistes) o de transmisión (huevos), tendrán componentes que eviten la degradación de la muestra y no afecten la estructura que se identificará, por ejemplo, una solución de formol al 10% conservará de manera adecuada una muestra fecal para la identificación de quistes de protozoarios entéricos. Si se espera observar movilidad microscópica de flagelados entéricos, es necesario que la muestra de heces sea fresca y se analice lo más pronto posible o se mantenga en una solución isotónica, como solución salina al 0.8%.

Cuando el método diagnóstico se base en el aislamiento y crecimiento del agente infeccioso, es de suma importancia mantener la muestra de manera que no se pierda la viabilidad del organismo. La congelación de una muestra sin un adecuado crioprotector, afecta de manera significativa la cantidad de células que permanecerán viables al descongelar la muestra, por lo que es recomendable mantener la muestra en refrigeración a 4°C.

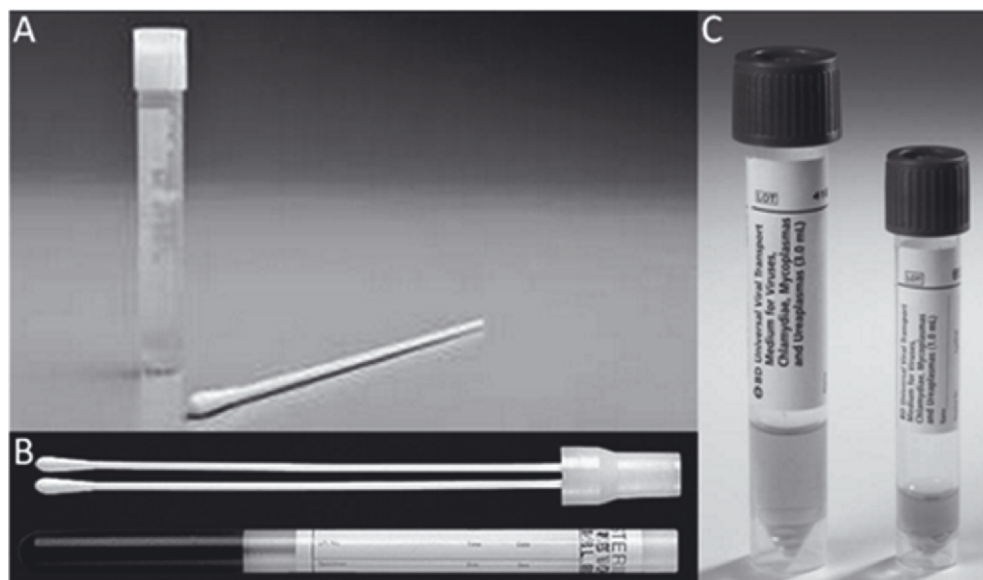
En casos cuando se pretende diagnosticar a un patógeno que se encuentra en bajas concentraciones en la muestra, se pueden usar medios de enriquecimien-

**Cuadro 1.3** Ejemplos de algunos sistemas de transporte de muestra y su uso final.

SISTEMA DE TRANSPORTE	APLICACIÓN
Tejido congelado	Inmunohistopatología, técnicas de biología molecular
Tejido fresco (refrigerado)	Aislamiento de bacterias u hongos
Tejido en formol 10%	Histopatología
Heces frescas/ en solución salina 0.8%, (refrigerado)	Observación de patógenos entéricos móviles
Heces en formol 10%	Observación de quistes entéricos
Hisopado en medio de transporte Amies* (refrigerado)	Aislamiento de bacterias anaerobias
Hisopado en medio de transporte Stuart* (refrigerado)	Aislamiento de bacterias aerobias y hongos
Hisopado en medio Caldo Tetrionato*	Enriquecimiento para detección de <i>Salmonella</i> spp.
Hisopado en medio de transporte viral	Aislamiento y detección de virus
Exudado recolectado en jeringa (refrigerado)	Aislamiento de bacterias anaerobias
Exudado recolectado en frasco (refrigerado)	Aislamiento de bacterias aerobias y hongos

\* Ver Apéndice II





**Figura 1.1.** Sistemas comerciales para el transporte de muestras. A) sistema AssayAssure; B) sistema de hisopados bacteriológicos Copan; C) sistema de transporte viral de BD.

to para disminuir la cantidad de agentes acompañantes y promover el desarrollo de algún agente etiológico específico. Como ejemplo, la inoculación de un hisopado rectal en el medio de enriquecimiento Caldo Tetrionato para enriquecer la muestra y lograr la identificación de algunas bacterias del género *Salmonella*.

Actualmente existen diferentes fabricantes de medios de transporte especializados para un gran tipo de muestras y de agentes infecciosos, entre ellas podemos encontrar los sistemas: AssayAssure, Copan y BD (Fig. 1.1).

### **El contacto con el laboratorio diagnóstico**

Al recolectar la muestra es necesario tomar todos los datos que pudiera requerir el laboratorio que realizará el diagnóstico, como son: especie del animal del que se recolectó la muestra, sexo, signos observados, tipo de muestra recolectado, fecha de toma y envío de muestra, administración previa de antibióticos, tipo de conservación que se usó y medio de transporte utilizado. Se

deberán incluir todos los datos en un documento en donde se enliste la cantidad de muestras que se envían, los diagnóstico(s) que se solicita(n), número de identificación de cada muestra, zona geográfica donde se recolectó y el nombre y procedencia del personal encargado de la toma, transporte y envío de las muestras.

### **Bioseguridad**

Cuando se presenta una mortalidad o morbilidad en animales, al tomar la muestra es necesario considerarla como potencialmente infecciosa, pues existen muchos patógenos de animales que pueden causar patologías en los humanos, algunas de ellas muy graves. Se recomienda tomar la mayor cantidad de precauciones posibles que se puedan aplicar en el campo; entre los requerimientos básicos están: guantes de látex, cubre bocas, lentes de seguridad y, de ser posible, el uso de batas desechables; el sitio donde se toma y maneja la muestra deberá ser desinfectado antes y después de su uso con una solución de cloro al 5%. Es muy importante que el personal o instrumentación utilizada en el muestreo no se conviertan en fómites que pudieran diseminar la enfermedad infecciosa a otras regiones geográficas, esto se evitará si se utiliza ropa exclusiva para el muestreo y se desecha cada vez que se usa. Las muestras deben recolectarse en contenedores resistentes al transporte y envío, y además, embalsarse de manera que no representen riesgo al personal que las transporta y recibe. Deben ser etiquetadas o marcadas con tal seguridad de que durante la conservación o el envío no se pierda el control sobre la identidad de cada una de las muestras.

## APÉNDICE I

Tipo de muestra dependiendo del análisis requerido y su posibilidad de realizarlo en campo.

MUESTRA	ANÁLISIS	OBJETIVO DEL DIAGNÓSTICO	ANÁLISIS <i>IN SITU</i>
Sangre completa	Hematología	Conteo eritrocitos y leucocitos	Posible
		Hematocrito	Sí
		Tasa de sedimentación eritrocítica	Sí
	Patógenos	Frotis para conteo celular	Sí
		Frotis para bacterias	Sí
		Frotis para hemoparásitos	Sí
Plasma	Toxicología	Aislamiento bacteriano	No
		Pesticidas	No
	Inmunología	Anticuerpos	No
	Genética	Extracción ADN	No
	Química	Vitaminas, minerales y metales	No
Suero	Química	Enzimas, electrolitos	Posible
	Endocrinología	Hormonas	No
	Inmunología	Globulinas, anticuerpos	No
	Toxicología	Pesticidas	No

## APÉNDICE II

### MEDIOS Y REACTIVOS

- Formol 4 y 10%  
Reactivos para un litro  
Formol 4 o 10 ml  
Agua destilada 96 o 90 ml
- *Lysis buffer* (Longmire *et al.* 1997)  
Reactivos  
Tris-HCl 2 M, pH 8.0 50 ml  
EDTA 0.5 M, pH 8.0 200 ml  
NaCl 5 M 2 ml  
Agua bidestilada 975 ml  
SDS 20% (peso/volumen). 25 ml
- Solución salina fisiológica al 0.9 %  
Reactivos  
Cloruro de sodio 0.9 g  
Agua destilada c.s.p. 100 ml  
*Procedimiento:* Mezclar el cloruro de sodio en el agua destilada, una vez lista la solución, guardar en frasco en un lugar fresco.
- Colorante de Wright  
Reactivos  
Colorante de Wright 0.3 g  
Metanol (CH<sub>3</sub> OH) 100 ml  
Glicerol 3.0 ml  
*Procedimiento:* Disolver en un mortero el colorante con el glicerol, una vez disuelto se adiciona el metanol trasvasándolo a un frasco ámbar. Posteriormente se debe de agitar y filtrar antes de usar.
- Caldo Tetrionato  
Reactivos  
Peptona Proteosa 2.5 g/L  
Caseína Pancreática Digerida 2.5 g/L  
Oxgall 1 g/L

Tiosulfato de Sodio 30 g/L

Carbonato de Calcio 10 g/L

*Preparación:* Disolver los componentes en agua desionizada y hervir, enfriar a 60°C. Agregar 2 ml de solución de iodo (6 g de cristales de iodo y 5 g de yoduro de potasio en 20 ml de agua desionizada) por cada 100 ml de medio. No recalentar o esterilizar en autoclave. Usar inmediatamente. pH final  $8.4 \pm 0.2$ . Usar controles microbiológicos para evaluar el correcto funcionamiento.

- Medio de transporte Amies

Reactivos

Cloruro de Sodio 3 g/L

Cloruro de Potasio 0.2 g/L

Cloruro de Calcio 0.1 g/L

Cloruro de Magnesio 0.1 g/L

Fosfato de Potasio Monobásico 0.2 g/L

Fosfato de Sodio Dibásico 1.15 g/L

Carbón Vegetal 10 g/L

Agar 4 g/L

*Preparación:* Disolver los componentes en agua desionizada, hervir y distribuir en tubos con tapón de rosca. Esterilizar a 121°C por 15 minutos; pH final  $7.3 \pm 0.2$ . Usar controles microbiológicos para evaluar el correcto funcionamiento.

- Medio de transporte Stuart

Reactivos

Tioglicolato de Sodio 1 g/L

Glicerofosfato de Sodio 10 g/L

Cloruro de Calcio 0.1 g/L

Azul de Metileno 2 mg/L

Agar 3 g/L

*Preparación:* Disolver los componentes en agua desionizada, hervir y distribuir en tubos con tapón de rosca. Esterilizar a 121°C por 10 minutos; pH final  $7.3 \pm 0.2$ . Usar controles microbiológicos para evaluar el correcto funcionamiento.

- *RNAlater*

Tissue Collection: RNA Stabilization Solution. Ambion, Inc.

Applied Biosystem, Referencia: AM7020, AM7024, AM7021, AM7022,

AM7023

Qiagen. Referencia 76104, 76106.

Sigma-Aldrich. Referencia R0901.

- Algunos sistemas de transporte de muestras

Thermo Scientific, Sistema AssayAssure

([http://www.thermoscientific.com/ecommerce/servlet/productscatalog\\_11152\\_L11023\\_97173\\_1\\_4](http://www.thermoscientific.com/ecommerce/servlet/productscatalog_11152_L11023_97173_1_4))

Copan

(<http://www.copanusa.com/index.php>)

Becton-Dickinson

(<http://www.bd.com/ds/productCenter/CT.asp>)

## APÉNDICE III

### ALGUNOS LABORATORIOS DE DIAGNÓSTICO EPIDEMIOLÓGICO EN MÉXICO.

#### **Laboratorio de Medicina de Conservación**

Escuela Superior de Medicina. Instituto Politécnico Nacional. Plan de San Luis y Díaz Mirón s/n, Col. Casco de Santo Tomás, Del. Miguel Hidalgo, C.P. 11340, México DF, México. Tel.: 57296000 ext. 62753.  
Correo electrónico: leopoldoaguilar@hotmail.com.

#### **Departamento de Microbiología e Inmunología**

Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Universidad Nacional Autónoma de México. Servicio de diagnóstico: tels.: 01 (55) 56 22 59 00 / 01 / 03, Fax: 01 (55) 56 22 59 71.  
[http://www.fmvz.unam.mx/fmvz/servicios/s\\_microbiologia.html](http://www.fmvz.unam.mx/fmvz/servicios/s_microbiologia.html)

#### **Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológica, Secretaría de Salud Federal**

Benjamín Franklin #132 Col. Escandón Del. Miguel Hidalgo, C.P. 11800. México, DF.  
Tels.: 2614 6892 al 96  
<http://www.cenavece.salud.gob.mx/indre/interior/servicios.html>

#### **Comisión México-Estados Unidos para la Prevención de la Fiebre Aftosa y Otras Enfermedades Exóticas de los Animales**

SAGARPA-CPA. Km. 15.5 Carretera México-Toluca, Col. Palo Alto, Delegación Cuajimalpa, C.P. 05110, México D.F.

#### **Laboratorio de Entomología Médica**

Universidad Autónoma de Nuevo León. Pedro de Alba s/n, Ciudad Universitaria. C.P. 66451. San Nicolás de los Garza, Nuevo León. México.

**Centro de Investigaciones Regionales "Hideyo Noguchi".** Universidad Autónoma de Yucatán. Unidad Itzáes. Avenida Itzáes # 490 x Calle 59. Colonia Centro C.P. 97000 Mérida, Yucatán, México. Tels.: (999) 9245809,9245755, Fax: (999) 9236120. Email: biomedic@www.uady.mx

## BIBLIOGRAFÍA

- Aguirre, A., R.S. Ostfeld, G.M. Tabor, C. House y M.C. Pearl (eds.). 2002. *Conservation Medicine*. Ecological health in practice. Oxford University Press. Oxford, UK.
- Améndola-Pimienta, M., L. García-Feria, J.C. Serio-Silva y V. Rico-Gray. 2009. Noninvasive collection of fresh hairs from free-ranging Howler monkeys for DNA extraction. *American Journal of Primatology* 70:1-5.
- Ancrenaz, M., J.M. Setchell y D.J. Curtis. 2003. Handling, anaesthesia, health evaluation and biological sampling. Pp. 122-139. En: Setchell, J.M. y D.J. Curtis (eds.). *Field and laboratory methods in primatology: A practical guide*. Cambridge University Press.
- Balkiz, Ö., S. Dano, C. Barbraud, S. Tekin, U. Özsesmi, M., Dündar y A. Béchet. 2007. Sexing Great flamingo chicks from feathers bulb DNA. *Waterbirds* 30:450-453.
- Ballweber, L.R. 2001. *Veterinary parasitology*. Butterworth-Heinemann, Woburn, MA. U.S.A.
- Barceló-Vera, L. 2004. Evaluación de contaminantes inorgánicos en tortugas blancas (*Chelonia mydas*) protegidas por el centro ecológico Akumal en el estado de Quintana Roo. Tesis de Licenciatura, Práctica Profesional Supervisada: Producción Acuícola. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, UNAM. México.
- Bello, N., O. Francino, A. Sánchez. 2001. Isolation of genomic DNA from feathers. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 13:162-164.
- Caney, S.M.A. 2010. Feline urine sample collection and in-house urinalysis. *Irish Veterinary Journal* 9:578-582.
- Dalén, L., A. Götherström y A. Angerbjörn. 2004. Identifying species from pieces of feces. *Conservation Genetics* 5:109-111.
- Deem, S.L., W.R. Karesh y W. Weisman. 2001. Putting theory into practice: wildlife health in conservation. *Conservation Biology* 15:1224-1233.
- Frantzen, M.A.J., J.B. Silk, J.W.H. Ferguson, R.K. Wayne y M.H. Kohn. 1998. Empirical evaluation of preservation methods for faecal DNA. *Molecular Ecology* 7:1423-1428.
- Friend, M. y C. Franson. 1999. *Field manual of wildlife diseases. General field procedures and diseases for birds*. U.S. Department of the Interior, U.S. Geological Survey, USGS Biological Resources Division, National Wildlife Health Center, Madison, WI, U.S.A.
- García-Feria, L.M. 2008. Remote sampling of hair for genetic analysis of wild mammals. *Revista de Ecología Latino Americana* 13:1-3.
- García-Feria, L.M., C.A. Ureña-Aranda y A. Espinosa de los Monteros. 2015. Minimally invasive blood sampling method for genetic studies on *Gopherus* tortoises. *Animal Biodiversity and Conservation* 38:31-35.



- González-Jáuregui, M. 2008. Relación de las concentraciones residuales de una mezcla de plaguicidas organoclorados y policlorobifenilos con la concentración de hormonas sexuales de dos poblaciones de *Crocodylus moreletti*. Tesis de Maestría en Ciencias. Instituto de Ecología, A.C. Xalapa, Ver.
- Grossens, B., L.P. Waits y P. Taberlet. 1998. Plucked hair samples as a source of DNA: reliability of dinucleotide microsatellite genotyping. *Molecular Ecology* 7:1237-1241.
- Hamilton, W.D. y M. Zuk. 1982. Heritable true fitness and bright birds: a role for parasites? *Science* 218:384-387.
- Heatley, J.J. y M. Johnson. 2009. Clinical technique: amphibian hematology, a practitioner's guide. *Journal of Exotic Pet Medicine* 18:14-19.
- Hodges, J.K. y M. Heistermann. 2003. Field endocrinology: monitoring hormonal changes in free-ranging primates. Pp. 282-294. En: Setchell, J.M. y D.J. Curtis (eds.). *Field and laboratory methods in primatology: a practical guide*. Cambridge University Press. Cambridge, UK.
- Hoss, M., M. Kohn, S. Paabo, F. Knauer y W. Schroder. 1992. Excrement analysis by PCR. *Nature* 359:199.
- Hudson, P.J., D. Newborn y A.P. Dobson. 1992. Regulation and stability of a free-ranging host-parasite system: *Trichostrongylus tenuis* in red grouse. I. Monitoring and parasite reduction experiments. *Journal of Animal Ecology* 61:477-486.
- Karesh, W.R., R. Cook, E.L. Bennet y J. Newcomb. 2005. Wildlife trade and global disease emergence. *Emerging Infectious Diseases* 11:1000-1002.
- Kosch, M. 1996. Wildlife, people, and development. *Tropical Animal Health and Production* 28:68-80.
- Lindahl, T. 1993. Instability and decay of the primary structure of DNA. *Nature* 362:709-715.
- Longmire, J.L., M. Maltbie y R.J. Baker. 1997. Use of "Lysis buffer" in DNA isolation and its implication for museum collections. *Occasional Papers, Museum Texas Tech University* 163:1-3.
- Mainka, S.A. 2001. The veterinarian's role in biodiversity conservation. *Journal of Zoo and Wildlife Medicine* 32:165-167.
- Marks, S. y R. Houston. 2009. Parásitos intestinales en perros y gatos. *Veterinary Focus* 19:46-48.
- Mautino, M. y C.D. Page. 1993. Biology and medicine of turtles and tortoises. *Exotic pet medicine I, Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice* 23:1251-1269.

- May, R.M. 1983. Parasitic infections as regulators of animal populations. *American Scientist* 71:36-45
- Meffe, G.K. 1999. Conservation Medicine. *Conservation Biology* 13:953-954.
- Mörner, T., D.L. Obendorf, M.Artois y M.H. Woodford. 2002. Surveillance and monitoring of wildlife diseases. *Reveu Scientifique et Technique* (International Office of Epizootics) 21:67-76.
- Mueller, R.S. 2000. *Dermatology for the small animal practitioner*. Teton NewMedia, Jackson, WY U.S.A.
- Norris, S. 2001. A new voice in conservation. *BioScience* 51:7-12.
- Osofsky, S.A., W.R. Karesh y S.L. Deem. 2000. Conservation Medicine: a veterinary perspective. *Conservation Biology* 14:336-337.
- Piggot, M.P. y A.C. Taylor. 2003. Remote collection of animal DNA and its applications in conservation management and understanding the population biology of rare and cryptic species. *Wildlife Research* 30:1-13.
- Raphael, B.L. 1993. Amphibians. *Exotic pet medicine I, Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice* 23:1271-1286.
- Regnaut, S., F.R. Lucas y L. Fumagalli. 2006. DNA degradation in avian faecal samples and feasibility of non-invasive genetic studies of threatened capercaillie populations. *Conservation Genetics* 7:449-453.
- Ritchie, B.W., G.J. Harrison y L.R. Harrison. 1994. *Avian medicine: principles and application*. Wingers Publishing, Inc. Lake Worth, FLA U.S.A.
- Robinson, W.L. y E.G. Bolen. 1989. *Wildlife ecology and management*. Macmillian Publishing Co. New York.
- Roon, D.A., L.P. Waite y K.C. Kendall. 2003. A quantitative evaluation of two methods for preserving hair samples. *Molecular Ecology Notes* 3:163-166.
- Scott, D.W., W.T. Miller, Jr. y C.E. Griffin. 2001. *Muller and Kirk's Small Animals Dermatology*. W.B. Saunders, U.S.A.
- Sedgwick, C.J. y J.C. Martin. 1994. Concepts of veterinary practice in wild mammals. *Exotic pet medicine II, Veterinary Clinics of North America* 24:175-185.
- Sloane, M.A., P. Sunnucks, D. Alpers, L.B. Beheregaray y A.C. Taylor. 2000. Highly reliable genetic identification of individual northern hairy-nosed wombat from remotely collected hairs: a feasible censusing method. *Molecular Ecology* 9: 1233-1240.
- Spear, J.R. 2000. Conservation medicine: the changing view of biodiversity. *Conservation Biology* 14:1913-1917.

- Taberlet, P., L.P. Waits y G. Luikart. 1999. Noninvasive genetic sampling: look before you leap. *Trends in Ecology and Evolution* 14: 323-327.
- Mörner, T., D.L. Obendorf y M.H. Woodford. 2002. Surveillance and monitoring of wildlife diseases. *Revue Scientifique et Technique*. Off. Int. Epiz. 21: 67-76.
- Valderrama, X., W.B. Karech, D.E. Wildman y D.J. Melnick. 1999. Noninvasive methods for collecting fresh hair tissue. *Molecular Ecology* 8:1749-1752.
- Vigilant, L. y K. Guschanski. 2009. Using genetic to understand the dynamics of wild primates populations. *Primates* 50:105-120.
- Wasser, S.K., C.S. Houston, G.M. Koehler, G.G. Cadd y S.R. Fain. 1997. Techniques for application of faecal DNA methods to field studies of Ursids. *Molecular Ecology* 6:1091-1097.
- Woods, J.G., D. Paetkau, D. Lewis, B.N. McLellan, M. Proctor y C. Strobeck. 1999. Genetic tagging of free-ranging black and brown bears. *Wildlife Society Bulletin* 27:616-627.
- Ziegler, T.E., J.K. Hodges, P. Winkler y M. Heistermann. 2000. Hormonal correlates of reproductive seasonality in wild females Hanuman langurs (*Presbytis entellus*). *American Journal of Primatology* 51:119-134
- Zielinski, W.J., F.V. Schlexer, K.L. Pilgrim y M.K. Schwartz. 2006. The efficacy of wire and glue hair snares in identifying Mesocarnivores. *Wildlife Society Bulletin* 34:1152-1161.
- Zuk, M., T. Kin, S.I. Robinson y T.S. Johnsen. 1998. Parasites influence social rank and morphology, but not mate choice, in female red junglefowl, *Gallus gallus*. *Animal Behaviour* 56:493-499.



# capítulo dos

## Técnicas de campo y laboratorio para el estudio de parásitos sanguíneos del orden haemosporida en aves terrestres

*Diego Santiago-Alarcon*

### INTRODUCCIÓN

Los parásitos representan el tipo de vida más exitoso en la Tierra, dado que se estima que más del 50% de los organismos son parásitos, y esta cifra varía dependiendo de la definición de parásito que se use (Poulin y Morand 2000, Poulin 2007). El **parasitismo** en términos generales se define como una relación o simbiosis en la cual uno de los participantes, el parásito, daña a su huésped o vive a expensas de él (Schmidt y Janovy 2009). Normalmente una relación parasitaria se representa con los símbolos +/-, que indican que un organismo, el parásito, se beneficia (+) y otro, el huésped, es perjudicado (-) (Schmidt y Janovy 2009). En los animales el parasitismo ha evolucionado o aparecido al menos 60 veces de manera independiente (Poulin y Morand 2000).

Cuando un parásito vive sobre la superficie del huésped se le conoce como **ectoparásito** y si vive dentro del huésped se le llama **endoparásito** (Schmidt y Janovy 2009). La mayoría de los parásitos son **parásitos obligados**, es decir, estos no pueden completar su ciclo de vida sin pasar al menos parte de su vida infectando a un huésped. Existen **parásitos facultativos**, los cuales no son normalmente parasíticos pero pueden convertirse en parásitos cuando accidentalmente son comidos o entran en una herida u otra cavidad del huésped. Cuando un parásito entra o se adhiere a una especie de huésped que es diferente a la de su huésped normal, entonces se le conoce como un **parásito accidental** o incidental. Algunos parásitos viven todo el tiempo dentro o sobre su

huésped, a estos se les llama **parásitos permanentes** (p. ej. piojos, parásitos de malaria), mientras que un **parásito temporal** o intermitente (p. ej. mosquito, chinche) únicamente se alimenta del huésped y luego se retira. Los **parasitoides** son insectos como avispas (Hymenoptera) o moscas (Diptera) que inyectan sus huevos en un huésped, el cual es por lo regular otro insecto más pequeño, y donde se desarrollan las etapas inmaduras de la avispa o mosca y finalmente matan al huésped cuando emergen. Los **parásitos protoleanos** son aquellos insectos en los cuales solo las etapas inmaduras son parasíticas. Finalmente, muchos parásitos son huéspedes de otros parásitos, a esta condición se le conoce como **hiperparasitismo** (p. ej. un ácaro sobre un mosquito, Schmidt y Janovy 2009).

Los parasitólogos definen varios tipos de huésped, dependiendo del papel que el huésped juega en el ciclo de vida del parásito. El **huésped definitivo** es aquel organismo en donde el parásito alcanza su madurez sexual. Algunos estudios han mostrado que no existe reproducción sexual en algunos parásitos (p. ej. amebas y muchos trypanosomas), en estos casos el huésped definitivo se define de manera subjetiva, como aquel que es más importante para los humanos. El **huésped intermedio** es aquel que se requiere para llevar a cabo una etapa de desarrollo del parásito, pero no se alcanza la madurez sexual en dicho huésped. Un **huésped paraténico** o de transporte es aquel en el cual el parásito no lleva a cabo ningún tipo de desarrollo, pero se mantiene vivo y puede infectar a otro huésped. Cualquier animal que trae consigo un agente infeccioso que puede ser transmitido al humano se le conoce como **huésped reservorio** o simplemente reservorio, aún cuando dicho animal sea un huésped normal para el parásito, es decir un reservorio puede ser un huésped definitivo, intermedio, o paraténico (Schmidt y Janovy 2009).

En una relación parasitaria puede haber más de un huésped, lo cual depende del parásito que se estudie. Los ciclos de vida de los parásitos pueden ser simples o complejos. Por ejemplo, los piojos (Insecta: Phthiraptera) tienen un **ciclo de vida simple**, en donde el parásito pone sus huevecillos sobre el huésped, los cuales pasan por varias etapas de desarrollo (ninfas) sobre el mismo huésped hasta llegar al adulto, y se repite nuevamente el ciclo (Schmidt y Janovy 2009).

Su modo de transmisión es principalmente vertical (de padres a hijos), aunque también puede presentarse transmisión horizontal (entre individuos de una misma población o de diferentes especies) (Whiteman *et al.* 2004). Por el contrario, los gusanos nemátodos (Phylum: Nematoda) han evolucionado **ciclos de vida complejos**, en donde interviene más de un huésped (Poulin 2007). Por ejemplo, el gusano *Gnathostoma spinigerum* (Nematoda: Gnathostomatidae) tiene un huésped definitivo (p. ej. gato), de dos a tres hospederos intermedios (copépodo, anfibio o pez), y varios hospederos paraténicos (humanos, cerdos, aves o víboras) (Schmidt y Janovy 2009). La complejidad del ciclo de vida de un parásito tiene fuertes implicaciones para su control médico. Si no se conoce con certeza las diferentes etapas del ciclo de vida existe una alta probabilidad de que los intentos por controlar una epidemia fallen; o en el mejor de los casos, se puede gastar más dinero del que se debería debido a que no se está atacando la etapa del ciclo de vida del parásito que es más susceptible, y que produciría la mayor reducción en el tamaño poblacional del parásito.

La diversidad de los parásitos sanguíneos transmitidos por vectores es enorme, incluye grupos muy diversos como son los virus, las bacterias, y las malaria. En este capítulo nos enfocaremos a las técnicas utilizadas para el estudio de los parásitos protozoarios del *Phylum Apicomplexa*, del Orden Haemosporida (p. ej. malaria, hemoproteosis) que infectan la sangre de los vertebrados y que son transmitidos por vectores del Orden Diptera (moscas, Valkiūnas 2005, Santiago-Alarcon *et al.* 2012). Estos parásitos presentan un ciclo de vida en donde intervienen dos tipos de hospederos: un insecto (vector) que es el huésped definitivo y un vertebrado que es el huésped intermedio. Aún cuando nos enfoquemos al estudio de los Haemosporida, la diversidad de este grupo es muy grande, solo en aves se han descrito más de 200 especies con base en su morfología, las cuales incluyen más de 1,000 variedades genéticas (Valkiūnas 2005, Bensch *et al.* 2009). Aunado a esto, la diversidad de los vectores que transmiten dichos parásitos es muy amplia, existen principalmente cinco familias de moscas (Culicidae, Ceratopogonidae, Hippoboscidae, Simuliidae, Psychodidae) cada una de las cuales contiene cientos o miles de especies que pueden actuar como vectores de uno o más parásitos Haemosporida (Schall 1996, Davies y Johnston 2000, Santiago-Alarcon *et al.* 2012). En este grupo de

parásitos se encuentra la malaria humana o paludismo, la cual causa millones de infecciones y miles de muertes cada año en África, América Latina y el sureste Asiático (Enayati y Hemingway 2010). El paludismo puede ser producido por 13 diferentes especies de *Plasmodium*, pero principalmente son cuatro las causantes de los problemas de salud pública en el mundo: *P. vivax*, *P. falciparum*, *P. ovale*, *P. malariae* (Enayati y Hemingway 2010).

## Métodos de campo

### Captura de los animales vertebrados

Existen varios métodos para capturar animales de los diferentes grupos de vertebrados. Se sugiere al lector revisar los capítulos 3 y 5 del volumen 1 de este manual (Gallina y López-González 2011) para revisar las técnicas de captura de anfibios, reptiles y mamíferos. Aquí desarrollaremos brevemente las técnicas para la captura de aves, y se recomienda que el lector consulte Keyes y Grue (1982), McClure (1984), Bub (1991), Ralph *et al.* (1994) y Hull y Bloom (2003) para obtener una descripción detallada de cada método aquí mencionado.

El método principal de captura de las aves son las redes ornitológicas o redes de niebla, las cuales pueden ser fabricadas en nylon o poliéster. Normalmente son de 2.6 m de alto y la longitud puede ser de 6, 9, y 12 m. Las redes de niebla pueden ser fabricadas de diferentes colores, cuya selección dependerá del tipo de hábitat donde se desea muestrear (p. ej. el color negro es ideal para zonas arboladas). La luz de malla (apertura de orificio de la red) también puede ser variable dependiendo del tipo de aves que se desean capturar. Para aves pequeñas como colibríes (Trochilidae) y chipes pequeños (Parulinae) la luz de malla puede ser de 24 mm y para aves del tamaño de chivirines (Troglodytidae) y trepatroncos (Dendrocolaptidae) puede ser de 30 mm. La luz de malla de 36 a 38 mm es un tamaño general que puede atrapar aves que van desde un gorrión pequeño (Emberizidae) hasta azulejos (Turdidae). La luz de malla de 60 a 61 mm capturarán aves de tamaño mediano como palomas grandes (Columbidae), aves playeras chicas a medianas como los chorlos (Charadriidae) y halcones pequeños (Falconidae, p. ej. *Falco ruficularis*). La luz de



malla de 100 mm puede atrapar aves como halcones pequeños o medianos (p. ej. *Falco femoralis*) y aves playeras de tamaño mediano a grande. Finalmente, la luz de malla de 121 mm puede capturar aves como gaviotas (Laridae), patos (Anatidae) y otros halcones (Falconidae).

Para colocar las redes a nivel del suelo se utilizan postes, ya sea de madera o de aluminio o cualquier material resistente, que tengan de 3 a 3.5 m de alto. Las redes de niebla pueden ser adquiridas con distintos comerciantes en línea, tres de los principales son Avinet, Ecotone y Manomet, pero se necesita tener permiso de captura y colecta de aves por parte de las autoridades correspondientes de cada país y localidad (p. ej. SEMARNAT en México) de otra manera los proveedores no autorizarán la compra de las redes.

Aprender a manejar las redes de niebla conlleva mucha práctica y paciencia, y algo importante de recordar es que por lo regular distintas personas tienen diferentes técnicas para capturar aves usando las redes; los detalles de la captura que funcionan para una persona no necesariamente funcionan para otra. Las redes de niebla tienen por lo regular cuatro bolsas divididas por tensores, estos tensores tienen un aro de cuerda en cada extremo de la red que es la parte de la red que se coloca en el poste para poder abrirla (Fig. 2.1). Existen muchas reglas importantes cuando se trabaja con las redes de niebla, pero la más importante es “cuando se coloca o se quita una red, esta nunca debe de tocar el suelo”, esto es para evitar que los escombros en el suelo se enreden en la red o la rompan, aunque en realidad esto es difícil de cumplir ya que en algún momento por accidente la red toca el suelo u otros objetos a su alrededor, pero siempre hay que tratar de apegarnos a esta regla. Otra regla importante a seguir es que “cuando se trabaja con redes es necesario utilizar ropa que tenga el menor número de accesorios en donde la red se pueda enredar, como son botones, cierres, decoraciones, etc.”

Las redes de niebla son enviadas en bolsas de plástico por el fabricante, una vez que se usaron es recomendable guardarlas en las mismas bolsas o en bolsas de tela en donde puedan secarse, si es que se mojaron. Existe un método adicional para guardar las redes, mediante el uso de bolsas plásticas con asas

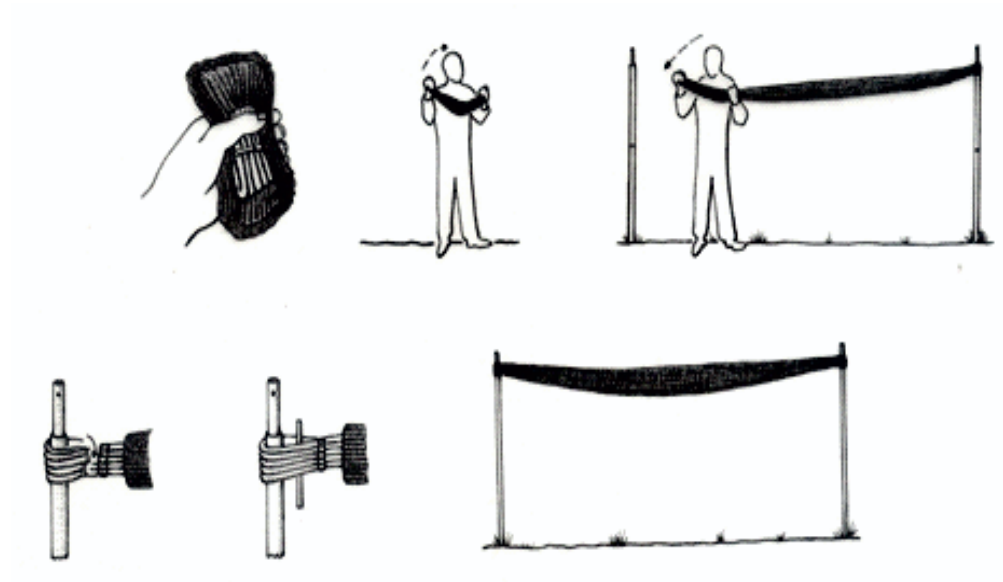


**Figura 2.1.** Poste para sostener la red y tensores de la red que se colocan en el poste: (a) red abierta mostrando las bolsas o secciones en donde cae el ave; (b) una línea de dos redes de niebla abiertas listas para capturar aves (Fotos: Diego Santiago Alarcón).

(bolsas del supermercado), este método permite que la red se guarde en orden y que no se enrede, lo cual hará más fácil su transportación y colocación la siguiente vez que se usen, para los detalles de este método consultar a Blackshaw (1993).

### ***Para colocar una red se siguen los siguientes pasos***

- 1) Para sacar la red de su bolsa, se toman primeramente los dos extremos de la red (por lo regular hay 5 tensores [aros] en cada extremo de la red). Una vez identificados los dos extremos, la red junto con un juego de tensores se coloca debajo del brazo para sostenerla mientras se trabaja con el otro juego de tensores (Fig. 2.2).
- 2) Los tensores tienen que ser separados uno por uno y asegurarse de que están en orden, por lo regular uno de los tensores (el superior, es decir el



**Figura 2.2.** Pasos para colocar una red de niebla (Ilustración: Edmundo Saavedra Vidal).

último que se colocara en el poste) está marcado con un color diferente a los demás (generalmente el asa es de color blanco). Tome este tensor y vaya abriendo los otros tensores poco a poco hasta asegurarse de que están en orden. Una vez en orden se insertan en el poste (por lo regular otra persona debe estar asistiendo al que pone la red) y el asistente fija el poste en la posición deseada (Fig. 2.2).

- 3) Una vez que el primer juego de tensores está colocado en el poste, se toma la red con las dos manos y se empieza a caminar sobre la vía que se limpió para colocar la red (se debe intentar en todo momento que la red no toque el suelo al ser estirada), una vez extendida, hay que asegurarse que el otro juego de tensores esté en orden y que la red no esté torcida, es decir que no haya giros con respecto al otro extremo, de otra forma la red no se podrá abrir adecuadamente (Fig. 2.2).
- 4) Se colocan los tensores en el otro poste, el asistente fija el poste al suelo y la red se abre (Fig. 2.2). En ocasiones el suelo es muy duro y los postes no pueden ser enterrados, por lo tanto, es necesario que los postes sean tensados con cuerda adicional. La cuerda se coloca entre el tercer y cuarto tensor

(contando tensores de abajo hacia arriba) y se amarra ya sea a un árbol, arbusto, o con una estaca (de aluminio, plástico o madera) que se entierra en el suelo; se estira la red hasta que queda tensa a lo largo.

- 5) Finalmente, debe asegurarse de que cada sección de la red (el espacio entre dos tensores, donde se forma la bolsa de red en donde quedará atrapada el ave) no esté muy estirada o con mucha tensión, ya que esto hará que las aves reboten en la red.

### ***Para guardar una red se siguen los siguientes pasos***

- 1) Debe asegurarse que la red este limpia, por ejemplo libre de hojas y/o ramitas. Una vez que está limpia se cierra la red, es decir los tensores se ponen juntos sobre el poste y en ambos lados de la red y se sigue el mismo procedimiento que se utilizó para abrir una red, nada más que ahora al revés (Fig. 2.2).
- 2) El asistente desamarra la cuerda atada a un árbol o estaca de uno de los extremos, mientras el que guardará la red sostiene el poste. Se toma el conjunto de los tensores y se sacan del poste, siempre asegurándose de mantenerlos en orden. Una forma de mantener su orden, es amarrar los tensores utilizando el tensor superior (el que tiene un color diferente) o utilizando una cuerda o liga, la cual se pasa por en medio de los tensores y se hace un nudo. Si se utiliza la técnica de la bolsa con asas, entonces una de las asas se pasa por en medio de los tensores y de esta manera quedan en orden.
- 3) Se sostiene el juego de tensores amarrados en una mano, y con la otra se toma la red, se comienza a doblar la red en pequeñas secciones (tan largas como el brazo estirado) hasta llegar al otro extremo. Una vez en el otro extremo y una vez que el asistente ha desamarrado el poste, se toma el segundo juego de tensores y se amarran en orden como se explicó anteriormente, o se utiliza la otra asa de la bolsa y se pasa nuevamente por en medio del juego de tensores. Se termina de doblar la última sección de la red y los tensores se ponen juntos sobre la red (Fig. 2.2). Otra forma adicional de mantener el orden de los tensores y la propia red en el interior de una bolsa de plástico, es usar ambas asas de la propia bolsa, la cual se pasa por en medio de cada conjunto de tensores y se hace un nudo (Blackshaw 1993).

El colocar, quitar y guardar una red es sencillo en la práctica, pero un poco más difícil de explicar como se intentó anteriormente, por lo tanto se recomienda ampliamente que la primera vez que se trabaje con redes se cuente con un ornitólogo con amplia experiencia en el uso de este método. Algunas recomendaciones prácticas son: (1) si la red se moja durante su uso, será necesario que una vez que se regrese al laboratorio u otra instalación, la red se saque de su bolsa y se seque, esto debe hacerse lo antes posible, de lo contrario existe el riesgo de que los hongos deterioren la red; (2) si la red tiene muchos hoyos o está muy dañada no vale la pena arreglarla, es mejor desecharla, pero para desecharla se recomienda ampliamente quemarla. Si la red se desecha sin quemar puede caer en manos de personas que todavía la pueden utilizar para atrapar aves que son usadas como comida o en comercio ilegal; y (3) si todavía no se tiene suficiente experiencia y no se cuenta con un asistente, entonces no intente poner las redes por sí solo. Con mucha experiencia es posible colocar redes por sí solo y aún así a veces puede ser complicado y lento.

Las redes de niebla pueden ser usadas en diferentes estratos de vegetación en un bosque (p. ej. sotobosque, dosel), esto con la finalidad de muestrear aves que pasan la mayor parte del tiempo en la parte media del bosque o en el dosel (p. ej. Holbrook 2011). Para subir las redes al dosel se buscan sitios no muy cerrados (que no haya ramas bloqueando el camino por donde subirá la red), y se utiliza un sistema de poleas, para mayores detalles sobre esta técnica se recomienda revisar McClure (1984). Si se pretende realizar un estudio en aves de dosel se recomienda ampliamente que se busque la ayuda de un ornitólogo que tenga experiencia con este método.

Existen otros métodos menos conocidos para capturar aves, los cuales se mencionan a continuación; imágenes y descripciones detalladas de estos métodos pueden ser encontradas en McClure (1984) y Bub (1991).

- 1) Trampas de caída (*Fall traps*)
- 2) Trampas de túnel (*Funnel traps*)
- 3) Jaulas (*Cage traps*)

- 4) Pozos (*Pit traps*)
- 5) Redes de caída (*Drop nets*)
- 6) Redes aéreas de tenaza (*Aerial clap nets*)
- 7) Redes de arco (*Bow nets*)
- 8) Trampa tipo horca (*Nooses*)

A pesar de la popularidad de las redes de niebla, las trampas con cebo son las más nobles y menos traumáticas para las aves, ya que después de caer en la jaula y pasar el trauma inicial la mayoría de las aves se tranquilizan y comienzan a alimentarse, incluso algunas de ellas regresan nuevamente a la trampa, al parecer el costo de ser manipuladas por un ornitólogo vale el precio de una buena comida. Cada método tiene sus fortalezas y utilidades dependiendo del tipo de aves que se desean estudiar; sin embargo, las redes de niebla, a pesar de su desventaja con relación a la seguridad de las aves, son las más prácticas para el trabajo de campo y pueden capturar la mayor variedad de aves. Por lo tanto, se recomienda el uso de las redes de niebla para el estudio de los parásitos de las aves, ya que nos interesa conocer la diversidad de parásitos que infectan a las aves.

En ninguno de los métodos arriba mencionados se sacrifica o mata al ave, siempre hay el riesgo de accidentes que pueden dañar al ave, pero ninguna de esas trampas está diseñada para lastimar a los organismos. Para la mayor parte de los estudios de los parásitos de sangre no es necesario sacrificar al individuo capturado ya que solo se requiere una pequeña muestra de sangre. Las únicas ocasiones en que se sacrifican a las aves es cuando se realizan ciertos experimentos en cautiverio para conocer los efectos que los parásitos tienen sobre los órganos internos de las aves (p. ej. Palinauskas *et al.* 2008, 2011), lo cual requiere el análisis microscópico de los tejidos (histología).

#### **Extracción de un ave de la red y su manejo para la toma de muestras de sangre**

El método para extraer a un ave de la red varía entre las personas, y es un proceso que toma mucha práctica, paciencia y, sobre todo, responsabilidad ética ya que se está manejando a un organismo vivo, el cual merece todo nuestro respeto y cuidado. Manejar a un ave en la red y fuera de la misma debe de

hacerse con firmeza y con mucha delicadeza al mismo tiempo. A continuación explicaré el método que se utiliza y que se considera más práctico; sin embargo, debo remarcar que es necesario que una persona principiante siempre trabaje con un ornitólogo de amplia experiencia en el manejo de las aves en redes. La regla más importante es “La vida del ave es lo más importante”.

### ***Extracción de un ave de la red***

- 1) Se determina de qué lado de la red entró el ave.
- 2) Una vez que se sabe de qué lado entró, se toma al ave con toda la mano (sin apretarla) para inmovilizarla (si es grande entonces se trabaja entre dos personas). Una vez inmovilizada se dejan libres las dos patas.
- 3) Siempre se empieza a desenredar al ave por las patas. Cuando se libera una pata, ésta se coloca entre el dedo índice y medio y se continúa con la otra pata. Cuando se han desenredado ambas patas, los muslos se colocan entre el dedo índice y el medio para evitar que se enreden nuevamente, mientras se continúa liberando las otras partes del cuerpo del ave.
- 4) Se sostiene al ave por las patas como se indicó en el punto anterior, y se comienza a desenredar una de las alas del ave. Los hilos de la red se enreden por encima del hombro y entre las plumillas secundarias. Por lo tanto, para liberar el ala, se deben buscar los hilos por la parte interior del ala y pasarse uno por uno por encima del hombro hasta que quede liberada. Una vez liberada, el ave se toma de diferente manera, asegurándose de que las patas no se enreden nuevamente, con una mano pase los dedos índice y medio por la nuca del ave y apoye al ave sobre la palma de su mano asegurándose de que el ala liberada esté pegada al cuerpo del ave, manténgala pegada al cuerpo del ave con su dedo pulgar y trate de mantener las patas alejadas de la red con la misma mano (si es un ave pequeña se pueden usar los dedos anular y meñique para mantener las patas pegadas al cuerpo del ave mientras se liberan la cabeza y la otra ala).
- 5) Una vez que el ave está asegurada en la mano, se procede a liberar la cabeza. Primeramente se buscan los hilos en la nuca, muchas veces es necesario soplar un poco para abrir el plumaje y poder localizar los hilos. Cada uno de los hilos se pasa por encima de la cabeza del ave. Una vez liberada, se procede a liberar el ala faltante como se describió anteriormente.

- 6) Finalmente, el ave se sostiene en la mano con la cabeza mantenida entre los dedos índice y medio (Fig. 2.3) y se coloca en una bolsa de tela para poder transportarla al lugar donde será procesada.
- 7) Las redes deben ser revisadas cada 5 minutos cuando hay una alta actividad; es decir, si cada cinco minutos cae un ave entonces ese debe ser el intervalo a utilizar. El tiempo promedio en que se revisa una red es de 10 minutos, este puede extenderse a 15 minutos si la actividad es muy baja, pero no más debido a que si cae un ave hay un alto riesgo de que se lastime estando mucho tiempo en la red, incluso puede ser depredada.

### ***Toma de muestra de sangre***

Para el estudio de los parásitos de sangre del Orden Haemosporida se toma una pequeña muestra de sangre, el volumen de dicha muestra se determina con relación al peso corporal del ave. El máximo que se puede extraer de sangre como regla estricta es el 3% del peso corporal del organismo, pero se recomienda el 1%. Por ejemplo, de un colibrí de 6.0 g solo se debería de extraer un máximo de 1.8  $\mu$ l (microlitros), es decir una gota de sangre que sería útil para la preparación de uno o dos frotis sanguíneos.

Este protocolo es el mismo para la obtención de sangre de cualquier vertebrado, lo único que cambia es el manejo y lugar de punción para la obtención de la sangre; se recomienda consultar a Campbell y Ellis (2007) para la descripción exacta de cómo obtener muestras de sangre de los diferentes grupos de vertebrados. Aquí presentamos el protocolo para aves, que es muy similar para murciélagos (se pica la vena braquial), la diferencia es que en murciélagos también se puede obtener sangre de venas del uropatagio (membrana de piel que está entre los dedos de las patas traseras).

En la siguiente página web se encuentran protocolos en inglés que pueden servir como referencia: <http://www.uvm.edu/~jschall/techniques.html>, esta liga es especialmente útil para varios tipos de protocolos y también contiene una película mostrando cómo preparar un frotis sanguíneo y fotografías de cómo sostener al ave en la mano para la extracción de sangre.



**Material necesario para los procedimientos aquí descritos**

1. Tubos microcapilares con heparina para evitar que la sangre se coagule en el tubo.
2. Portaobjetos para preparación de frotis sanguíneo con área para rotular.
3. Algodón o Q-tips (hisopo) y alcohol para limpiar el área donde se utilizará la aguja para la punción de la vena braquial; de forma alternativa al alcohol, se podrían comprar toallitas de algodón (*alcohol swabs*) que ya vienen bañadas en alcohol y vienen en sobres individuales.
4. Agujas de diferentes tamaños y calibres: 1) 20G x 38 mm; 2) 22G x 38 mm; 3) 25G x 16 mm; 4) 27G x 13 mm; y 5) 30G x 13 mm. Se utiliza este rango de tamaños porque es probable que las aves que se capturen varíen en tamaño desde algo muy pequeño hasta una que otra muy grande (p. ej. rapaz).
5. Metanol puro. Este es para fijar las preparaciones de los frotis sanguíneos.
6. Tinción de Giemsa (para tinción de estructuras celulares y parásitos sanguíneos). Este es para teñir los frotis sanguíneos, la marca Baker o Sigma nos han funcionado bien.
7. portalaminillas/portaobjetos plásticos pequeños para 5 muestras (contenedores Coplin). Estos son los contenedores en donde se colocan los portaobjetos para fijarlos con el metanol, son para un máximo de cinco portaobjetos. Son los que utilizaremos en el campo.
8. 3 porta laminillas/porta objetos para contener 25 portaobjetos. Estos se utilizarán en el campo para guardar las preparaciones una vez que estén fijados en metanol y secos.
9. Cajas coplin para teñir las muestras que se han fijado en el metanol. Estos contenedores son más grandes, pueden sostener entre 24 y 48 laminillas y son los que se utilizan para teñir las muestras con Giemsa.
10. 1 frasco de 500 mg de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  (fosfato de sodio di-básico) y un frasco de 500 mg de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (fosfato de potasio monobásico) para preparar el buffer salino en donde se diluye el Giemsa.
11. Aceite de inmersión para microscopía, para revisar los frotis sanguíneos bajo el microscopio en aumento alto (objetivo 100x).
12. Tubos plásticos de 1.5 ml para biología molecular. Estos son para guardar las muestras de sangre que se utilizarán para extraer el ADN y hacer el trabajo molecular. La forma alternativa para guardar las muestras sanguí-

neas en lugar de utilizar tubos plásticos es por medio de la utilización de papel filtro, en donde se hacen varios puntos de sangre, se secan, guardan en bolsas plásticas con silica gel para mantenerlas secas y luego se guardan a -20°C en el laboratorio hasta que sean usadas para extraer el ADN.

13. Una caja de pipetas de plástico desechables. Y una bandeja plástica para tubos de laboratorio molecular, la cual se utiliza para colocar los materiales que se utilizan durante el procesamiento del ave.
14. Dos o tres mini-ventiladores (de baterías) portátiles que se utilizarán para secar los frotis sanguíneos, en especial cuando el clima es muy húmedo. La humedad puede arruinar las preparaciones si estas no se secan rápidamente.
15. Material de vidrio para laboratorio. Una probeta de 1 litro, una probeta de 500 ml, un embudo, un contenedor de 1 litro y otro de 500 ml.
16. Una carpa o techo del material que se utiliza en las tiendas de campaña para poder trabajar en condiciones secas cuando los días son muy húmedos o está llovisnando.
17. Una libreta de campo u hojas de campo para anotar todos los datos correspondientes de cada ave muestreada.

### ***Pasos para la obtención de la muestra de sangre de un ave***

1. Un ave de tamaño pequeño se sostiene con una mano (ver Fig. 2.3). En caso de ser un ave grande, es necesaria la ayuda de otra persona, una sostendrá al ave y la otra tomará la muestra.
2. Cuando el ave se tiene bajo control, esta se coloca boca arriba, la espalda del ave recargada sobre la palma de la mano. Con el dedo índice y medio se sostiene el ala del ave en posición abierta (Fig. 2.4).
3. Con la ayuda de un algodón o con un Q-tip impregnado con alcohol al 70%, se comienza a separar las plumas de la parte del codo del ala para exponer el área de la vena que será punzada para obtener la muestra de sangre (Fig. 2.4).
4. Una vez que la vena este visible y el área de la piel donde se hará la punción sea limpiada con alcohol, se procede a puncionar la vena con una aguja nueva del tamaño de aguja correspondiente (por eso es necesario tener una amplia disponibilidad de agujas de diferentes tamaños, Fig. 2.4).
5. Se debe tener listo un tubo microcapilar, dos o tres porta objetos limpios y un

tubo plástico de 1.5 ml (Figs. 2.5a, b, c) o papel filtro para la toma de la muestra. Todo este material debe de estar debidamente etiquetado con lápiz y con la siguiente información: fecha, sitio de colecta, nombre de la especie y un número de registro único para poder ligarlo a la libreta de campo y más tarde a una base de datos (la cual contiene toda la información morfológica, edad, sexo, y observaciones de campo) que se llena después del trabajo de campo.

6. En aves pequeñas (paserinas de unos 18.0 g) el máximo de sangre a colectar es un cuarto de un tubo microcapilar de 75  $\mu$ l, por lo cual es importante que una vez que el tubo haya alcanzado dicho volumen se retire rápidamente, se coloque un pedazo de algodón seco sobre la herida y se haga ligera presión ya sea con el dedo pulgar de la mano que sostiene al ave o se coloca el

**Figura 2.3.** Manera correcta de sostener un ave en la mano (Ilustración: Edmundo Saavedra Vidal).

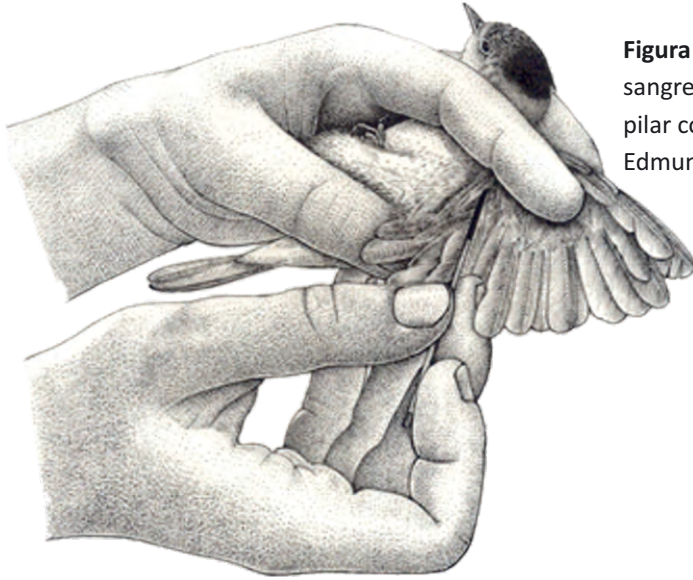




**Figura 2.4.** Ave en posición para tomar muestra de sangre de la vena del ala y punción de la vena braquial (Foto: Diego Santiago Alarcón).

algodón y se cierra el ala para mantener presión sobre la herida. Dependiendo del individuo y especie de ave la herida puede tardar en coagular de unos segundos a varios minutos por lo que es importante mantener una presión ligera con el algodón sobre la herida y supervisar continuamente para ver que el sangrado se ha detenido (NO liberar al ave si el sangrado continúa).

Otra opción para detener el sangrado es la utilización de un producto comercial como el Bleed Stop® (Vetinova de México, S.A. de C.V.). Después de poner un poco de algodón sobre la herida, rápidamente con los dedos índice y pulgar se toma una cantidad suficiente de Bleed Stop® que se pone



**Figura 2.5a.** Obtención de la sangre usando un tubo microcapilar con heparina (Ilustración: Edmundo Saavedra Vidal).



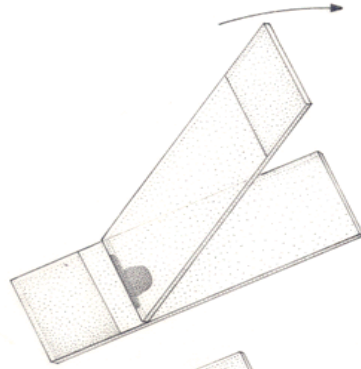
**Figura 2.5b.** Material necesario para guardar la muestra de sangre y preparar los frotis sanguíneos (Foto: Diego Santiago Alarcón).

directamente en la herida, se presiona muy ligeramente y en cuestión de segundos el sangrado se detiene.

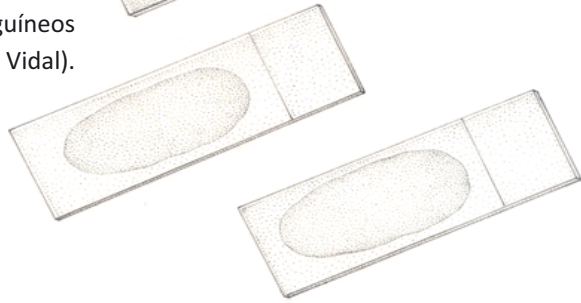
7. La sangre contenida en el microcapilar se utilizará de dos formas: 1) se colocará una gotita de sangre sobre dos o tres portaobjetos previamente etiquetados (una gotita por cada porta objeto), utilizando la orilla de un segundo portaobjeto (se debe mantener un ángulo de 45° con respecto al porta objeto horizontal que tiene la gota de sangre) se expande la gotita sobre dicha orilla y se extiende sobre la laminilla (ver película en la página <http://vertebratesandparasites.blogspot.mx> o en <http://vertebradosconservacion.blogspot.mx>) para hacer el frotis (Fig. 2.6). Se realiza el mismo procedimiento con las otras dos laminillas. Cuando el ambiente es seco o poco húmedo las laminillas se dejan secar solas; si el ambiente es húmedo se utilizarán ventiladores de baterías para secar los frotis lo antes posible y 2) el resto de la sangre contenida en el tubo capilar se coloca en un tubo plástico de 1.5 ml o en papel filtro (según se desee para el posterior procesamiento de las muestras en el laboratorio molecular).

**Figura 2.5c.** Estación de trabajo de campo (Foto: Diego Santiago Alarcón).





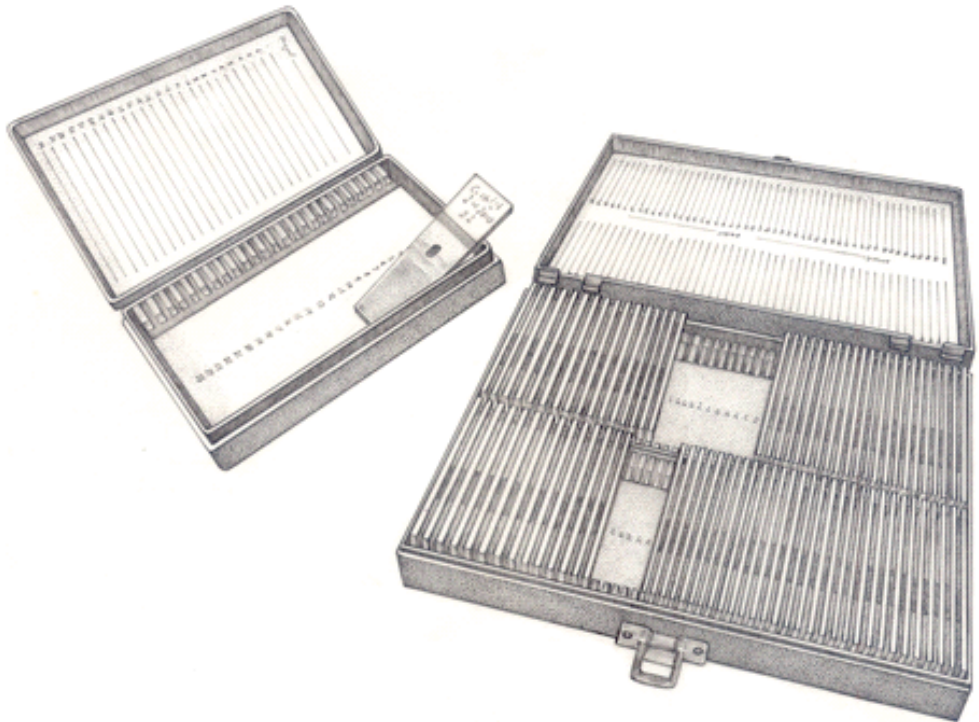
**Figura 2.6.** Preparación de frotis sanguíneos (Ilustración: Edmundo Saavedra Vidal).



8. Una vez que los frotis sanguíneos estén secos, estos se colocarán en metanol al 100% para fijar la muestra en un lapso de 3 a 4 minutos y luego se sacarán y se dejarán secar al ambiente cuando el clima esté seco o poco húmedo, de otra forma se utilizarán nuevamente los ventiladores de baterías para secar la muestra. Recomendación: cuando el ambiente es muy húmedo se recomienda ampliamente trabajar bajo una lona o tienda de campaña pequeña para evitar que la humedad entre en la preparación y eche a perder la muestra. Además, es necesario tener contenedores o bolsas plásticas con sílica gel para poner los frotis a secar y mantenerlos secos.
9. Una vez que los frotis sanguíneos estén secos se guardan en cajas especiales para guardar portaobjetos (Fig. 2.7) o en paquetes hechos de papel (Fig. 2.8) y amarrados con ligas.

### ***Tinción de los frotis en el laboratorio***

1. En el laboratorio se teñirán los frotis sanguíneos con Giemsa histológico (en nuestro grupo utilizamos la marca Baker® y también la marca Sigma-Aldrich®, los cuales han dado excelentes resultados en estudios previos). El



**Figura 2.7.** Cajas para guardar porta objetos con capacidad para 24 muestras (estas se utilizan en el campo, figura izquierda) y para 100 muestras (figura derecha) (Ilustración: Edmundo Saavedra Vidal).

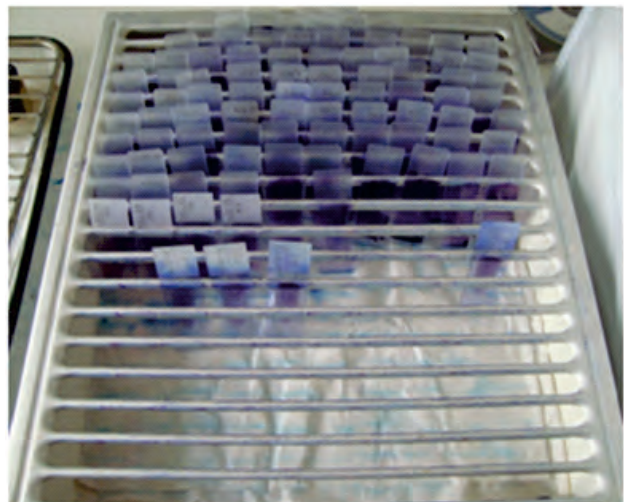


**Figura 2.8.** Método alternativo para guardar los porta objetos utilizando papel. Una vez que el paquete está hecho se utiliza una liga o cinta adhesiva para mantenerlo cerrado y guardarlo (Foto: Diego Santiago Alarcón).

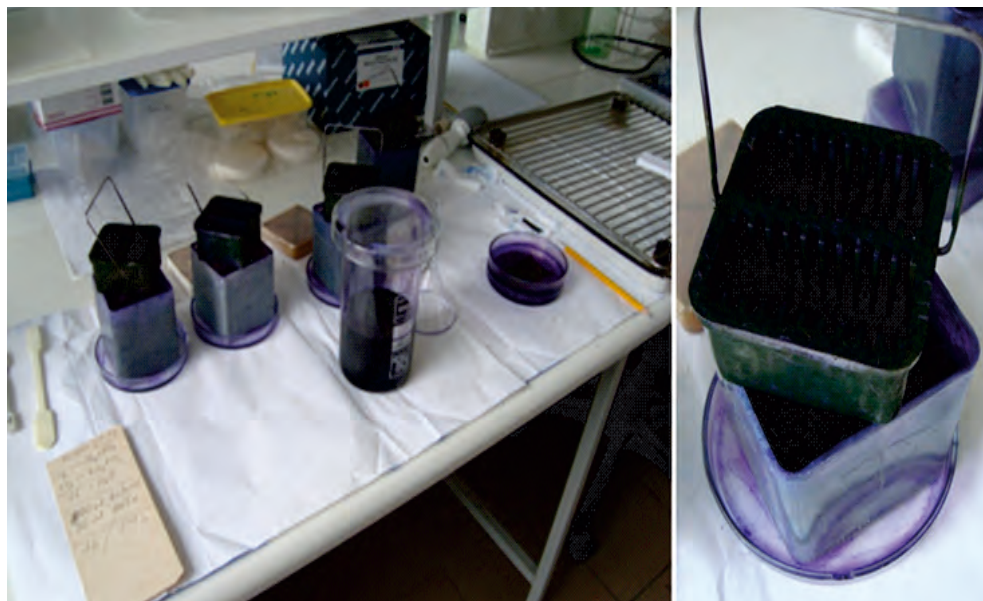


colorante Giemsa, comparado con muchos otros, es muy estable y es el mejor para tener material de calidad para colecciones científicas.

2. Se prepara un buffer salino el cual contendrá un litro de agua destilada ( $\text{dH}_2\text{O}$ ), 1.0g de fosfato de sodio di-básico ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ) y 0.7g de fosfato de potasio monobásico ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ), se revuelve hasta que las sales estén completamente disueltas, el pH del buffer debe estar entre 7.0 y 7.2. Por lo regular el pH del buffer queda en el rango necesario después de prepararlo, pero siempre se debe verificar el pH ya sea con una máquina que mida el pH (potenciómetro) o con tiras de pH, estas últimas son la opción más barata y dan buenos resultados. El buffer debe de prepararse fresco, es decir al instante en que se va a utilizar, el sobrante se desecha.
3. En otro contenedor se verterá el buffer junto con la solución de Giemsa. La proporción es una parte de Giemsa por cada 10 de Buffer para las aves, reptiles, anfibios y peces (p. ej. 10 ml de Giemsa en 100 ml de buffer), y 0.5 partes de Giemsa por cada 10 de Buffer para mamíferos (p. ej. 5 ml de Giemsa en 100 ml de buffer, Fig. 2.9).
4. Utilizando cajas Coplin se vierte el colorante y se colocan los portaobjetos (frotis sanguíneos) por un periodo de una hora (Fig. 2.9). Importante: el colorante siempre debe prepararse fresco (el día que se va a utilizar) y únicamente se utiliza una vez.
5. Transcurrida la hora, se desecha el colorante (ver instrucciones de regulación de materiales peligrosos para saber cómo desechos el colorante) y se



**Figura 2.9.** Bandeja de secado (Foto: Diego Santiago Alarcón).



**Figura 2.10.** Colorante Giemsa disuelto en buffer salino listo para ser vertido en cajas o contenedores Coplin (acercamiento en la foto de la derecha) (Foto: Diego Santiago Alarcón).

enjugan las preparaciones con agua corriente (si el agua es muy dura o contiene muchos minerales entonces se recomienda que las preparaciones se laven con agua destilada), esto es para quitar el exceso de colorante. Se dejan secar a temperatura ambiente en el laboratorio (Fig. 2.10).

- Una vez que las preparaciones están teñidas y secas se guardan en cajas con capacidad para 100 portaobjetos (Fig. 2.7) o en paquetes de papel (Fig. 2.8) sostenidos con ligas; dichos paquetes deben llevar la información de la procedencia de las muestras y la fecha, esto con el propósito de identificarlas en el futuro si es que no se procesan de inmediato.

## Trabajo de laboratorio - microscopía y biología molecular

### *Microscopía*

Para este trabajo se necesita un microscopio óptico (p. ej. Nikon 80i). Aquí se realizan dos tipos de trabajo: el primero es la determinación de parámetros poblacionales tales como prevalencia, intensidad de infección y abundancia,

además de conteos diferenciales de células blancas (leucocitos). El segundo trabajo es la determinación morfológica de los parásitos, la cual se realiza siempre con objetivos de alto aumento (ocular 10x y objetivo 100x, Fig. 2.11).

A continuación se definen los parámetros poblacionales mencionados anteriormente y algunos otros de importancia (se recomienda revisar a Bush *et al.* 1997, Rózsa *et al.* 2000).

**Prevalencia** - es el número de individuos de una población que están infectados por el parásito que se está estudiando.

Prevalencia = (número de hospederos infectados/número total de hospederos) X 100



**Figura 2.11.** Foto de un microscopio óptico (Foto: Diego Santiago Alarcón).

**Intensidad** – es el número de parásitos de la misma especie que viven dentro o sobre un huésped. Es decir, este parámetro solo toma en cuenta a los hospederos infectados.

**Abundancia** – es el número esperado de parásitos de la misma especie que viven dentro o sobre cualquier huésped de la población que se esté estudiando. Para este parámetro se están tomando en cuenta los individuos no infectados.  $Abundancia = Prevalencia \times Intensidad$  (suma de la intensidad de cada huésped de la población).

**Intensidad promedio** – es el promedio o media aritmética del número de individuos de una especie de parásito por cada huésped infectado en una muestra o población.

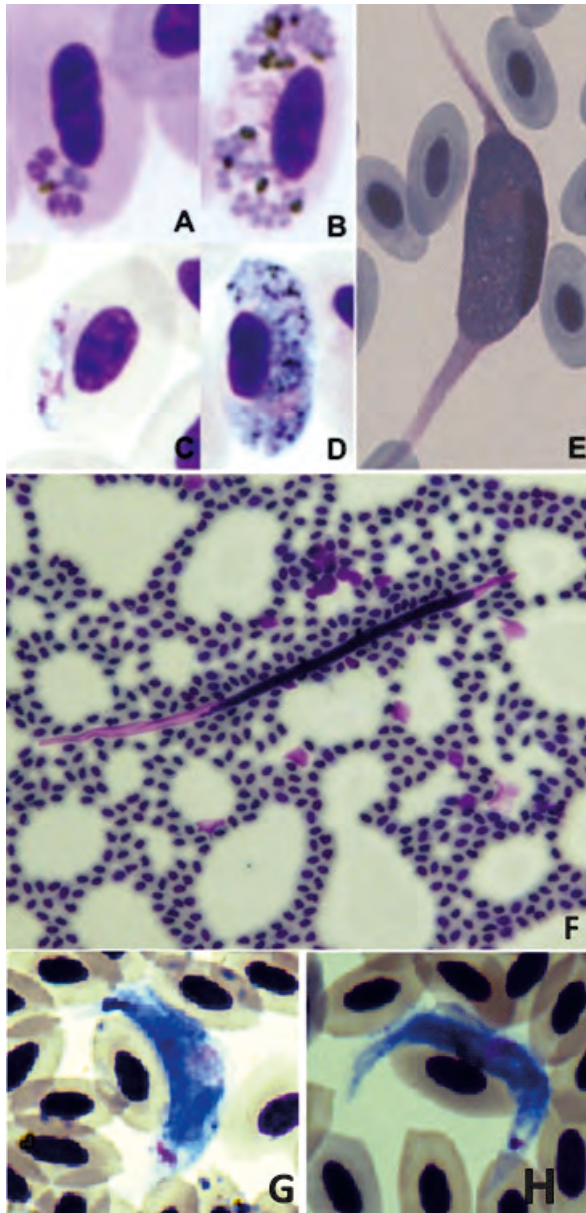
$Intensidad\ Promedio = \frac{\text{número de parásitos en la población}}{\text{número de hospederos infectados}}$

**Abundancia promedio** – es el promedio o media aritmética del número de individuos de una especie de parásito por cada huésped examinado en una muestra/población.

$Abundancia\ Promedio = \frac{\text{número de parásitos en la población}}{\text{número total de hospederos}}$

El procedimiento para analizar un frotis sanguíneo bajo el microscopio es la siguiente:

- 1) utilizar un ocular 10x y un objetivo 40x o 60x en aceite de inmersión (el usuario debe asegurarse de que los objetivos están fabricados para su uso con aceite de inmersión, ya que existen objetivos a 40x que se utilizan en seco) para revisar un área de 2 cm<sup>2</sup> del frotis por 15 minutos (investigadores con experiencia) y por 30 minutos o el frotis completo de preferencia (investigadores novatos) para determinar si la muestra está infectada o no. Si la muestra está infectada, este procedimiento dará la oportunidad de encontrar rápidamente tanto a los parásitos más pequeños (p. ej. *Plasmodium* spp., Fig. 2.12 A, B) como a los más grandes

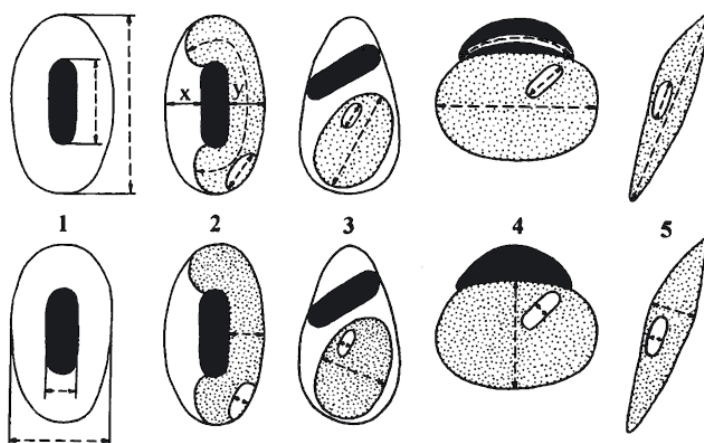


**Figura 2.12.** Parásitos del Orden Haemosporida de los géneros *Plasmodium* (A juvenil/meronte, B adulto), *Haemoproteus* (C juvenil, D adulto), *Leucocytozoon* (E adulto), microfilaria (F larva de nemátodo del género *Pelecitus*), y *Trypanosoma* sp. (G y H adultos) que infectan a las aves (Fotografías tomadas de Campbell y Ellis 2007).

(*Leucocytozoon* spp., *Trypanosoma* spp., filarias, Fig. 2.12E, F, G). Después de esto se revisan 100 campos oculares con aumento alto (ocular 10x y objetivo 100x, se usa aceite de inmersión).

**Recomendación:** el observador deberá determinar la intensidad relativa de infección con aumento alto conforme examina por primera vez la muestra. Esto simplificará enormemente el trabajo subsecuente que requiere seleccionar el material más apropiado para un análisis detallado (p. ej. determinación taxonómica e intensidad de infección). Se recomienda utilizar los siguientes símbolos: “+” 1 a 10 parásitos/100 campos oculares, “++” 11 a 100 parásitos/100 campos oculares, “+++” 1 a 10 parásitos/campo ocular, “++++” > 10 parásitos/campo ocular.

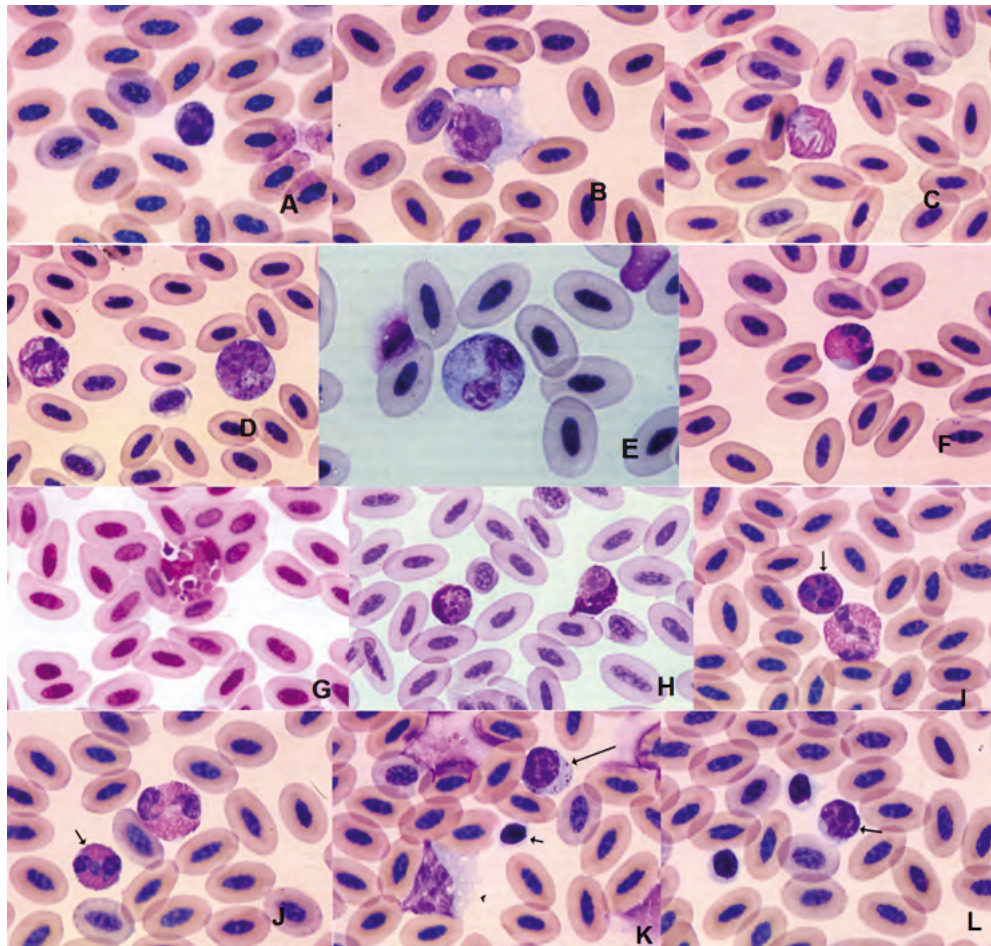
- 2) Si la muestra está infectada, entonces se procede a determinar la intensidad de infección. Para esto se cuenta el número de parásitos que hay por cada 2,000 o 10,000 células rojas en campos ópticos seleccionados al azar. Si el investigador encuentra parásitos en cada campo ocular que es examinado (es decir, la muestra se categoriza con “+++” o “++++”), muy probablemente la intensidad de infección es alta ( $\geq 0.2/100$  eritrocitos) y solo será necesario examinar 1,000 (“++++”) o 2,000 (“+++”) eritrocitos, de otra forma siempre es recomendable examinar entre 6,000 (“++”) o 10,000 (“+”) eritrocitos.



**Figura 2.13.** Diagrama general de medidas morfológicas de longitud (arriba) y ancho (abajo) que son usados para la descripción de especies de parásitos haemosporideos: 1 – eritrocito; 2, 3 – gametocito de *Haemoproteus* y *Plasmodium* sp.: 2 – forma alargada, y 3 – forma redondeada y oval; 4 – gametocito de *Leucocytozoon* sp. y núcleo de su célula huésped; 5 – ookinete; x, y – parámetros usados para calcular la Relación de Desplazamiento del Núcleo (NDR) (Ilustración tomada de Valkiūnas 2005).

- 3) Para determinar las especies de parásitos es necesario utilizar tratados taxonómicos especializados (p. ej. Valkiūnas 2005 para Haemosporida aviar) y buscar la ayuda de un especialista para cada grupo de parásitos que se desea trabajar. En la Fig. 2.13 se muestran las medidas morfológicas que de manera rutinaria se toman para la ayuda en la identificación de los parásitos. Sin embargo, existen otras características taxonómicas (número de pigmentos de hemozoína, localización del núcleo del parásito, la proporción NDR que mide el desplazamiento del núcleo del eritrocito debido a la presencia del parásito) que deben ser consultadas en las claves arriba mencionadas y en artículos recientes que describen nuevas especies de Haemosporida (p. ej. Mantilla *et al.* 2013, Valkiūnas *et al.* 2010, 2013).
- 4) Si se desea hacer un conteo diferencial de células blancas (leucocitos) es necesario tener a la mano el tratado de Campbell y Ellis (2007) o cualquier otro libro que tenga fotografías a color de los diferentes tipos de células blancas para poder identificarlas (en la Fig. 2.14 presentamos algunos ejemplos de células blancas en aves). El conocer las cantidades y proporciones de las células blancas es información básica hematológica para establecer valores de referencia para las especies de hospederos. De manera práctica, ciertas proporciones de células blancas nos permiten saber si el organismo ha estado bajo estrés y/o expuesto a cierto tipo de parásitos; por ejemplo, la proporción de heterófilo/linfocito o mejor conocido como H/L (Lüdtke *et al.* 2013), pero existen restricciones en su utilidad para especies silvestres debido a que sus valores de referencia (es decir, valores normales) son desconocidos, y la proporción H/L que sería normal en una especie puede indicar estrés en otra especie (Campbell y Ellis 2007). Para más detalles sobre estas técnicas se recomienda revisar Valkiūnas (2005) y Campbell y Ellis (2007).

Después de observar la muestra se puede utilizar un pañuelo de papel (p. ej. Kimwipes) para absorber el aceite, se pasa el pañuelo muy ligeramente sobre el frotis. El aceite de inmersión es fácilmente removido utilizando un algodón humedecido con xilol o por inmersión en dicho líquido. El xilol es altamente tóxico y se recomienda su uso en una campana, el investigador debe usar bata y guantes plásticos.



**Figura 2.14.** Fotos de células blancas tomadas de frotis sanguíneos de perico. A: Linfocito maduro con gránulos citoplásmicos azurofílicos; B: Monocito y eritrocitos; C: Heterófilo y eritrocitos; D: Heterófilo maduro normal (izquierda) y heterófilo mielocítico (derecha); E: Heterófilo con un citoplasma obscuro basofílico; F: Eosinófilo normal; G: Eosinófilo con gránulos citoplásmicos hinchados; H: Basófilos y eritrocitos; I: Eosinófilo (flecha) y un heterófilo grande; J: Eosinófilo (flecha) y un heterófilo grande; K: Monocito (punta de flecha), trombocito (flecha corta) y linfocito grande con gránulos azurofílicos (flecha larga); L: Linfocito (flecha) y dos trombocitos entre los eritrocitos.



## **Recomendaciones sobre otros grupos de parásitos**

### **Nemátodos y *Trypanosoma***

En los frotis sanguíneos es posible identificar las etapas larvarias (microfilarias) de varias especies y géneros de gusanos redondos o nemátodos. En caso de que se encuentren microfilarias en las laminillas es posible identificar únicamente hasta nivel de género (p. ej. Fig. 2.12F), recomendamos la utilización del capítulo de Bartlett (2008). Para la identificación de la especie es necesario obtener gusanos adultos, los cuáles se pueden encontrar en diferentes partes del cuerpo del ave dependiendo de la especie (p. ej. los gusanos del género *Pelecitus* forman nódulos en las patas de las aves). **Importante:** cuando se preparen frotis sanguíneos es necesario dejar una preparación sin teñir (pero fijada en metanol al 100%) ya que es necesario contar los núcleos de la microfilaria, el cual es un carácter taxonómico importante, y dichos núcleos se pierden o no son fácilmente identificables cuando la preparación esta teñida.

Cuando se extraen los gusanos adultos en campo es necesario fijarlos ya sea en alcohol al 70% o en formol al 4%, es muy importante que estos líquidos sean calentados (a punto de ebullición) para que cuando los gusanos ingresen al líquido queden extendidos, de otra forma los gusanos quedarán enrollados y complicará el trabajo taxonómico posterior.

Muchos gusanos adultos son eliminados en las excretas, por lo tanto es buena práctica conservar las excretas de las aves capturadas; las excretas deben conservarse en formol al 4% en frascos plásticos pequeños, se debe mezclar bien para que el formol se integre de manera homogénea a toda la muestra. Es igualmente importante obtener una biopsia del tejido en donde se encuentra el gusano para determinar el tipo de daño o patología que dicho parásito genera, la biopsia debe de guardarse en formol al 10%. Para mayor detalle sobre técnicas para obtener y preparar parásitos de vida silvestre ver el manual de Lamothe Argumedo (1997).

El grupo de los parásitos *Trypanosoma* en aves es menos conocido que los Haemosporida y los nemátodos. Existen muchas sinonimias para estos parási-

tos, por ejemplo anteriormente se consideraba a cualquier parásito de este grupo infectando aves como *Trypanosoma avium*, lo cual es incorrecto, actualmente se están mejorando las técnicas moleculares para profundizar en el conocimiento de este grupo (Zídková *et al.* 2012). Uno de los caracteres taxonómicos importantes de este grupo es el ancho del llamado kinetoplástido, que es la parte conspicua de la mitocondria de un *Trypanosoma*. Otros caracteres morfológicos que se utilizan para la identificación de estos parásitos son las medidas de longitud de las etapas conocidas como epimastigote (etapa encontrada en el insecto vector) y trypomastigote (etapa encontrada en el vertebrado), sin embargo es ampliamente recomendado la utilización de técnicas moleculares para la determinación de especies (Zídková *et al.* 2012). Para mayores detalles consultar Schmidt y Janovy (2009) y Zídková *et al.* (2012).

### **Laboratorio Molecular**

**Las técnicas básicas que se realizan en un laboratorio molecular son:**

1. Extracción del ADN, ya sea de una muestra de sangre o de tejido.
2. Reacción en cadena de la polimerasa o PCR (*Polymerase Chain Reaction*) por sus siglas en Inglés. En ocasiones se puede utilizar qPCR (también rPCR) o Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativo o también conocido como tiempo real.
3. Secuenciación de los fragmentos de ADN amplificados durante el PCR.
4. Clonación, esto cuando se necesita separar diferentes cepas de parásitos que se encuentran infectando al mismo individuo.

Existen muchas más técnicas moleculares que pueden ser utilizadas, todo depende del objetivo del estudio, pero las mencionadas anteriormente son las que se utilizan rutinariamente. En el caso de los parásitos Haemosporida la técnica de PCR se describe en Hellgren *et al.* (2004) y Martinsen *et al.* (2008), y para los parásitos del género *Trypanosoma* en Zídková *et al.* (2012). Cuando se desee utilizar estas técnicas será necesario buscar la colaboración directa con un especialista en biología o ecología molecular.

## **Recomendaciones Finales**

Este capítulo debe entenderse como una introducción muy general al fascinante tema de los parásitos, y no debe tratarse como sustituto para estudios y análisis más profundos del tema. Por lo tanto, se recomienda que siempre se trabaje con algún especialista según sea el tema de interés, esta relación se debe dar hasta que el estudiante adquiera la capacidad de trabajar por sí solo y desarrolle un criterio ético y de investigación sólido, amplio y profundo. Las técnicas aquí descritas representan los métodos básicos para el estudio únicamente de los parásitos de sangre del grupo Haemosporida que infectan a vertebrados. Si se desea trabajar con otros grupos de parásitos se exhorta a que se busque la ayuda del especialista que corresponda. De igual forma se recomienda ampliamente que todo interesado en los parásitos estudie a fondo los tratados de parasitología que se listan en la bibliografía, de manera particular el libro de Schmidt y Janovy (2009) que es una excelente introducción a la parasitología.

## ***Agradecimientos***

Los comentarios de J. C. Serio Silva, L. García Fera, F. González-García, P. Carbó Ramírez y C. Hernández Lara mejoraron notablemente la calidad de este capítulo. Agradezco a R. González-Trápaga por la edición del capítulo y S. Gallina-Tessaro por la invitación a colaborar en este manual de técnicas de campo. Este trabajo fue apoyado por fondos del programa de ciencia básica (SEP-CONACYT proyecto No. 168524).

## BIBLIOGRAFÍA

- Bartlett, C.M. 2008. Filarioid nematodes. In: Atkinson, E.T., N.J. Thomas y D.B. Hunter (eds.). *Parasitic diseases of wild birds*. Wiley-Blackwell. Ames, IO.
- Bensch, S., O. Hellgren, y J. Pérez-Tris. 2009. A public database of malaria parasites and related haemosporidians in avian hosts based on mitochondrial cytochrome *b* lineages. *Molecular Ecology Resources* 9:1353-1358.
- Blackshaw, S.R. 1993. An improved method of net handling and storage. *North American Bird Bander* 18:49-50.
- Bub, H. 1991. *Bird trapping and bird banding: a handbook for trapping methods all over the world*. Cornell University Press. Ithaca, NY.
- Bush, A.O., K.D. Lafferty, J.M. Lotz y A.W. Shostak. 1997. Parasitology meets ecology on its own terms: Margolis *et al.* revisited. *Journal of Parasitology* 83:575-583.
- Campbell, T.W. y C.K. Ellis. 2007. *Avian and exotic animal hematology and cytology*, 3<sup>rd</sup> ed. Blackwell Publishing. Ames, IO.
- Davies, A.J. y M.R.L. Johnston. 2000. The biology of some intraerythrocytic parasites of fishes, amphibian and reptiles. *Advances in Parasitology* 45:1-107.
- Enayati, A. y J. Hemingway. 2010. Malaria management: past, present, and future. *Annual Review of Entomology* 55:569-591.
- Gallina, S. y C. López-González. (eds.). 2011. *Manual de técnicas para el estudio de la fauna*. Instituto de Ecología, A.C. y Universidad Autónoma de Querétaro. Querétaro, México.
- Hellgren, O., Waldenström, J., y Bensch, S. 2004. A new PCR assay for simultaneous studies of *Leucocytozoon*, *Plasmodium*, and *Haemoproteus* from avian blood. *Journal of Parasitology* 90:797-802.
- Holbrook, K.M. 2011. Home range and movement patterns of toucans: implications for seed dispersal. *Biotropica* 43:357-364.
- Hull, B. y P. Bloom. 2001. *Manual de técnicas de anillado de rapaces del anillador de Norteamérica*. The North American Banding Council. Point Reyes Station, CA.
- Keyes, B.E. y C.E. Grue. 1982. Capturing birds with mist nets: a review. *North American Bird Bander* 7:1-14.

- Lamothe Argumedo, R. 1997. *Manual de técnicas para preparar y estudiar los parásitos de animales silvestres*. A.G.T. Editor, S.A. México, D.F.
- Lüdtke, B., I. Moser, D. Santiago-Alarcon, M. Fischer, E.K.V. Kalko, H.M. Schaefer, M. Suarez-Rubio, M. Tschapka y S.C. Renner. 2013. Associations of forest type, parasitism and body condition of two European passerines, *Fringilla coelebs* and *Sylvia atricapilla*. *PLoS ONE*8:e81395.
- Mantilla, J.S., N.E. Matta, M.A. Pacheco, A.A. Escalante, A.D. González y L.I. Moncada. 2013. Identification of *Plasmodium (Haemamoeba) lutzi* (Lucena, 1939) from *Turdus fuscater* (Great Thrush) in Colombia. *Journal of Parasitology*99:662-668.
- Martinsen, E.S., Perkins, S.L., y Schall, J.J. 2008. A three-genome phylogeny of malaria parasites (*Plasmodium* and closely related genera): evolution of life-history traits and host switches. *Molecular Phylogenetics and Evolution*47:261-273.
- McClure, E. 1984. *Bird banding*. The Boxwood Press. Pacific Grove, CA.
- Palinauskas, V., G. Valkiūnas, C.V. Bolshakov y S. Bensch. 2008. *Plasmodium relictum* (lineage P-SGS1): effects on experimentally infected passerine birds. *Experimental Parasitology*120:372-380.
- Palinauskas, V., G. Valkiūnas, C.V. Bolshakov y S. Bensch. 2011. *Plasmodium relictum* (lineage SGS1) and *Plasmodium ashfordi* (lineage GRW2): the effects of the coinfection on experimentally infected passerine birds. *Experimental Parasitology*127:527-533.
- Poulin, R. 2007. *Evolutionary Ecology of Parasites*. Princeton University Press. Princeton, NJ.
- Poulin, R. y S. Morand. 2000. The diversity of parasites. *Quarterly Review of Biology*75:277-293.
- Ralph, C.J., G.R. Geupel, P. Pyle, T.E. Martin, D.F. Desante y B. Milá. 1994. *Manual de Métodos de Campo para el Monitoreo de Aves Terrestres*. General Technical Report, Albany, CA: Pacific Southwest Station. Forest Service, U.S. Department of Agriculture.
- Rózsa, L., J. Reiczigel, y G. Majoros. 2000. Quantifying parasites in samples of hosts. *Journal of Parasitology*86:228-232.
- Santiago-Alarcon, D., V. Palinauskas y H.M. Schaefer. 2012. Diptera vectors of avian haemosporidian parasites: untangling parasite life cycles and their taxonomy. *Biological Reviews*87:928-964.
- Schall, J.J. 1996. Malaria parasites of lizards: diversity and ecology. *Advances in Parasitology*37:255-333.

Schmidt, G.D. y J. Janovy, Jr. 2009. *Foundations of parasitology*, 8<sup>th</sup> ed. McGrawHill. New York, NY.

Valkiūnas, G. 2005. *Avian malaria parasites and other haemosporidia*. CRC Press Book. Boca Ratón, FL.

Valkiūnas, G., D. Santiago-Alarcon, I. Levin, T.A. Iezhova y P.G. Parker. 2010. *Haemoproteus multipigmentatus* sp. nov. (Haemosporida, Haemoproteidae) from the endemic Galapagos dove *Zenaida galapagoensis*, with remarks on the parasite distribution, vectors, and molecular diagnostics. *Journal of Parasitology* 96:783-792.

Valkiūnas, G., T.A. Iezhova, E. Evans, J.S. Carlson, J.E. Martínez-Gómez y R.N.M. Sehgal. 2013. Two new *Haemoproteus* species (Haemosporida: Haemoproteidae) from columbiform birds. *Journal of Parasitology* 99:513-521.

Whiteman, N.K., D. Santiago-Alarcon, K.P. Johnson y P.G. Parker. 2004. Differences in straggling rates between two genera of dove lice (Insecta: Phthiraptera) reinforce population genetic and cophylogenetic patterns. *International Journal for Parasitology* 34:1113-1119.

Zídková, L., Cepicka, I., Szbová, J., and Svobodová, M. 2012. Biodiversity of avian trypanosomes. *Infection, Genetics and Evolution* 12:102-112.

# capítulo tres

## Aplicaciones del análisis de isótopos estables para el manejo y conservación de la fauna silvestre

*Eduardo Nájera Hillman*

### INTRODUCCIÓN

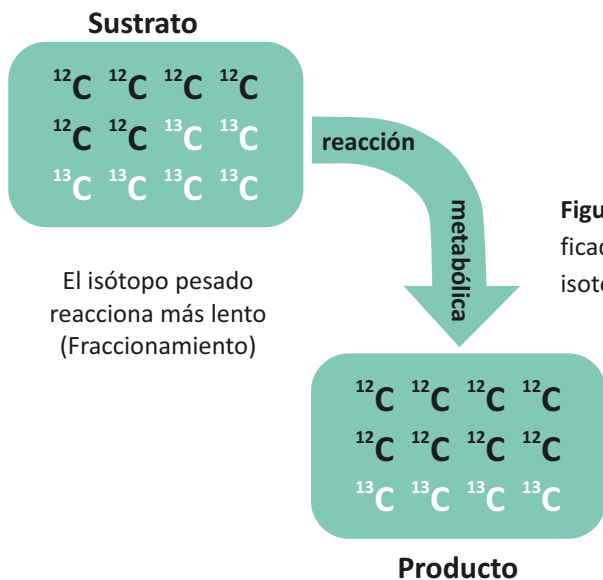
Las mediciones de isótopos estables son resultados de análisis químicos que permiten observar de manera definida el flujo de los elementos en cualquier ecosistema –por lo tanto los isótopos estables permiten ver y probar interacciones ecológicas que de otra forma serían invisibles para los investigadores. En los últimos 30 años los análisis de la composición isotópica estable se han hecho populares y una parte importante de la caja de herramientas del ecólogo animal (Inger y Bearhop 2008) así como de cualquier investigador involucrado en el manejo de fauna silvestre (p. ej. médicos veterinarios zootecnistas). Los análisis de isótopos estables (AIE) se han utilizado para determinar las fuentes alimentarias y el nivel trófico de las especies (Kelly 2000, Stapp y Polis 2003, Botha y Stock 2005, Nájera-Hillman *et al.* 2009), así como para la caracterización del origen y la migración de especies silvestres (Hobson 1999, Torres Dowdall *et al.* 2006); también se han utilizado para identificar subpoblaciones (Walter *et al.* 2010), para la identificación de animales procedentes de granjas (Dempson y Power 2004, Hammershøja *et al.* 2005), para estudiar el impacto de las modificaciones del hábitat así como para evaluar el impacto de las especies invasivas en la estructura trófica de los ecosistemas (Vander Zanden *et al.* 1999, Bodey *et al.* 2010). Sin embargo, a pesar de su potencial, la técnica sigue siendo algo enigmático para muchos ecólogos. Hoy en día existen varias publicaciones que compilan información sobre la aplicación de los isótopos estables en la geología, la hidrología y la ecología (Fry 2006, Allegre

2008, Gat 2010). No obstante este trabajo resalta a la aplicación de los AIE en el manejo y la conservación de la fauna silvestre con la finalidad de ilustrar el potencial de esta técnica esperando así poder motivar a más ecólogos a pensar en cómo este enfoque puede ayudar a comprender la fauna silvestre con la que ellos trabajan.

### Isótopos estables y fraccionamiento

Los isótopos son átomos de un mismo elemento que difieren en el número de neutrones que contienen; es decir, tienen las mismas propiedades químicas (número de protones y electrones), pero diferentes propiedades físicas (número de neutrones). En la naturaleza todos los elementos tienen isótopos que pueden ser estables o inestables. Los isótopos estables difieren de los inestables en que mantienen siempre el mismo número de protones y neutrones, pero pueden existir en forma ligera (menos neutrones) o pesada (más neutrones) (Fry 2006).

El fenómeno que permite que los análisis de isótopos estables sean útiles en la investigación ecológica es el fraccionamiento isotópico —que en términos simples se refiere a la diferencia en la velocidad de reacción entre isótopos ligeros y pesados de un mismo elemento (p. ej.  $^{12}\text{C}$  y  $^{13}\text{C}$ ). En la naturaleza los isótopos



**Figura 3.1.** Reacción metabólica simplificada mostrando el fraccionamiento isotópico.

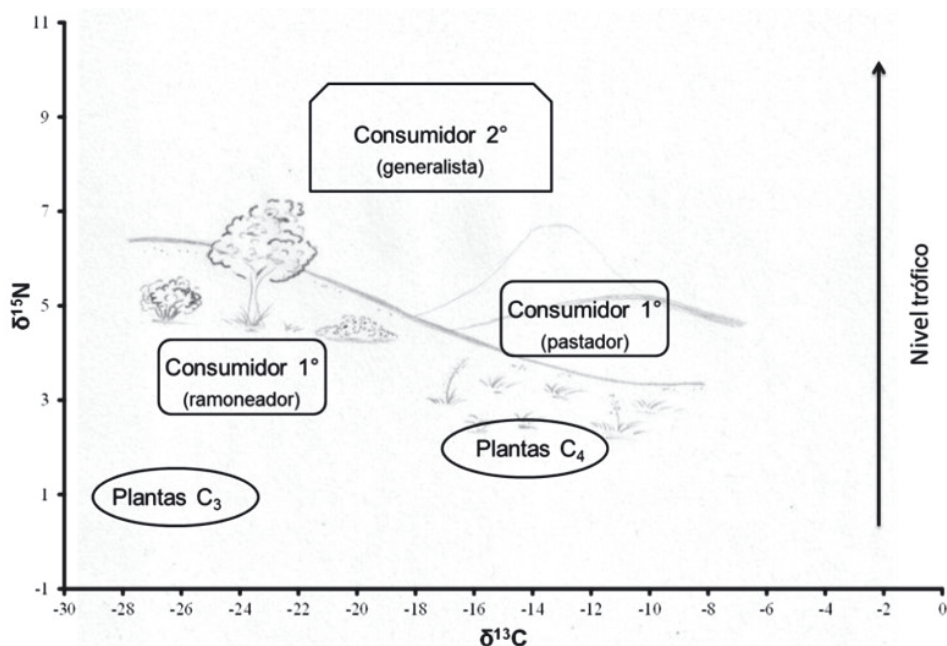


de un mismo elemento pueden participar en las mismas reacciones metabólicas, pero debido a que los átomos de diferentes isótopos tienen masas diferentes, reaccionan a velocidades diferentes (Wada *et al.* 1991) y por lo tanto los procesos metabólicos pueden producir productos de reacción que sean isotópicamente más pesados o ligeros que sus materiales precursores (Fig. 3.1).

### Isótopos estables y su flujo en la naturaleza

El fraccionamiento isotópico tiende a generar variación en la composición isotópica entre organismos y hábitats diferentes, por lo tanto esta variación puede ser utilizada en la investigación ecológica. Por ejemplo, ya que los átomos de la dieta de cualquier organismo se incorporan al consumidor a través de los procesos metabólicos, es de esperarse que exista un fraccionamiento isotópico entre la dieta y el consumidor. Por ejemplo, los isótopos estables de carbono se utilizan para distinguir las fuentes alimentarias. Esto es posible debido a que el fraccionamiento entre la composición isotópica de carbono ( $\delta^{13}\text{C}$ ) de la dieta y la  $\delta^{13}\text{C}$  del consumidor es de aproximadamente 1‰ (DeNiro y Epstein 1978). Adicionalmente la composición isotópica del nitrógeno ( $\delta^{15}\text{N}$ ) presenta un enriquecimiento gradual con cada nivel trófico de aproximadamente 3‰ (DeNiro y Epstein 1981), por lo que la combinación de AIE de carbono y nitrógeno resulta útil para reconstruir la estructura trófica de los ecosistemas (Fig. 3.2).

Además, conforme los organismos viven o se mueven entre biomas isotópicamente distintos, pueden registrar señales isotópicas que permiten la reconstrucción de su origen o movimientos (Bowen *et al.* 2005). Por ejemplo, la composición isotópica del hidrógeno ( $\delta^2\text{H}$  ó  $\delta\text{D}$ ) del agua varía amplia y sistemáticamente en la superficie del planeta (Rozanski *et al.* 1993) y debido a que el agua es un componente clave de muchas reacciones biosintéticas, su señal isotópica se transfiere a las plantas y se propaga a los tejidos animales por medio de las redes alimentarias (Hobson *et al.* 1999). De esta forma la  $\delta\text{D}$  de tejidos bioquímicamente inertes (p. ej. pelo, plumas, uñas) conservan las señales isotópicas correspondientes a la localidad en donde creció dicho tejido y potencialmente al lugar de origen del organismo (Bowen *et al.* 2005) (Fig. 3.3).



**Figura 3.2.** Estructura de isotópica de carbono y nitrógeno de un sistema con plantas  $\text{C}_3$  (arbustos) y  $\text{C}_4$  (pastos), consumidas por herbívoros ramoneadores y pastadores, que a su vez son consumidos por el mismo depredador. Se asume un enriquecimiento de  $\delta^{15}\text{N} \sim 3\%$  con cada nivel trófico y enriquecimiento de  $\delta^{13}\text{C} = \sim 1\%$  del consumidor respecto a su dieta. La composición isotópica del consumidor secundario es el resultado de mezclar dos fuentes alimenticias isotópicamente distintas.

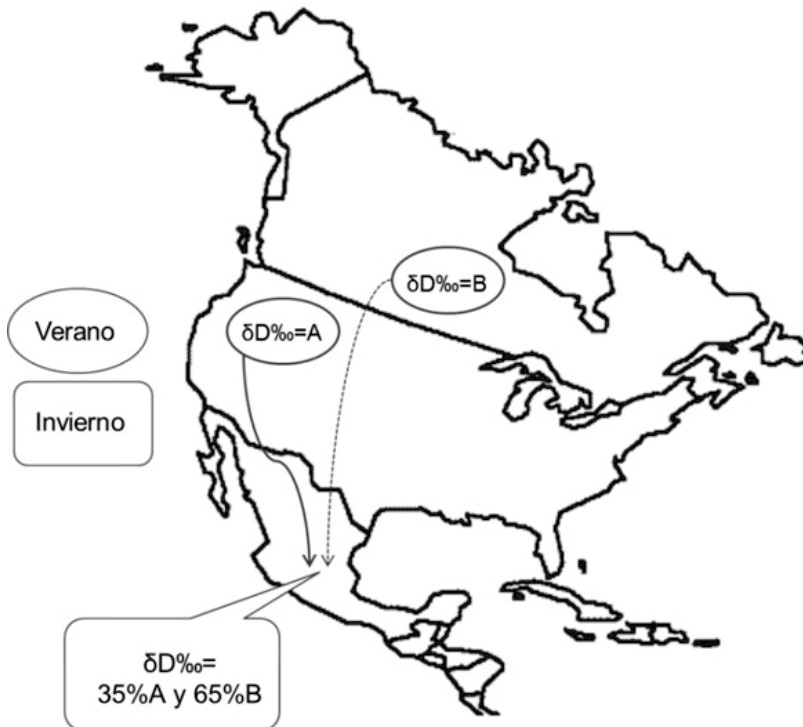
Como hemos visto los AIE de carbono, nitrógeno e hidrógeno tienen muchas aplicaciones en la investigación ecológica. Sin embargo otros isótopos estables como el oxígeno (origen del agua) y el azufre (distinción entre fuentes marinas y terrestres) también comprenden gran parte de la masa orgánica del planeta y por lo tanto complementan el potencial de los AIE para entender y potencialmente resolver algunos problemas de conservación y manejo de la fauna silvestre.

### Modificación del hábitat y los AIE

La modificación del hábitat se ha convertido uno de los temas más importantes de investigación de la biología de la conservación y se considera como una de las causas principales de la pérdida de la biodiversidad que afecta negativa-

mente a todos los grupos taxonómicos incluyendo aves, mamíferos, reptiles, anfibios, invertebrados y plantas (Fischer y Lindenmayer 2007). Los AIE representan una herramienta útil para predecir, identificar o evaluar los impactos de la modificación del hábitat sobre la fauna silvestre, ya que es muy común que al modificar algún ecosistema se afecten las relaciones tróficas de las especies que ahí habitan, se alimentan o se reproducen (Anderson *et al.* 1999).

Los AIE son particularmente útiles para cuantificar el flujo alimentario entre ecosistemas (Stapp y Polis 2003, Nájera-Hillman *et al.* 2009) que puede ser crucial para la sobrevivencia de muchas especies (Rose y Polis 1998). Por ejemplo, a través de los AIE de carbono y nitrógeno se ha comprobado que los recursos marinos ayudan a sostener densidades mayores de roedores (*Peromyscus maniculatus*) cerca de las costas en la Península de Baja California



**Figura 3.3.** Determinación de la proporción de individuos provenientes de localidades de origen geográfica e isotópicamente distintas. Círculos = localidades de origen; rectángulo = colonia de hibernación.

(Stapp y Polis 2003). Por lo tanto, la cuantificación de la extensión geográfica del flujo trófico a través de AIE puede ser utilizada como un elemento de decisión para el diseño de áreas para la conservación de fauna costera. Adicionalmente, por medio de los AIE de carbono y nitrógeno se ha demostrado que las redes alimentarias acuáticas en arroyos rodeados por bosque riparios dependen tróficamente de recursos terrestres (Hicks 1997, Benstead y Pringle 2004, Nájera-Hillman *et al.* 2009). De esta forma los AIE pueden ayudar a predecir o detectar el efecto de la remoción de bosques riparios sobre la fauna acuática (e.g. peces y anfibios). Cabe mencionar que la Norma Oficial Mexicana, NOM-060-ECOL-1994, establece que la planificación del manejo de la vegetación riparia debe ser llevada a cabo considerando la “función ecotonal” entre las comunidades vegetales adyacentes y los ecosistemas acuáticos. De esta forma los AIE se convierten en una alternativa para evaluar la influencia trófica de la vegetación riparia (función ecotonal) sobre la fauna acuática.

Por otro lado el desarrollo agropecuario también tiene importantes implicaciones en la conservación y el manejo de la fauna silvestre. Por ejemplo en las últimas décadas la acuicultura ha sido el sector productivo de generación de alimentos de origen animal que ha crecido más rápido en el mundo, convirtiéndose en una fuente importante de alimento para la humanidad así como una fuente de desarrollo económico para muchos países (FAO 2010). Sin embargo la acuicultura puede impactar el ambiente natural por medio de la destrucción o modificación del hábitat, contaminación del agua e interacciones entre organismos cultivados y silvestres. (Naylor *et al.* 2000). Aun cuando la legislación mexicana busca mitigar los impactos de la acuicultura sobre la calidad del agua (NOM-001-SEMARNAT-1996) y la sanidad de los organismos cultivados (NOM-010-PESC-1993), los impactos sobre la fauna silvestre causados por la concomitante modificación del hábitat son poco entendidos y rara vez cuantificados. En este sentido los AIE tienen el potencial para identificar los impactos de la modificación del hábitat causados por la acuicultura (Vizzone y Mazzola 2006, Herbert *et al.* 2008). Por ejemplo, ya que la composición isotópica estable del azufre ( $\delta^{34}\text{S}$ ) permite discernir entre fuentes alimentarias marinas ( $\delta^{34}\text{S} \geq 10\text{‰}$ ) y dulceacuícolas ( $\delta^{34}\text{S} < 10\text{‰}$ ), se ha demostrado que cormoranes de doble cresta (*Phalacrocorax auritus*) que consumen peces prove-

nientes de la infraestructura del cultivo del bagre de agua dulce (*Ictalurus punctatus*) tienen una condición corporal mayor en comparación con aquellos cormoranes que utilizan principalmente el ambiente marino (Herbert *et al.* 2008) lo que puede tener consecuencias en la adecuación de los cormoranes y ser responsable, al menos en parte, del incremento en la población de cormoranes que se ha observado en las últimas décadas (Weseloh *et al.* 2002).

La fauna silvestre también puede verse afectada por alimentarse en hábitats modificados por perturbaciones naturales (p. ej. incendios forestales). En este sentido los AIE representan una alternativa para identificar el consumo de fuentes específicas de alimento que pueden estar ligados a distintos paisajes. Por ejemplo a través de AIE de carbono y nitrógeno se comprobó que los venados bura (*Odocoileus hemionus*) de áreas sujetas a incendios forestales sufrieron un cambio en la dieta (cambio significativo en la  $\delta^{13}\text{C}$ ) y que tanto los venados bura como los venados cola blanca (*Odocoileus virginianus*) de áreas sujetas a incendios forestales consumieron forrajes más nutritivos en comparación con individuos provenientes de áreas no incendiadas (Walter *et al.* 2009), debido a que la  $\delta^{15}\text{N}$  del consumidor (en este caso los venados) está positivamente asociada con el contenido proteico de su dieta (Sponheimer *et al.* 2003). Estos resultados pueden tener importantes implicaciones en el manejo de poblaciones de venados sujetos a aprovechamiento cinegético, ya que se ha sugerido que los incendios forestales inducidos por el hombre (quemadas controladas o prescritas) pueden tener efectos positivos sobre la condición corporal de los venados (Fulbright y Ortega-S 2007). De esta forma se ilustra como los AIE tienen múltiples aplicaciones en la identificación, predicción y cuantificación de los impactos que la modificación del hábitat puede tener sobre la fauna silvestre.

### **Especies invasivas y los AIE**

Las especies invasivas representan una seria amenaza para la biodiversidad; sin embargo predecir y cuantificar sus impactos ecológicos es problemático (Lodge 1993) debido, en parte, a que las redes tróficas en la naturaleza son variables y complejas (Polis 1991) y lo que es más, los métodos tradicionales para examinar el impacto de las especies invasivas son costosos y laboriosos

(Bodey *et al.* 2010). No obstante, los AIE son comúnmente utilizados para proveer de una medida temporal de las relaciones tróficas basada en flujos de energía (i.e. flujos de isótopos estables en los ecosistemas). Por ejemplo, en Canadá se ha observado que la trucha lacustre (*Salvelinus namaycush*) sufrió una reducción en su posición trófica (valores más bajos de  $\delta^{15}\text{N}$ ) y un cambio en la dieta (cambios en la  $\delta^{13}\text{C}$ ), como consecuencia de la introducción de otros peces depredadores (*Micropterus dolomieu* y *Ambloplites rupestris*) (Vander Zanden *et al.* 1999); con lo que se demuestra la utilidad de los AIE para detectar cambios en la estructura de las redes tróficas ocasionados por especies invasivas.

Adicionalmente se considera que un traslape en el nicho alimentario entre especies ecológicamente similares (p. ej. unglados silvestres e introducidos) es una medida útil para inferir competencia por alimento (Stewart y Bowyer 2003). En este sentido, debido a que los AIE proveen de variables continuas que son comunes para todas las especies; que integran la información sobre las alimentos asimilados a través del tiempo; y que pueden producir datos relativamente rápido, se considera que son un método poderoso para medir la amplitud del nicho alimentario de las especies (Bearhop *et al.* 2004). Por ejemplo a través de AIE de carbono y nitrógeno se estableció que existe un traslape del nicho alimentario entre el ajolote de Xochimilco (*Ambystoma mexicanum*) y dos especies invasivas de peces (*Cyprinus carpio* y *Oreochromis niloticus*), que ahora dominan ese sistema acuático en términos de biomasa y abundancia (Zambrano *et al.* 2010). Así se ejemplifica cómo el uso de los AIE es un enfoque que provee de un indicador sensible de cambio ambiental derivado de la introducción de especies exóticas o invasivas que puede ser utilizado en una gran variedad de ambientes naturales.

### **Orígenes y movimientos de la fauna**

Comprender la conexión entre áreas utilizadas por animales a través de su ciclo de vida y/o migraciones es un aspecto crucial para su manejo y conservación, ya que se pueden dirigir estrategias más apropiadas y específicas a los sitios de reproducción, alimentación y/o áreas de descanso (Myers *et al.* 1987). El enfoque tradicional para seguir movimientos de animales depende

del uso de marcadores extrínsecos y la recaptura de los animales marcados. Sin embargo, generalmente estas técnicas son inapropiadas para animales pequeños o que no están sujetos a la cacería o explotación; además estas técnicas pueden ser muy costosas (p. ej. marcas satelitales). Pero, ya que los organismos que se mueven entre redes tróficas isotópicamente distintas pueden llevar con ellos información del lugar donde se alimentaron previamente. Los AIE han sido útiles para rastrear los movimientos de animales entre redes tróficas costeras y pelágicas, marinas y dulceacuícolas, terrestres húmedas y secas, y dominadas por plantas  $C_3$ ,  $C_4$  o CAM (Hobson 1999). Adicionalmente, como vimos con anterioridad, la señal isotópica estable del hidrógeno ( $\delta D$ ) se ha utilizado para establecer vínculos entre organismos y regiones geográficas a gran escala (Hobson y Wassenaar 1997).

Por otra parte dado el desarrollo de granjas de animales que también existen de forma silvestre (p. ej. salmones, venados, mustélidos), es importante poder distinguir entre animales silvestres y de granjas; en parte para poder informar al consumidor sobre el origen geográfico y método de producción del producto que están consumiendo (Bell *et al.* 2007), así como también para poder distinguir entre animales silvestres de aquellos que hayan escapado de las granjas y así ser capaces de estudiar los impactos que puedan tener sobre las poblaciones silvestres (p. ej. depresión de la variabilidad genética; Dempson y Power 2004). Gracias a que generalmente la alimentación de los animales silvestres difiere isotópicamente de la alimentación de animales criados en granjas, los AIE resultan una herramienta práctica y económica para diferenciar entre animales silvestres y de granjas (Bowen *et al.* 2005).

### **Recomendaciones finales**

La mejor manera de comprender los AIE es por medio de la práctica. Así es que como los isótopos estables se encuentran en cualquier parte, el investigador puede pensar en cómo los isótopos estables circulan en algo que le interese. Posteriormente debe buscar información previa relacionada a su idea y encontrar un sitio de estudio pensando en que muestras se pueden obtener y son apropiadas para sus metas. En México las instituciones públicas de investigación cuentan con al menos tres laboratorios de isotopía estable (Laboratorio

de Isótopos estables, Instituto de Ciencias del Mar y Limnología, UNAM - Unidad Académica Mazatlán, Laboratorio Universitario de Geoquímica Isotópica, Instituto de Geología, UNAM e Instituto de Investigaciones Oceanológicas, UABC), que pueden ser contactados o visitados con el fin de familiarizarse con el proceso de preparación y almacenaje de las muestras antes de enviarlas para los análisis. Una vez obtenidos los datos existen varias formas de interpretarlos por lo que es recomendable discutirlos con otros investigadores o estudiantes.



## BIBLIOGRAFÍA

- Allegre, C.J. 2008. *Isotope geology*. New York: Cambridge University Press.
- Anderson, A.M., D.A. Haukos y J.T. Anderson. 1999. Diet composition of three anurans from the Playa Wetlands of northwest Texas. *Copeia* 1999:515-520.
- Bearhop, S., C.E. Adams, S. Waldron, R.A. Fuller y H. Macleod. 2004. Determining trophic niche width: a novel approach using stable isotope analysis. *Journal of Animal Ecology* 73:1007-1012.
- Bell J.G., T. Preston, R.J. Henderson, F. Strachan, J.E. Bron, K. Cooper y D.J. Morrison. 2007. Discrimination of wild and cultured european sea bass (*Dicentrarchus labrax*) using chemical and isotope analyses. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 55:5934-5941.
- Benstead, J.P. y C.M. Pringle. 2004. Deforestation alters the resource base and biomass of endemic stream insects in eastern Madagascar. *Freshwater Biology* 49:490-501.
- Bodey, T.W., S. Bearhop, S.S., Roy, J. Newton y R.A. McDonald. 2010. Behavioural responses of invasive American mink *Neovison vison* to an eradication campaign, revealed by stable isotope analysis. *Journal of Applied Ecology* 47:114-120.
- Botha, S. y W. Stock. 2005. Stable isotope composition of faeces as an indicator of seasonal diet selection in wild herbivores in southern Africa. *South African Journal of Science* 101:371-374.
- Bowen, G.J., L.I. Wassenaar y K.A. Hobson. 2005. Global application of stable hydrogen and oxygen isotopes to wildlife forensics. *Oecologia* 143:337-348.
- Dempson, J.B. y M. Power. 2004. Use of stable isotopes to distinguish farmed from wild Atlantic salmon, *Salmo salar*. *Ecology of Freshwater Fish* 13:176-184.
- DeNiro, M.J. y S. Epstein. 1978. Influence of diet on the distribution of carbon isotopes in animals. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 42:495-506.
- DeNiro, M.J. y S. Epstein. 1981. Influence of diet on the distribution of nitrogen isotopes in animals. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 42:495-506.
- FAO. 2010. *The state of world fisheries and aquaculture*. Roma, Italia: Food and Agriculture Organization of the United Nations.
- Fischer, J. y D.B. Lindenmayer. 2007. Landscape modification and habitat fragmentation: a synthesis. *Global Ecology and Biogeography* 16:265-80.

- Fry, B. 2006. *Stable isotope ecology*. Springer. New York.
- Fulbright, T.E. y J.A. Ortega-S. 2007. *Ecología y manejo de venado cola blanca*. College Station, Texas, USA: Texas A&M University Press.
- Gat, J.R. 2010. *Isotope hydrology: a study of the water cycle*. Imperial College Press. Londres.
- Hammershøj, M., C. Pertoldi, T. Asferg, T. Bach Møller y N.B. Kristensen. 2005. Danish free-ranging mink populations consist mainly of farm animals: Evidence from microsatellite and stable isotope analyses. *Journal for Nature Conservation* 13:267–274.
- Herbert, C.E., M. Bur, D. Sherman y J. Laird Shutt. 2008. Sulfur isotopes link overwinter habitat use and breeding condition in double-crested cormorants. *Ecological Applications* 18:561–567.
- Hicks, B.J. 1997. Food webs in forest and pasture streams in the Waikato region: a study based on analyses of stable isotopes of carbon and nitrogen and fish gut contents. *New Zealand Journal of Marine and Freshwater Research* 31:652–664.
- Hobson, K.A. 1999. Tracing origins and migration of wildlife using stable isotopes: a review. *Oecologia* 120:314–326.
- Hobson, K.A., L. Atwell y L.I. Wassenaar. 1999. Influence of drinking water and diet on the stable-hydrogen isotope ratios of animal tissues. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 96:8003–8006.
- Hobson, K.A. y L.I. Wassenaar. 1997. Linking breeding and wintering grounds of neotropical migrant songbirds using stable hydrogen isotopes analysis of feathers. *Oecologia* 109:142–148.
- Inger, R. y S. Bearhop. 2008. Applications of stable isotope analyses to avian ecology. *Ibis* 150:447–461.
- Kelly, J.F. 2000. Stable isotopes of carbon and nitrogen in the study of avian and mammalian trophic ecology. *Canadian Journal of Zoology* 78:1–27.
- Lodge, D.M. 1993. Biological invasions: lessons for ecology. *Trends in Ecology and Evolution* 8:133–137.
- Myers, J.P.; R.I.G. Morrison, P.Z. Antas, B.A. Harrington, T.E. Lovejoy, M. Salaberry, S.E. Senner y A. Tarak. 1987. Conservation strategy for migratory species. *American Scientist* 75:18–26.

Nájera-Hillman, E., C.A. Alfaro, B.B. Barbara y S. O'shea. 2009. Characterization ( $\delta^{13}\text{C}$  and  $\delta^{15}\text{N}$  isotopes) of the food webs in a New Zealand stream in the Waitakere Ranges, with emphasis on the trophic level of the endemic frog *Leiopelma hochstetteri*. *New Zealand Journal of Zoology* 36:165-176.

Naylor, R.L., R.J. Goldberg, J.H. Primavera, N. Kautsky, M.C.M. Beveridge, J. Clay, C. Folke, J. Lubchenco, H. Mooney y M. Troell. 2000. Effect of aquaculture on world fish supplies. *Nature* 405:1017-1024.

Polis, G.A. 1991. Complex trophic interactions in deserts: an empirical critique of food web theory. *American Naturalist* 138:123-155.

Rose, M.D. y G.A. Polis. 1998. The distribution and abundance of coyotes: the effects of allochthonous food subsidies from the sea. *Ecology* 79:998-1007.

Rozanski, K., L. Araguas-Araguas y R. Gonfiantini. 1993. Isotopic patterns in moderns global precipitation. Pp.1-36. En: Swark, P.K., K.C. Lohmann, J. McKenzie y S. Savin (eds.). *Climate change in continental isotopic records*. American Geophysical Union. Washington D.C.

Sponheimer, M., T. Robinson, L. Ayliffe, B. Roeder, J. Hammer, B. Passey, A. West, T. Cerline, D. Dearing y J. Ehleringer. 2003. Nitrogen isotopes in mammalian herbivores: hair  $\delta^{15}\text{N}$  values from a controlled feeding study. *International Journal of Osteoarchaeology* 13:80-87.

Stapp, P. y G.A. Polis. 2003. Marine resources subsidize insular rodent populations in the Gulf of California, Mexico. *Oecologia* 134:496-504.

Stewart, K.M. y R.T. Bowyer. 2003. Niche partitioning among mule deer, elk, and cattle: do stable isotopes reflect dietary niche? *Ecoscience* 10:297-302.

Torres Dowdall, J., A. Farmer y E.H. Bucher. 2006. Uso de los isótopos estables para determinar conectividad migratoria en aves: alcances y limitaciones. *Hornero* 21:73-84.

Vander Zanden, M.J., J.M. Casselman y J.B. Rasmussen. 1999. Stable isotope evidence for the food web consequences of species invasions in lakes. *Nature* 401:464-67.

Vizzine, S. y A. Mazzola. 2006. The effects of anthropogenic organic matter inputs on stable carbon and nitrogen isotopes in organisms from different trophic levels in a southern Mediterranean coastal area. *Science of the Total Environment* 368:723-731.

Wada, E., H. Mizuntani y M. Minagawa. 1991. The use of stable isotopes for food web analysis. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 30:361-71.

Walter, W.D., D.M. Leslie, Jr., E.C. Hellgren y D.M. Engle. 2010. Identification of subpopulations of North American elk (*Cervus elaphus* L.) using multiple lines of evidence: habitat use, dietary choice, and fecal stable isotopes. *Ecological Research* 25:789-800.

Walter, W.D., T.J. Zimmerman, D.M. Leslie y J.A. Jenks. 2009. Dietary response of sympatric deer to fire using stable isotope analysis of liver tissue. *Wildlife Biology in Practice* 5:128-35.

Weseloh, D.V. Pekarik, Havelkat, Barret y Reiud. 2002. Population trends and colony locations of Double-crested Cormorants in the Canadian Great Lakes and immediately adjacent areas 1990-2000: a managers guide. *Journal of Great Lakes Research* 28:125-44.

Zambrano, L., E. Valiente y M.J. Vander Zanden. 2010. Food web overlap among native axolots (*Ambystoma mexicanum*) and two exotic fishes: carp (*Cyprinus carpio*) and tilapia (*Oreochromis niloticus*) in Xochimilco, Mexico City. *Biological Invasions* 12:3061-69.

# capítulo cuatro

## El uso de la estadística en el estudio de la vida silvestre

*Dante Alfredo Hernández Silva y Gerardo Sánchez Rojas*

### INTRODUCCIÓN

Para estudiar, analizar y comprender muchos de los fenómenos que ocurren en la vida silvestre, es importante recordar que muchas de las variables que medimos para comprenderla son llamadas aleatorias o estocásticas (de las cuales a pesar de lo mucho que sepamos de su estado inicial, no es posible predecir su valor final), estos fenómenos pueden ser el tamaño de una población de borregos cimarrón, el tamaño de la camada del pecarí de collar, el número de árboles por hectárea o el número de puntas en una asta de venado, por mencionar solo algunos.

La herramienta matemática que mejor se ajusta para estudiar estos fenómenos aleatorios es la estadística, que es la rama de las matemáticas que estudia la variación natural (Sokal y Rohlf 2005). Por lo tanto, se hace indispensable que los estudios sobre la vida silvestre involucren el uso adecuado de las herramientas estadísticas, para combinar el conocimiento biológico y el estadístico y poder describir e inferir conclusiones de las observaciones que se realizan así como reflexionar sobre su interpretación.

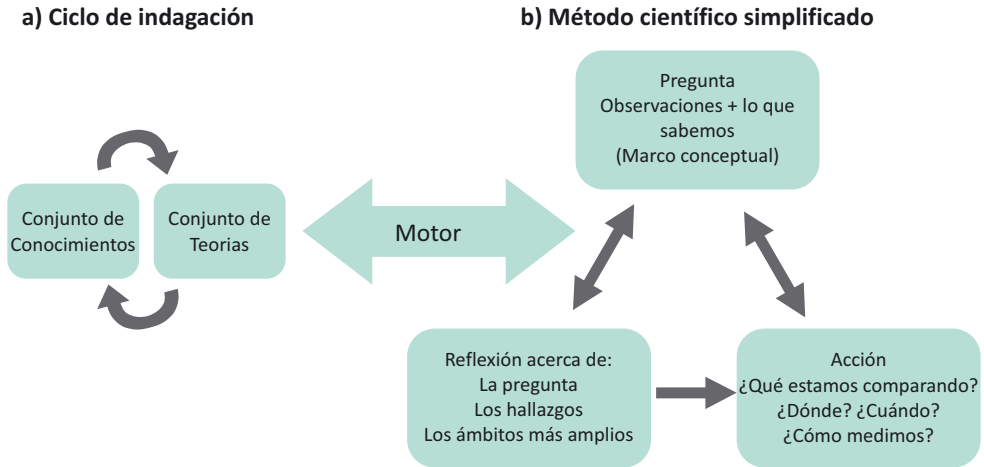
Es importante tomar en cuenta, que la inferencia estadística es más robusta en su capacidad predictiva, si las mediciones se realizan siempre bajo las mismas condiciones, con ello se logra que disminuya la incertidumbre del fenómeno aleatorio. En los estudios biológicos es muy difícil de aplicar totalmente

los supuestos de la estadística, a los fenómenos que se estudian ya que se presentan cambios constante (p. ej., un día no es idéntico a otro, en los individuos de reproducción sexual siempre hay alguna diferencia genética), de manera que lo normal es que no podamos controlar mucha de la variación en la que se miden los fenómenos que estudiamos en la vida silvestre. De ahí que las investigaciones siempre tendrán este conflicto entre la necesidad de las herramientas estadísticas y la realidad biológica, por lo que un diseño adecuado de las mediciones es lo que nos ayuda a ajustar ambas necesidades.

El objetivo de este capítulo es explicar la necesidad que hay, en los estudios y manejo de la fauna silvestres, de la aplicación de la estadística, por lo que se definen algunos términos útiles para su comprensión y se dan algunos consejos acerca de la selección de diseños de experimentos que están asociados a pruebas estadísticas particulares, haciendo énfasis solo en las de la estadística univariada (cuando el análisis solo involucra una sola variable de respuesta, ver más adelante) aunque no es la única aproximación estadística que se puede utilizar.

### **Proceso de la indagación científica**

La *indagación científica* es un medio de hacer y contestar una pregunta, de forma lo más objetiva y precisa posible, sobre una pequeña parte de nuestro entorno y reflexionar sobre las implicaciones que tendrán los datos registrados para un ámbito más amplio (Feinsinger 2004). En el proceso de la indagación científica, el uso de la estadística implica necesariamente formular preguntas de *carácter comparativo* sobre el fenómeno del cual el investigador conoce o quiere conocer algún aspecto, de tal manera que se mantiene un proceso cíclico de obtención de conocimientos y la compilación de teorías (Fig. 4.1a). Este ciclo dinámico de la investigación requiere estar retroalimentándose mediante el método científico, aunque en este caso nos referimos a un método científico muy simplificado, ya que el método científico formal limita mucho su aplicación en los problemas del estudio de la vida silvestre (ver una mayor discusión en Feinsinger 2004). Este método estará integrado por una pregunta, que nos lleva a una acción y finalmente a una reflexión.



**Figura 4.1.** La indagación científica se realiza mediante un ciclo dinámico de dos componentes que están ligados. Uno es el conjunto de observaciones acumuladas y en continua producción (conjunto de conocimientos), y otro que es el conjunto de conceptos que proveen del marco conceptual de referencia de estos datos y que tratan de explicarlo mediante un conjunto de teorías. Este ciclo dinámico está en constante revisión mediante el método científico, el cual es el motor que da el dinamismo.

Para plantearnos una pregunta comparativa, es necesario saber desde el principio qué variable se va a medir (esta es la variable que ha despertado nuestra curiosidad) y que llamaremos variable de respuesta, así mismo hay que visualizar cómo es que esta va a compararse mediante una o más variables explicatorias. Las variables explicatorias pueden ser categóricas, como las épocas del año, los diferentes tipos de hábitats, en diferentes fragmentos de vegetación, o pueden ser variables continuas como medir a lo largo de un gradiente altitudinal o de temperatura. En cualquier caso son las variables que determinan nuestro factor de diseño. Una vez que se tiene clara la pregunta, podemos pasar al siguiente paso del método científico simplificado que es la acción, donde se plantea mediante un diseño particular cómo contestar la pregunta en cuestión, y es en este punto en donde se emplean las herramientas de la estadística. Finalmente los resultados de la acción nos deben de llevar a la reflexión que deben de tratar de contestar los porqué de los resultados que obtuvimos (Fig. 4.1b).

El ciclo de la indagación contempla que nuestros estudios sean del tipo observacional, lo que ocurre cuando nosotros no podemos asignar las unidades al factor de diseño, y más bien dependemos de que las condiciones que buscamos comparar se encuentren en la naturaleza. Mientras que el tipo experimental es cuando se manipulan las unidades observacionales, y nosotros sí podemos asignar las unidades de evaluación al factor de diseño. Ninguna de las dos aproximaciones es mejor que la otra, sin embargo los estudios de tipo experimental pueden lograr que las mediciones se hagan bajo condiciones similares y, como ya se mencionó antes, esto le da a los resultados mayor robustez estadística, pero biológicamente pierden en cuanto a la condiciones de realidad en las que los fenómenos ocurren, es decir, constantemente tendremos que pensar cómo podemos abordar de la manera más objetiva la pregunta que nos hacemos para poder continuar con el ciclo de la indagación.

Es muy importante reconocer que no existe una escala única en la cual los fenómenos naturales deben ser estudiados; los sistemas naturales muestran una gama de características variables de organización temporal y espacial. Por lo cual, es necesario comprender que la heterogeneidad espacio-temporal cambia desde el punto de vista de la escala, es decir, a escalas pequeñas existe un gran número de variables que explican un proceso, por tanto, los fenómenos que ocurren en estas tienen gran variabilidad y poca generalidad; por el contrario, a grandes escalas, pocas variables explican los procesos, por lo cual se incrementa la predictibilidad (Wiens 1989, Galicia y Zarco 2002). La escala por tanto debe de ser incorporada desde la pregunta inicial.

### **Cómo se distribuyen los datos**

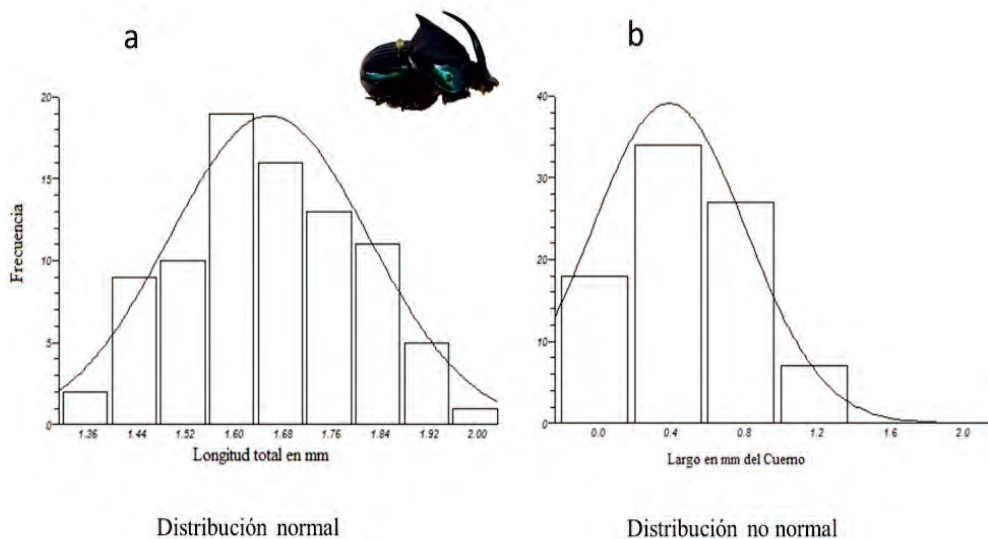
Una valoración muy importante: cuál es la función de distribución de la variable de respuesta, una de las representaciones más comunes que tienen los datos es la forma de una campana, donde el valor medio será el que presente más frecuencia e irá disminuyéndola hacia los valores extremos. Este tipo de distribución de los datos se conoce como distribución normal. Cuando los datos presentan esta forma los podemos analizar con estadística paramétrica. Como ejemplo, está el caso para una muestra de 86 individuos de *Phaneus*



*adonis*, un escarabajo estercolero que habita la Barranca de Metztitlán, a los que se les midió la longitud total (Fig. 4.2a).

Por lo contrario, podemos observar cuando la frecuencia con la que ocurren los datos se aleja de esta distribución, utilizaremos la estadística no paramétrica que resuelve problemas parecidos a la paramétrica pero con un poco menos de robustez estadística. Para ejemplificar, se puede observar en una variable distinta que es el largo del cuerno del escarabajo, el cual tiene un función como un ornamento y tiene implicaciones en la selección de pareja y que habitualmente no se distribuyen normalmente (Serrano-Meneceles *et al.* 2008) (Fig. 4.2b). La simple distribución de los datos suele ser muy informativa y es en general el primer paso para establecer cuáles pueden ser las herramientas estadísticas que debemos utilizar.

Ambos tipos de estadística, la paramétrica y la no paramétrica, son herramientas valiosas, sin embargo, y dada su naturaleza, es más fácil establecer el grado de



**Figura 4.2.** Distribución de la frecuencia de dos variables aleatorias, la longitud total y el largo total del tamaño de cuerno de los machos del escarabajo *Phaneus adonis* que habita la Barranca de Metztitlán: a) Frecuencia del largo total que sigue una distribución normal; b) Frecuencia del tamaño del cuerno el cual presenta un sesgo hacia la izquierda y se aleja de la distribución normal.

incertidumbre de la conclusión estadística con las herramientas paramétricas (lo cual se llama robustez estadística). No obstante, para las interpretaciones biológicas, las herramientas que proveen ambas aproximaciones son igualmente útiles.

### Tipo de variables

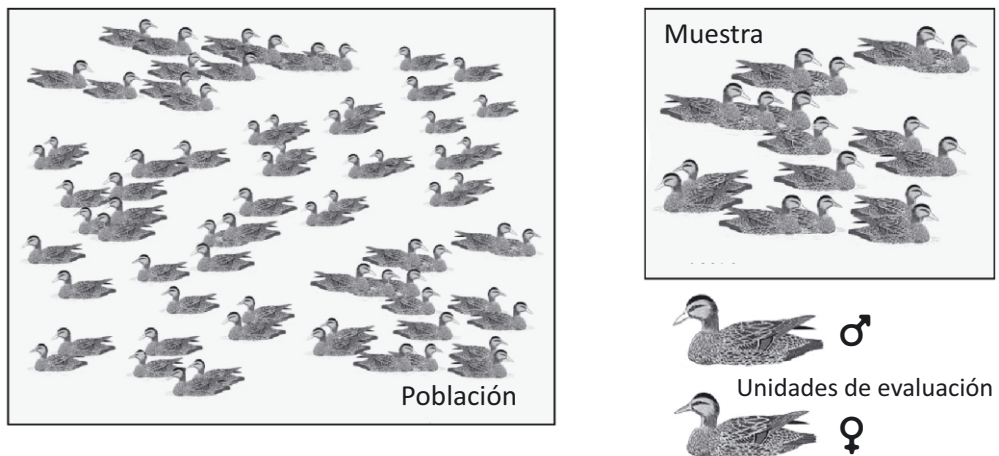
Los datos en los estudios de la vida silvestre están basados generalmente en observaciones individuales, las cuales son el conteo o mediciones tomados de la más pequeña de las unidades de muestreo (llamada unidad de evaluación), estas deben de ser lo más homogéneas posibles entre sí y su número igual al número de réplicas que se están utilizando. A partir de la preguntas que nos hacemos, se selecciona el objeto y la característica que queremos medir, por ejemplo podemos estar interesados en alguna característica del pato de collar mexicano *Anas platyrhynchos diazi* como cuántos patos hay en un laguna, su peso, si son macho o hembras, o cuál de los polluelos es el que nació primero (Fig. 4.3), todas estas características las podemos agrupar en los siguientes tipos de variable:

- a) **Variables continuas:** son aquellas que asumen un infinito número de valores entre dos puntos fijos cualquiera (p.ej. la altura en metros, riqueza de especies, cobertura vegetal),
- b) **Variables discretas:** son aquellas que solo tienen valores en números enteros, sin valores intermedios posibles (p.ej. conteos de individuos),
- c) **Variables de intervalos:** donde los valores son relativos, y los valores consecutivos pueden no tener la misma magnitud (p.ej. el orden en el que van naciendo los polluelos en una nidada),
- d) **Variables categóricas o nominales:** también llamadas atributos, son las variables que no podemos medir pero que podemos expresar cualitativamente (p.ej. tipo de hábitat, sexo).

Dónde y cómo vamos a medir estas variables dependerá de la pregunta comparativa que queremos contestar con la estadística, ya que la definición de las variables dependerá de cómo determinemos otros dos conceptos claves de la estadística que son la *población* y la *muestra estadística*.

Una *población estadística* es el conjunto total de unidades de evaluación (es decir lo que queremos medir y como lo queremos medir) que puedan interesar en un estudio, la unidad de evaluación debe estar definida de tal forma que podamos diferenciar qué medición pertenece y qué mediciones no pertenecen a la población. Sin embargo para muchas de las preguntas que deseamos abordar, como el tamaño de las poblaciones de nuestro interés es tan grande que logísticamente es imposible medirla (p.ej. todos los patos de la laguna de Tecocomulco en el estado de Hidalgo) por lo que usualmente utilizamos una muestra.

Una muestra es cualquier subconjunto de la población que estudiamos donde las unidades de evaluación que han sido seleccionadas al azar (de manera que todas las unidades de la población tengan la misma oportunidad de ser seleccionadas) (Fig. 4.3). En este caso es clave que las muestras sean seleccionadas al azar, ya que por este simple hecho tienen mayor probabilidad de ser representativas de la población (es decir, que sus estadísticas como la media y/o la varianza de la muestra no sean estadísticamente diferentes de los parámetros de la población). La comprobación matemática de cómo las muestras pueden ser representativas de una población se da en la teoría del límite central (Christensen 1997, Sokal y Rohlf 2005, Zar 2010, Rumsey 2013).



**Figura 4.3.** Representación gráfica de lo que son una población, una muestra y una unidad de observación, utilizando como ejemplo una población de patos, *Anas platyrhynchos diazi*.

## Cómo empezar a diseñar los estudios

En los estudios de fauna silvestres deben tomarse en cuenta dos tipos de variables:

- a) **variables de respuesta** que es usualmente lo que se está midiendo.
- b) **variables explicatorias** que pueden ser continuas o categóricas, y que suponemos tienen un efecto en la variable de respuesta y determinan el factor de diseño.

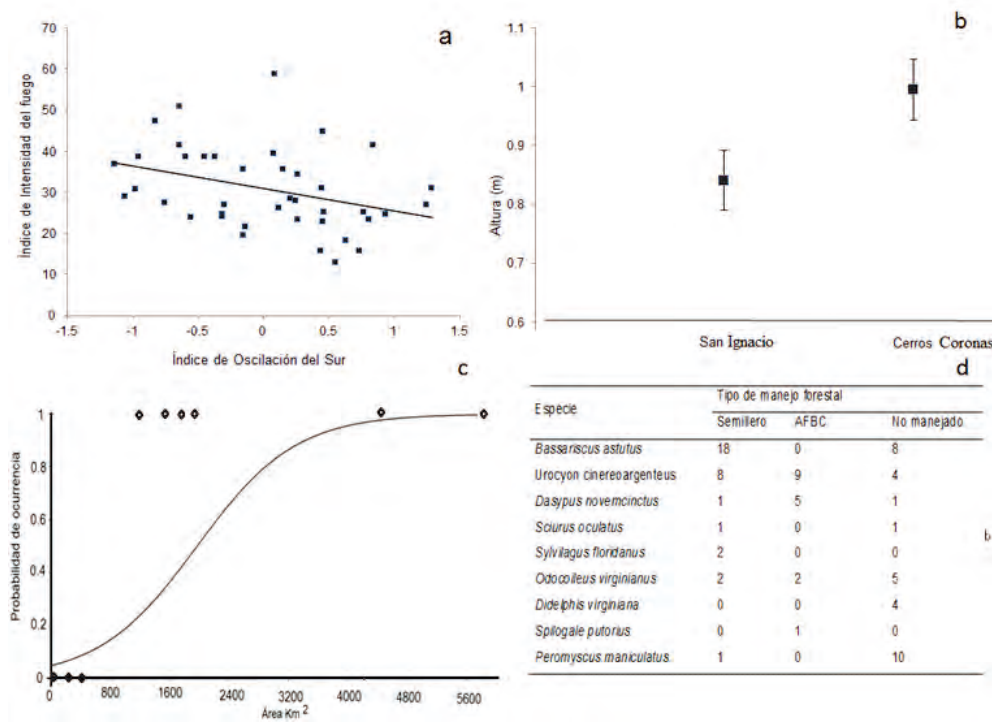
Por ejemplo, la intensidad de los incendios forestales, está determinada por factores ambientales como la distancia a caminos, distancia a zonas urbanas, precipitación y temperatura (Perez-Vendin 2014). También es común asociar la presencia de incendios forestales cuando hay estiaje y acumulación de biomasa en el sotobosque, esta expresión de la naturaleza ocurre de forma azarosa, y aunque es posible predecir años que serán lluviosos o secos asociados por ejemplo al fenómeno del Niño utilizando el índice de Oscilación del Sur (SOI) que es una variable continua, al analizar la intensidad de los fuegos con este índice solo podemos analizar si están asociados o no (datos tomados de Pavón y Sánchez-Rojas 2011, Fig. 4.4a).

También puede ser que la variable explicatoria sea categórica, como cuando nos referimos al tamaño de los arbustos en dos diferentes elementos del paisaje donde podemos ver, comparando el valor medio de estas, si hay o no una diferencia significativa entre ellos. Como ejemplo, podemos analizar la altura promedio de los arbustos en dos elementos del paisaje en la Reserva de la Biosfera de Mapimí (datos tomados de Sánchez-Rojas y Gallina 2000, Fig. 4.4b). El conocer de qué tipo son nuestras variables explicatorias o de respuesta, es muy importante para la selección de las herramientas estadísticas que queremos usar.

Existen tratados completos sobre cómo diseñar los experimentos en el campo de las ciencias biológicas (p.ej. Scheiner y Gurevitch 2001, Quinn y Keough 2002). Los diseños más simples que se pueden plantear son aquellos que pode-

mos resolver con la estadística univariada, que es aquella utilizada cuando nos interesa analizar una sola variable de respuesta o cuando hay muchas variables de respuesta, la estadística que se debe de utilizar es la multivariada.

En la estadística univariada hay cuatro tipos de diseños esenciales, que resultan de la combinación de los tipos de variables de respuesta y explicatorias, así como saber la magnitud en la que se está midiendo, ya sea como una variable



**Figura 4.4.** Representación de los diferentes diseños de estudios: a) Cuando tenemos que ambas variables –la dependiente y la independiente– son continuas, por ejemplo, entre la intensidad de los fuegos forestales y el índice de oscilación del sur (datos modificados de Pavón y Sánchez Rojas 2011); b) Cuando la variable independiente es categórica y la dependiente es continua, por ejemplo, cuando comparamos el tamaño de los arbustos en dos localidades (datos modificados de Sánchez Rojas y Gallina 2000); c) Cuando la variable dependiente es categórica y la independiente es continua tendríamos una regresión logística, por ejemplo, en la presencia o ausencia del puma en fragmentos de diferentes tamaños (datos tomados de Crooks et al. 2002) y d) Cuando ambas variables son categóricas, por ejemplo, cuando vemos la frecuencia que presentan especies de mamíferos terrestres en tres diferentes hábitats.

continua o como una variable categórica (Gotelli y Ellison 2004). Es imprescindible que al hacernos una pregunta de investigación, ya tengamos en mente cuál es la variable respuesta (también llamada variable dependiente) y por otro lado también tengamos qué variables pueden estar explicando nuestros resultados (también podemos llamar a estas variables independientes) (Cuadro 4.1).

Si sabemos que tanto la variable independiente como dependiente son continuas, lo que podemos analizar de ellas es si estas dos variables están asociadas significativamente, o se pueden explicar mediante una ecuación lineal, lo cual podemos evaluar mediante pruebas de correlación y/o regresión respectivamente. Por otro lado, si tenemos una variable dependiente continua y una variable independiente categórica, entonces es necesario hacer una comparación de medias, la cual representa toda un familia de pruebas estadísticas y donde podemos encontrar los más diversos y complejos diseños de estudios (ver Zar 2010), donde se ajustan muchas posibles combinaciones de uno o más variables categóricas para explicar a la variable dependiente. Cuando la variable dependiente es categórica (p.ej. expresa presencia o ausencia de una especie de carnívoro) y la variable independiente es continua (p.ej. tamaño de un fragmento de hábitat) entonces debemos de poder reconocer si hay una asociación entre la probabilidad de que ocurra alguno de los dos estados de la variable categórica y el valor de la variable continua como se puede ver la probabilidad de ocurrencia del puma en fragmentos de chaparral de diferente tamaños en California (datos tomados de Cooks 2002, ver Fig. 4.4c). Finalmente cuando ambas variables son categóricas la variable que podemos medir en este caso es la frecuencia con la que ocurren simultáneamente y establecer si esta frecuencia se ajusta al azar o no (p.ej. como se da la frecuencia con la que ocurren diferentes especies de mamíferos en ciertos hábitats) esta información es una medida de la independencia que hay entre ambas variables categóricas, resolviéndose con pruebas tabulares (pruebas de bondad de ajuste o tablas de contingencia) y, al igual que en las comparación de medias, es toda una familia de pruebas donde se pueden tener más de una variable categórica explicatoria (Fig. 4.4d).

Evidentemente es imposible revisar todos los casos y los tipos de diseños para investigar la fauna silvestre, sin embargo, creemos que estas sencillas reglas

pueden de ser de gran utilidad cuando se intenta estudiar la fauna silvestre, ya que implícitamente están conjuntando a los diferentes actores de una investigación científica y nos puede llevar de una manera más fácil a lograr el ciclo de la indagación que se mencionó antes.

A pesar de lo útil que resulta el Cuadro 4.1, es importante tratar de visualizar que para escoger la herramienta estadística adecuada para poder realizar una reflexión sobre nuestros hallazgos es necesario ir tomando en cuenta si los datos se ajustan o no a la distribución normal. Para tal fin se generó un árbol de decisión (Fig. 4.5) donde se va planteando si lo que se busca es comparar medias o si se desea saber si las variables que se están utilizando se encuentran asociadas.

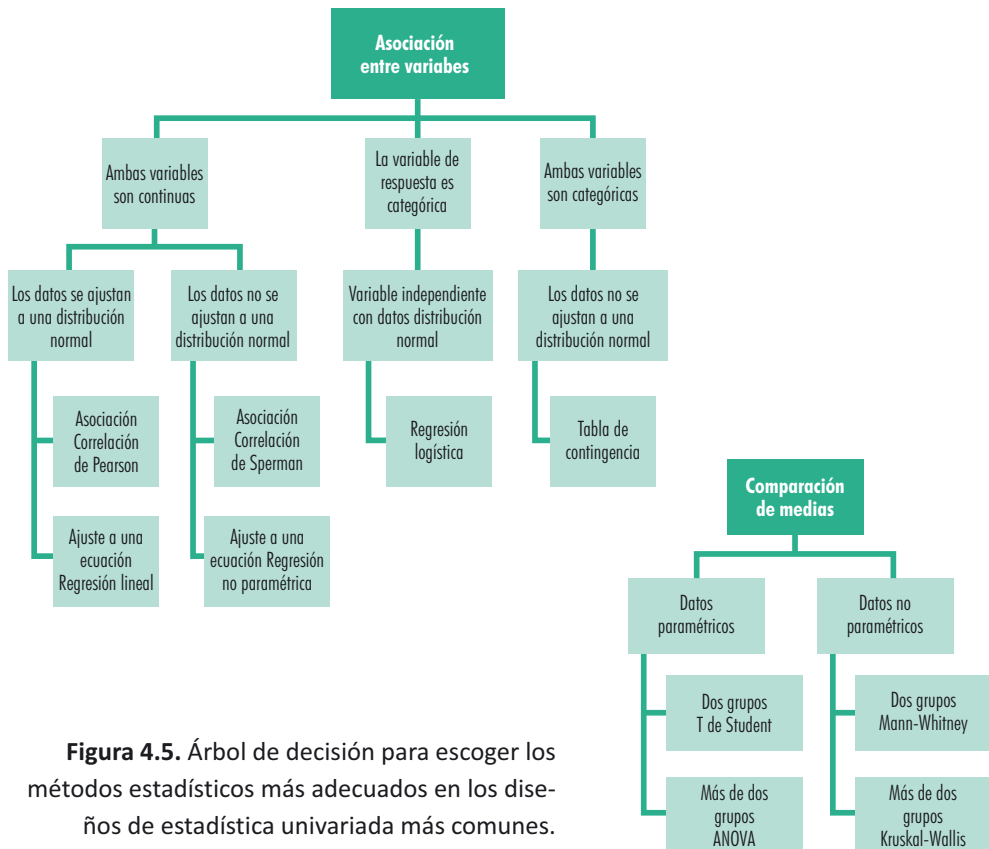
Si el caso es la comparación de medias entonces deberíamos saber primero si nuestros datos se ajustan o no a una distribución normal, y si queremos comparar dos grupos o más, en el caso de que los datos sean paramétricos y solo sean dos grupos, podemos utilizar una prueba de T de Student; mientras que si son más de dos grupos la prueba adecuada sería un análisis de varianza (ANOVA), en el caso de que los datos no fueran paramétricos entonces si solo son dos grupos podemos utilizar una prueba de U de Mann-Whitney; mientras que si son para más de dos grupos la prueba adecuada sería una análisis de varianza en rangos o prueba de Kruskal-Wallis.

**Cuadro 4.1.** Cuatro tipos de diseños y pruebas estadísticas univariadas. En gris se indican aquellas pruebas que buscan evaluar el grado de asociación de las variables dependientes e independientes mientras que la única que realmente evalúa la diferencia es la ANOVA.

Variable dependiente	Variable independiente	
	Continua	Categoría
Continua	Regresión Correlación	Comparación de medias
Categoría	Regresión logística	Tabla de contingencia

*Modificado de Gotelli y Ellison 2004.*

Cuando nos interesa saber si hay una asociación lo primero es saber si los datos continuos de la variables dependiente e independientes se ajustan o no a una distribución normal, en el caso de que sí se ajuste a esta distribución, si nos interesa ver solo que están asociadas entonces utilizamos una correlación de Pearson, mientras que si queremos ajustar los valores a una ecuación de la línea recta entonces utilizamos la regresión paramétrica, pero si nuestros datos no se ajustan a una distribución normal, entonces, para saber si están asociadas utilizamos una correlación de Spearman, mientras que si queremos ajustar los valores a una ecuación entonces utilizamos la regresión no paramétrica.



**Figura 4.5.** Árbol de decisión para escoger los métodos estadísticos más adecuados en los diseños de estadística univariada más comunes.



## BIBLIOGRAFÍA

- Christensen, H.B. 1997. *Estadística paso a paso*. Editorial Trillas. México.
- Cooks, K.R. 2002. Relative sensitivities of mammalian carnivores to habitat fragmentation. *Conservation Biology* 16:488-502.
- Farji-Brener, G.A. 2009. ¿Ecólogos o ególogos? Cuando las ideas someten a los datos. *Ecología Austral* 19:167-172.
- Feinsinger, P. 2004. *El diseño de estudios de campo para conservación de la biodiversidad*. Fundación Amigos de la Naturaleza. La Paz.
- Galicia, S.L. y A.E. Zarco. 2011. El concepto de escala y la teoría de las jerarquías en ecología. *Ciencias* 67:24-40.
- Gotelli N. J. y A.M. Ellison. 2004. *A primer of ecological statistic*. Sunderland: Sinauer.
- Pavón, N.P. y G. Sánchez Rojas. 2011. El Niño y los incendios en matorrales semiáridos de México. Pp. 67-70. En: Sánchez-Rojas, G., B.C. Ballesteros y N. Pavón (eds.). *Cambio climático. Aproximaciones para el estudio de su efecto en la biodiversidad*. Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo. Hidalgo, México.
- Perez-Verdin, G., M.A. Marquez-Linares y M. Salmeron-Macias. 2014. Spatial heterogeneity of factors influencing forest fires size in northern of Mexico. *Journal of Forestry Research* 25:291-300.
- Quinn G. P. y M. J. Keough 2002. *Experimental design and data analysis for biologists*. Cambridge University Press. Cambridge.
- Rumsey, D.J. 2013. *Estadística para dummies*. Grupo Planeta. Barcelona.
- Sánchez-Rojas, G. y S. Gallina. 2000. Mule deer (*Odocoileus hemionus*) density in a landscape element of the Chihuahuan Desert, Mexico. *Journal of Arid Environments* 44:357-368.
- Scheiner S. M. y J. Gurevitch 2001. *Design and analysis of ecological experiments*. Oxford University Press. New York.
- Serrano-Meneses M.A., G. Sánchez-Rojas y A. Córdoba Aguilar. 2008. Sexual selection as the possible underlying force in *Calopterygid* wing pigmentation: comparative evidence with *Hetaerina* and *Calopteryx* genera. *Odonatologica* 37:221-233.

Sokal, R.R. y F.J. Rohlf. 2005. Biometry. *The principles of statistics in biological research*. W.H. Freeman. Nueva York.

Wiens, J.A. 1989. Spatial scaling in ecology. *Functional ecology* 3:385-397.

Zar, J.H. 2010. *Biostatistical analysis*. Prentice Hall. Nueva Jersey.

# capítulo cinco

## Evaluación de la diversidad de especies en ensamblajes de vertebrados: un primer acercamiento midiendo y comparando la riqueza de especies

*Eduardo Pineda y Claudia E. Moreno*

### INTRODUCCIÓN

La diversidad de especies, considerándola en un sentido amplio como la variedad de especies y su abundancia relativa en el espacio y el tiempo (Hubbell 2001), se ha convertido en un tema central tanto en ecología de comunidades como en biología de la conservación. Su estudio es una aproximación práctica para conocer el estado de los sistemas ecológicos, evaluar el impacto de distintas actividades humanas sobre la naturaleza, identificar espacios que ameriten protección inmediata, así como para entender el funcionamiento de los ecosistemas (Maclaurin y Sterelny 2008).

Actualmente se reconoce a la diversidad de especies como una propiedad de las comunidades biológicas, la cual amerita ser examinada y monitoreada para entender a la naturaleza (Begon *et al.* 2006, Podani 2006). Sin embargo, dependiendo de los propósitos o alcances del estudio, existen múltiples formas de evaluarla (Moreno 2001, Magurran 2004). En este sentido la riqueza de especies, es decir, el número de especies que ocurren en un espacio determinado, es probablemente el componente más estudiado de la diversidad de especies. Además de ser la forma más sencilla de evaluar la variedad de entidades que componen a un ensamblaje o un ensamble<sup>1</sup>, la riqueza de especies

---

1. Siguiendo la propuesta de Fauth *et al.* 1996, se considera ensamblaje a un grupo de especies relacionadas filogenéticamente que coexisten en espacio y tiempo (p. ej. los anfibios del bosque de niebla del centro de Veracruz), mientras que ensamble es un grupo de especies relacionadas filogenéticamente pero que además usan un conjunto de recursos de manera similar (p. ej. las ranas de hojarasca de la reserva Los Tuxtlas).

proporciona información sobre la expresión de procesos ecológicos e históricos que han ocurrido en una localidad, y podría reflejar lo que sucede en otros niveles de organización biológica. Las desventajas de utilizar la riqueza específica como medida de la diversidad biológica es que se asume que todas las entidades que componen a un conjunto tienen la misma relevancia, al usarla como comparativo entre distintos escenarios no distingue las diferencias en la identidad de las especies y, desde un punto de vista metodológico, el número de especies registrados en un espacio y tiempo determinado depende del tamaño de la muestra. En ese sentido, el análisis de la riqueza de especies puede considerarse como un primer acercamiento, práctico y relativamente sencillo, para estudiar a las comunidades biológicas y los procesos que las regulan, pero la medida por sí sola tiene limitaciones las cuales, en función de los propósitos y alcances del estudio, pueden reducirse usando de manera complementaria otras métricas de la diversidad de especies.

El propósito del presente capítulo es apoyar a los interesados en el estudio de la diversidad de especies, particularmente de la riqueza de especies, mediante una serie de propuestas que faciliten su análisis e interpretación. Es preciso mencionar que ya existen varios trabajos que tratan sobre distintos métodos y su aplicación para analizar la riqueza de especies (ver Moreno 2001, Halffter *et al.* 2001, Magurran 2004, Magurran y McGill 2011, Pineda-López y Verdú 2013). En este capítulo, como un elemento distintivo, se plantea el uso conjunto de una serie de métodos que fueron propuestos o mejorados recientemente para estudiar la riqueza de especies (ver Chao y Jost 2012, Colwell *et al.* 2012, Colwell 2013, MacGregor y Payton 2013, Hsieh *et al.* 2013, Colwell y Elsensohn 2014) pero en un contexto particular, el de los vertebrados. Asimismo, se abordan algunas consideraciones básicas en cuanto al diseño del estudio, la colecta y el manejo de los datos, así como su representación. Cabe aclarar que las bases teóricas y explicaciones detalladas sobre el funcionamiento de cada método no son tratadas en este capítulo, estas pueden ser encontradas en las publicaciones antes citadas.

## **Algunas consideraciones básicas sobre el diseño del estudio y la colecta de datos**

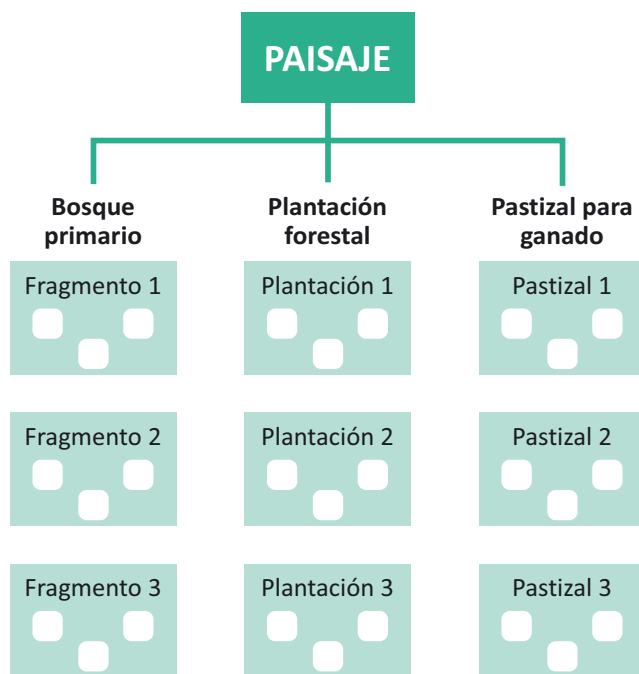
La medición o cuantificación de la riqueza de especies de un ensamblaje es posible a través de un muestreo estructurado espacial y temporalmente. Una muestra se define como una parte o porción de un conjunto, extraída mediante métodos que permiten considerarla como representativa del propio conjunto. Planificar los muestreos adecuadamente demanda de un ejercicio de priorización, de selectividad y es la base para generar datos confiables que nos reflejen el fenómeno que se desea examinar.

Cuando se busca estimar la riqueza de especies de una localidad o un paisaje, es pertinente considerar varios elementos vinculados con el muestreo y su diseño. Por ejemplo, es necesario reconocer que todos los métodos de muestreo tienen sesgos, algunas técnicas, ya sea por causas biológicas o relacionadas con el observador o el instrumento de detección, son muy útiles para registrar especies con determinados hábitos, conducta o características físicas, por ejemplo, pero no son tan adecuadas para detectar especies con otros atributos. En este sentido, la probabilidad de detección varía entre las especies y a lo largo del periodo del estudio (Buckland *et al.* 2011), lo cual se relaciona directamente con la precisión para estimar la riqueza de especies. Por lo tanto, las estimaciones de la riqueza estarán sesgadas en la medida que la probabilidad de detección y las técnicas de muestreo así lo estén. De ser posible, es recomendable usar varios métodos de muestreo que sean complementarios en su capacidad de detección, de esta forma, se incrementará la probabilidad de registrar el mayor número de especies presentes en el área estudiada.

Otro elemento fundamental relacionado con el diseño del estudio y con el muestreo es la escala. La riqueza de especies registrada en un área dependerá tanto del tamaño del área, como del periodo de tiempo y del momento en el que sea examinada esa área. Cuando el área de muestreo se incrementa, la probabilidad de observar más especies también aumenta; de la misma manera, cuanto más tiempo se invierta para registrar a las especies, mayor será la probabilidad de observarlas. En este sentido, es pertinente recordar que los hábitats son dinámicos y los vertebrados responden a esa dinámica despla-

zándose en el espacio y en función del tiempo (p. ej. ciclo diurno-nocturno, estacionalidad, ciclos anuales, multianuales, etc.). De manera general, mientras el área y el tiempo sean más reducidos para estimar la riqueza de especies, el valor de esta tenderá a ser menor. Esto es especialmente relevante al analizar ensamblajes compuestos por una porción significativa de especies raras, por especies migratorias o aquellas con vagilidad reducida. Al incrementar el área y tiempo de muestreo en la medida de lo posible, se reduce la probabilidad de cometer errores como los falsos negativos o falsas ausencias, esto es, no registrar la especie cuando sí está presente, lo cual puede redundar de manera negativa en la estimación de la riqueza de especies (Tyre *et al.* 2003).

Cuando el propósito del estudio implica comparar ensamblajes de especies en distintos escenarios (ambientes, fragmentos de vegetación, etc.) es recomendable invertir el mismo esfuerzo de colecta en todas las muestras que se



**Figura 5.1.** Ejemplo de un diseño de muestreo considerando un esfuerzo de colecta similar en cada ambiente y en cada fragmento o parcela que conforman a ese ambiente.

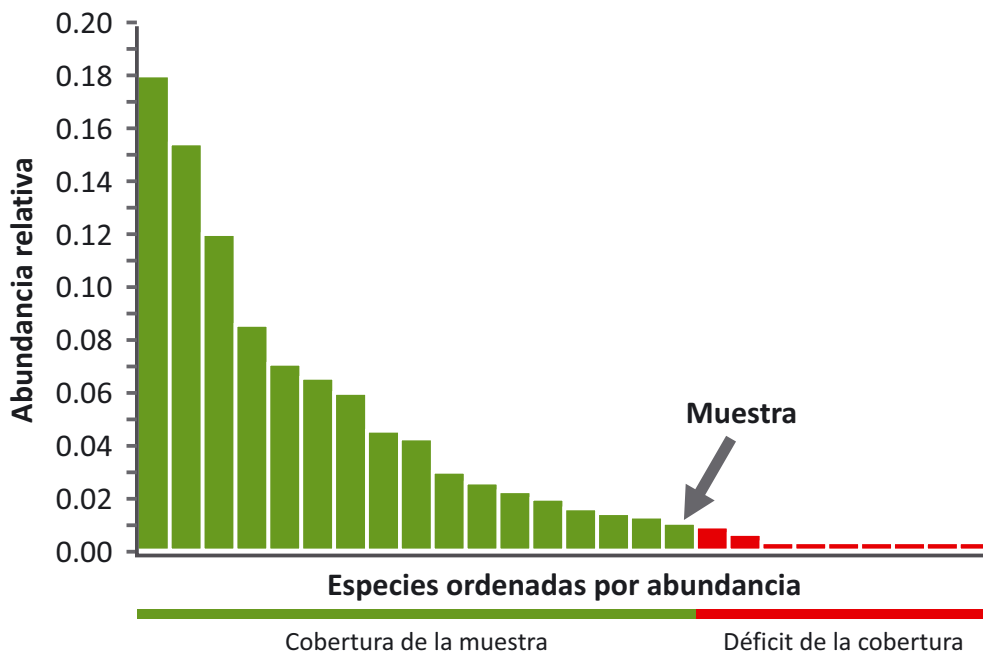
desean comparar (Fig. 5.1). Es oportuno coleccionar muestras en distintos puntos dentro de cada escenario y a lo largo del periodo de actividad de las especies estudiadas o al menos en las etapas más representativas para el grupo de vertebrados (p.ej., las estaciones del año con mayor actividad, la época de reproducción, la de migración o alguna particularmente relevante para cada grupo).

### **La completitud de la muestra y la representatividad del ensamblaje**

Como se mencionó previamente, la medición de la riqueza de especie se relaciona directamente con el esfuerzo de muestreo aplicado durante todo el estudio. Una vez que hemos concluido el trabajo de campo o incluso si aun no lo finalizamos, es pertinente evaluar qué tan completa es la muestra para representar al ensamblaje que deseamos analizar. Esta tarea es particularmente relevante cuando se pretende comparar ensamblajes, lo recomendable es que las comparaciones se hagan con niveles de completitud parecidos y preferentemente altos. Una opción propuesta recientemente para atender esta tarea es una aproximación denominada cobertura de la muestra.

El concepto de "cobertura de la muestra" fue desarrollado originalmente por Alan Turing e I.J. Good (citado en Chao y Jost 2012) para realizar análisis criptográficos durante la Segunda Guerra Mundial, pero fue retomada y adecuada en los últimos años por Chao y Shen (2010) y Chao y Jost (2012) para analizar datos de diversidad biológica. En ese contexto, la cobertura es considerada una medida de la completitud de la muestra, indicando la proporción del número total de individuos de un ensamblaje que pertenecen a las especies representadas en la muestra. Asimismo, al restar el valor de la cobertura de la muestra de la unidad, se obtiene la proporción de la comunidad que pertenece a las especies no muestreadas, lo cual se denomina "déficit de la cobertura". El déficit de la cobertura de la muestra también puede interpretarse como la probabilidad de que una nueva especie (i. e. especie no detectada previamente) sea registrada si se aumentase la muestra con un individuo (Fig. 5.2).

Un ejemplo similar al que proponen Chao y Jost (2012) puede ayudar a ilustrar el concepto. Imaginemos que un ensamblaje de aves en un bosque de una reserva está compuesto por 50 especies, la especie 1 tiene una abundancia



**Figura 5.2.** Cobertura de la muestra y déficit de la cobertura determinadas en función de las abundancias relativas del conjunto de especies que forman el ensamblaje.

relativa de 0.25, la especie 2 tiene una abundancia relativa de 0.15, de la especie 3 a la especie 5 tienen una abundancia relativa de 0.06 cada una y de la especie 6 a la 50 la abundancia relativa es de 0.01 para cada una. Las abundancias relativas de las especies del ensamblaje se pueden referir como: 0.25, 0.15,  $0.06 \times 3$ ,  $0.01 \times 45$ . Si se lleva a cabo un muestreo aleatorio con reemplazo y se registran 20 individuos, los cuales pertenecen a 12 especies y se asume que son las 12 especies más abundantes del ensamblaje, la cobertura de esta muestra en particular es  $0.25 + 0.15 + (0.06 \times 3) + (0.01 \times 7) = 65\%$ , ya que esas 12 especies en la muestra en conjunto, constituyen el 65% del número total de individuos del ensamblaje. El déficit de la cobertura es  $100\% - 65\% = 35\%$ , lo cual significaría que el 35% de los individuos del ensamblaje pertenecen a especies que no fueron detectadas por el muestreo (las cuales fueron 38 especies). En ese sentido, estos valores pueden ser considerados indicadores objetivos de la completitud del muestreo, aunque no indican la proporción de espe-



cies detectadas en el muestreo. Para estimar esa proporción se ocupan estimadores como Chao 1, Jack 1 y otros estimadores que son tratados con detalle en textos como los de Moreno (2001), Magurran y McGill (2011) o Pineda-López y Verdú (2013).

Desde un punto de vista práctico, la cobertura de la muestra debería ser estimada con los datos que se obtienen a partir del muestreo, sin necesidad de conocer de antemano las abundancias relativas reales de todas las especies que componen el ensamblaje. Para ello, Chao y Shen (2010) y Chao y Jost (2012) derivaron una ecuación, a partir de la propuesta inicial de Alan Turing usando la información contenida en la propia muestra, la cual consideran precisa y eficiente. El cálculo de la cobertura se basa en la integración de tres elementos fundamentales: el tamaño de la muestra, esto es, el número total de individuos registrados (denotado como  $n$ ), el número de *singletons* (especies representadas por solamente un individuo en la muestra, cuya notación es  $f_1$ ) y el número de *doubletons* (especies representadas por dos individuos en la muestra, denotado como  $f_2$ ), los cuales se relacionan de la siguiente manera:

$$\hat{C}_n = 1 - \left( \frac{f_1}{n} \left[ \frac{(n-1)f_1}{((n-1)f_1) + 2f_2} \right] \right)$$

Así, en un muestreo donde se hayan registrado 752 individuos de 43 especies de reptiles, de las cuales 21 fueron *singletons* y 5 fueron *doubletons*, la cobertura de la muestra sería del 97% y el déficit de la cobertura del 3%. Este cómputo puede hacerse de manera sencilla con papel y lápiz y, por supuesto, de manera expedita en una hoja de cálculo como Excel de la siguiente manera (Fig. 5.3).

Cabe mencionar que aunque se planea un esfuerzo de muestreo equitativo en todas las localidades o escenarios que se desea comparar, no hay garantía de que las coberturas de las muestras serán similares. Si no fuese posible nivelar la cobertura de la muestra con más esfuerzo en campo, es pertinente considerar en la discusión del trabajo que las diferencias en las riquezas observadas pueden deberse, al menos parcialmente, a diferencias en la cobertura de la muestras.

	A	B	C	D	E
1		Número de singletons	Número de doubletons	Número de individuos	Cobertura de la muestra
2	Notación	$f_1$	$f_2$	$n$	Cn
3	Valores	21	5	754	0.97217
4					
5					
6					$=1-((B3/D3)*(((D3-1)*B3)/(((D3-1)*B3)+(2*C3))))$

**Figura 5.3.** Ejemplo del formato y arreglo de los valores para calcular la cobertura de la muestra en una hoja de cálculo.

### Comparando la riqueza promedio de las muestras

En algunas ocasiones puede resultar interesante calcular la riqueza de especies promedio de las unidades de muestreo (trayectos, días, conjuntos de trampas, sitios de muestreo) y después comparar dicha riqueza promedio entre diferentes comunidades (localidades, tipos de vegetación, etc.). Para ello hay varias alternativas:

- 1) Si los datos cumplen los supuestos de normalidad y homogeneidad de varianzas, se pueden utilizar pruebas estadísticas paramétricas, particularmente la prueba de t de Student para comparar la riqueza promedio de dos comunidades, o análisis de varianza (ANOVA) para comparar tres o más comunidades.
- 2) Si los datos no tienen una distribución normal (como casi siempre ocurre) y se desea realizar pruebas paramétricas tradicionales como las descritas en el punto anterior, se pueden transformar los datos. Por ejemplo, transformando los datos de número de especies en su raíz cuadrada, puede alcanzarse una distribución normal.
- 3) Si los datos no tienen una distribución normal, se pueden utilizar pruebas estadísticas no paramétricas para comparar la mediana de las comunidades: una prueba de Mann-Whitney para comparar la riqueza de dos comunidades o una prueba de Kruskal-Wallis para comparar tres o más comunidades.

- 4) Se pueden utilizar modelos lineales generalizados (generalized linear models, GLMs) con los cuales uno puede especificar el tipo de distribución de los datos antes de realizar la prueba estadística correspondiente. Los datos de riqueza de especies (conteos) suelen tener una distribución de tipo Poisson.

### **Comparando la riqueza total o acumulada de especies: una tarea en tres pasos**

La comparación de la riqueza total de especie de varias localidades, ambientes o momentos, puede llevarse a cabo mediante un proceso que implica tres etapas: la elaboración de curvas de acumulación de especies, su extrapolación a un mismo esfuerzo de muestreo y la construcción de intervalos de confianza al 84% para contrastar de manera robusta los valores calculados.

#### ***Curvas de acumulación de especies***

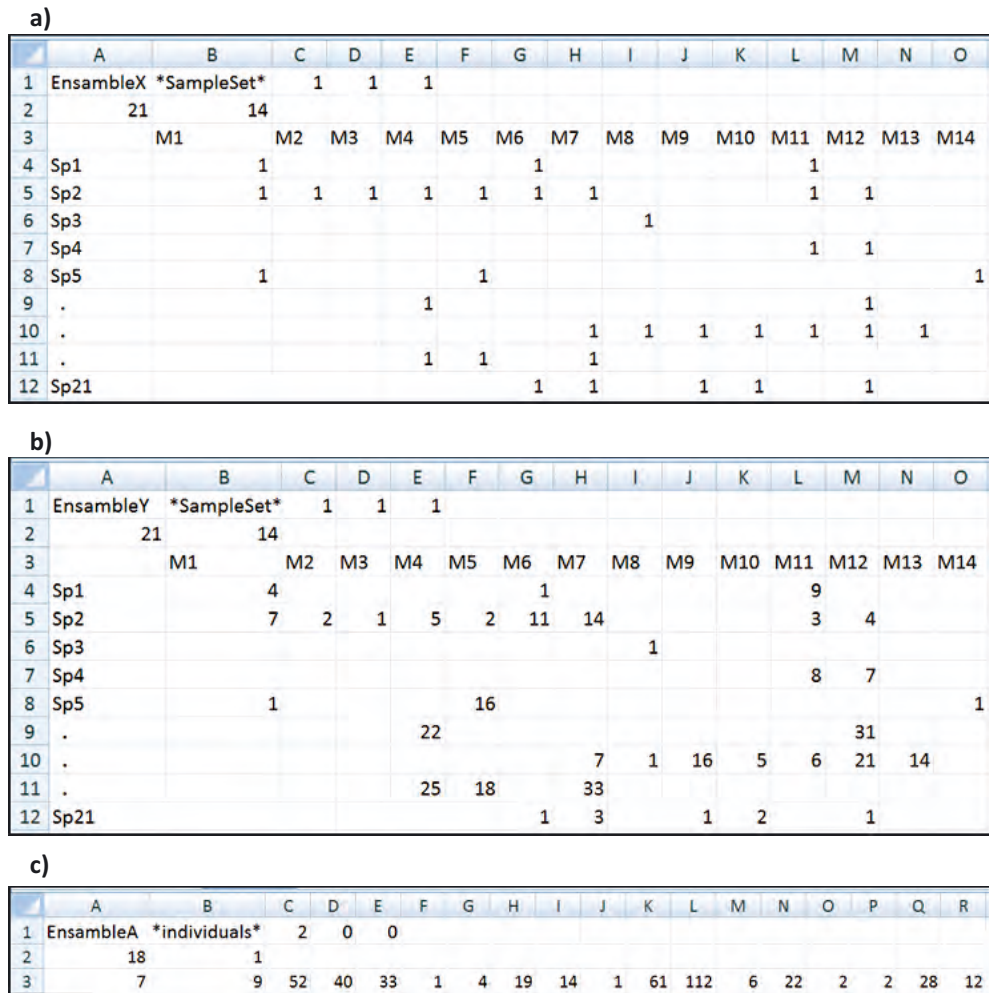
Las curvas de acumulación de especies han sido usadas en ecología de comunidades y biología de la conservación, entre otras cosas, para comparar la riqueza específica entre ensamblajes (Soberón y Llorente 1993, Gotelli y Colwell 2001). De manera breve, se puede definir a una curva de acumulación de especies como un modelo que relaciona el número acumulado de especies registradas en función de alguna medida del esfuerzo aplicado a lo largo de un muestreo. Su uso facilita la comparación entre ensambles pues siempre tiene como referencia el esfuerzo de muestreo, elemento que influye de manera determinante en los valores de riqueza de especies observados.

De manera general, para la generación de una curva de acumulación de especies se puede usar como unidad de esfuerzo a las muestras o a los individuos registrados. En el primer caso, el esfuerzo puede medirse en función de la técnica usada, como número de trampas o cámaras trampa, metros cuadrados de red, horas de búsqueda, puntos de conteo, área o distancia de muestreo, etc. o bien puede ser una mezcla de estas técnicas. En el caso de usar al número de individuos como esfuerzo de muestreo, si bien uno no sale al campo pensando en registrar 20, 40 o 100 individuos, resulta práctico tomarlo como esfuerzo de muestreo al generar las curvas ya que todas las técnicas

mencionadas previamente tienen como común denominador a los individuos capturados o registrados. Esto es particularmente útil cuando se usa una combinación de técnicas, además de que facilita la comparación con estudios publicados en otros lugares o en otros momentos: los individuos registrados como parámetro de comparación, independientemente de las técnicas usadas. Ahora bien, no siempre es posible distinguir entre individuos en los muestreos. En ocasiones, como cuando se registran rastros de animales o cuando mediante las cámaras trampa no se puede distinguir si se está registrando al mismo individuo en varias fotografías o son diferentes ejemplares, es pertinente usar los datos como presencia-ausencia.

Para generar las curvas de acumulación se puede ocupar algún programa de cómputo, varios de ellos son de uso gratuito, son de fácil manejo y están disponibles en la red. En este caso se ocupará el programa EstimateS v. 9.1 (Colwell 2013) debido a que es un programa comúnmente usado en estudios de diversidad para analizar una amplia gama de grupos biológicos, tiene más de 20 años de haber sido creado y continuamente está en actualización, además de que es de acceso gratuito.

El programa usa como materia prima una matriz de datos la cual puede ser, como se mencionó previamente, generada con datos de presencia-ausencia o bien con datos de abundancia. En la versión 9.0 y posteriores es posible analizar tres tipos de matrices de datos, las cuales pueden generarse mediante una hoja de cálculo y guardar como texto delimitado por tabulaciones. En la Fig. 5.4 se muestra un ejemplo de cada formato. En el primer formato (Fig. 5.4a) se trata de una matriz de datos de presencia-ausencia donde las muestras están dispuestas en columnas y las especies en las filas. La celda A1 se refiere al nombre del ensamblaje, localidad o ambiente que se pretende analizar y el nombre se asigna a criterio del usuario. La celda B1 se refiere al formato de la matriz (conjunto de muestras), la C1 incluye la clave del arreglo de la matriz (1) que en este caso se refiere a las muestras en columnas y las especies en filas, los valores en D1 y E1 se refieren al número de columnas y filas que no se deben de tomar en cuenta para los análisis, que en este caso son 1 y 1: el encabezado de las muestras y el nombre de las especies (fila 3 y columna 1, respectivamen-



**Figura 5.4.** Formatos de bases de datos que pueden ser usados como archivos de entrada en el programa EstimateS v. 9.1 para generar curvas de acumulación. a) Matriz de presencia–ausencia (o incidencia) basada en muestras; b) Matriz de abundancia basada en muestras; c) Matriz basada en individuos.

te). La notación de estas celdas es obligatoria si se usa una matriz de datos como la que se muestra en el ejemplo (Fig. 5.4a). Si se usa una matriz que no incluye el nombre de las muestras, ni el nombre o clave de las especies, entonces los valores asignados a las celdas D1 y E1 deben ser 0 (cero). Con respecto a las celdas A2 y B2, los valores que se deben de asignar son el número total de

especies y el número total de muestras respectivamente (21 y 14 para el caso del ejemplo). El resto de las celdas incluye el valor 1 si se registró la presencia de una especie en una muestra en particular, si no se detectó, la celda queda vacía, no es necesario indicar un 0 (cero). Cabe aclarar que dentro de la matriz de datos no debe haber columnas, ni filas vacías.

El segundo formato (Fig. 5.4b), que puede analizarse en EstimateS 9.0 y versiones posteriores, incluye datos de abundancia y es muy parecido al de presencia-ausencia, pero en este caso los valores que se incluyen dentro de la matriz se refieren a la abundancia registrada de cada especie, en cada una de las muestras.

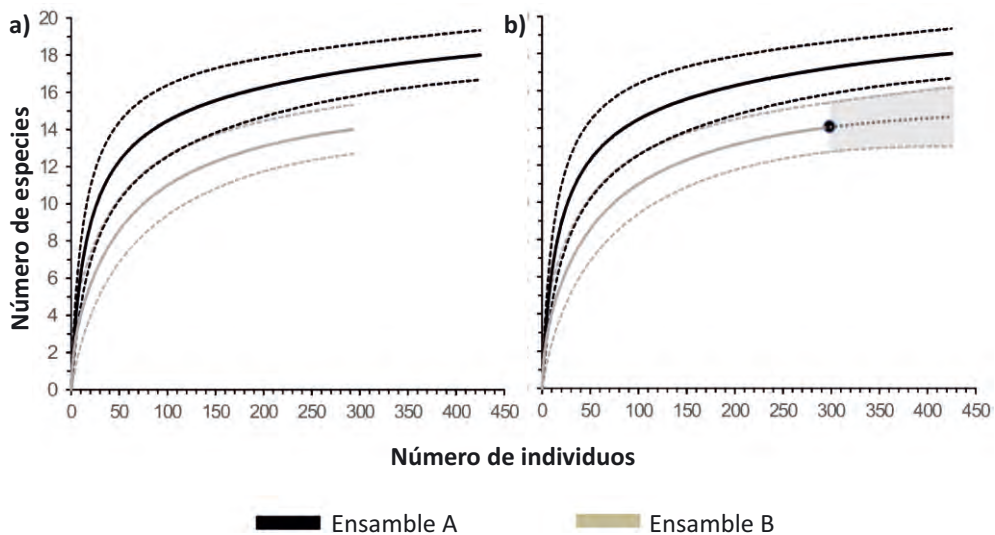
El tercer formato (Fig. 5.4c) es una manera resumida de ordenar los datos generados en el estudio y es pertinente solo cuando se tienen datos de abundancia. En este caso, las celdas B1, C1, D1 y E1 se refieren al formato de la matriz (por individuos), la clave del arreglo (en este caso 2: las especies en columnas y las muestras en filas) y como no se incluye el nombre de las muestras, ni de las especies, se debe de indicar 0 y 0 respectivamente. Las celdas B2 indican el número de especies y la celda C2 señala las muestras, que en este caso como es un formato reducido solo se indica 1. Los valores en las celdas A3, B3, C3, etc. se refieren a las abundancias totales de cada especie, registradas al final del estudio. Cualquiera de los formatos antes mencionados debe guardarse como "texto delimitado por tabulaciones" y se recomienda almacenarlo en una carpeta generada especialmente para este tipo de análisis.

Para procesar en el programa alguna matriz de datos, en este caso el ejemplo mostrado en el tercer formato, se debe abrir el programa y realizar lo siguiente:

1. Cargar el archivo (menú *File* de la barra de opciones), seleccionar la opción *Individual-based abundance data*, así como *One individual-based abundance sample* y seleccionar el archivo que se guardó en la carpeta especial. Posteriormente se abrirán algunas ventanas que indicarán las características de nuestra base de datos, hay que seleccionar OK.
2. En el menú *Diversity*, seleccionar *Diversity Settings* y aparecerá una ventana que indica las condiciones bajo las que se generará la curva de acumulación,

por defecto se harán 100 aleatorizaciones, lo cual es adecuado para el tamaño de la matriz de datos que se procesará es adecuado, pero si se procesa una base de datos mucho más grande, con  $n$  número de especies cercanas a la centena o más, conviene aumentar el número de aleatorizaciones, por lo menos unas tres o cuatro veces más que el número de especies. Por el momento, el resto de las opciones se queda como se indican por defecto y se indica OK.

3. En el menú *Diversity* se elige la opción *Compute Diversity Stats* y después de aceptar, se desplegará una ventana con los valores del número de especies estimadas (denotado como  $S[\text{est}]$ ) en función del número de individuo (columnas 2 y 1, respectivamente), así como los intervalos de confianza superior e inferior al 95% (columnas 3 y 4), la desviación estándar (columna 5), una serie de estimadores de la riqueza de especies, así como los valores de *singletons* y *doubletons*, en el resto de las columnas.



**Figura 5.5.** Curvas de acumulación de especies de dos ensamblajes en función del número de individuos registrados. Se grafican los valores estimados (línea continua) y los intervalos de confianza superior e inferior (líneas discontinuas). a) Curvas de acumulación de dos ensamblajes donde el esfuerzo de muestreo fue distinto; b) Curvas de acumulación de dos ensamblajes donde el esfuerzo de muestreo fue distinto pero en uno se extrapoló al mismo esfuerzo de muestreo que el otro ensamblaje. La línea punteada después del círculo negro indica los valores calculados mediante la extrapolación y el área gris indica la amplitud de los intervalos de confianza resultantes.

4. Exportar la base directamente desde la ventana o en el menú Diversity y guardarla en la carpeta especial.
5. Abrir la base de datos en una hoja de cálculo y ahí se podrá graficar con facilidad la curva de acumulación, incluyendo los intervalos de confianza (de la columna 1 a la 4).

Es posible procesar varias bases de datos y mostrarlas en una sola gráfica, lo cual ayuda a mostrar el comportamiento de la riqueza de ensamblaje en función del esfuerzo de muestreo, que en este caso fue el número de individuos, como se muestra en la Fig. 5.5a.

### **Extrapolación**

Cabe reconocer que a pesar de lo proyectado al inicio de un estudio, rara vez es posible invertir exactamente el mismo esfuerzo en todos los ensambles que se pretenden comparar, debido tanto a restricciones de personal, metodológicas, estocásticas o ajenas al estudio. Como se sugiere que las comparaciones de los valores de riqueza específica se hagan considerando un mismo esfuerzo, comúnmente se usaba como referencia aquella curva que tuviese el menor esfuerzo, se trazaba una línea vertical (real o imaginaria) al final de la curva, y se comparaban los valores del número acumulado de especies de cada curva a ese nivel. La desventaja de hacer comparaciones de este tipo es que todos los valores estimados que estuviesen a la derecha de esa línea vertical, trazada a partir de la muestra con menor esfuerzo, eran ignorados, lo que en el fondo representaba que ese trabajo de campo y esfuerzo no era valorado. Como alternativa para considerar el esfuerzo de muestreo en cada ensamble y valorarlo, Colwell y colaboradores (2012) elaboraron una propuesta que permite extrapolar, mediante métodos no paramétricos, las curvas de acumulación más allá del esfuerzo de muestreo invertido en el estudio y en el que también se incluyen a los intervalos de confianza y a la desviación estándar, como medida de variación, lo cual resulta útil para la etapa final (ver más adelante) a la hora de comparar los valores calculados.

Para extrapolar las curvas de acumulación, ahora como referencia se puede tomar al ensamblaje con el mayor esfuerzo de muestreo y las comparaciones



se harían a ese nivel de esfuerzo. No obstante, Colwell y colaboradores (2012) advierten que no es recomendable extrapolar más allá de dos o tres veces el esfuerzo de muestreo del ensamblaje original, con el propósito de que los resultados se consideren razonablemente confiables y los intervalos de confianza no se amplíen de manera exagerada.

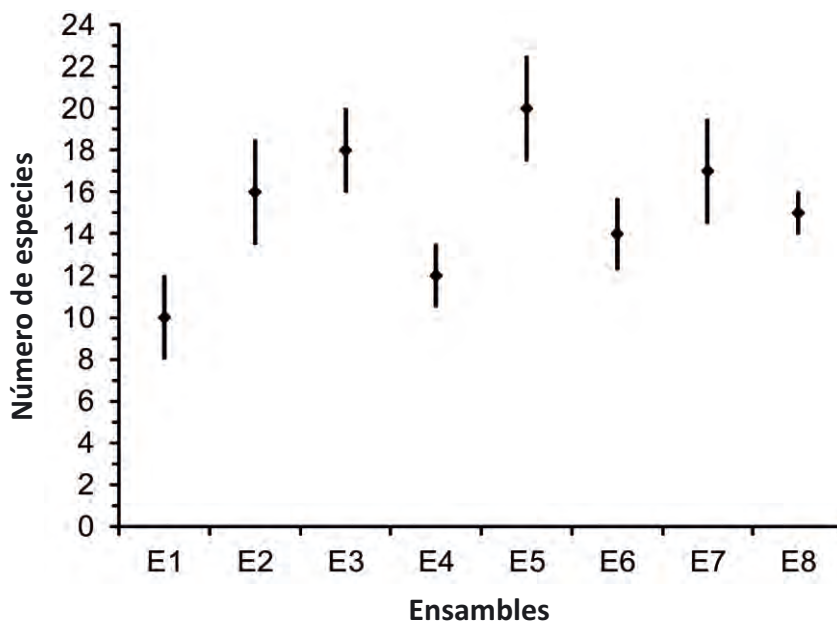
En el mismo programa (EstimateS v. 9.1) que se usó para estimar las curvas se pueden extrapolar las curvas de acumulación de especies. En el paso 2, cuando al seleccionar Diversity Settings en el menú Diversity se despliega la ventana con las condiciones bajo la que se generará la curva de acumulación, hay una opción para extrapolar las curvas. Ahí, por ejemplo, se selecciona *Extrapolate rarefaction curves* y *Extrapolate to a total of \_\_ individuals*, donde es posible definir hasta qué número de individuos se desea hacer la extrapolación. El procedimiento que sigue es el mismo que se hizo para generar las curvas.

Las gráficas, ahora con la extrapolación de por medio en aquellos ensamblajes que así lo ameriten, pueden ser útiles para atender la recomendación de hacer las comparaciones tomando como referencia un mismo esfuerzo de muestreo. En la Fig. 5.5b se muestra un ejemplo de ello y se señala, con una línea punteada después del círculo negro de la curva correspondiente al ensamblaje B, el comportamiento de la estimación (extrapolación) más allá del esfuerzo original de muestreo (350 individuos). La zona gris hacia el final de la curva indica el comportamiento de los intervalos de confianza extrapolados, nótese que se abren ligeramente, lo cual es común en el proceso de extrapolación.

### **Cálculo de intervalos de confianza al 84%**

Para completar el proceso que nos permita hacer una comparación más robusta de los valores de riqueza estimados, incluso de valores generados mediante la extrapolación, MacGregor y Payton (2013) sugieren usar intervalos de confianza al 84%, en lugar de los intervalos de confianza al 95% que normalmente se calculan en los programas de cómputo que elaboran curvas de acumulación. La ventaja de usar intervalos de confianza al 84% es que mimetizan de manera robusta pruebas estadísticas con un  $\alpha=0.05$  y por lo tanto determinan si existe diferencia o no dependiendo de si los intervalos se traslapan.

Para calcular los intervalos de confianza al 84% a partir de los resultados que se generaron con EstimateS, los valores que servirán son los relacionados con la desviación estándar de las especies estimadas ( $S[est]SD$ , columna 5). El valor que se indica de la desviación estandar debe multiplicarse por 1.372, de acuerdo con MacGregor y Payton (2013) y el resultado que se genere debe ser sumado y restado al valor que indica el número estimado especies ( $S[est]$ , columna 2,) para generar el intervalo superior y el intervalo inferior, respectivamente. Esto puede calcularse para cada uno de los valores estimados de la curva y posteriormente graficarlos, para observar el comportamiento de las curvas y al mismo tiempo compararlas a lo largo de toda su trayectoria. Otra alternativa es calcular los intervalos de confianza solo con los valores finales de la curva y graficarlos como se muestra en la Fig. 5.6. Esta opción resulta útil cuando son varios los ensamblajes que se pretenden comparar y colocar muchas curvas con sus respectivos intervalos de confianza podría resultar en una figura saturada.



**Figura 5.6.** Comparación de la riqueza de especies de ocho ensamblajes. Se muestran los valores calculados de riqueza (rombos) y sus intervalos de confianza superior e inferior al 84% (barras de error).

Como se mencionó previamente, los valores calculados y graficados pueden ser los resultantes de la extrapolación de cada ensamblaje, para que las comparaciones se hagan bajo un mismo esfuerzo. Adicionalmente, gráficos de este tipo pueden ayudar a mostrar tendencias si los valores calculados se arreglan de mayor a menor (o viceversa), en función de algún factor como el nivel de disturbio, la altitud o el tiempo de recuperación de un bosque por ejemplo, con lo cual podría ilustrarse también los niveles de variación de los valores calculados.

### **Consideraciones finales**

A pesar de su simplicidad y su amplio uso como medida general de biodiversidad, la riqueza de especies es un parámetro con propiedades complejas, como su dependencia del tipo y esfuerzo de muestreo invertido. En este capítulo se han descrito brevemente algunos métodos útiles para una primera aproximación al conocimiento y comparación de la riqueza de especies entre comunidades ecológicas. Sin embargo, estos métodos están en constante análisis, prueba y proceso de mejoría, y se sugiere hacer una revisión profunda de ellos para seleccionar los que mejor resuelvan las preguntas biológicas de interés. Por ejemplo, hay múltiples opciones metodológicas para tratar de corregir los sesgos en la estimación de la riqueza de especies, y nuevas propuestas como la rarefacción basada en cobertura de la muestra, que permite comparar la riqueza de las comunidades estandarizándolas a un mismo nivel de completitud del muestreo. No hay un método único que resulte el más adecuado para distintos contextos, sino una gama de posibilidades entre las que se pueden elegir alternativas con base en la revisión del propio método, los objetivos de estudio y las características ecológicas del grupo biológico de interés.

## BIBLIOGRAFÍA

Begon, M., C.R. Townsend y J.L. Harper. 2006. *Ecology: from individuals to ecosystems*, 4a. ed. Blackwell Publishing. Oxford.

Buckland, S.T., A.C. Studeny, A.E. Magurran y S.E. Newton. 2011. Biodiversity monitoring: the relevance of detectability. Pp. 25-36. En: Magurran, E.A. y B.J. McGill (eds.) 2011. *Biological diversity frontiers in measuring and assessment*. Oxford University Press. New York.

Chao, A. y L. Jost. 2012. Coverage-based rarefaction and extrapolation: standardizing samples by completeness rather than size. *Ecology* 93:2533-2547.

Chao, A. y T.J. Shen. 2010. Program SPADE: species prediction and diversity estimation. Program and user's guide. CARE, Hsin-Chu, Taiwan. <http://chao.stat.nthu.edu.tw/softwareCE.html>

Colwell, R.K. 2013. *EstimateS: statistical estimation of species richness and shared species from samples*. Versión 9.1 Guía de usuario y aplicaciones en <http://purl.oclc.org/estimates>.

Colwell, R.K. y J.E. Elsensohn. 2014. EstimateS turns 20: statistical estimation of species richness and shared species from samples, with non-parametric extrapolation. *Ecography* 37:609-613.

Colwell, R.K., A. Chao, N.J. Gotelli, S. Lin, C.X. Mao, R.L. Chazdon y J.T. Longino. 2012. Models and estimators linking individual-based and sample-based rarefaction, extrapolation, and comparison of assemblages. *Journal of Plant Ecology* 5:3-21.

Fauth, J. E., J. Bernardo, M. Camara, W. J. Resetarits, Jr., J. Van Buskirk y S. A. McCollum. 1996. Simplifying the jargon of community ecology: a conceptual approach. *The American Naturalist* 147:282-286.

Gotelli, N.J. y Colwell, R.K. 2001. Quantifying biodiversity: procedures and pitfalls in the measurement and comparison of species richness. *Ecology Letters* 4:379-391.

Halffter, G., C.E. Moreno y E.O. Pineda. 2001. *Manual para evaluación de la biodiversidad en Reservas de la Biósfera*. MT Manuales y Tesis SEA 2.

Hsieh, T. C., K. Ma y A. Chao. 2013. iNEXT online: interpolation and extrapolation (Version 1.2.0) [Software]. Disponible en: <http://chao.stat.nthu.edu.tw/inext/>

Hubbell, S. 2001. *The unified neutral theory of biodiversity and biogeography*. Princeton University Press. Princeton, New Jersey.

MacGregor, I. y M.E. Payton. 2013. Contrasting diversity values: statistical inferences based on overlapping confidence intervals. *PLoS ONE* 8: e56794. doi:10.1371/journal.pone.0056794

Maclaurin, J. y K. Sterelny. 2008. *What is biodiversity?* The University of Chicago Press. Chicago.

Magurran, E.A. 2004. *Measuring biological diversity*. Blackwell Publishing. London.

Magurran, E.A. y B.J. McGill (eds.) 2011. *Biological diversity frontiers in measuring and assessment*. Oxford University Press. New York.

Moreno, C. E. 2001. *Métodos para medir la biodiversidad*. M&T-Manuales y Tesis SEA, vol. 1. Zaragoza.

Pineda-López, R. y J.R. Verdú F. 2013. *Cuaderno de prácticas. Medición de la biodiversidad: diversidades alfa, beta y gamma*. Universidad Autónoma de Querétaro, Universidad de Alicante. Editorial Universitaria, Colección Académica, Serie Nodos. Querétaro.

Podani, J. 2006. With a machete through the jungle: some thoughts on community diversity. *Acta Biotheoretica* 54:125-131.

Soberón, J.M. y J.B. Llorente. 1993. 1993. The use of species accumulation functions for the prediction of species richness. *Conservation Biology* 7:480-488.

Tyre, A.J., B. Tenhumberg, A.A. Field, D. Niejalke, K. Parris y H. Possingham. 2003. Improving precision and reduced bias in biological survey: estimating false-negative error rates. *Ecological Applications* 13:1790-1801.



# capítulo seis

## Análisis de viabilidad poblacional aplicada al manejo de fauna silvestre

*Salvador Mandujano*

### INTRODUCCIÓN

Los análisis de viabilidad poblacional mejor conocidos como PVA<sup>1</sup> por sus siglas en inglés *Population Viability Analysis*, son procedimientos de evaluación de los riesgos de una población y/o especie de uso frecuente en biología de la conservación (Beissinger y McCullogh 2002, Morris y Doak 2002). Tradicionalmente se define como el proceso que determina la probabilidad de que una población se extinga dentro de un determinado número de años. Más recientemente, los PVA han sido descritos como una integración entre algunas disciplinas de la ecología con la estadística, los cuales reúnen características de las especies y la variabilidad del medio ambiente para evaluar la salud o viabilidad de la población y hacer un pronóstico o predicción del riesgo de extinción. En este sentido, cada PVA es desarrollado de forma individual para una población o especie, y por lo tanto cada PVA es único. El objetivo principal es asegurar que la población de una especie sea auto-sostenible en el largo plazo. Entonces, los PVA se utilizan para comparar opciones de manejo y evaluar los actuales esfuerzos de recuperación. El presente capítulo es una introducción a los análisis de viabilidad poblacional tema central en el campo de la biología de la conservación y en el manejo de la fauna silvestre.

---

1. Aunque en sentido estricto el acrónimo en español debería ser AVP, en este trabajo se mantendrá PVA pues es como regularmente la gente conoce este tipo de procedimientos.

## Vulnerabilidad a la extinción

La cacería incontrolada, el tráfico ilegal, la destrucción del hábitat, la introducción de especies exóticas, los parásitos y las enfermedades, son las causas principales por las que muchas poblaciones y/o especies de fauna silvestre se encuentran en peligro. La extinción es un proceso natural pero nunca como ahora un inmenso número de especies están amenazadas por las actividades humanas. En este sentido la ecología de poblaciones también está aportando bases conceptuales y metodológicas para la conservación biológica.

De acuerdo a Primack *et al.* (1998), las especies categorizadas como “raras” son más vulnerables que las especies “comunes”. Lo paradójico es que la rareza es la condición prevaleciente en la naturaleza. Es decir, solo algunas especies tienden a ser muy abundantes mientras que la mayoría presentan poblaciones pequeñas. La condición de rareza es el resultado de factores naturales y factores de origen antrópico. Las siguientes características pueden definir a una especie como rara:

- Especies con distribuciones geográficas muy restringidas
- Especies con poblaciones naturalmente pequeñas
- Especies en las cuales el tamaño de las poblaciones está disminuyendo
- Especies con baja densidad poblacional
- Especies de gran tamaño corporal que requieren áreas extensas para sobrevivir
- Especies que no tienen dispersión efectiva
- Especies migratorias estacionales
- Especies con escasa variabilidad genética
- Especies características de ecosistemas antiguos
- Especies con distribuciones agregadas
- Especies con necesidades de nicho muy especializado
- Especies que evolucionaron en aislamiento
- Especies cazadas o cosechadas por la gente
- Especies que están ampliando su área de distribución y están colonizando nuevos ambientes



Es importante considerar que no hay una sola especie que tenga todas estas características de manera simultánea. Es decir, la rareza y vulnerabilidad podría ser la consecuencia de unos pocos de estos factores combinados. Esto implica que las necesidades de conservación serán distintas entre especies, e incluso entre poblaciones de una misma especie.

Diferentes organizaciones clasifican a las especies según su estado de conservación. Por ejemplo, la IUCN tiene diez categorías: extinta, extinta en la naturaleza, en peligro crítico, en peligro, vulnerable, dependiente de la conservación, con riesgo de amenaza, de menor preocupación, insuficientemente estudiada y no evaluada. Hay otras clasificaciones y en algunos países se tienen sus definiciones propias, por ejemplo en México la NOM059 define a cada una de las especies. Pero en general las especies enlistadas en los Libros Rojos de la IUCN tienen amplia aceptación. Sin embargo, para un gran número de especies y poblaciones incluso se carece de la información básica para saber su estado de conservación.

Consecuentemente, el análisis poblacional de este tipo de especies se centra en las características que hacen vulnerable a una especie debido a que son más proclives de que sus poblaciones disminuyan en número y lleguen a estar en peligro de extinción local o total. Esto es lo que se conoce como el paradigma de las poblaciones pequeñas y en declinación debido al efecto vórtice o *vortex*.

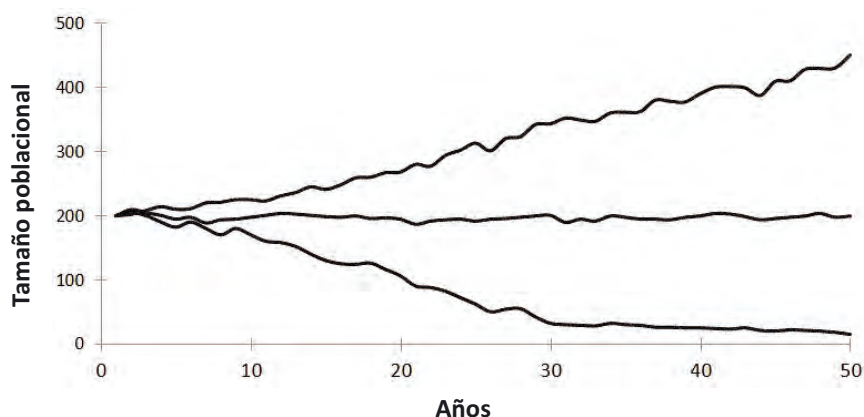
### **Paradigma de las poblaciones pequeñas y en decremento**

El paradigma de las poblaciones con abundancia baja y aquellas en decrecimiento, indica que conforme la abundancia disminuye la probabilidad de extinción ( $P_e$ ) aumenta debido a factores externos (cacería, tráfico ilegal, fragmentación de hábitat e introducción de especies exóticas) y factores intrínsecos (estocasticidad demográfica, efecto Allee y pérdida de variabilidad genética) (Fig. 6.1). Lo anterior es conocido como efecto *vortex* y es central en la conservación biológica a nivel de poblaciones y/o especies. Los análisis de viabilidad poblacional son procesos o herramientas que permiten estimar el tamaño mínimo viable de la población (MVP) necesarios para disminuir el riesgo de

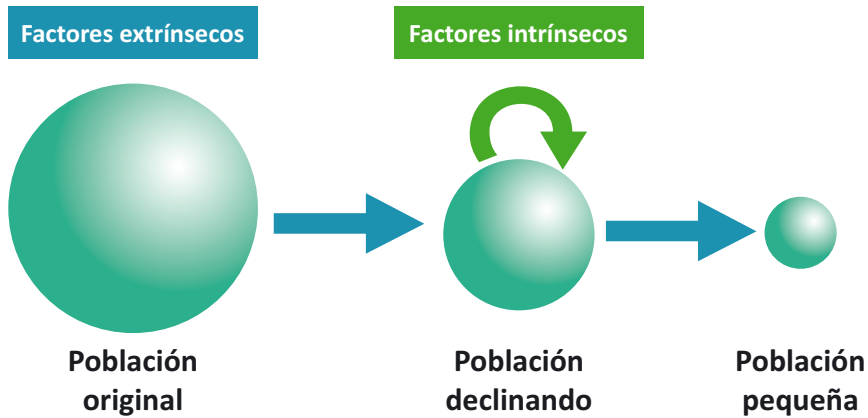
extinción, y también para definir tasas de cosecha bajo simulando diferentes escenarios posibles (Akçakaya 2002). La ecología de metapoblaciones es otro de los paradigmas nuevos el cual estima la persistencia a nivel regional en función de las extinciones locales y colonización de parches vacíos. Esta teoría está siendo muy aplicada para especies fragmentadas por actividad humana. Una de las relaciones más consistentes que se ha documentado para muchas especies animales por todos lados del mundo, es que conforme el tamaño de parche es mayor y el aislamiento disminuye, hay mayor probabilidad de que ese parche esté ocupado. Los modelos de funciones de incidencia (IFM) se basan en modelar la ocupación en función de la extinción local explicada principalmente por el tamaño de los parches, y la colonización explicada por la conectividad de los parches.

### Efecto vórtice

Brevemente, el efecto *vortex* consiste en que una población original disminuye debido a factores extrínsecos como la cacería, tráfico, destrucción de hábitat, e introducción de especies exóticas, entre los principales, los cuales disminuyen la población original. Llegado cierto tamaño poblacional, los factores intrínsecos como la estocasticidad demográfica, estocasticidad ambiental,



**Figura 6.1.** La abundancia (N) de una población cambia a través del tiempo. Puede crecer, mantenerse o disminuir. En este último caso, si la abundancia baja a un punto crítico surge el peligro de erradicación local lo cual requiere de alguna acción de manejo para recuperarla. Los PVA sirven para este fin de conservación.



**Figura 6.2.** El efecto vórtice o *vortex* es un proceso donde se explica la disminución progresiva en la abundancia de una población debido a factores extrínsecos e intrínsecos lo cual puede llevar a la población a un punto de riesgo.

efecto Allee, pérdida de variabilidad genética, alteración de estructuras sociales y ciclos hormonales, entre los principales, tienen un papel crucial que puede acelerar la disminución de la abundancia hasta llegar a un punto donde la población se encuentra en alto riesgo o probabilidad de extinción (Fig. 6.2).

Metodológicamente, este efecto *vortex* se ha abordado a través de los análisis de viabilidad poblacional que sirven, entre varios aspectos, para estimar la probabilidad de extinción local ( $P_e$ ), el tamaño mínimo viable de la población (MVP), la superficie mínima crítica para sostener MVP, el tamaño efectivo poblacional ( $N_e$ ), y el mínimo número de poblaciones para persistir a nivel metapoblacional. Es decir, los PVA son herramientas muy útiles para la conservación y el manejo de la fauna silvestre.

En particular, la estimación del tamaño poblacional mínimo viable es un tema muy debatido en el ambiente de la conservación y, hasta el momento, no hay un consenso respecto a cuál es este número y cómo calcularlo. En biología de la conservación existe lo que se conoce como la regla 50/500 de Franklin la cual se basa en tamaños efectivos de población ( $N_e$ ) y no en  $N$ . Esta regla tiene su base en estudios de genética y se ha demostrado que es muy útil para muchas

especies. Sin embargo, no hay un consenso absoluto y para algunas especies se ha propuesto que el número de individuos necesario para que una población sea viable está en el orden de los miles o cientos de miles. En otros casos se ha considerado, de manera muy general, que el mínimo debe ser de 500 a 5000 individuos. Pero esto varía dependiendo de la historia de vida de cada especie.

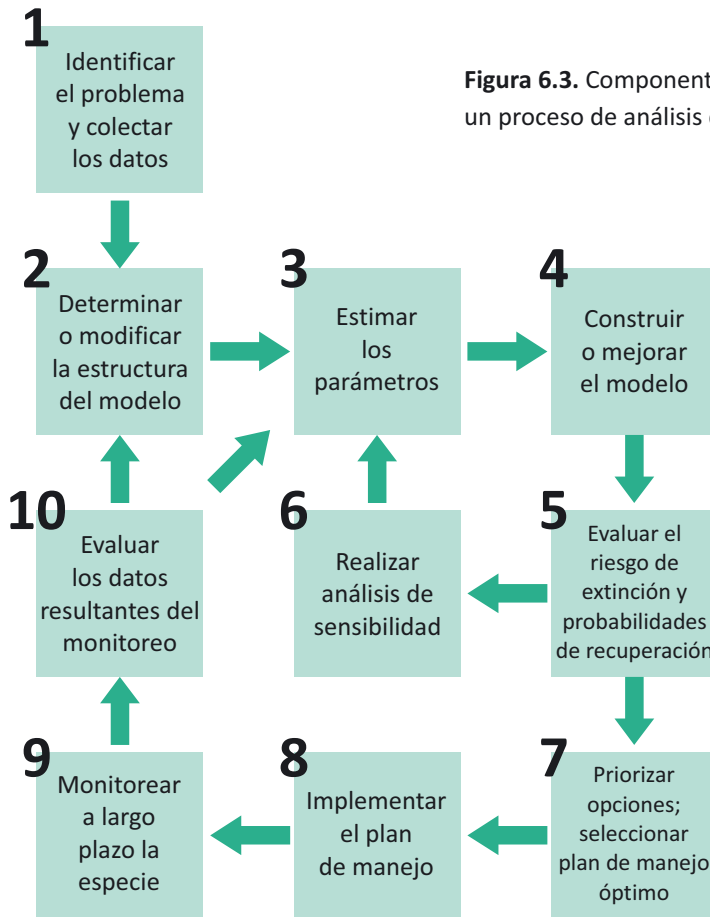
### **Conceptos y definiciones de los PVA**

El análisis de viabilidad poblacional es un proceso de evaluación de riesgo o probabilidad de extinción ( $P_e$ ) usado cada vez con mayor frecuencia en la biología de la conservación. Tres definiciones de PVA podrían ser:

- “un proceso de identificación de las amenazas que enfrentan las especies y la evaluación de la probabilidad de que se mantendrá durante un tiempo determinado en el futuro”,
- “un proceso en el cual se evalúan datos y modelos de una población para anticipar la probabilidad de que esa población persista en el futuro por algún tiempo definido”,
- bien como “el proceso que determina la probabilidad de que una población se extinga dentro de un tiempo determinado, es decir la estimación de  $P_e$ ”.

Es decir, los PVA son procedimientos (Fig. 6.3). De manera general, en los PVA se construyen modelos matemáticos que evalúan los factores que pueden tener influencia sobre el declive de una determinada población. Aparte de la propia evaluación de los factores que provocan el declive, un PVA proporciona información sobre cómo el manejo puede revertir la tendencia negativa de la población actuando sobre los factores que la provocan. Los PVA están orientados tanto a la conservación como al manejo de especies y/o poblaciones raras, amenazadas y también otras que son susceptibles de aprovechamiento. Es importante destacar que cada PVA se desarrolla individualmente para una población concreta y, por lo tanto, cada PVA es único.

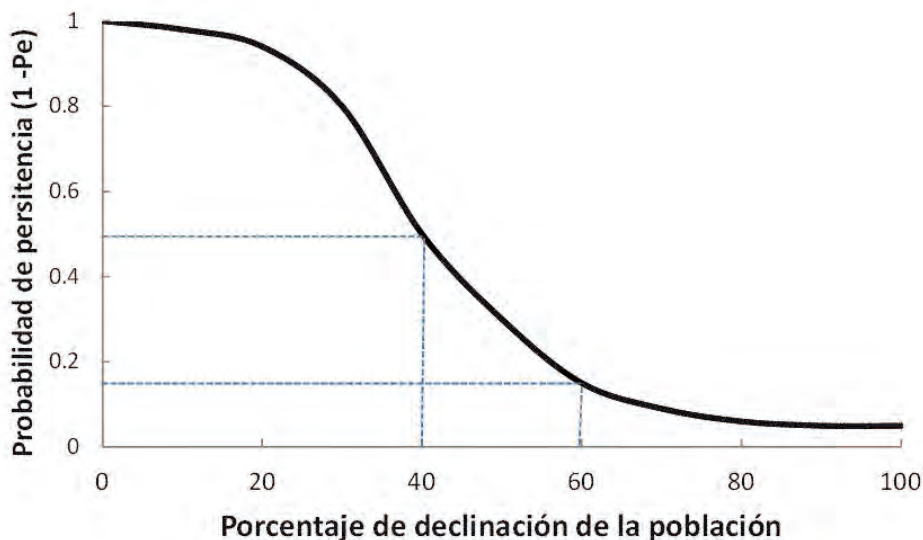
Dentro de este contexto, los PVA se pueden utilizar para hacer frente a tres aspectos de la gestión de especies amenazadas: 1) Planificación de la investigación y recopilación de datos, 2) evaluación de la vulnerabilidad, y 3) prede-



**Figura 6.3.** Componentes o pasos generales de un proceso de análisis de viabilidad poblacional.

cir la respuesta a la reintroducción de especies, cría en cautividad, el control de la quema prescrita, la hierba, la rehabilitación del hábitat, o diseños diferentes para las reservas naturales o las redes de corredor.

En general, los PVA involucran la simulación o el análisis de una población con el fin de hacer una proyección hacia el futuro de la tendencia de la misma, o bien estimar la probabilidad de extinción ( $P_e$ ) o de persistencia ( $1 - P_e$ ) esa población. Sin embargo, en sí misma la definición y criterios de lo que es viabilidad, persistencia y extinción, son arbitrarios. Por ejemplo, en ocasiones viabilidad se refiere como “asegurar el 95% de probabilidad de que la población sobreviva por lo menos 100 años”. Lo importante a comprender es que conforme el cambio en la abundancia es menor, la persistencia aumenta (Fig. 6.4).



**Figura 6.4.** Cambio en la probabilidad de extinción ( $P_e$ ) o de persistencia ( $1 - P_e$ ) conforme el porcentaje de decline de la población cambia. En este ejemplo, cuando el porcentaje de declinación es menor (por ejemplo 40%) la probabilidad persistencia es de 0.50; pero si el decline es mayor (60%) la persistencia disminuye a un 0.15. Un valor de persistencia de 1.0 implica una probabilidad de extinción igual a cero.

Es relevante destacar que una de las funciones principales de los PVA no es en sí mismo obtener un solo valor de  $P_e$  de la población en cuestión, sino simular la tendencia de la misma y los posibles diferentes valores de  $P_e$  bajo diferentes escenarios y comparar luego estos valores para evaluar el riesgo y posibles medidas para mitigarlo. Estos escenarios se construyen introduciendo variaciones sobre los diferentes parámetros utilizados dependiendo los modelos que se empleen. Por ejemplo, algunos PVA están basados en modelos poblacionales sencillos como el exponencial y logístico ya sean determinísticos o estocásticos. Otros modelos incorporan información más detallada como es el caso de los llamados modelos espacialmente explícitos en los cuales no solo se introducen datos demográficos de la población, sino además se incorporan datos del paisaje, como el número, tamaño, aislamiento de los parches, dispersión de los animales, entre otros. Estos últimos modelos pueden resultar más complejos y realistas.

### Procedimiento general de un PVA

Una herramienta útil en estos esfuerzos es el análisis de viabilidad de las poblaciones (PVA), en el cual la información sobre la biología y ecología de la especie es utilizada para simular tendencias poblacionales en diferentes escenarios (Reed *et al.* 2002). Un enfoque de PVA puede ser utilizado principalmente de tres maneras. Primero, para estimar la población mínima viable, frecuentemente definida como la población más pequeña con 95% a 99% de probabilidad de persistencia en un periodo dado (por ejemplo 100 años). La MPV puede ser estimada por análisis múltiples variando las poblaciones iniciales o la capacidad de carga.

Segundo, es posible realizar una prueba de sensibilidad para determinar cuáles parámetros tienen mayor influencia en la sobrevivencia de la población a largo plazo. En el caso de las especies de cuya biología se tiene un conocimiento pobre, las pruebas de sensibilidad pueden ayudar a establecer prioridades en los esfuerzos de investigación. Finalmente, el uso más común de un PVA es la simulación de escenarios diferentes de amenazas antropogénicas, protección y manejo. Estos ejercicios han probado ser útiles para estimar las prioridades de conservación y manejo para poblaciones silvestres y cautivas de varios taxa. Es importante notar que incluso en casos en los que no es suficiente la información sobre la biología de la especie y que, por lo tanto, tiene que ser inferida o especulada con base en el conocimiento disponible, un PVA puede proporcionar ideas útiles para la conservación pues indica las tendencias poblacionales en un rango plausible de escenarios e identifica los parámetros importantes para acciones de manejo e investigación adicional (Brook *et al.* 2000, Burgman y Possingham 2000).

Finalmente, existen diferentes paquetes y programas para realizar PVAs con diferentes enfoques. El más conocido y gratuito es Vortex (<http://www.vortex9.org/vortex.html>), ALEX (Possingham y Davies 1995), Metapop (<http://webs.uvigo.es/anepfi/metapop/>), RAMAS (<http://www.ramas.com/>), entre los más conocidos.

## BIBLIOGRAFÍA

Akçakaya, H.R. 2002. *RAMAS Metapop: Viability analysis for stage-structured Metapopulations (version 4.0)*. Applied Biomathematics. Setauket, New York.

Beissinger, S.R. y D.R. McCulloch (eds.). 2002. *Population viability analysis*. University of Chicago Press. Chicago, IL.

Brook, B.W., J.J. O'Grady, A.P. Chapman, M.A. Burgman, H.R. Akçakaya y R. Frankham. 2000. Predictive accuracy of population viability analysis in conservation biology. *Nature* 404:385-387.

Burgman, M. y H. Possingham. 2000. Population viability analysis for conservation: the good, the bad and the undescribed. Pp. 97-112. En: Young, A.G. y G.M. Clarke (eds.). *Genetics, demography and viability of fragmented populations*. ambridge University Press. Cambridge, UK.

Morris, W.F. y D.F. Doak. 2002. *Quantitative conservation biology: theory and practice of population viability analysis*. Sinauer Associates Inc. Sunderland, MA.

Possingham, H.P. y I. Davies. 1995. ALEX: a model for the viability analysis of spatially structured populations. *Biological Conservation* 73:143-150.

Primack, R.B., R. Rozzi, P. Feinsinger, R. Dirzo y F. Massardo. 1998. *Fundamentos de Conservación Biológica: Perspectivas Latinoamericanas*. Fondo de Cultura Económica. México.

Reed, J.M., L.S. Mills, J.B. Dunning, E.S. Menges, K.S. Mckelvey, R. Frye, S.R. Beissinger, M. Anstett y P. Miller. 2002. Emerging issues in population viability analysis. *Conservation Biology* 16:7-19.



# capítulo siete

## Conceptos y modelos para estimar la capacidad de carga del hábitat para ungulados

*Salvador Mandujano y Sonia Gallina*

### INTRODUCCIÓN

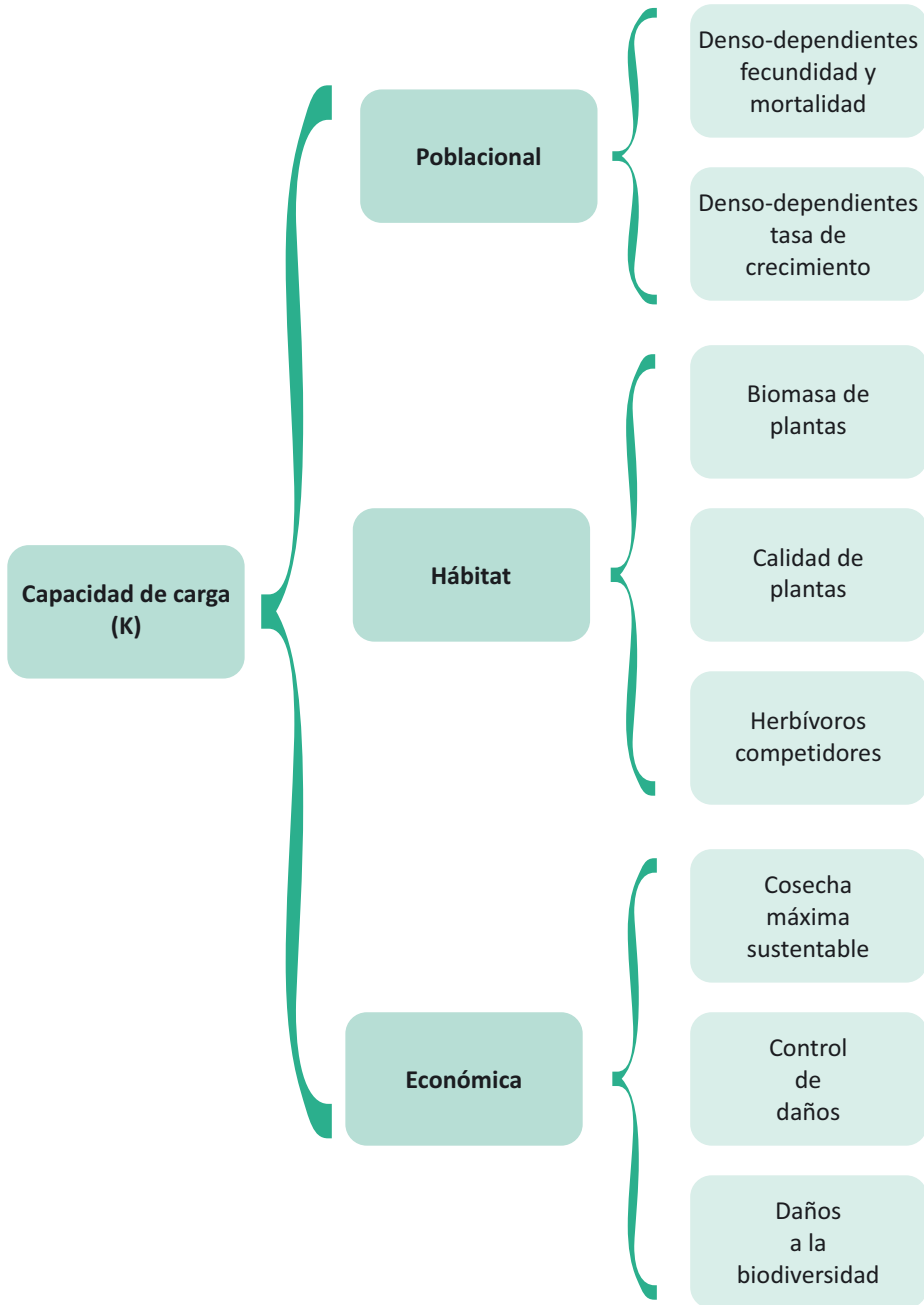
El concepto de capacidad de carga o sustento ( $K$ ) es frecuentemente empleado en el manejo de la fauna silvestre. La definición más común es: “el número máximo de animales de una población que pueden ser sostenidos en función de los recursos disponibles y sin deterioro del hábitat” (Caughley y Sinclair 1994). Sin embargo, este concepto puede tener una variedad de significados que pueden resultar confusos, dependiendo de los objetivos y del enfoque (Miller y Wentworth 2000). Desde una perspectiva del uso sustentable de la fauna silvestre y doméstica, es crucial tener una clara definición de este concepto pues esto guiará el enfoque y los objetivos de manejo. Por ejemplo, desde un enfoque poblacional, la capacidad de carga se refiere “al punto de equilibrio entre las tasas de nacimiento y de mortalidad”, es decir cuando el crecimiento poblacional se estabiliza (Gotelli 1998). Sin embargo, en la práctica difícilmente se tendrán estos datos demográficos tan precisos a lo largo de muchos años. En este sentido, de manera práctica se ha asumido que el número de animales que un hábitat puede sustentar estará en función de la disponibilidad de recursos, principalmente la biomasa y calidad de las plantas. Como consecuencia, ha sido tradicional en el manejo del ganado doméstico y de grandes herbívoros silvestres la estimación de  $K$  con base en los recursos que consumen (McCullough 1987). Por otro lado,  $K$  puede ser definida como “la estimación de la población en la cual la tasa de cosecha sustentable podría ser máxima” (Robinson y Bennett 1999, Mandujano 2007).

Desde otra perspectiva,  $K$  puede ser referida “al número de animales que pueden aceptarse antes de que causen algún conflicto con intereses humanos como por ejemplo daños a la agricultura y la ganadería” (Fulbright y Ortega-S. 2007). Es decir, aunque ampliamente aceptado en la práctica, el concepto de capacidad de carga es muy variado y esto se refleja en los métodos empleados para su estimación. En consecuencia, el término capacidad de carga se puede definir desde al menos tres perspectivas: de la ecología de poblaciones, del hábitat y de la cosecha (Fig. 7.1).

En este trabajo se presenta una revisión de algunos de los diferentes conceptos y métodos para estimar la capacidad de carga con la finalidad de poner en perspectiva las diferentes aproximaciones desde un enfoque de hábitat y su importancia en términos de manejo. Asimismo, la revisión se enfoca en los métodos empleados para grandes mamíferos herbívoros, principalmente ungulados silvestres y domésticos, donde se han desarrollado diferentes técnicas de análisis. Se espera que con este trabajo se estimule un mayor número de investigaciones para aplicar y desarrollar técnicas específicas de estimación de  $K$  para problemas y especies particulares. Aunque en sentido estricto  $K$  (*carrying capacity*) debería ser traducido al español como “capacidad de sustento”, en esta revisión se mantendrá el uso de “capacidad de carga” debido a su amplia aceptación.

### **Importancia de la estimación de $K$**

La capacidad de carga no es un parámetro sencillo de definir y, como se mostrará en las siguientes secciones, su estimación requiere de información demográfica, de biomasa, de la calidad de las plantas, así como de otros datos los cuales no siempre están disponibles para la especie de interés, para el sitio de estudio o de la población en particular. Además, no es un parámetro estático sino que es dinámico, al estar directamente relacionado con las condiciones ambientales del sitio. Sin embargo,  $K$  es un parámetro muy útil en el manejo de la fauna silvestre, en particular nos sirve para contestar al menos las siguientes preguntas:



**Figura 7.1.** Clasificación de las tres diferentes aproximaciones y métodos para estimar la capacidad de carga ( $K$ ), aunque en este capítulo se trata en extenso lo relacionado con la capacidad de carga del hábitat.

### ***¿Qué tan alta o baja es la densidad poblacional estimada en un sitio?***

Habitualmente la respuesta a esta pregunta se busca comparando la estimación obtenida en el sitio de estudio contra la reportada en otros lugares, preferentemente en el mismo tipo de hábitat, y a partir de esta comparación se concluye que la densidad en el sitio de estudio es alta o baja. Por ejemplo, si en el sitio de estudio la densidad estimada es de 2 ind/km<sup>2</sup> y se compara esta con la reportada en otro sitio con 10 ind/km<sup>2</sup>, se concluye que en el primero la densidad es baja y se trata de discutir las posibles causas de esto. Como una primera aproximación estas comparaciones resultan útiles sobre todo cuando se hace entre tipos de hábitats similares y con metodologías similares. Sin embargo, y como se mostrará en las secciones siguientes, una respuesta más correcta a esta pregunta es saber si la densidad es adecuada respecto al potencial de sustento del sitio, es decir a las características ambientales del mismo. Esto es, si en nuestro sitio tenemos 2 ind/km<sup>2</sup> la pregunta es si este número está cercano, arriba o debajo de la capacidad de carga del lugar. Por ejemplo, si supiéramos (empleando alguno de los métodos que se describen en este capítulo) que la *K* del sitio es 2.5 ind/km<sup>2</sup> entonces nuestra visión inicial cambia y tendríamos que concluir que la densidad es alta en ese sitio no obstante que comparado con otros, sea más baja.

### ***¿Qué tan cercana está la densidad de la capacidad de carga del sitio?***

En términos ecológicos y de manejo, hacerse esta pregunta es más adecuado pues se está evaluando la densidad en función al potencial del sitio. Por ejemplo, si la estimación de la densidad es de 2 ind/km<sup>2</sup> y la capacidad de carga del sitio es de 1.2 ind/km<sup>2</sup>, estamos ante una situación aparentemente paradójica. Es decir, la densidad en sí podría ser baja en términos absolutos, pero al compararla contra la *K* del sitio resulta que la densidad está muy por encima de la capacidad de carga. Es decir, hay una sobrepoblación en relación con el hábitat. Un ejemplo distinto es si en ese mismo sitio la *K* fuera de 14.3 ind/km<sup>2</sup> en este caso la densidad estimada estaría muy por debajo de la capacidad de carga del sitio.

### ***¿Cuántos individuos se pueden cosechar sin afectar a la población?***

Quizá esta es la principal pregunta que se hace un manejador de fauna silvestre. Es una pregunta con interés económico pues se busca un beneficio del manejo de la población en cuestión, pero también es una pregunta de conservación pues se está buscando que ese aprovechamiento sea compatible con la viabilidad de la población a largo plazo. No es una respuesta sencilla y existen muchas aproximaciones las cuales están más allá del objetivo del presente capítulo. Lo que aquí interesa puntualizar y resaltar es que la respuesta a esta pregunta requiere de tener una estimación confiable de  $K$  y de otros parámetros demográficos (estructura de edades, proporción de sexos, tasa de crecimiento, entre otros) para el sitio de manejo. En la sección de modelos de capacidad de carga económica se revisarán algunos que consideran  $K$  para estimar la cosecha máxima sostenible (*MSY* por sus siglas en inglés *Maximum Yield Sustainable* o también *Optimal Yield Sustainable*).

### ***¿Se puede aumentar la capacidad de carga de un sitio?***

Esta también es una pregunta frecuente en el ámbito del manejo de la fauna silvestre. Habitualmente esta pregunta surge cuando la densidad estimada resulta baja. Antes de llevar a cabo cualquier acción de manejo, por ejemplo el mejoramiento del hábitat, ya sea incrementando la disponibilidad de alimento y/o agua, y en muchos otros casos desafortunadamente, el control de depredadores, se debe primero evaluar la calidad del hábitat y otras condiciones ambientales para detectar cuáles son los factores del hábitat, antrópicos o de otro tipo, que están determinando una baja densidad y/o bajo potencial de sustento del sitio. Para este caso los procedimientos de evaluación de hábitat (*HEP* por sus siglas en inglés *Habitat Evaluation Procedures*) proveen un acercamiento adecuado ya que consideran distintas variables que pueden estar afectando la población de interés.

### **Capacidad de carga desde una perspectiva del hábitat**

La definición y estimación de la capacidad de carga desde un enfoque del hábitat, ha sido la más empleada en el manejo de fauna, principalmente para ungulados silvestres y domésticos. Desde una perspectiva de uso y

disponibilidad de hábitat, la capacidad de carga puede ser definida como “el número de animales saludables que pueden ser mantenidos en el hábitat, en una unidad dada de superficie”. Un área determinada puede soportar solamente un número determinado de animales y el término capacidad de carga ha sido utilizado para representar esta limitación impuesta por el medio. Se refiere “al máximo número de individuos de una población que puede ser sostenido a largo plazo sin que exista un deterioro del hábitat”. Además, en el caso de ungulados se ha asumido que  $K$  depende de la cantidad de forraje o alimento disponible y del valor nutricional de las plantas. En el ámbito de la ganadería frecuentemente el concepto de  $K$  es referido como el índice o coeficiente de agostadero donde se estima el número de hectáreas necesarias para sostener una unidad animal (ha/ua), es decir una vaca con su cría durante un año (y de venado). En las siguientes secciones se describen diferentes modelos para estimar la capacidad de carga.

### **Modelo basado en la biomasa de plantas**

Los modelos de capacidad de carga basados en estimaciones de la cantidad de biomasa de plantas y alimento disponible para herbívoros, han sido ampliamente difundidos a partir de los trabajos de Gallina (1993). Para ello se utiliza la técnica de doble muestreo desarrollada por Pechanec y Pickford (1937, adaptada por Gallina 1993) para los bosques templados, y consiste en hacer estimaciones del peso de cada especie de planta (utilizando dinamómetros marca PESOLA de distintas capacidades en gramos) que aparece en el área de muestreo, en círculos de  $1 \text{ m}^2$  y a una altura de 1.80 m, que corresponde a la altura máxima alcanzada por el venado para forrajear. Para ello, en transectos con 10 áreas circulares espaciadas 40 m, se hacen las estimaciones de biomasa disponible y únicamente en dos de los 10 círculos se corta la vegetación herbácea y arbustiva, para luego secar las muestras (3 días a  $100 \text{ }^\circ\text{C}$ ) y determinar el peso seco. Posteriormente se obtiene un factor de corrección que es la relación entre el peso fresco estimado y el obtenido de peso seco para ajustar los valores estimados para cada especie de planta. Esta estimación deberá hacerse primeramente en la época de lluvias que es cuando ocurre la mayor biomasa disponible y aparecen la mayoría de las herbáceas, y también en la época más seca para conocer el cambio en la disponibilidad. De

acuerdo a Gallina (1993), la fórmula para estimar  $K$  (ind/ha) tanto del venado como del ganado es:

$$K = \left( \frac{f \times p}{c \times t} \right)$$

donde:  $f$  = factor de utilización igual 0.60 (que significa que deberá dejarse en pie el 40% de la vegetación) de acuerdo a Avery (1975, citado en Gallina 1993),  $p$  = biomasa disponible como alimento (kg/ha en peso seco),  $c$  = consumo total por el venado igual a 63.56 kg/ind/mes, y  $t$  = tiempo de pastoreo para el venado igual a 12 meses.

**Modelos basados en la disponibilidad de nutrientes y energía metabolizable**  
Recientemente Plata *et al.* (2011a, b) realizaron una revisión y aplicación de diferentes aproximaciones para estimar la capacidad de carga, básicamente a partir de datos de nutrientes y energía metabolizable contenida en las plantas, a partir de trabajos previamente publicados.

Para estimar  $K$  considerando la biomasa total de las plantas se puede emplear la siguiente fórmula:

$$K = 0.35 \times \left( \frac{\sum_{i=1}^n B_i \times F_j}{RD} \right)$$

donde:  $K$  = capacidad de carga del área de estudio (venados/ha),  $B_i$  = biomasa del estrato vegetal- $i$  (gramíneas, herbáceas, arbustivas y arbóreas; kg/ha),  $F_j$  = contenido de los componentes nutritivos del estrato vegetal- $j$  (materia seca materia seca kg, nitrógeno N kg/kg o energía digestible Mcal/kg),  $R$  = requerimiento de los componentes nutritivos de un venado de 60 kg (kg o kcal),  $D$  = tiempo de utilización (días), y 0.35 = eficiencia de utilización del forraje.

Otro modelo que describen Plata *et al.* (2011a, b) es:

$$K_s = \frac{\sum_{i=1}^n (AF_i \times NC_i)}{\{(DI \times t) \times NR\}}$$

donde  $K_s$  = densidad estimada de venados adultos (ind/ha) que un área puede mantener durante una temporada  $S$ ,  $n$  = número de las principales especies de forraje (>1% de la dieta),  $AF_i$  = forraje disponible estimado de las especies- $i$  en kg de materia seca,  $NC_i$  = contenido de nutrientes estimado de la especie- $i$  (en kg/kg materia seca por nitrógeno),  $DI$  = consumo de forraje estimado para un venado adulto (kg de materia seca/día),  $t$  = número de días durante la temporada  $S$ , y  $NR$  = requerimiento estimado de nutrientes ( $N$ ) para un venado adulto (en kg/kg de materia seca) durante  $S$ . De acuerdo a Fulbright y Ortega-S (2007),  $AF_i$  se define como 50% del forraje disponible presente, bajo la premisa de que más de 50% de uso puede resultar en deterioro del hábitat.

### Modelo basado en la presión de pastoreo

Para estimar la capacidad de carga con el método basado en la presión de pastoreo, se estima la disponibilidad ( $D$ ) de  $MS$  (materia seca) total o de cada estrato vegetal por hectárea de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$K_s = \left\{ \frac{\left( \frac{D \times 0.35 \times A \times 100}{T \times PP} \right)}{60} \right\}$$

donde:  $K$  = capacidad de carga (venado/ha),  $D$  = disponibilidad de  $MS$  total o por estrato vegetal (kg/ha), 0.35 = eficiencia de utilización del forraje,  $A$  = área (ha),  $T$  = tiempo (días),  $PP$  = presión de pastoreo (% de  $PV$  o sea peso vivo), y 60 = peso vivo del venado (kg). La presión de pastoreo es igual al factor de consumo proporcional al peso vivo ( $PV$ ) propuesto por Stuth y Sheffield (2001) de 3.5% del  $PV$ , el tiempo ( $T$ ) cambió de acuerdo a la época del año. Para determinar el número de animales por hectárea que se pueden sostener con los diversos estratos vegetales se divide el número de kg de animal entre 60.

### Modelos basados en el metabolismo ecológico

Este método se basa en una estimación del requerimiento energético del venado en vida libre, por una serie de ecuaciones que conforman el metabolismo ecológico ( $ME$ , kcal/día). A diferencia de los métodos anteriores, el modelo de metabolismo ecológico es un método dinámico que cambia el requerimiento energético de acuerdo a la época del año junto con los cambios



de actividad del venado. Para estimar la capacidad de carga en este modelo se divide la energía metabolizable disponible de la biomasa total o de los diversos estratos vegetales entre la sumatoria del requerimiento energético del animal de los meses que corresponden a cada periodo, utilizando la siguiente fórmula:

$$K = \frac{\sum_{1=n} Emf \times A \times 0.35}{\sum_{1=m} MEV_d}$$

donde:  $K$  = capacidad de carga (venados de 60 kg/ha),  $Emf$  = energía metabolizable del forraje de la especie vegetal 1 hasta  $n$  (kcal /ha),  $A$  = área total del predio (ha),  $n$  = estrato,  $m$  = día juliano,  $MEV_d$  = metabolismo ecológico diario de un venado de 60 kg (kcal/día), y 0.35 = eficiencia de utilización del forraje.

En un segundo modelo en esta categoría para estimar la capacidad de carga, se divide la energía metabolizable utilizable a partir de las arbóreas, arbustivas, herbáceas y gramíneas (considerando sus restricciones) entre el requerimiento energético de un animal de un peso y sexo dados durante un periodo- $j$ . El modelo es:

$$K = \left( \frac{EM_u + EM_g}{MEV_p} \right)$$

donde:  $K$  = capacidad de carga (venados/ha),  $EM_u$  = energía metabolizable útil (kcal/kg),  $EM_g$  = energía metabolizable de gramíneas (kcal/kg),  $MEV_p$  = metabolismo en vida libre de un venado durante el periodo- $p$ . Para mayor detalle de este modelo se remite a los trabajos de Plata *et al.* (2011a, b).

### Modelo de manejo combinado de venado y ganado

El modelo “norteño” en los llamados ranchos ganaderos diversificados a la producción, manejo y conservación de la fauna silvestre, es común el manejo de ungulados silvestres (principalmente venado cola blanca) y el ganado doméstico. En estos sitios se pretende no solo calcular la capacidad de carga del hábitat para sostener venados sino además que sea compatible con el aprovechamiento del ganado sin deterioro del hábitat (Ezcurra y Gallina 1980,

Gallina 1993, Villarreal 1999). Aunque esta aproximación se ha desarrollado principalmente en las regiones semi-áridas del norte de México y sur de Estados Unidos (Fulbright y Ortega-S. 2007), y se está extendiendo hacia regiones tropicales del centro del país (Villarreal-Espino Barros 2006). En el caso del manejo de bovinos para producción de carne, es común que se utilice un índice equivalente a la capacidad de carga denominado “*coeficiente de agostadero*” el cual se define como “la cantidad de hectáreas de terreno promedio que se requieren en condiciones normales, en cuanto a que se presentan las lluvias normales de la región, para mantener o sostener una unidad animal (una vaca de 400 kg con un becerro o ternero de 160 kg que consumen 12 kg de materia seca al día o 4380 kg MS al año), es decir, una vaca con su cría durante todo un año” y se expresa como hectáreas/unidad animal (Villarreal 1999, Villarreal Espino-Barros 2006).

La determinación de la capacidad de carga se puede hacer de dos maneras: 1) considerando el uso exclusivo de un herbívoro (en este caso el venado cola blanca) o 2) tomando en cuenta el uso compartido del hábitat donde el venado y el ganado vacuno comparten la biomasa existente de herbáceas, aunque el venado utiliza preferentemente arbustos y árboles, mientras que el ganado vacuno utiliza mayormente los pastos (Gallina 1993). Un modelo donde se toma el uso compartido entre el venado y el ganado, es:

$$K_{\text{venado}} = \left\{ \frac{1}{1 - \left( \frac{chg}{pg} \times \frac{chv}{pv} \right)} \right\} \times \left( \frac{fv \times av}{cv \times tv} \right) \times (pv - chg)$$

y

$$K_{\text{ganado}} = \left\{ \frac{1}{1 - \left( \frac{chg}{pg} \times \frac{chv}{pv} \right)} \right\} \times \left( \frac{fg \times ag}{cg \times tg} \right) \times (pg - chv)$$

donde:  $fv$  = factor de utilización del venado igual 0.60 de acuerdo a Avery (1975, citado en Gallina 1993),  $fg$  = factor de utilización del ganado igual a 0.60 de acuerdo a Stoddart *et al.* 1975 (citado en Gallina 1993),  $pv$  = biomasa disponible como alimento para el venado,  $pg$  = biomasa disponible como alimento para el ganado,  $cv$  = consumo total del venado igual a 63.56

kg/ind/mes,  $cg$  = consumo total de ganado igual a 340.5 kg/ind/mes,  $tv$  = tiempo de pastoreo para el venado igual a 12 meses,  $tg$  = tiempo de pastoreo para el ganado igual a 6 meses,  $chv$  = cantidad de biomasa de herbáceas para el venado,  $chg$  = cantidad de biomasa de herbáceas para el ganado,  $av$  = área para el venado, y  $ag$  = área para el ganado.

Cuando no se tiene el tiempo necesario para llevar a cabo una estimación de biomasa disponible, sobre todo considerando las zonas áridas y semiáridas, se puede recurrir a estimar el volumen de las plantas (las arbustivas básicamente) mediante la medida de los dos diámetros de la planta y la altura de la misma (y el volumen se determinará según la forma de la planta como un cono o como un cilindro). Esto se puede realizar en transectos preestablecidos y cada 20 o 100 m hacer las mediciones siguiendo el método de cuadrantes centrados en puntos y midiendo los arbustos más cercanos de cada cuadrante. Esto nos permite tener una idea de la disponibilidad. También se puede pesar una parte de la planta y extrapolar a toda la planta estimando el peso y relacionándolo a través de una regresión, al volumen de la misma. De esta forma se pueden hacer unas 10 mediciones por especie para tener un acercamiento a la biomasa disponible.

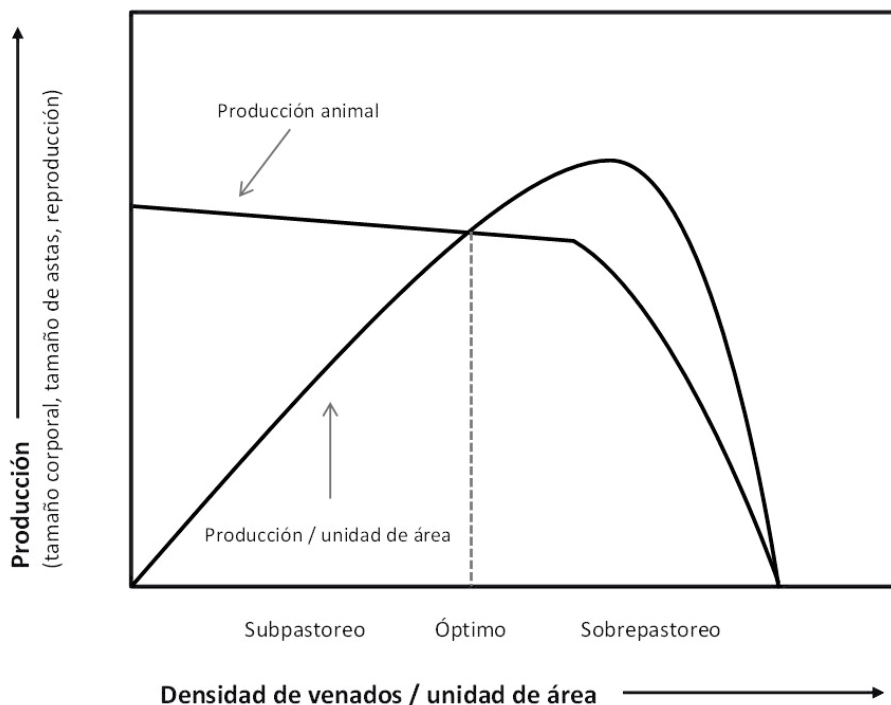
### **Modelo basado en Mott (1960)**

De acuerdo a Fulbright y Ortega-S (2007), otra manera de conceptualizar la capacidad de carga y que tiene implicaciones interesantes para el manejo del venado, es la basada en la curva de Mott (1960, citado en Fulbright y Ortega-S 2007) desarrollada originalmente para el ganado (Fig. 7.2). De acuerdo a este modelo, bajas densidades de venado maximizan la producción por animal en términos de peso corporal, tamaño de astas, producción de cervatos, entre los principales. Esto se debe a que a bajas densidades no existe competencia por alimento y los animales pueden maximizar la selección de plantas y partes de las mismas de mayor valor nutricional. Por el contrario, la presión de pastoreo se incrementa conforme la densidad de animales aumenta lo cual resulta en un incremento progresivo de la competencia por los recursos forrajeros. En consecuencia, la producción por animal es baja a altas densidades, lo cual resulta en una sobre utilización de la vegetación (Fig. 7.2).

Por otro lado, la producción/unidad de área expresada como total de kg de venado por unidad de área, es baja cuando la densidad de población es baja. Mientras que la producción por unidad de área aumenta conforme se incrementa la densidad animal hasta cierto punto donde el forraje comienza a sobreutilizarse. A partir de ese punto la producción/unidad de área declina rápidamente. En consecuencia, de acuerdo a lo anterior la capacidad de carga se ubica en el punto óptimo.

### Tendencia temporal de K

El número de animales que el hábitat puede mantener cambia continuamente en tiempo y espacio. En consecuencia, las fluctuaciones en la capacidad de carga resultan por la variación estacional en la distribución y cantidad de la precipitación, así como los cambios en las poblaciones de otros herbívoros



**Figura 7.2.** Relación hipotética entre la densidad de venados, comportamiento productivo individual incluyendo desarrollo de astas, peso corporal, y producción/unidad de área (Basado en Fulbright y Ortega-S. 2007).

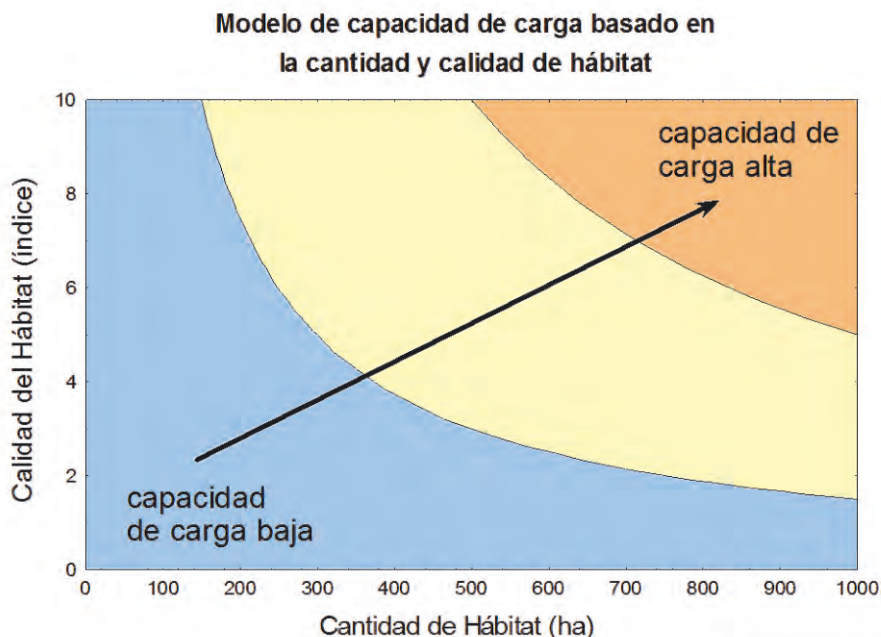
silvestres y domésticos que pueden competir con el venado cola blanca por forraje y espacio. La capacidad de carga podría alcanzar el nivel de cero durante una sequía severa y podría ser mucho más alta durante un año lluvioso. Los venados sobreviven los veranos cálidos a través de adaptaciones fisiológicas y de comportamiento tales como el almacenamiento de energía en forma de grasa durante períodos de abundancia de forraje, la restricción de la actividad y permaneciendo echados en áreas protegidas que les permiten soportar los períodos de limitación extrema de alimento.

De acuerdo a Fulbright y Ortega-S (2007), una regla sencilla utilizada para sobrellevar las altas y bajas en la disponibilidad de forraje es manejar carga animal de ganado bovino ligeramente por debajo del promedio de la capacidad de carga del agostadero. La decisión de manejar una estrategia conservadora en las densidades de venado y la carga animal de ganado doméstico evita la sobreutilización durante los años secos. La utilización moderada y ligera durante los años promedio y arriba de la media resulta en una reserva de forraje no utilizado, el cual puede utilizarse durante los años secos. Un problema potencial con esta estrategia es que los ciclos húmedos y secos no siempre son eventos de corto plazo, por el contrario podrían durar una década o más. Una estimación de la capacidad de carga con base en los promedios de largo plazo podría estar por debajo de lo que el hábitat puede mantener durante las series de años húmedos y viceversa. Particularmente, en el caso de ambientes muy variables como el norte de México las metas en términos de densidad de población de venados deberían tener la flexibilidad para ajustarse a las tendencias climáticas.

### **Modelo de la relación entre calidad y cantidad de hábitat**

En las secciones anteriores se presentaron diferentes modelos y fórmulas para estimar la capacidad de carga básicamente estimando variables asociadas a la cantidad y calidad del forraje disponible, y a las necesidades nutricionales de los animales. Sin embargo, desde el punto de vista del hábitat existen otras aproximaciones interesantes a comentar brevemente en este apartado. Dos factores asociados al hábitat son la cantidad y calidad del mismo. De acuerdo a Patton (1997), la calidad del hábitat ( $H_Q$ ) está

determinada o es una función del alimento, cobertura y agua. Para un herbívoro como el venado cola blanca, tanto el alimento como la cobertura estará íntimamente relacionado con el tipo de vegetación (por ejemplo, bosque templado de pino-encino, selva baja caducifolia, u otro), y por el estado sucesional de la misma, es decir si se trata de un bosque primario poco perturbado o de vegetación secundaria, sitios con diferentes tipos de vegetación incluidos aquellos creados por el hombre como cultivos, zonas ganaderas, entre los principales. Esto determina en gran medida la composición y diversidad florística, y la estructura de la vegetación. A mayor cantidad y calidad del alimento, mayor cobertura de protección contra el clima y depredadores, y disponibilidad de fuentes de agua ya sean arroyos, agujas, árboles frutales u otro, entonces el sitio tendrá mayor potencial para sostener un mayor número de venados. Un modelo que combina ambos



**Figura 7.3.** Modelo de cambio en la capacidad de carga ( $K$ ) en función de la cantidad o superficie de hábitat y de la calidad del hábitat medida a través de algún índice. Se espera una mayor capacidad de carga conforme la cantidad y la calidad del hábitat aumentan. Sin embargo, nótese que una superficie de hábitat grande pero de baja calidad tendrá como resultado una  $K$  baja; lo mismo se espera si la calidad del hábitat es alta pero la superficie pequeña. Las cifras mostradas en ambos ejes solo tienen una función ilustrativa y no deben tomarse como una regla.

aspectos, calidad y cantidad, se presenta de manera gráfica en la Fig. 7.3. Una mayor  $K$  se espera cuando ambas variables tiene valores altos, sin embargo, una  $K$  baja puede suceder o bien cuando la superficie del hábitat es grande pero de baja calidad de hábitat; o cuando la calidad es alta pero la superficie es muy pequeña.

Es importante resaltar que si bien se ha considerado una alta abundancia como un índice de la salud de la población, en algunos casos una sobrepoblación puede ir en detrimento de los animales. En todo caso, junto con el dato de abundancia (o densidad) deben considerarse simultáneamente otros índices de salud de la población como por ejemplo una alta fecundidad, baja mortalidad, mayor sobrevivencia de crías, mayor peso corporal, tamaño de astas grandes, carga parasitaria baja, entre algunos. Estas consideraciones ponen de manifiesto un aspecto importante en el manejo: no solo se debe monitorear la abundancia de una población y cambios en la misma a través del tiempo o en distintos tipos de hábitats, sino además monitorear otros aspectos demográficos y de salud relevantes para mantener una población con su mayor potencial de crecimiento posible.

### **Sobrecarga del hábitat**

Un aspecto importante a considerar en el manejo de la fauna silvestre, principalmente con ungulados silvestres como el venado cola blanca, es el problema de la sobrecarga del hábitat. Es decir, cuando existen más animales que la capacidad de carga del sitio. De acuerdo a las observaciones reportadas por varios autores en Villarreal (1999), los principales problemas en las poblaciones de venados y su hábitat asociados son la sobrecarga del hábitat son:

- 1) Las plantas más palatables son fuertemente consumidas y tienden o pueden desaparecer
- 2) El consumo de plantas o partes menos palatables de las mismas se incrementa considerablemente
- 3) Es común que se observen líneas de ramoneo o sea líneas de consumo total de las partes de las plantas que consume el venado a una altura donde alcanza (1.50 - 1.80 m)

- 4) La tasa de nacimientos disminuye considerablemente y es común que se presenten nacimientos sencillos en lugar de cuates (dobles que es lo común en hembras adultas en hábitats adecuados)
- 5) El índice de mortalidad por inanición o falta de alimentos se incrementa considerablemente en cervatos
- 6) Los venados adultos tienen un tamaño y peso menor al promedio que se obtiene en la región
- 7) El tamaño, grosor, y cantidad de puntas de las astas tiende a ser menor y existe la posibilidad de que se presente un alto porcentaje de aleznillos (machos con solo una punta por lado)
- 8) Los venados tienden a presentar condiciones físicas pobres y generalmente son susceptibles a enfermedades, parásitos y depredadores
- 9) Es común que la tasa sexual de nacimientos en lugar de ser 1:1 (machos:hembras) tienda a favorecer a los machos



## BIBLIOGRAFÍA

- Caughley, G. y A.R.E. Sinclair. 1994. *Wildlife ecology and management*. Blackwell Science. Cambridge, MA.
- Ezcurra, E., S. Gallina y P.F. Ffolliott. 1980. Manejo combinado del venado y el ganado en el norte de México. *Rangelands* 5:208-209.
- Fulbright, E. y A. Ortega-S. 2007. *Ecología y manejo de venado cola blanca*. Texas A & M University Press. College Station, TX.
- Gallina, S. 1993. Biomasa disponible y capacidad de carga en la reserva la Michilía, Durango. Pp. 437-453. En: Medellín, R.A. y G.A. Ceballos (eds.). *Avances en el estudio de los mamíferos de México*. Publicaciones Especiales, Vol. 1. Asociación Mexicana de Mastozoología A.C.
- Gotelli, N.J. 2008. *A primer of ecology*. Sinauer Associates Inc. Sunderland, MA.
- Mandujano, S. 2007. Carrying capacity and potential production of ungulates for human use in a Mexican tropical dry forest. *Biotropica* 39:519-524.
- McCullough, D.R. 1987. The theory and management of *Odocoileus* populations. Pp. 535-549. En: Wemmer, C.M. (ed.). *Biology and management of the Cervidae: Proceedings of a symposium*. Smithsonian Institution Press. Washington, DC.
- Miller, K.V. y J.M. Wentworth. 2000. Carrying capacity. Pp. 140-155. En: Demarais, S. y P.R. Krausman (eds.). *Ecology and management of large mammals in North America*. Prentice Hall. Upper Saddle River, NJ.
- Patton, D.R. 1997. *Wildlife habitat relationships in forested ecosystems*. Timber Press. Portland, OR.
- Plata, F.X., G.D. Mendoza, J.A. Viccon, R. Bárcena y F. Clemente. 2011a. Comparación de métodos basados en los requerimientos nutricionales y disponibilidad de biomasa para estimar la capacidad de carga para venado cola blanca. *Archivos de Medicina Veterinaria* 43:41-50.
- Plata, F.X., G.D. Mendoza, J.A. Viccon, R. Bárcena, F.C. Sánchez y O.A. Villarreal. 2011b. Adecuación y análisis de sensibilidad de un modelo para la estimación de la capacidad de carga del hábitat de venado cola blanca. *Archivos de Medicina Veterinaria* 43:267-275.

Robinson, J.G., y E.L. Bennett. 1999. Carrying capacity limits to sustainable hunting in tropical forest. Pp. 13-30. En: Robinson, J.G. y E.L. Bennett (eds.). *Hunting for sustainability in tropical forest*. Columbia University Press. New York, NY.

Stuth J.W. y W.J. Sheffield. 2001. Determining carrying capacity for combinations of livestock, white-tailed deer and exotic ungulates. Pp. 5-12. En: *Wildlife Management Handbook*. Texas A&M University System. Texas.

Villarreal, J. 1999. *Venado cola blanca: manejo y aprovechamiento cinegético*. Unión Ganadera Regional de Nuevo León. Monterrey, N. L.

Villarreal-Espino Barros, O. A. 2006. *El venado cola blanca en la mixteca poblana: conceptos y métodos para su conservación y manejo*. Fundación Produce de Puebla A.C., Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, Mazamatli A.C., Puebla.

# capítulo ocho

## Técnicas para el estudio de los murciélagos

*Areli Rizo-Aguilar, Luis Gerardo Ávila-Torresagatón, Liliana Fuentes Vargas, Ana Cristel Lara Nuñez, Gabriela I. Flores Nuñez y Sergio Albino Miranda*

### INTRODUCCIÓN

El orden Chiroptera es uno de los órdenes de mamíferos más exitosos (Altringham 1996), y comprenden una increíble variedad de formas y estilos de vida y se encuentran entre los mamíferos más diversificados y con una gran radiación adaptativa. Son el segundo orden con mayor número de especies a nivel mundial después de los roedores, con aproximadamente 1,116 especies descritas. Esta riqueza de especies se agrupa en 19 familias y 177 géneros (Simons 2005). A nivel de comunidades locales, los quirópteros son el orden de mamíferos más diverso en casi todos los biomas del planeta (Hutson *et al.* 2001). La República Mexicana posee una de las quiropterofaunas más ricas del planeta, con una lista de casi 138 especies, todas pertenecientes al suborden de los microquirópteros (Ceballos y Arroyo-Cabrales 2012). Esta gran diversidad taxonómica está acompañada de una amplia variedad en los hábitos ecológicos, en los tipos de recursos y hábitats empleados. Consumen una enorme variedad de recursos, como son insectos y otros artrópodos, pequeños vertebrados, sangre, frutos, hojas, flores, néctar y polen (Hutson *et al.* 2001, Schnitzler y Kalko 2001). Los murciélagos frugívoros y polinívoros generalmente desempeñan funciones clave, como dispersores de semillas e intermediarios en la polinización de plantas importantes en el funcionamiento del ecosistema (Fleming y Sosa 1994, Galindo-González 1998). Las especies insectívoras y carnívoras pueden consumir grandes cantidades de artrópodos y pequeños vertebrados, sobre cuyas

poblaciones pueden tener efectos importantes (Lee y McCracken 2002, Wilson 2002).

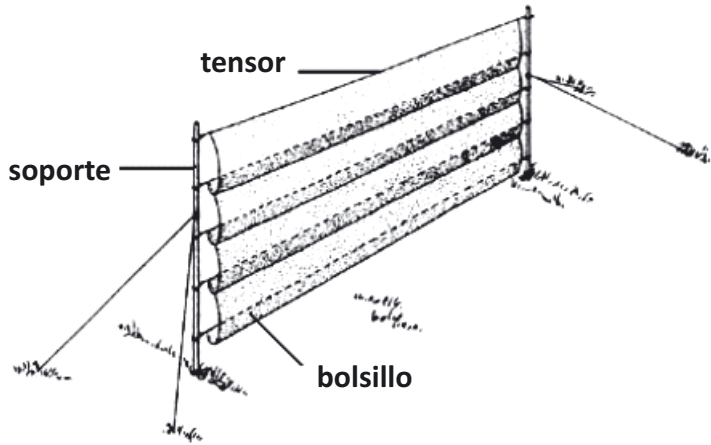
En este capítulo se pretende mostrar un panorama general de las opciones disponibles para el estudio de los murciélagos, así como las consideraciones pertinentes antes de elegir el método para estudiar a la quiroptero fauna, las cuales deben ser en función de los objetivos planteados en el proyecto de trabajo, ya sea de estimación poblacional, inventario, uso de hábitat, comportamiento, entre otros.

### **Redes de niebla**

El uso de las redes de niebla o, también conocidas como redes japonesas, es considerado uno de los métodos más tradicionales y antiguos en la captura de aves y murciélagos. En el caso de los murciélagos su uso es más efectivo en el estudio de las poblaciones de murciélagos nectarívoros, frugívoros, hematófagos e insectívoros de sustrato, no así con los insectívoros aéreos que tienen un sistema de ecolocación más desarrollado que les permite detectar y evadir las redes en la mayoría de las ocasiones. Aun así, es un método directo que nos permite obtener información valiosa de muchas especies de murciélagos.

Tradicionalmente eran confeccionadas con hilos de algodón y seda, pero al ser un material poco duradero se optó por tejerlas con hilo de nylon. Se encuentran dos tipos de redes de niebla en el mercado: las de nylon trenzado o poliéster Dacron y las de nylon monofilamento. Estas últimas son preferidas para captura de murciélagos insectívoros aéreos por tener finas fibras más finas, en comparación de las hechas con nylon trenzado, sin embargo, en este tipo de redes las afectaciones son frecuentes ya que los murciélagos son difíciles de remover y en muchos casos los hilos se rompen (Rodales y Juri 2006).

Una vez que se ha optado por este método directo, deben seleccionarse el tipo y tamaños de la red de niebla en función de las características del sitio de estudio, la longitud de la malla o tamaño del rombo de la red. Existe una gran variedad de opciones en el tamaño de la malla y la longitud. Se pueden conseguir redes que van desde los 3 a los 30 metros con una altura de aproximadamente



**Figura 8.1.** Partes de una red de niebla.

2 metros; la malla es de forma romboidal y la abertura de la malla es variable; cuentan con 3 o 5 paneles que se traslapan formando bolsas (Fig. 8.1), de tal forma que el murciélago choca y cae dentro de dichas bolsas, enredándose e incapacitándose para continuar el vuelo de forma momentánea (Wilson *et al.* 1996). La colocación de las redes se adecuará al área de estudio, si es un sitio amplio se elegirá una red de gran tamaño o en caso contrario una red pequeña. Se recomienda colocarlas en línea recta y utilizar la cantidad de redes necesarias según sea el objetivo del trabajo a realizar (Fig. 8.2) (Ralph *et al.* 1996).

La forma correcta de desplegar una red es, en principio, pasar todas las anillas de los tensores sobre uno de los soportes, este debe asegurarse con cuerdas al piso o con cualquier objeto que impida su caída. Posteriormente se despliega la red hacia el otro extremo y se hace lo mismo con las anillas en el siguiente poste, asegurándolo como el anterior. Finalmente se separan las anillas de ambos postes para que esta quede extendida (Rodales y Juri 2006). Se debe evitar dejar la red tensa ya que esto impide una captura adecuada. Los animales colectados son retirados con precaución para evitar herirlos o dañar la red.

Esta herramienta de colecta es fácil de transportar y de peso ligero, además que es accesible económicamente en comparación con otros métodos de estu-



**Figura 8.2.** Colocación de redes de niebla en pasos de vuelo y en cuerpos de agua. (Fotos Alberto González Romero).



dio de murciélagos, pero se considera un método invasivo debido a que hay manipulación directa del organismo y que, en muchas ocasiones y sin un manejo adecuado, puede resultar en la muerte del espécimen colectado, o las hembras preñadas pueden presentar aborto espontáneo en consecuencia del estrés que les produce la captura y el forcejeo en la red.

Una vez que se ha elegido esta técnica de estudio, es necesario contar con el equipo mínimo indispensable: guantes de carnaza, bolsa de manta para mantener seguro al murciélago capturado y lámpara de cabeza (Fig. 8.3).

### Detectores ultrasónicos

Los murciélagos utilizan un sistema activo de orientación, denominado ecolocación (Griffin 1958), el cual les permite detectar con facilidad objetos en la oscuridad, emitiendo una serie de pulsos de alta frecuencia que se emiten a través de la boca o las narinas. Este sistema es muy preciso, y la imagen que se forma permite a los murciélagos detectar la presencia, forma, distancia y movimiento de los objetos con los que los sonidos chocaron (Jones y Rydell 2003). Salvo pocas excepciones, la mayoría de los sonidos de ecolocación producidos por los murciélagos son inaudibles para el ser humano. Pocos oídos humanos son capaces de oír sonidos que sobrepasen los 20 kHz, y la mayoría quedan lejos de ese valor, mientras que hay murciélagos que emiten a frecuencias mucho más elevadas que incluso pueden superar los 200 kHz. Sin embargo, se han desarrollado aparatos que permiten la detección y grabación de estas señales, permitiendo detectar la presencia de los murciélagos en el ambiente.



**Figura 8.3.** Equipo necesario para hacer uso de redes de niebla. (Foto Sergio Albino Miranda).

Ya desde hace varias décadas se han utilizado detectores de ultrasonido, los cuales nos permiten detectar la presencia e identificar los murciélagos a nivel de especies o sonotipos, sin necesidad de capturarlos (O'Farrell y Gannon 1999). Esta metodología proporciona una forma no invasiva de estudio de los murciélagos (O'Farrell *et al.* 2000). La implementación y el avance de estas técnicas de detección ultrasónica y el análisis de los sonidos ha permitido el desarrollo de investigaciones sobre la distribución de las especies y la diversidad de las comunidades, los patrones de actividad y uso de hábitat, y la influencia de las variables ambientales sobre ellos, así como las estrategias de forrajeo de los murciélagos insectívoros y la relación de los sonidos de ecolocación, con diferentes grados de complejidad estructural en la vegetación (Kalcounis-Rúppell *et al.* 2003).

Las características de los sonidos que emiten los murciélagos difieren entre especies y se ven influenciadas, entre otros factores, por las condiciones ambientales en que viven y desarrollan sus actividades. Sus características pueden variar incluso entre individuos de una misma especie (Neuweiler 2000). Dado que los sonidos de ecolocación han evolucionado como elementos portadores de información sobre las características del ambiente en el que se mueve el murciélago, también podemos esperar que las características de las señales sean similares entre especies que están filogenéticamente emparentadas, que forrajean de forma parecida y que tienen tamaño corporal similar (Barclay 1999, Corben 2004). La identificación de especies a partir del análisis de los sonidos de ecolocación es posible cuando sus llamadas de ecolocación muestran características distintivas, esto aporta información importante para el conocimiento de la biología y ecología de la especie (O'Farrell *et al.* 2000).

En la actualidad existen varias técnicas para transformar los sonidos de la ecolocación en frecuencias audibles para el ser humano o digitalizarlos a alta frecuencia, permitiendo la grabación y posterior análisis de la señal. Todas las técnicas tienen limitantes y el entendimiento de cómo es que funcionan es esencial para una interpretación correcta. Los detectores utilizan comúnmente tres técnicas para la transformación de las frecuencias ultrasónicas, las cuales son el heterodinaje, la división de frecuencias y la expansión de tiempo.



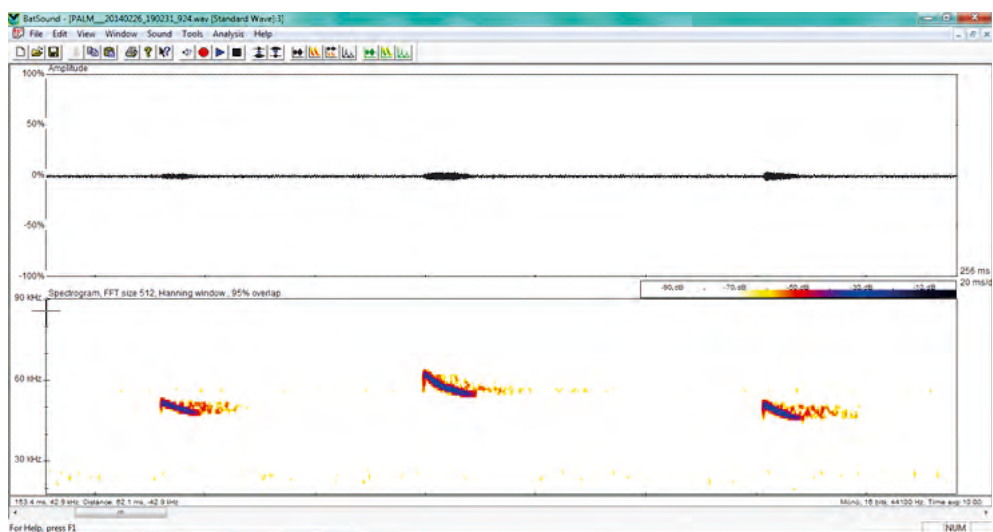
Estas técnicas nos permiten escuchar los ultrasonidos emitidos por los murciélagos, y almacenarlos con un sistema de grabación adaptado al rango de frecuencias audibles. Cada una de estas técnicas tiene sus ventajas, sin embargo la de expansión de tiempo es la que mejor conserva las características de los sonidos de ecolocación, por lo tanto, es el que se emplea para analizar e identificar a los murciélagos (Lisón 2011).

Para los estudios en los que se requiera la identificación de las especies, es necesario analizar las características temporales y espectrales de las señales. Para ello, es necesario representar las señales en gráficos de amplitud-tiempo (oscilograma), frecuencia-tiempo (espectrograma) o frecuencia-amplitud (espectro de energía), lo cual requiere a veces, como el caso de los espectros, analizar las señales mediante técnicas matemáticas (Parsons *et al.* 2000). Los principales parámetros que se miden para describir los pulsos de ecolocación de los murciélagos son la estructura del pulso, la frecuencia inicial y final, la frecuencia de máxima energía, la duración, el intervalo interpulsos, el ancho de banda, la amplitud y los armónicos (Lisón 2011).

De acuerdo al tipo de investigación que se pretenda realizar, se eligen qué datos son importantes y pueden llegar a responder las preguntas que se planteen. Con base en esto se determina qué detectores y programas computacionales de análisis de ultrasonido se requieren para dicha investigación (Lim-pens y McCracken 2004). Estas decisiones se deben basar en el conocimiento de la biología de los murciélagos. Por ejemplo las especies de murciélagos que emiten sonidos de ecolocación de baja intensidad son mucho menos detectables que aquellos que emiten sonidos de ecolocación de alta intensidad (Rydell *et al.* 2002). Por esta razón, en muchos casos la presencia, comportamiento y actividad de los murciélagos que emiten sonidos de baja intensidad no puede ser evaluada con el monitoreo de sus señales de ecolocación. Además, en algunos grupos de murciélagos, las señales que emiten diferentes especies son débiles y muy similares entre sí, con lo cual no es posible identificar las especies. Es el caso de la mayoría de los murciélagos de las familias Phyllostomidae y Natalidae y algunos de la Vespertilionidae que cazan sobre sustratos (Kalko 2002 y Rizo-Aguilar 2008).

Por el contrario, también existen especies, en general cazadoras de insectos voladores, que forrajean cerca o en el interior de la vegetación, con pulsos de estructura particular, lo cual permite la determinación segura de la especie después de visualizar los espectrogramas. Entre estas especies están los mormópidos del género *Pteronotus*, los noctiliónidos y los embalonúridos del género *Saccopteryx* y *Peropteryx* (Rizo-Aguilar 2008). Al mismo tiempo existen especies de murciélagos, que cazan insectos voladores generalmente en áreas relativamente abiertas, y que emplean pulsos de ecolocación de estructura variable, cuyas características pueden ser muy similares o superponerse con los de otras especies, generalmente las filogenéticamente cercanas, así como con aquellas de tamaño y comportamiento parecidos. En este caso se encuentran la mayoría de los vespertiliónidos. En estos casos para discriminar entre especies por sus señales se requiere en general un análisis cuantitativo (Barclay 1999, Fenton y Bogdanowicz 2002).

Una vez grabados los pulsos de ecolocación de los murciélagos, estos se analizan en una computadora por medio de programas computacionales especializados en el análisis de sonido. En estos programas se puede observar de manera gráfica las características de los ultrasonidos, mostrando un oscilograma



**Figura 8.4.** Oscilograma y espectrograma de los pulsos de una especie de la familia Molossidae.



**Figura 8.5.** Interfaz de SonoBat mostrando una secuencia de una especie de la familia Vespertilionadae.

para visualizar la forma de onda y amplitud de la señal con respecto al tiempo y un espectrograma que muestra la frecuencia de la señal. Existe una amplia variedad de programas de cómputo para el análisis del sonido. Algunos de los más utilizados actualmente son:

### Batsound

Es un programa fabricado por la compañía sueca Pettersson Elektronik, hecho especialmente para analizar los pulsos de ecolocación de murciélagos. Soporta formatos de sonido por encima de los 32 bits con uno o dos canales (mono o estéreo) y puede muestrear frecuencias arriba de 192 kHz. Este programa muestra las señales de forma diferente ya sea en oscilograma y espectrograma o espectro de energía (Fig. 8.4). Mientras la señal es grabada, en la pantalla se muestra el oscilograma y/o espectrograma en tiempo real, con el fin de hacer evaluaciones inmediatas de las llamadas. Este programa permite medir pará-

metros como la frecuencia inicial y final del pulso, duración del pulso, máxima energía del pulso o secuencia de pulsos, así como el intervalo entre pulsos.

La versión Pro del Batsound puede recibir tarjetas de alta velocidad de sonido, permitiendo tener una velocidad de muestreo arriba de los 500kHz, pudiendo reproducir señales de hasta 250kHz. Este programa graba directamente las señales ultrasónicas sin tener que ser transformadas previamente por un detector de ultrasonidos.

### **Sonobat**

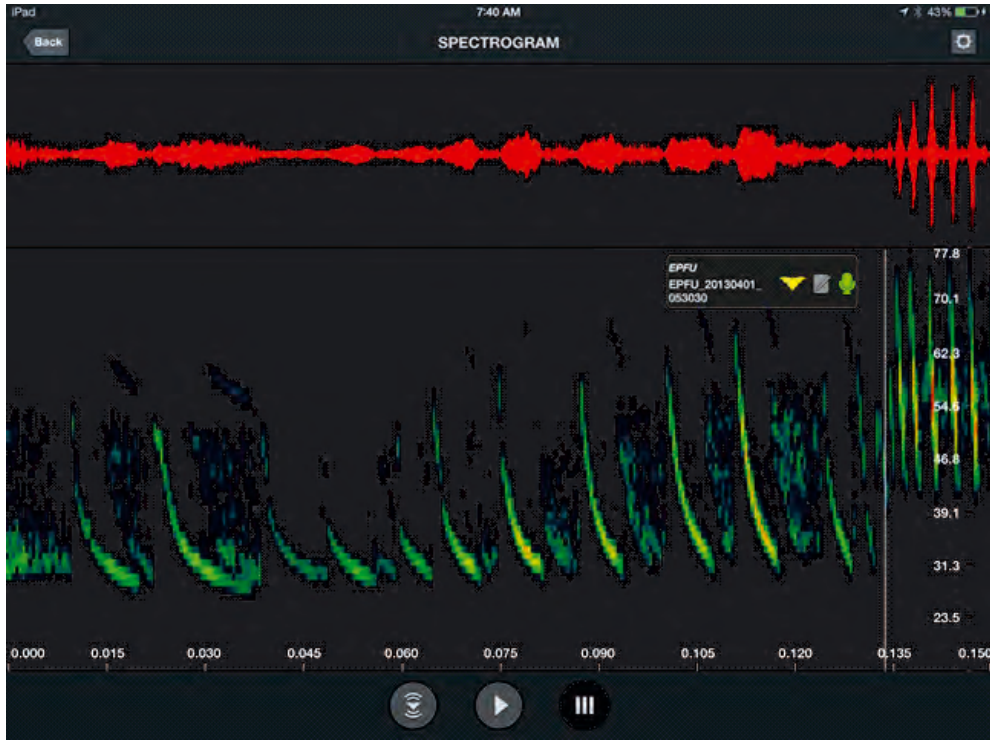
Este programa, desarrollado en Estados Unidos, proporciona herramientas para un análisis detallado y en alta resolución de un espectro completo del sonograma de los pulsos de ecolocación. Además, permite anexar una biblioteca de ultrasonidos de referencia para una secuencia de pulsos o incluso uno solo, visualizándolos en la misma ecografía al mismo tiempo y con las mismas escalas de frecuencia (Fig. 8.5).

Sonobat es compatible con este tipo de detectores:

- Pettersson D240x, D500X, D1000x
- Binary Acoustic Tecnología AR125, AR180, FR125
- Wildlife Acoustics SM2BAT, EM3

### **BatScan**

Es producto de la compañía británica Batbox LTD. Este programa computacional puede reproducir y grabar las muestras de sonido por medio de su tarjeta de sonido compatible con Windows, sin embargo esta tarjeta no es necesaria para analizar y visualizar los espectrogramas de audio. Procesa el audio en formato PCM\* digital (archivos de sonido WAV\*) y por medio del programa se puede visualizar, en la misma pantalla, el oscilograma y espectrograma. En la pantalla también se puede ver una gama de colores representando la amplitud, así como el tiempo (ms), la frecuencia (kHz) y el espectro (dB/kHz). Permite analizar frecuencias de 17 a 120 kHz; mide parámetros como la frecuencia inicial y máxima, el intervalo entre pulsos y la tasa de repetición del pulso. BatScan se puede ejecutar en Windows 95, 98, ME, NT 4.0, 2000, Vista o XP.



**Figura 8.6.** Interfaz de Echo Meter Touch con sonogramas de la familia Vespertilionidae.

### Echo Meter Touch

Es un detector de ultrasonidos de Wildlife Acoustics, compatible con la plataforma IOS de Apple. Su programa permite escuchar los ultrasonidos de los murciélagos en tiempo real y, al mismo, tiempo visualizar el espectrograma con una amplia gama de color (Fig. 8.6). El GPS del iPhone o iPad proporciona la ubicación de las grabaciones realizadas. Los archivos grabados se pueden transferir fácilmente al ordenador por medio de un cable USB o a través de la red Wi-Fi.

### Kaleidoscope

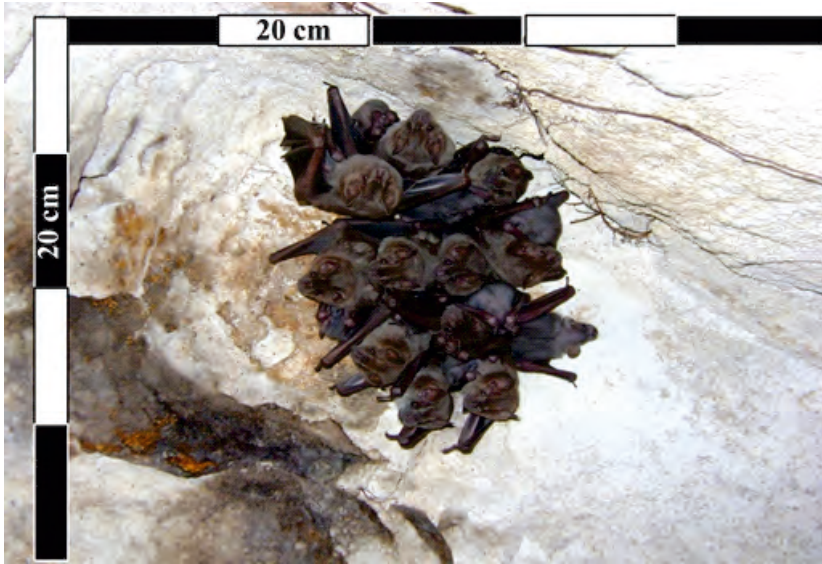
Es un programa de Wildlife Acoustics, diseñado para una rápida conversión de archivos WAC a WAV, que ordena y clasifica los pulsos de ecolocación por especie. Este programa permite trabajar con las grabaciones hechas en tiempo expandido o cruzamiento por cero. Kaleidoscope Viewer analiza los pulsos de

ecolocación de los murciélagos por medio de un espectrograma. Sus características permiten una identificación, clasificación y filtrado de los pulsos de ecolocación. Los archivos pueden ser revisados en Full-Spectrum o cruzamiento por cero.

### **Refugios cavernícolas**

Los murciélagos cavernícolas, es decir aquellas especies de murciélagos que habitan y utilizan como refugio ambientes como cuevas, minas, grutas y cavernas, requieren que sus refugios presenten condiciones microambientales particulares (Avila-Flores y Medellín 2004, Altringham 1996). Estas características garantizan la permanencia de las colonias de murciélagos, las cuales pueden ser residentes o migratorias. Un importante número de especies de murciélagos, utilizan cavidades como refugio, por ejemplo las minas abandonadas, túneles o cuevas. En México, poco más del 40% de las especies reconocidas (Medellín *et al.* 2008), utilizan ambientes cavernícolas como refugio permanente (Arita 1999), donde desarrollan diversas fases de su ciclo de vida (Kunz y Lumsden 2003). Además, en los refugios cavernícolas, los murciélagos se reproducen, paren y cuidan a sus crías, y sobre todo se resguardan de sus depredadores y de las condiciones ambientales externas (Kunz y Lumsden 2003).

Los refugios cavernícolas, de acuerdo al número de especies de murciélagos que los ocupan, se dividen en dos tipos. Aquellos que albergan una única especie de murciélago, son denominados refugios monoespecíficos, mientras que los refugios cavernícolas con dos o más especies de murciélagos, se les llama refugios multiespecíficos. Tanto los refugios monoespecíficos como los multiespecíficos pueden mantener colonias que van desde algunos cuantos individuos, hasta varios miles e incluso millones. Es importante tener en cuenta que, en diferente época del año, un mismo refugio puede ser multiespecífico y monoespecífico. Es necesario antes de iniciar cualquier monitoreo, verificar si se trata de un refugio multiespecífico o monoespecífico, así como las características generales del refugio, es decir, dimensión y número de entradas-salidas usadas por los murciélagos, túneles, bóvedas, grietas, y todas aquellas zonas del refugio inaccesibles a los investigadores, donde potencialmente los murciélagos puedan refugiarse y quedar fuera de los conteos.



**Figura 8.7.** Método directo de estimación de murciélagos (*A. jamaicensis*) en un refugio cavernícola. (Foto Luis Gerardo Ávila Torresagatón).

Los planes y propuestas de manejo y conservación de murciélagos y sus refugios, requieren imprescindiblemente información sobre el tamaño y fluctuación de sus poblaciones lo largo del tiempo. Para ello, existen diferentes métodos de censo y monitoreo, que permiten obtener tal información. Entre ellos, los tres mayormente recomendados son: i) conteos al interior del refugio, ii) conteos durante la dispersión de la colonia, y iii) conteos durante el éxodo del refugio (Kunz *et al.* 2009).

### **Conteos al interior del refugio.**

Son considerados un método invasivo, pues se requiere ingresar al refugio y contar directamente los murciélagos en sus sitios de percha. Los conteos pueden ser individuo por individuo o bien, contar los murciélagos que ocupan un área determinada, por ejemplo  $1\text{m}^2$ . Posteriormente se extrapola el área contada, al área total que ocupa la colonia (Fig. 8.7), por ejemplo  $9\text{m}^2$ , entonces si  $1\text{m}^2$  concentra 150 murciélagos, en su área de percha de  $9\text{m}^2$  esperaríamos encontrar 1350 individuos.

Para hacer tales estimaciones, los conteos pueden hacerse directamente, o bien tomar fotografías para posteriormente, sobre la imagen, hacer el conteo de los animales y extrapolar el conteo al área total ocupada (Galindo *et al.* 2004, Thomas y La Val 1988). Este método, también puede aplicarse en los refugios de maternidad, es decir aquellos sitios donde altas concentraciones de hembras se agrupan para gestar y cuidar a sus crías. En estos casos, es posible contar directamente las crías o fotografiar áreas del refugio, para después, extrapolar el área fotografiada al resto del área que ocupan las crías en el refugio (O'Shea *et al.* 2003, Thomas y La Val 1988). Es importante hacer estas visitas, al momento en que los adultos están fuera del refugio durante la noche, y en el periodo cuando las crías son aun incapaces de volar.

Los dos métodos de conteo desde el interior de los refugios, son difícilmente aplicables en refugios cavernícolas de zonas tropicales, debido a que las especies de murciélagos ahí presentes, al percibir actividades fuera de lo común en sus refugios, como puede ser la luz de las lámparas, el ruido generado por las visitas o el flash de la cámara fotográfica, vuelan y abandonan su sitio de percha. Esto anula la posibilidad de hacer conteos certeros. En cambio, en zonas templadas donde los murciélagos cursan largos periodos de hibernación o torpor, es decir, los animales estarán prácticamente inmóviles durante el ingreso al refugio, estos métodos pueden facilitarse (Thomas y La Val 1988, Tuttle 2003).

Debe considerarse que las visitas al interior de los refugios cavernícolas, incluso aquellas de carácter científico, implican perturbaciones tanto al microambiente de los refugios como a las colonias de murciélagos (Fenton 2003, Mickleburgh *et al.* 2002, Arita 1999, McCracken 1989). Estas perturbaciones en conjunto, pueden generar efectos negativos que pueden reflejarse, en la pérdida de energía acumulada en organismos tórpidos o en hibernación, en la disminución del éxito de apareamiento en las colonias de reproducción, en el abandono o pérdida de crías por adultos en las colonias de maternidad (McCracken 1989, Tuttle 2003), además del empobrecimiento de la calidad del refugio debido a las alteraciones microambientales. Esto puede causar eventualmente el abandono del refugio y su sustitución por otro de inferior cali-



dad, lo cual puede disminuir la supervivencia y tasa de reproducción de los individuos (Fenton 2003, McCracken 1986).

### **Conteos durante la dispersión de la colonia**

Estos métodos se consideran como no invasivos. Su aplicación exitosa depende particularmente de la ubicación de observación respecto al área de vuelo y dispersión del grupo de murciélagos. Es decir, de si la cobertura vegetal entre observador - columna de vuelo, permite la libre observación de los animales, así como las condiciones lumínicas ambientales.

Posterior al éxodo del refugio, algunas especies de murciélagos cavernícolas como *Tadarida brasiliensis*, se agrupan en la periferia cerca al refugio y posteriormente forman largas columnas de vuelo hasta dispersarse para alimentarse. Estos patrones conductuales, permiten aplicar algunos métodos para conocer y/o estimar el tamaño de las colonias, los cuales requieren del apoyo de equipos electrónicos sencillos como pueden ser cámaras fotográficas o videograbaciones digitales, infrarrojas, e incluso, tecnologías más complejas como por ejemplo imágenes térmicas infrarrojas, combinados con complejos programas computacionales que analizan las termomágenes o el recorrido individual de cada murciélago (Kunz *et al.* 2009).

Un factor que limita este método, es su aplicación en refugio multiespecíficos, ya que identificar visualmente diferentes especies en una misma columna de vuelo, es complicado. Por otro lado, los sistemas que analizan las termomágenes y eventualmente podrían identificar alguna especie por su forma, son económicamente costosos (Kunz *et al.* 2009).

### **Conteos durante el éxodo del refugio**

Este grupo de métodos, puede ser tanto invasivo como no invasivo. Tal es el caso de las capturas con redes de niebla o trampas de arpa, para contar los animales mediante el método de captura-recaptura, como un método invasivo. Mientras que realizar conteos visuales, ya sean directos o indirectos, son considerados como métodos no invasivos.

Un aspecto a considerar es si el refugio es monoespecífico o multiespecífico. Además de la cantidad de salidas, por donde los murciélagos puedan emerger, pues de ello dependerá la certeza de los datos. El no cubrir alguna salida, puede dejar fuera de los conteos a un importante porcentaje de la colonia de murciélagos.

El uso de redes de niebla y trampas de arpa, suele ser la técnica para aplicar el método de captura-recaptura, esto, hipotéticamente, permite después de un tiempo determinado (meses o años) conocer la fluctuación de las colonias de murciélagos cavernícolas (Thomas y La Val 1988), además de que este método difícilmente cumple con las suposiciones necesarias, se requiere de gran inversión de tiempo, además la tasa de recaptura suele ser baja (Thomas y La Val 1988, Gaisler y Chytil 2002). Adicionalmente, la necesidad de marcar a los individuos es un factor de riesgo de lesiones o muerte para los animales (Novo *et al.* 2002, Thomas y La Val 1988).

Entre las alternativas o métodos no invasivos, y por ello altamente recomendables, se encuentran los conteos visuales de murciélagos mientras abandonan su refugio (Kunz *et al.* 2009, O'Donnell y Sedgely 2001, Barclay y Bell 1988). Esto se realiza desde una posición que no interfiera con el comportamiento y flujo del éxodo del refugio. La observación y conteo se hace a contra luz, o con ayuda de equipos de visión nocturna, e incluso con luz artificial (O'Donnell y Sedgely 2001, Barclay y Bell 1988). Esto último se usa cuando los murciélagos están habituados a este tipo de iluminación, como puede ocurrir en zonas urbanas o semiurbanas (Shirley *et al.* 2001). Este método se limita a las colonias pequeñas de murciélagos y en refugios cavernícolas monoespecíficos.

En el caso de los refugios monoespecíficos que albergan una alta cantidad de murciélagos, se pueden utilizar videgrabaciones para estimar el tamaño de la colonia. Estas videgrabaciones deben hacerse sin bloquear la salida de los animales y sin utilizar algún equipo de iluminación que altere el comportamiento natural de emergencia de los murciélagos. Para ello, el uso de reflectores o iluminadores infrarrojos, resultan útiles al monitorear refugios monoespecíficos conformados por varios cientos e incluso miles de individuos (Fleming *et al.* 1998, Barclay y Bell 1988).



**Figura 8.8.** Sistema de iluminación, grabación de video y detección acústica simultáneo en un refugio cavernícola.

Cuando se dan los casos de que en un mismo refugio lo ocupan dos o más especies de murciélagos en concentraciones numerosas (refugios multiespecíficos), como suele ocurrir en áreas tropicales, la aplicación de los métodos anteriormente descritos, se limita ampliamente, pues lograr identificar cada especie al emerger y al mismo tiempo cuantificar los individuos de cada especie durante el numeroso éxodo, resulta complicado, sobre todo si solo se cuenta con la imagen visual o la videograbación.

Bajo estas condiciones, el uso de videograbaciones, iluminación infrarroja junto al empleo de detección acústica como un mismo sistema (Rodrigues y

Palmeirim 1994), permite monitorear de manera confiable refugios cavernícolas multiespecíficos. Tal es el caso de algunos refugios cavernícolas en España (Guillén-Servent 1998), Portugal (Rodrigues 1996), y México (Avila-Torresagatón y Guillén-Servent 2007).

Este sistema (Fig. 8.8) parece causar baja o nula perturbación a los murciélagos y refugios cavernícolas. Además, la posibilidad de identificar las especies al emerger del refugio de manera conjunta, mediante la detección acústica, lo hace altamente recomendable en los refugios multiespecíficos ocupados por especies de murciélagos acústicamente diferenciables, por ejemplo *Balaniopteryx plicata*, *Saccopteryx bilineata* de la familia Emballonuridae, *Mormoops megalophylla*, *Pteronotus parnellii* de la familia Mormoopidae y *Tadarida brasiliensis*, *Molossus sinaloae* de la familia Molossidae. Algunas de estas son especies con amplia distribución y comúnmente encontradas en refugios cavernícolas de México.

Sin embargo, las especies de murciélagos cavernícolas de las familias Phyllostomidae por ejemplo *Artibeus* spp., *Leptonycteris* spp., *Macrotus waterhousii*, *Glossophaga* spp., *Natalus* spp., de la familia Natalidae y *Myotis velifer* de la familia Vespertilionidae son acústicamente similares, es decir, sus pulsos de ecolocación difícilmente podrían diferenciarse durante el éxodo de los refugios cuando estos son multiespecíficos y las colonias son numerosas (superiores a los mil individuos de cada especie), como suele suceder en las zonas tropicales. Lo anterior debido a las características estructurales de sus pulsos de ecolocación (ver detalles en la sección de Ecolocación). Si bien se ha avanzado en la descripción de los pulsos de ecolocación en varias especies de filostómidos (Kalko 2002), aún no se ha puesto en práctica este sistema con ese grupo de especies de murciélagos cavernícolas.

En la mayoría de los casos, el “mejor” método, es decir, aquella alternativa que cause la menor perturbación o efectos negativos a las colonias cavernícolas, no es necesariamente el más viable a utilizar. Las particularidades del refugio, como su accesibilidad, el número de salidas para los murciélagos, la riqueza de especies y el número de individuos dentro del refugio, son los factores

determinantes para aplicar uno u otro método. No pueden dejarse de considerar los costos económicos, y sobre todo, el tiempo necesario o disponible que se tiene para obtener los resultados.

### **Toma de muestra de tejidos y sangre**

Para practicar estos métodos, es necesario contar con permiso de colecta otorgado por la Dirección General de Vida Silvestre. Es importante tratar de aprovechar al máximo los organismos que se van a sacrificar y que el sacrificio se realice de una manera humanitaria. Se recomienda hacerlo con sobredosis de anestésicos como la ketamina y la xilacina (NOM-033 1995, AVMA 2013).

La persona que va a realizar estas actividades debe utilizar guantes de látex o nitrilo, cubre bocas y lentes, para evitar estar expuesto a cualquier contacto directo con fluidos del animal (Reuter y Vargas 2011). Es necesario que todo el material a utilizar sea lavado con jabón líquido, cloro y que sea flameado con alcohol, para evitar contaminar las muestras, esto se debe repetir antes de procesar cada espécimen (Romero-Almaraz *et al.* 2007).

Para la extracción de tejido, una vez sacrificado el espécimen, se debe realizar una pequeña incisión en el abdomen con ayuda de un bisturí, posteriormente se podrá cortar la piel con tijeras, de manera que se puedan sacar los órganos con unas pinzas. Todos los órganos se deben de colocar sobre una caja Petri, al separar cada uno de los tejidos de interés se recomienda cortarlos en dos o tres partes de cada órgano y colocarlos en criotubos o tubos Eppendorf con alcohol al 90 o 95% si se requiere el material para hacer estudios de biología molecular o Trizol para análisis con RNA. Es recomendable utilizar nitrógeno líquido para el transporte de los tejidos (Romero-Almaraz *et al.* 2007, AVMA 2013).

La toma de sangre es una técnica que puede realizarse por vía intravenosa, la técnica consiste en sujetar firmemente al individuo, asegurando que no se mueva, estirar el antebrazo y con la lanceta nueva realizar un pequeño piquete en la vena cefálica. Enseguida se formará la gota de sangre que puede ser succionada con micropipeta con puntas de 100µl (Fig. 8.9) (Joint Working Group 1993). Se recomienda tomar una muestra de 25 o 30µl para evitar que se tome



**Figura 8.9.** Toma de muestra de sangre. (Fotos Sergio Albino Miranda).

aire al succionar la gota y depositar la sangre dentro de un criotubo que ya contengan el suero o el anticoagulante a utilizar. Si no se obtuvo la sangre necesaria se puede extender y contraer el antebrazo varias veces para que la sangre fluya.

Una vez que se obtuvo la sangre, se debe ejercer presión con un algodón sobre la vena que se perforó. Finalmente para reanimar al individuo puede administrársele jugo comercial, néctar o agua azucarada con la ayuda de una jeringa (sin la aguja) para auxiliarle en la recuperación de energía y que pueda emprender su vuelo.

La cantidad de sangre a extraer es variable y dependerá principalmente del peso y la talla del individuo, así como de el momento en que haya sido capturado. Es decir, si había comido o hidratado antes de la captura o se colecta al salir de un refugio. Los anticoagulantes más utilizados son la heparina, la guanidina y EDTA. En cualquiera que sea el medio donde se vaya a conservar la sangre se debe de asegurar que sean volumen a volumen (v:v), es decir, si se obtuvieron 100 $\mu$  de sangre esta debe de tener 100 $\mu$  o más de suero. Todos los sueros requieren ser conservados a 4°C por lo que se recomienda transportar todo el material en una hielera (Gardner y Molyneaux 1987, Joint Working Group 1993).

### Transporte de individuos

Durante los muestreos, los individuos capturados pueden ser transportados de forma individual o colectiva. Para el transporte individual se usan bolsas de manta pequeñas, pero de un tamaño suficiente para asegurar que los individuos se sientan cómodos (Fig. 8.3). Una vez colocados dentro, debe asegurarse de cerrar la bolsa correctamente para evitar que puedan escaparse. Las bolsas de manta son útiles cuando se necesita recolectar excretas para estudios de dieta, por ejemplo.

Cuando el estudio requiere mantener un grupo de murciélagos en cautiverio por algunas horas o en el caso de ser necesario transportarlos, para evitar lastimarlos o causarles algún tipo de lesión que les impida retomar el vuelo una vez liberados, hemos diseñado una estructura con materiales económicos y fáciles de conseguir, tales como malla mosquitera, hilo y aros para bordar. Se arma una estructura cilíndrica (Fig. 8.10) y, de esta forma los murciélagos pueden percharse sin el peligro de ser aplastados o asfixiados.



**Figura 8.10.** Transportadora de murciélagos. (Foto Areli Rizo Aguilar).

## BIBLIOGRAFÍA

- Altringham, D.J. 1996. *Bats biology and behaviour*. Oxford University Press. Oxford, N.Y.
- Arita, T.H. 1999. Conservation of mexican cave bats. *Journal of Mammalogy* 74:693-702.
- Avila-Flores, R. y R. Medellín. 2004. Ecological, taxonomical, and physiological correlates of caves use by mexican bats. *Journal of Mammalogy* 85:675-687.
- Avila-Torresagatón, L.G. y A. Guillén-Servent. 2007. Counting bats in tropical cave roosts using a simultaneous infrared video and ultrasound detection system: an attempt in a Mexican deciduous forest habitat. *Bat Research News* 48:175.
- AVMA. 2013. *Guidelines for the euthanasia of animals*. American Veterinary Medical Association. Schaumburg, IL.
- Barclay, M.R. y G.P. Bell. 1988. Marking and observation techniques. Pp. 59-76. En: Kunz, T.H. y P.A. Racey (eds.). *Ecological and behavioral methods for the study of bats*. Smithsonian Institution Press. Washington, D.C.
- Barclay, R.M.R. 1999. Bats are not birds—a cautionary note on using echolocation calls to identify bats: A comment. *Journal of Mammalogy* 80:290-296.
- Ceballos, G. y J. Arroyo-Cabrales. 2012. Lista actualizada de los mamíferos de México *Revista Mexicana de Mastozoología Nueva época* 2:27-80.
- Corben, C. 2004. Zero-crossings analysis for bat identification: An overview. Pp. 114-120. En: Brigham, R.M., E.K.V. Kalko, G. Jones, S. Parsons y H.J.G.A. Limpens (eds.). *Bat echolocation research. Tools, techniques and analysis*. Bat Conservation International. Austin, TX.
- Fenton, M.B. 2003. Science and the conservation of bats: where to next? *Wildlife Society Bulletin* 31:6-15.
- Fenton, M.B., y W. Bogdanowicz, 2002. Relationships between external morphology and foraging behaviour: bats in the genus *Myotis*. *Canadian Journal of Zoology* 80:1004-1013.
- Fleming, H.T., A. Nelson y V.M Dalton. 1998. Roosting behavior of lesser long-nosed bat *Leptonycteris curasoae*. *Journal of Mammalogy* 79:147-155.
- Fleming, T.H. y V.J. Sosa. 1994. Effects of nectarivorous and frugivorous mammals on reproductive success of plants. *Journal of Mammalogy* 75:845-851.



Gaisler, J. y J. Chytil. 2002. Mark-recapture results and changes in bat abundance at the cave of Na Turoldu, Czech Republic. *Folia Zoologica* 51:1-10.

Galindo, C., A. Sánchez, R.H. Quijan y G. Herrera. 2004. Populations dynamics of a resident colony of *Leptonycteris curasoae* (Chiroptera: Phyllostomidae) in Central México. *Biotropica* 36:382-391.

Galindo-González, J. 1998. Dispersión de semillas por murciélagos: su importancia en la conservación y regeneración del bosque tropical. *Acta Zoológica Mexicana (n. s.)* 73:57-74.

Gardner, R.A., D.H. Molyneaux y R.E. Stebbings. 1987. Studies on the prevalence of heamatozoa of British bats. *Mammal Review* 17:75-80.

Griffin, D.R. 1958. *Listening in the dark*. Yale University Press. New Haven, CT.

Guillén-Servent, A. 1998. *Plan de recuperación del Rinolofo mediano y otras especies de murciélagos cavernícolas en la Comunidad Valenciana. Informe inédito*. Cancillería de Agricultura, Pesca y de la Ganadería Valenciana, Valencia, España.

Hutson, A.M., S.P. Mickleburgh, y P.A. Racey. 2001. *Global status survey and conservation action plan: Microchiropteran bats*. IUCN/SSC Chiroptera Specialist Group.

Joint Working Group BFRU. 1993 Removal of blood from laboratory mammals and birds: First Report of the BVA/FRAME/RSPCA/UFAW Joint Working Group on Refinement. *Laboratory Animals* 27:1-22.

Jones, G. y J. Rydell. 2003. Attack and defense: Interactions between echolocating bats and their insect prey. Pp.301-345. En: Kunz, T.H. y M.B. Fenton (eds.). *Bat ecology*. The University of Chicago Press. Chicago, IL.

Kalcounis-Rüppell, M.C., T.J. Brown, P.T. Handford y R.A. Ojeda. 2003. Preliminary notes on bat activity and echolocation in northwestern Argentina. *Mastozoología Neotropical* 10:331-339.

Kalko, K.E. 2002. Neotropical leaf-nosed bats (Phyllostomidae): "Whispering" bats as a candidates for acoustic surveys? Pp. 63-69. En: Brigham, M., E. Kalko, G. Jones, S. Parsons y H. Limpens (eds.). *Bat echolocation research. Tools techniques and analysis*. Bat Conservation International. Austin, TX.

Kunz, H.T. y L.F. Lumsden. 2003. Ecology of cavity and foliage roosting bats. Pp. 3-89. En: Kunz, T.H. y M.B. Fenton (eds.). *Ecology of bats*. University of Chicago Press. Chicago, IL.

- Kunz, H.T., M. Betke, N.I. Hristov y M.J. Vonhof. 2009. Methods for assessing abundance of bats. Pp. 133-157. En: Kunz, T.H. y S. Parsons (eds.). *Ecological and behavioral methods for the study of bats*. Johns Hopkins University Press. Baltimore, MD.
- Lee, Y.F. y G.F. McCracken. 2002. Foraging activity and food resource use of Brazilian free-tailed bats, *Tadarida brasiliensis* (Molossidae). *Ecoscience* 9:306-313.
- Limpens, H.J.G.A. y G.F. Mccracken. 2004. Choosing a bat detector: Theoretical and practical aspects. Pp. 28-37. En: Brigham, R.M., E.K.V. Kalko, G. Jones, S. Parsons y H.J.G.A. Limpens (eds.). *Bat echolocation research. Tools, techniques and analysis*. Bat Conservation International. Austin, TX.
- Lisón, F. 2011. *Clave de identificación de las llamadas de ecolocación de los murciélagos de la Península Ibérica*. Versión electrónica 1.0. URL.
- McCracken, F.G. 1986. Why are we losing our Mexican Free-tailed Bats? *Bats* 3:1-4.
- McCracken, F.G. 1989. Cave conservation: special problems of bats. *National Speleological Society Bulletin* 51:47-51.
- Medellín R.A., H. Arita y O. Sánchez. 2008. *Identificación de los murciélagos de México, clave de campo*, 2da. ed. Instituto de Ecología, UNAM. México.
- Mickleburgh, P.S., A.M Hutson, y P.A. Racey. 2002. A review of the global conservation status of bats. *Oryx* 36:18-34.
- Neuweiler, G. 2000. *The biology of bats*. Oxford University Press. Oxford, N.Y.
- Norma Oficial Mexicana NOM-033-ZOO-1995, Sacrificio humanitario de los animales domésticos y silvestres. Secretaria de Agricultura, Ganadería y Desarrollo Rural. México.
- Novo, W.K., S.G. Henry y T.E. Ingersoll. 2002. Observation of swarming by bats and bat recoveries in Colorado. *Western North American Naturalist* 62:124-126.
- O'Donnell, C.F.J. y J.A. Sedgely. 2001. *Guidelines for survey and monitoring Long-Tailed Bats populations using line transects*. Department of Conservation Science Internal Series 12 Department of Conservation. Wellington, New Zeland.
- O'Farrell, M.J. y Gannon, W. L. 1999. A comparison of acoustic versus capture techniques for the inventory of bats. *Journal of Mammalogy* 80:24-30.
- O'Farrell, M.J., C. Corben y W.L. Gannon. 2000. Geographic variation in the echolocation calls of the hoary bat (*Lasiurus cinereus*). *Acta Chiropterologica* 2:185-196.

- O'Shea, J.T., M.A. Bogan y L.E. Ellison. 2003. Monitoring trends in bat population of the United States and Territories: status of science and recommendation for the future. *Wildlife Society Bulletin* 31:16-29.
- Parsons, S., A. M. Boonman y M. K. Obrist. 2000. Advantages and disadvantages of techniques for transforming and analyzing chiropteran echolocation calls. *Journal of Mammalogy* 81:927-938.
- Ralph, C.J., G.R. Geupel, P. Pyle, T.E. Martin, D.F. DeSante y B. Milá. 1996. *Manual de métodos de campo para el monitoreo de aves terrestres*. General and Technical Report PSW-GTR-159. U.S.D.A., Forest Service, Pacific Southwest Research Station.
- Reuter, A. y O. Vargas. 2011. *Bioseguridad y prevención de accidentes: consideraciones básicas sobre enfermedades zoonóticas relacionadas a la manipulación de animales vivos de fauna silvestre*. Módulo de capacitación. Departamento de los E.E.U.U., TRAFFIC Norteamérica, WWF México.
- Rizo-Aguilar, A. 2008. *Descripción y análisis de los pulsos de ecolocación de 14 especies de murciélagos insectívoros aéreos del Estado de Morelos*. Tesis de Maestría. Posgrado en Manejo de Fauna Silvestre. Instituto de Ecología, A.C. Xalapa, Veracruz, México.
- Rodales, A. y E. Juri. 2006. ¿Cómo se capturan murciélagos en Uruguay? *Grupo de Investigación de los Murciélagos. Boletín Electrónico*. 2(3):2-4.
- Rodrigues, L. 1996. *Utilización de rejas para la protección de refugios de murciélagos cavernícolas*. Tesis de Maestría. Departamento de Zoología y Antropología, Facultad de Ciencias, Universidad de Lisboa. Portugal.
- Rodrigues, L. y L.M. Palmeirim. 1994. An infrared video system to count and identify emerging bats. *Bat Research News* 35:77-79.
- Romero-Almaraz, M.L., C. Sánchez-Hernández, C. García-Estrada y D.R. Owen. 2007. *Mamíferos pequeños. Manual de técnicas de captura, preparación, preservación y estudio*. Universidad Nacional Autónoma de México (Facultad de Ciencias e Instituto de Biología) y Centro de Investigaciones Biológicas, Universidad Autónoma del Estado de México. México.
- Rydell, J., H.T. Arita, M. Santos y J. Granados. 2002. Acoustic identification of insectivorous bats (order Chiroptera) of Yucatan, Mexico. *Journal of Zoology* 257:27-36.
- Schnitzler, H.U. y E.K.V. Kalko. 2001. Echolocation by insect-eating bats. *BioScience* 51:557-569.

Shirley M.D.F., V.L. Armitage, T.L. Barden, M. Gough, P.W.W. Lurz, D.E. Oatway, A.B. South y S.P. Rushton. 2001. Assessing the impact of a music festival on the emergence behaviour of a breeding colony of Daubenton's bats (*Myotis daubentonii*). *Journal of Zoology* 254:367-373.

Simmons, N.B. 2005. Order Chiroptera. Pp. 312-529. En: Wilson D.E. y D.M. Reeder (eds.). *Mammal species of the World: A taxonomic and geographic reference*, 3rd ed. Johns Hopkins University Press. Baltimore, MD.

Thomas, W.D. y K.R. La Val. 1988. Sampling methods for bats. Pp 77-90. En: Kunz, T.H. y P.A. Racey (eds.). *Ecological and behavioral methods for the study of bats*. Smithsonian Institution Press. Washington, D.C.

Tuttle, D.M. 2003. Estimating population sizes of hibernating bats in caves and mines. Pp. 31-39. En: O'Shea, J.T. y M.A. Bogan. (eds.). *Monitoring trends in bats populations of the Unites States and territories: Problems and prospects*: U.S. Geological Survey, Biological Resources Discipline, Information and Technology Report, USGS/BRD/ITR--2003-0003.

Wilson, D.E. 2002. *Murciélagos, respuestas al vuelo*. Universidad Veracruzana, Xalapa, Veracruz.

Wilson, D.E., F.R. Cole, J.D. Nichols, R. Rudran y M.S. Foster (eds.). 1996. *Measuring and monitoring biological diversity: Standard methods for mammals*. Smithsonian Institution Press. Washington, D.C.

# capítulo nueve

## Métodos de investigación social: fundamentos, técnicas y aportaciones para el entendimiento de las relaciones sociedad-vida silvestre

*Alicia Castillo Álvarez y Juan L. Peña-Mondragón*

### INTRODUCCIÓN

La conservación de la vida silvestre continúa siendo un asunto prioritario tanto para los gobiernos y las agencias encargadas de la formulación e implementación de las políticas públicas, así como para los diversos grupos e individuos que conforman nuestras sociedades contemporáneas. El sector académico desempeña un papel fundamental generando y brindando a los sectores sociales que lo requieren, información científica que permita contribuir al entendimiento de los problemas relacionados con el estado actual de la vida silvestre, así como sobre los problemas que enfrenta y las necesidades que las sociedades deben atender para su mantenimiento en el corto, mediano y largo plazo.

Las ciencias naturales han sido las encargadas de proveer gran parte de la información sobre la vida silvestre y de construir las explicaciones pertinentes para la toma de decisiones sobre el aprovechamiento, la conservación y actualmente sobre la necesaria restauración de ecosistemas. Gracias a los avances tecnológicos en el instrumental científico, muchas investigaciones hoy en día aportan datos esenciales sobre la distribución, estados de deterioro y/o conservación de los hábitats de muchas especies, así como sobre el impacto de las actividades humanas sobre éstas. Las ciencias sociales, por otro lado, no han sido ajenas a generar conocimiento sobre las relaciones sociedad-naturaleza (Endter-Wada *et al.* 1998, Descola y Pálsson 2002). Sin embargo, es importante señalar que aunque estas dos grandes esferas de la

ciencia han brindado aportaciones relevantes y continúan haciéndolo, son todavía escasas las interacciones y los cruces entre ambos ámbitos disciplina-rios. No obstante, cada vez se dan más esfuerzos de trabajo interdisciplinario y actualmente se incrementan los foros de intercambio y de publicación de carácter "híbrido". Es decir, cada vez se convocan a más reuniones académicas sobre temas como la economía ecológica, la sociología ambiental, la agro-ecología, los servicios brindados por los ecosistemas a las sociedades huma-nas, la conservación ambiental comunitaria, el saneamiento de cuencas y la ecología urbana, por mencionar algunos. Es importante reconocer que disci-plinas como la ecología humana o las diversas ramas de las llamadas Etno-ciencias (Etno-botánica, Etno-zoología, Etno-micología y Etno-ecología), se han desarrollado desde hace décadas y su evolución -tomando en cuenta que estudian los conocimientos tradicionales de sociedades nativas-, data de cien-tos de años (Argueta *et al.* 2012). Existen también en la actualidad revistas científicas que promueven el desarrollo de investigaciones que utilizan enfo-ques interdisciplinarios. Se tiene por ejemplo la revista *Ecology and Society*, creada en 1997 e inicialmente llamada *Conservation Ecology* constituida por un grupo formado principalmente por ecólogos ([www.ecologyandsociety.org](http://www.ecologyandsociety.org)). Por otro lado está también la revista *Society and Natural Resources* como la contraparte editada por la asociación internacional del mismo nombre y fundada en 1986 por académicos de las ciencias sociales ([www.iasnr.org](http://www.iasnr.org)). Sin embargo, queda todavía mucho por hacer para atender la generación de cono-cimientos que nos ayuden a desentrañar la complejidad de los problemas ambientales que enfrentamos desde las escalas locales hasta el nivel global.

Resulta esencial consecuentemente, continuar impulsando una mayor y mejor comunicación e interacción entre científicos de las ciencias naturales y de las ciencias sociales interesados en contribuir al entendimiento integral de los problemas ambientales y aquellos relacionados con el mantenimiento de la vida silvestre. Para ello, es fundamental que académicos y estudiantes de ambas esferas, conozcan y entiendan los enfoques metodológicos y los méto-dos de investigación utilizados en cada ámbito disciplinario. El objetivo cen-tral de este capítulo es introducir a colegas provenientes principalmente de disciplinas de las ciencias naturales, en la investigación de las dimensiones

sociales relacionadas con la vida silvestre. Cabe mencionar que a lo largo del capítulo se utiliza el término investigador (masculino) pero en este se incluye, desde luego, a investigadoras y estudiantes del sexo femenino.

Las explicaciones construidas desde las ciencias naturales, nos permiten en la actualidad comprender diversos aspectos de la complejidad del fenómeno de la vida en la Tierra. En los últimos tiempos, sin embargo, las consecuencias de la presencia humana sobre prácticamente todos los hábitats planetarios han desencadenado transformaciones en los paisajes y alteraciones a numerosos ciclos y procesos ecológicos (Vitousek *et al.*1997). Lo anterior provoca que el mismo ser humano, generen conocimientos que ayudan a entender la gravedad del deterioro ambiental y sus consecuencias para la supervivencia de todos los habitantes del planeta, incluida la propia especie. Se busca entonces contestar preguntas sobre los problemas desde ópticas que integren el entendimiento de los componentes y funcionamiento de los sistemas naturales, a la vez que se analicen los procesos sociales relacionados con cómo los humanos interactuamos con el ambiente (Ehrlich 1997). Entender los procesos de toma de decisiones es fundamental en estos análisis y para ello es necesario entender principios básicos de la investigación social. Cabe resaltar que aunque son pocos todavía los trabajos que abordan problemas sobre la vida silvestre que incluyen un análisis de las dimensiones sociales, las investigaciones de carácter interdisciplinario sobre los actualmente denominados sistemas socio-ecológicos, se reconocen cada vez más como indispensables para lograr entendimientos integrales de los problemas ambientales y la urgente necesidad de construir alternativas que mitiguen y logren solucionar dichos problemas (Berkes y Folke 2000).

### **Distintas miradas desde la investigación social**

Es importante señalar que en las ciencias sociales se analiza, discute y debate continuamente no solamente qué se investiga sino también desde qué perspectivas se abordan los problemas, lo cual tiene implicaciones sobre los métodos y análisis que se utilizan. Se examinan cuestiones relacionadas con cómo se entiende la realidad (ontología), el conocimiento (epistemología), así como sobre su construcción (Cantrell 1996, Newing 2011). Históricamente, las cien-

cias sociales han derivado su forma de trabajo adoptando las perspectivas metodológicas de las ciencias naturales (Denzin y Lincoln 2000) y en muchos casos enfatizan la necesidad de identificar las variables involucradas en algún fenómeno y diseñar instrumentos para medirlas. Por otro lado, desde disciplinas como la antropología, muchas investigaciones buscan entender los significados que los individuos dan a sus acciones y a las de otras personas, y han diseñado y utilizado instrumentos de investigación que les permiten coleccionar información textual (lo que las personas dicen cuando se les hacen preguntas de forma abierta), con lo que se construyen narrativas que describen y explican de manera profunda aspectos de la vida de los sujetos y comunidades sociales (Tarrés 2004). La diferencia entre estas dos posturas o tradiciones que a grandes rasgos se pueden identificar como positivista e interpretativista, se relaciona con las nociones antes mencionadas sobre la naturaleza de la realidad, el conocimiento y la metodología para generar dicho conocimiento. En la postura positivista, se parte de la idea de que la realidad es única, fragmentable, medible y consecuentemente se pueden plantear leyes y hacer predicciones (Cantrell 1996). Por otro lado, los llamados interpretativistas, defienden que muchas preguntas de investigación se relacionan con entender cómo las personas conciben la realidad (adentrarse en el mundo subjetivo) y que entonces, la idea de realidad es una construcción social (O'Brien y Kollock 2011). Es decir, se busca documentar las ideas que tienen las personas sobre hechos y fenómenos y que determinan sus actos en la vida cotidiana (Berger y Luckmann 1991).

De estas posturas que, en efecto, no comparten las mismas nociones de realidad y qué de esta y a través de qué procedimientos podemos conocerla, se ha derivado una dualidad entre la investigación cuantitativa (identificada más con el positivismo) y la cualitativa (asociada con el interpretativismo y otras tradiciones similares de pensamiento). Sin embargo, esta división no debe tomarse como visiones opuestas y excluyentes. Lo cuantitativo y cualitativo se relaciona con el tipo de datos que se pueden obtener y en ambas posturas, se pueden utilizar métodos que obtengan tanto datos cuantitativos como cualitativos. Como en cualquier área de investigación (tanto en ciencias naturales como sociales), son las preguntas específicas las que guían la información



pertinente a coleccionar y tanto la toma de datos que se puedan cuantificar como aquellos de corte cualitativo, deben utilizarse para contestar y cumplir los objetivos de un proyecto de investigación determinado.

En los trabajos sobre vida silvestre que buscan entender las dimensiones sociales, se pueden tener preguntas sobre aspectos específicos que es pertinente contestar coleccionando datos cuantitativos o cualitativos. Preguntas tales como cuánta leña utiliza una familia a la semana, cuáles son los sitios en donde se coleccionan plantas medicinales o cuántas cabezas de ganado son depredadas por animales carnívoros, requieren de diseñar instrumentos a través de los cuales se obtenga información cuantitativa precisa. Cuando, por otro lado, se requiere entender cuál es la percepción de una familia sobre la importancia de la leña o las plantas medicinales en sus vidas, o sobre cómo se valora a animales tales como jaguares, pumas o lobos en una comunidad, las preguntas y formas de análisis de los datos son distintas. Los instrumentos de investigación, consecuentemente, deben diseñarse acordes con los objetivos que se persiguen.

Es importante señalar también que el posicionamiento de una investigación en cuanto a las nociones ontológicas, epistemológicas y metodológicas es relevante ya que el diseño de una estrategia de investigación, así como los métodos e instrumentos que se utilizarán para coleccionar la información deben ser acordes con algún posicionamiento (Cantrell 1996). Nuestro grupo de trabajo ha seguido un paradigma de corte esencialmente interpretativista ya que nuestros temas de investigación han buscado entender las perspectivas de los actores involucrados en los fenómenos bajo estudio (ver Castillo *et al.* 2005a, Castillo *et al.* 2009, Pujadas y Castillo 2007, Schroeder y Castillo 2012, Peña-Mondragón y Castillo 2013). Nos ha interesado fundamentalmente, desarrollar proyectos que permitan dar voz a los individuos o colectividades que están en contacto directo con la vida silvestre así como a aquellos actores que influyen la toma de decisiones sobre el manejo de ecosistemas y la gestión ambiental relacionada con la formulación e implementación de políticas públicas. Es por ello, que en este capítulo presentamos principalmente los métodos utilizados en la investigación interpretativista que busca esencial-

mente adentrarse en entender las interacciones sociales y los sentidos y significados que dan a estas relaciones, los actores involucrados (Sánchez-Serrano 2004).

### **Las técnicas de investigación**

Una primera cuestión que es esencial tomar en cuenta cuando se incorpora la investigación social en los análisis sobre vida silvestre es que en estos estudios se trabaja con "sujetos" y no con "objetos" de investigación. Consecuentemente, las relaciones que se establecen entre investigadores e individuos o grupos sociales deben considerarse como relaciones entre humanos. Esto no significa que un académico (investigador o estudiante) deba necesariamente establecer relaciones de amistad o de otro tipo con las personas, pero sí es importante tener siempre en mente que los sujetos de estudio son personas como nosotros. La investigación social la hacen humanos sobre los propios humanos.

Por otro lado y al igual que en las ciencias naturales, cualquier investigación sobre las dimensiones sociales (ya sea exploratorio, complementario o sea el interés principal de un estudio) requiere ser planeado y diseñado siguiendo principios de rigor científico. Es decir, deben existir protocolos claros sobre las preguntas que se busca contestar, los objetivos de la investigación y el diseño claro y detallado de los pasos metodológicos que se seguirán. Asimismo, se debe tener claridad sobre qué tipo de datos se coleccionarán y cómo se analizarán dichos datos.

Antes de comenzar una investigación, es importante tomar en cuenta que son necesarios algunos pasos previos que permitan lograr el acceso al sitio de estudio. Al trabajar con personas, es importante que éstas no solamente conozcan y entiendan el tema de una investigación, sino es esencial primero solicitar su autorización para llevar a cabo un trabajo. Asimismo, se debe en todo momento generar confianza en la gente a través de conducirnos con respeto y seriedad. Un aspecto de gran importancia se relaciona con la confidencialidad de la información que las personas le brindan al investigador. Los sujetos bajo estudio deben conocer cómo se usará la información que

provean y debe preguntárseles si desean permanecer en anonimato (tanto como individuos o como organizaciones sociales). Estos principios de carácter ético deben tomarse en cuenta desde la etapa de diseño de una investigación y continuarse hasta la publicación y difusión de los resultados obtenidos (Watson 2011). En el Recuadro 1 se presenta un resumen de las cuestiones a tomar en cuenta cuando se inicia un proyecto de investigación social.

#### Recuadro 1. Acceso a campo

- Solicitar permiso para realizar la investigación con las autoridades locales pertinentes (comisariados ejidales, comunales, agentes municipales, presidentes municipales).
- Solicitar los permisos por escrito (de preferencia en papel membretado de una institución u organización social).
- Explicar en las solicitudes qué se va a hacer: platicar con las personas, acompañarlas a campo, organizar talleres. Si se busca grabar entrevistas o grabar en video los talleres, incluir estas cuestiones en una solicitud.
- Utilizar ropa adecuada (no llamativa o muy diferente a la usada por los pobladores locales)
- Actuar con ética durante todo el trabajo de campo. Asegurar los aspectos de respeto a las personas, confidencialidad de la información, no causar conflictos entre los miembros de una comunidad.
- No establecer con una comunidad, compromisos que no se cumplirán.

A continuación se describen los principales métodos utilizados en investigación social, teniendo en mente su utilidad para generar conocimientos que ayuden a entender las problemáticas que enfrenta la vida silvestre. Como se mencionó antes, nos parece que la perspectiva interpretativista de investigación posee diversas ventajas en este sentido y consecuentemente se presentan sus principales métodos: la observación participante, la entrevista individual, los grupos focales y la revisión documental. Incluimos también el método de la encuesta que aunque es el instrumento preferente de la perspectiva positivista, las encuestas son muy útiles para obtener información y pueden diseñarse desde visiones no positivistas (ver Drury *et al.* 2011). Finalmente se incluye también lo que se conoce como investigación acción participativa por

su relevancia en los trabajos que buscan incrementar la calidad de vida de las poblaciones humanas, a la vez que contribuir al mantenimiento de los procesos que sustentan la vida en nuestro planeta y de los cuales las sociedades obtienen diversos bienes y servicios. Para cada método que se explica, se incluye un recuadro con las principales recomendaciones que deben tomarse en cuenta.

### **Observación participante**

La observación puede considerarse como la base de las ciencias; el ser humano formula preguntas a partir de la observación de los fenómenos a su alrededor (Chalmers 1982). La observación en las ciencias sociales se utiliza como método particular a través del cual un investigador se ubica como espectador de lo que ocurre en los escenarios en los que trabaja y a partir de observar, obtiene información que es útil para la construcción de descripciones y explicaciones. Como método, se puede realizar tanto observación no participante como participante. La primera son los registros que hace un investigador de manera estructurada, sin tomar parte en los eventos que observa. Aunque se acepta que un observador generalmente afecta de alguna forma el fenómeno observado, este tipo de observación busca que el investigador logre mantenerse al margen del fenómeno y solamente documente lo que observa (Angrosino y Mays de Pérez 2000). Por otro lado, la observación participante es un método de corte interactivo que busca que el investigador se involucre con el grupo social bajo estudio y que, de dicha interacción, documente las ideas, opiniones, valorizaciones, acciones y conflictos vividos por los sujetos de estudio. El investigador busca entender qué hacen las personas y por qué hacen lo que hacen (Puri 2011). En ambos tipos de observaciones, los investigadores deben ser capaces de reportar sus resultados evitando sesgos derivados de su presencia o participación en lo observado. El Recuadro 2 resume lo que debe tomarse en cuenta al utilizar el método de observación participante y en el Recuadro 3 se brindan recomendaciones para la recopilación de la información obtenida de la observación en una libreta de campo.

### Recuadro 2. Observación participante

- Respetar las costumbres de la comunidad en la que se trabaje.
- Observar los asuntos de interés y platicar con las personas manteniendo el respeto y los principios de confidencialidad de la información que se obtenga.
- Registrar la información de forma ordenada en una libreta de campo.
- Escoger los momentos en que se registrará la información buscando no ser intrusivo (en lugares no vistosos o al terminar el día).
- Registrar la información de forma sistemática (escribir las notas todos los días; no dejar de hacerlo durante varios días porque los recuerdos se borran o se confunden si se deja pasar demasiado tiempo).

### Recuadro 3. ¿Qué incluir en las notas de campo?

- En las notas de campo se incluye lo que se ha visto y/o escuchado.
- Incluir hora, día y lugar de observación, así como datos específicos tal como se observaron o escucharon (números, palabras, frases) sobre los temas de investigación.
- Anotar impresiones sensoriales tales como sonidos, olores, sabores, o descripciones de imágenes que son parte de la experiencia vivida.
- Se recomienda dividir en secciones la libreta de campo y tomar las notas de manera estructurada.
- Separar las notas que describen lo observado, escuchado o que fue parte de una conversación con algún actor social de las notas que surgen del propio proceso de investigación (cuestionamientos conceptuales o ideas que servirán para explicar o discutir los resultados de la investigación).
- Anotar preguntas que surgen para posibles investigaciones futuras.

## Entrevista individual

La entrevista es quizás el método más utilizado en investigación social. Se puede definir la entrevista como una conversación entre dos o más personas y cuando su objetivo es académico, el entrevistador busca obtener información del entrevistado en referencia a su tema de estudio. De acuerdo con Sierra (1998), la entrevista debe ser vista como un acto de comunicación que es diná-

mico y el cual es influenciado por los contextos sociales particulares de aquellos que participan en ella. Para que una entrevista cumpla su objetivo, el entrevistador debe utilizar un lenguaje que pueda ser entendido por el entrevistado y asegurar que se establece un intercambio fluido de ideas. Una cuestión importante para lograr este intercambio es preparar con anterioridad una lista de temas y preguntas que sirvan de guía en la conversación. Lo anterior no significa que se tenga un cuestionario rígido; hay que recordar que la entrevista busca obtener las ideas del entrevistado y para esto, debe dejársele hablar. Las entrevistas consisten generalmente de preguntas abiertas y la finalidad de tener una guía permite que la entrevista aborde los temas generales de interés para el investigador. Cabe resaltar también que para mantener una comunicación abierta, es importante que el lugar donde se lleve a cabo una entrevista sea cómodo para el entrevistado; se recomienda que sean lugares familiares para este en donde se sienta en confianza para compartir sus visiones.

Debido a que las entrevistas pueden tomar tiempos largos (dependiendo de la profundidad con la que se busque tratar un tema), y con el objetivo de poder llevar a cabo un análisis fino y riguroso de la información, se recomienda grabar en audio una conversación. Para esto, debe solicitarse la autorización del entrevistado explicando las razones por las que se quiere grabar (no perder detalle de lo que el entrevistado dice ya que sus ideas son de mucha relevancia para el investigador) y asegurando, cuando la situación lo requiera o lo solicite el entrevistado, mantener el anonimato de la persona en cuestión. Cabe señalar que en la actualidad existen grabadoras digitales de tamaño pequeño con capacidades muy buenas para eliminar ruidos y lograr obtener grabaciones nítidas. Las transcripciones de las entrevistas, deben hacerse utilizando los instrumentos apropiados (dictáfonos) y no escuchando directamente una grabación. Para poder analizar con detalle la información obtenida en una entrevista, es fundamental contar con transcripciones muy bien hechas. En el Recuadro 4 se brindan recomendaciones útiles para la conducción de entrevistas.

#### Recuadro 4. Preparación y conducción de entrevistas individuales

- Explicar con claridad los propósitos de la entrevista y establecer relaciones cordiales y de respeto con los sujetos de estudio.
- Explicar que la información solicitada se usará con fines de investigación y asegurar que se respetará la confidencialidad.
- Asegurar que la persona entrevistada entiende las preguntas que se le hacen.
- Diseñar las preguntas de tal forma que no exista sesgo; es decir que no exista una sugerencia de respuesta. Ejemplo de una pregunta con sesgo puede ser: ¿Le parece que las víboras son animales dañinos? La pregunta abierta debería ser ¿Qué piensa sobre las víboras?
- Mostrar interés en lo que expresa el entrevistado.

### Grupos focales

Se utilizan los principios generales usados para las entrevistas individuales pero debe tomarse en cuenta que la circunstancias son muy distintas cuando se entrevista a un grupo. La principal ventaja de las entrevistas grupales o focales es que al hablar con un grupo de personas, se estimulan los recuerdos entre ellos y se generan procesos de reflexión y discusión grupal que son muy buenos para obtener información. Se recomienda usar este método con grupos de entre seis y ocho personas ya que el manejo de grupos más grandes es difícil. El número de temas a tratar disminuye en relación con las entrevistas individuales ya que son varios los sujetos que tomarán la palabra (Russi 1998). Es importante que el conductor de un grupo focal coordine de manera eficaz el uso de la palabra, tratando de que las personas no hablen al mismo tiempo y procurando que no sean unas pocas las que dominen la conversación. De ser posible, es importante contar con el apoyo de una o dos personas más; se puede tener un relator que se encarga de la grabación (si se obtuvo la autorización del grupo) o de escribir lo que se está diciendo. Además, un observador puede apoyar al conductor en la identificación de temas que no se han abordado o en tomar notas sobre la dinámica interna del grupo: quiénes dominan, quiénes se perciben cohibidos o presentan señales de no estar de acuerdo. Esta información puede ser muy útil cuando se analiza la informa-

ción obtenida de una entrevista grupal.

Tanto en la entrevista individual como en el grupo focal, se recomienda ampliamente llevar a cabo pruebas piloto, de preferencia con el tipo de sujetos con quienes se trabajará una investigación. La información obtenida en las pruebas piloto puede también utilizarse en los análisis; esto dependerá de la calidad de los datos obtenidos. En el Recuadro 5 se brindan recomendaciones generales para los grupos focales.

#### Recuadro 5. Preparación y conducción de grupos focales

- Tener criterios claros sobre a quiénes se invitará a participar en un grupo focal.
- Explicar la dinámica de trabajo al grupo focal.
- Conducir el grupo de tal forma que todos los participantes puedan expresar sus ideas.
- Ser sensible a situaciones de incomodidad de los participantes y reforzar la confianza en el trabajo que se está realizando.
- Proveer agua, café y alimentos de ser necesario y como una forma de crear un ambiente propicio para el desarrollo de la actividad.

Antes de continuar con la descripción de los siguientes métodos, es necesario abordar el tema del muestreo, sobre todo cuando se está haciendo una investigación de carácter interpretativista. Como se ha insistido, el diseño de una investigación depende de sus objetivos. El tipo de muestreo, asimismo, dependerá de las preguntas de investigación que se tengan. Cuando se busca obtener la visión de una comunidad o un grupo social y que las distintas miradas surjan en la investigación, se recomienda utilizar muestreos al azar para conducir las entrevistas apropiadas. Si el tema de investigación se relaciona con algún problema específico, por ejemplo, la gestión de una unidad de manejo para la conservación de la vida silvestre (UMA), se requiere la identificación de lo que se conoce como "informantes clave" que se pueden definir como aquellas personas que tienen el conocimiento sobre los temas particulares de investigación (Patton 2002). Pueden considerarse como expertos de campo y convertirse en muchas ocasiones en coautores de un estudio ya que ayudan al investigador a entender el escenario debido a que poseen información rele-



vante, además de gozar de la confianza y prestigio de su comunidad (Sánchez-Serrano 2004). En estos casos y muchos otros en la investigación interpretativista, se utiliza el muestreo "bola de nieve" que consiste en que un informante clave puede identificar e introducirnos con otros informantes clave. El tamaño de muestra se determina cuando la información vertida en las entrevistas se repite. Es decir cuando se llega a una saturación de los datos obtenidos. Es cuando se puede decidir que se ha logrado coleccionar la información necesaria para construir las descripciones y explicaciones buscadas (Taylor y Bogdan 2010).

### **Revisión documental**

Los documentos son una fuente importante de información. Además de que en toda investigación se incluye una revisión de la literatura científica sobre el tema específico que se trabaja, en investigación social, los documentos (concebidos como productos de las sociedades humanas) se pueden analizar de forma sistemática y constituir una fuente de datos en sí misma.

### **Encuestas**

La encuesta es también uno de los métodos más utilizados en ciencias sociales (López 1998) y quizás al que más han recurrido los biólogos y otros científicos naturales interesados en abordar aspectos sociales relacionados con la conservación (Drury *et al.* 2011). Lo anterior debido a que es un método que permite cuantificar y algunos de los pasos metodológicos para su uso, requieren de conocimientos de estadística que se comparten con las ciencias naturales. No obstante, desde hace décadas (Lewis 1946), se le ha criticado porque puede producir resultados superficiales sobre los fenómenos sociales, siendo lo anterior no un problema del método en sí, sino de cómo se ha utilizado y se le ha sobrevalorado debido a que proporciona resultados fácilmente representables a través de diversas formas gráficas. A la vez que permite que se realicen análisis comparativos, en ocasiones de gran complejidad.

Las encuestas son generalmente cuestionarios de preguntas cerradas y parecería que son fáciles de construir ya que se requiere formular preguntas que se respondan de manera dicotómica (con opciones de respuesta: sí o no; sí me

gusta, no me gusta; sí estoy de acuerdo, no estoy de acuerdo) o dando de antemano a las personas a encuestar, opciones de posibles respuestas. El problema surge cuando las opciones dadas por un investigador, no son las respuestas que necesariamente daría una persona si se le preguntara lo mismo de manera abierta. Aunque difícil de ver, lo que sucede en muchas ocasiones es que se hacen preguntas que solamente confirman o no, lo que un investigador piensa o cree que es una respuesta. Para que una encuesta se pueda diseñar apropiadamente, deben conocerse con profundidad los contextos históricos, sociales y culturales de los grupos a investigar (Drury *et al.* 2011). Para lograr esto, se recomienda realizar estudios previos exploratorios utilizando métodos de corte cualitativo como los descritos antes. Asimismo, es recomendable realizar pruebas piloto que contemplen que las personas opinen de manera abierta sobre lo que se está preguntando. Cabe resaltar, no obstante, que las encuestas son un buen método cuando se busca coleccionar información específica como por ejemplo, para caracterizar un grupo social (edades, escolaridad, oficios, actividades económicas realizadas) o cuando se busca conocer aspectos específicos como el tamaño de parcelas agrícolas o de terrenos dejados

#### Recuadro 6. Preparación y levantamiento de encuestas

- Explicar por escrito o de forma oral a los sujetos de estudio, para qué se hace la encuesta.
- Asegurar que el lenguaje utilizado es el adecuado (necesario conocer a los grupos de estudio)
- Utilizar las técnicas de muestreo apropiadas de acuerdo con los análisis que se realizarán a los datos.
- Formular preguntas por temas y en un orden lógico (de lo general a lo particular o de acuerdo a eventos cronológicos por ejemplo).
- Al igual que en las entrevistas, diseñar las preguntas de tal forma que no exista sesgo.
- Asegurar que las opciones de respuesta están sustentadas en conocimientos previos sobre los contextos sociales de los sujetos de estudio.
- Tener claro las técnicas de análisis de datos (pruebas estadísticas) que se utilizarán.

como áreas de conservación, el número de veces que se va a un río a acarrear agua o a lavar ropa, por dar algunos ejemplos. En el Recuadro 6 se brindan recomendaciones generales para la realización de encuestas.

Otro aspecto que se debe abordar y que concierne a los métodos antes explicados es la triangulación. Esta es una forma de asegurar el rigor en la colecta de datos y consiste en verificar la información obtenida a través de cotejar datos provenientes de diversas fuentes, obtenidos por más de un investigador, o datos que se obtienen mediante diferentes métodos (Cantrell 1996). Estos procesos de verificación incrementan la credibilidad de las descripciones y explicaciones que se construyen.

### **El análisis de datos cualitativos**

Los datos cualitativos son esencialmente textos producto de las notas de campo, las transcripciones de entrevistas individuales y grupales o los propios documentos. Cabe señalar, no obstante, que son también datos cualitativos imágenes como dibujos, fotografías o grabaciones en video. Aunque existen programas de cómputo que facilitan el procesamiento de datos cualitativos, es importante aclarar que estos programas son solamente herramientas de apoyo. A diferencia de los programas estadísticos que realizan pruebas y arrojan resultados duros, en el análisis de datos cualitativos es el propio investigador quien realiza los análisis (interpretación). Las herramientas de cómputo son un apoyo técnico muy útil en el análisis riguroso de datos (Dey 1993). Nosotros recomendamos el programa Atlas.ti ([www.atlas.ti.com](http://www.atlas.ti.com)) cuyo formato es amigable y fácil de utilizar.

El procedimiento básico para el análisis de datos es leer línea por línea un texto e identificar cuáles son los significados expresados en dicho texto, qué se responde en relación con lo que se preguntó y de acuerdo con los objetivos particulares del estudio. Este tipo de análisis es inductivo ya que a partir de los datos se construyen las categorías y los patrones que describen y explican el fenómeno bajo estudio (Patton 2002). Lo importante de estos análisis es permitir que las ideas o respuestas emerjan de la revisión detallada línea por línea. De esta revisión se construyen categorías o códigos que reflejan las

ideas encontradas. Y con las categorías, se hacen usualmente diagramas en donde se ubican las categorías en un espacio bidimensional y se les relaciona entre sí obteniendo una especie de “mapa conceptual”. Los diagramas son una forma de presentar los resultados y se acompañan de una narrativa que los explique (ver Castillo *et al.* 2005b, López-Medellín *et al.* 2011). Asimismo, los resultados se pueden presentar en tablas e inclusive en gráficos que utilicen la frecuencia de citas (es decir, el número de fragmentos de texto a partir de los cuales se construyeron las categorías). Para llevar a cabo análisis de tipo cualitativo, se recomienda estudiar los fundamentos y procedimientos descritos en numerosos libros de metodología (por ejemplo, Álvarez-Gayou 2003, Creswell 1998, Tarrés 2004, Taylor y Bogdan 2010). Como se mencionó al inicio, este capítulo busca brindar un panorama muy general sobre los métodos de investigación social.

### **Investigación - acción participativa**

Con base en fuertes críticas a la investigación social por su poca contribución a resolver problemas concretos enfrentados por las sociedades, surgieron durante las últimas décadas, propuestas para hacer investigación vinculada con procesos de acción social para la construcción de soluciones (Chambers 1983). Se enfatiza en estas críticas la poca atención dada al entendimiento de los problemas enfrentados por grupos marginados (Chambers 1983, Lewis 1946).

La investigación acción participativa parte de reconocer que son las personas que viven una situación determinada quienes pueden identificar los problemas para los cuales se requiere realizar algún diagnóstico y que estas personas deben y pueden ser parte del proceso de investigación (Salazar 2006). Esto como una forma de contribuir a elevar sus niveles de conciencia sobre su propia realidad, a la vez que adquieren capacidades para valorar su propio conocimiento y generar nuevo conocimiento que es útil para ellos, sus familias y sus comunidades (Alcocer 1998). En temas relacionados con la vida silvestre, existe en México una experiencia vasta sobre métodos de diagnóstico participativo usados principalmente en contextos rurales y urbanos marginales (GEA 1993). La realización de talleres es una de las principales formas de construir conocimientos de manera participativa. Cabe resaltar que involucrarse en trabajos

de investigación acción participativa requiere de aceptar compromisos con los sujetos con quienes se trabaja que deben cumplirse y que los tiempos para llevar a cabo este tipo de proyectos, deben ser acordes con las vidas de estas personas y que los investigadores deben acoplarse a estas circunstancias.

Podemos recomendar, no obstante, el uso de talleres tanto para proyectos de carácter participativo, como para proyectos de investigación más convencional en los que se busque compartir con los sujetos de estudio los resultados de las investigaciones realizadas (Recuadro 7). Así como para verificar si las interpretaciones de la realidad de las personas hechas por los investigadores coinciden con las visiones de estas personas, lo anterior como una forma de triangulación. Compartir con las personas o grupos sociales el proceso de investigación, sin embargo, debería ser siempre parte integral de cualquier proyecto que busca contribuir a mejorar las relaciones entre los grupos humanos y la vida silvestre.

#### Recuadro 7. Preparación y facilitación de talleres (participativos y otros)

- Definir a quiénes se invitará a participar e invitar a las personas a través de los medios locales: carteles, altavoces, radio, entre otros posibles.
- Coordinar el equipo de trabajo (presentador, facilitadores si se trabajará por equipos, relatores)
- Asegurar que se utiliza lenguaje accesible para los participantes. Explicar con claridad cuáles son los propósitos del taller, qué actividades se realizarán y cuánto tiempo durará el taller.
- Ofrecer agua y/o comida (dependiendo de la duración del taller).
- Si se grabará en audio o video, obtener el permiso de los participantes.

#### Consideraciones finales

Incluir la investigación social en los trabajos que abordan problemas relacionados con la problemática enfrentada por la vida silvestre, es cada vez más reconocido como un aspecto esencial para construir visiones integrales de estos problemas. Son los estudios que entretujan la información biológico-ecológica de las especies, con aquella que describen y explican las relaciones

que las sociedades establecen con dichas especies y sus hábitats, los que proporcionan panoramas más complejos y sobre los cuales es posible nutrir la toma de decisiones. Para diseñar intervenciones que contribuyan a disminuir y mitigar el deterioro ambiental y que promuevan el tránsito hacia sociedades responsables de los ambientes naturales, es necesario comenzar con entender las necesidades, visiones, motivaciones y entendimientos de los diversos grupos sociales que conforman nuestra propia especie. Esperamos que este capítulo logre despertar y fortalecer un interés por asomarse y adentrarse al vasto mundo de las ciencias sociales y las importantes aportaciones que puede hacer para la conservación, uso y manejo sustentables de la vida silvestre.

## BIBLIOGRAFÍA

Alcocer, M. 1998. Investigación acción participativa. Pp. 433-463. En: Galindo, C.J. (coord.). *Técnicas de Investigación en sociedad, cultura y comunicación*. Pearson & Addison Wesley Longman. México.

Álvarez-Gayou, J.J.L. 2003. *Cómo hacer investigación cualitativa. Fundamentos y metodología*. Paidós. México.

Angrosino, M.V. y K.A. Mays de Pérez. 2000. Rethinking observation: from method to context. Pp. 673-702. En: Denzin, N.K. y Y.S. Lincoln (eds.). *Handbook of qualitative research*. SAGE Publications. Thousand Oaks, CA.

Argueta Villamar, A., E. Corona-M., G. Alcántara-Salinas, D. Santos-Fita, E.M. Aldasoro-Maya, R. Serrano Velázquez, C. Teutli-Solano y M. Astorga-Domínguez. 2012. Historia, situación actual y perspectivas de la etnozología en México. *Etnobiología* 10:18-40.

Berger, P. y T. Luckmann. 1991. *The social construction of reality*. Penguin Books. London.

Berkes, F. y C. Folke. 2000. Linking social and ecological systems for resilience and sustainability. Pp. 1-25. En: Berkes, F. y C. Folke (eds.). *Linking social and ecological systems. Management practices for social mechanisms for building resilience*. Cambridge University Press. Cambridge, UK.

Cantrell, D.C. 1996. Paradigmas alternativos para la investigación en educación ambiental. Pp. 97-123. En: Mrazek, R. (ed.). *Paradigmas alternativos de investigación en educación ambiental*. Universidad de Guadalajara, NAAEE y Secretaría de medio Ambiente, Recursos Naturales y Pesca. México.

Castillo, A., M.A. Magaña, A. Pujadas, L. Martínez y C. Godínez. 2005a. Understanding rural people interaction with ecosystems: a case study in a tropical dry forest of Mexico. *Ecosystems* 8: 630-643.

Castillo, A., A. Torres, G. Bocco y A. Velásquez. 2005b. The use of ecological science by rural producers: a case study in Mexico. *Ecological Applications* 15:745-756.

Castillo, A., C. Godínez, N. Schroeder, C. Galicia, A. Pujadas-Botey y L. Martínez. 2009. Los bosques tropicales secos en riesgo: conflictos entre uso agropecuario, desarrollo turístico y provisión de servicios ecosistémicos en la costa de Jalisco, México. *Interciencia* 34:844-850.

Chalmers, A.F. 1982. *¿Qué es esa cosa llamada ciencia?* Siglo XXI Editores. México.

Chambers, R. 1983. *Rural development. Putting the last first.* Pearson Education Limited. Nueva York, NY.

Creswell, J. W. 1998. Designing a qualitative study. Pp. 13–26. En: Creswell J.W. 1998. *Qualitative inquiry and research design. Choosing among five traditions.* SAGE Publications, Inc. Los Angeles, CA.

Denzin, N.K. y Y.S. Lincoln. 2000. Introduction. The discipline and practice of qualitative research. Pp. 1–28. En: Denzin, N.K. y Y.S. Lincoln (eds.). *Handbook of qualitative research.* SAGE Publications. Thousand Oaks, CA.

Descola, P y G. Pálsson. 2002. *Nature and society. Anthropological perspectives.* Routledge. London.

Dey, I. 1993. *Qualitative Data Analysis. A user-friendly guide for social scientists.* Routledge. London.

Drury, R., K. Homewood y S. Randall. 2011. Less is more: the potential of qualitative approaches in conservation research. *Animal Conservation* 14:18–24.

Ehrlich, P.R. 1997. *A world of wounds: ecologists and the human dilemma.* Excellence in Ecology Book 8, Ecology Institute. Oldendorf/Luhe, Alemania.

Endter-Wada, J., D. Blahna, R. Krannich y M. Brunson. 1998. A framework for understanding social science contributions to ecosystem management. *Ecological Applications* 8:891–904.

GEA (Grupo de Estudios Ambientales A.C.). 1993. *El proceso de evaluación rural participativa. Una propuesta metodológica.* Instituto de Recursos Mundiales y Grupo de Estudios Ambientales, A.C. México.

Lewis, K. 1946. La investigación-acción y los problemas de las minorías. Pp 15–25. En: Salazar, C.M. (coord.). 2006. *La investigación-acción participativa. Inicios y desarrollo.* Editorial Laboratorio Educativo. Caracas.

López, R.H. 1998. La metodología de la encuesta. Pp. 33–73. En: Galindo C.J. (coord.). 1998. *Técnicas de investigación en sociedad, cultura y comunicación.* Pearson & Addison Wesley Longman. México.

López-Medellín, X., A. Castillo y E. Ezcurra. 2011. Contrasting perspectives on mangroves in arid northwestern Mexico: implications for integrated coastal management. *Ocean & Coastal Management* 54:318–329.



Newing, H. 2011. *Conducting research in conservation. A social perspective*. Routledge. London

O'Brien, J. y P. Kollock. 2001. What is real? Pp. 3-14. En: O'Brien, J. y P. Kollock (eds.). *The production of reality. Essays and readings on social interaction*. SAGE Publications. Pine Forge, CA.

Patton, M.Q. 2002. *Qualitative research and evaluation methods*. SAGE Publications. Thousand Oaks, CA.

Peña-Mondragón, J.L. y A. Castillo. 2013. Depredación de ganado por jaguar y otros carnívoros en el noreste de México. *Therya* 4: 431-446.

Pujadas, A. y A. Castillo. 2007. Social participation in conservation efforts: a case study of a biosphere reserve on private lands in Mexico. *Society and Natural Resources* 20:57-72.

Puri, R.K. 2011. Participant observation. Pp. 85-97. In: Newing, H. (coord.). *Conducting research in conservation. A social perspective*. Routledge. London.

Russi, A.B. 1998. Grupos de discusión. De la investigación social a la investigación reflexiva. Pp. 75-115. En: Galindo, C.J. (coord.). 1998. *Técnicas de investigación en sociedad, cultura y comunicación*. Pearson & Addison Wesley Longman. México.

Salazar, M.C. (coord.). 2006. *La investigación-acción participativa. Inicios y desarrollos*. Editorial Laboratorio Educativo. Caracas.

Sánchez-Serrano, R. 2004. La observación participante como escenario y configuración de la diversidad de significados. Pp. 97-131. En: Tarrés, M.L. (coord.). *Observar, escuchar y comprender. Sobre la tradición cualitativa en investigación social*. Miguel Angel Porrúa, Facultad Latinoamericana de Ciencias Sociales (El Colegio de México). México.

Schroeder, N. y A. Castillo. 2012. Collective action in the management of a tropical dry forest ecosystem: effects of Mexico's property rights regime. *Environmental Management* 51:850-861.

Sierra, F. 1998. Función y sentido de la entrevista cualitativa en investigación social. Pp. 277-345. En: Galindo, C.J. (coord.). *Técnicas de investigación en sociedad, cultura y comunicación*. Pearson & Addison Wesley Longman. México.

Tarrés, M.L. Lo cualitativo como tradición. Pp. 35-60. En: Tarrés, M.L. (coord.). *Observar, escuchar y comprender. Sobre la tradición cualitativa en investigación social*. Miguel Angel Porrúa, Facultad Latinoamericana de Ciencias Sociales (El Colegio de México). México.

Taylor, S.J. y R. Bogdan. 2010. Descubriendo métodos. Pp. 133-151. En: Taylor, S.J. y R. Bogdan. *Introducción a los métodos cualitativos de investigación*. Paidós. Barcelona.

Vitousek, P.M., H.A. Mooney, J. Lubchenco y J. Melillo. 1997. Human domination of Earth's ecosystems. *Science* 277:494-499.

Watson, C.W. 2011. Ethical issues in research. Pp. 226-237. En: Newing, H. (coord.). *Conducting research in conservation. A social perspective*. Routledge. London.



