2.1 MATERIALES Y MÉTODOS.

2.1.1 Metodología de Campo.

2.1.1.1 Muestreo piloto.

Se realizó un muestreo piloto en cada playa rocosa del 26 de agosto al 2 de septiembre de 2000, con la finalidad de ajustar la metodología y estimar un tamaño de muestra. Se empleó el método de transecto paralelo a la línea de costa. El área muestreada en cada localidad fue de 16 m^2 con unidad muestral de 1 m^2.

2.1.1.2 Muestreos formales.

El ciclo de estudio comprendió 6 fechas de muestreo, que fueron septiembre y diciembre de 2000 así como marzo, junio, septiembre y diciembre de 2001, visitando en cada ocasión las nueve playas rocosas.

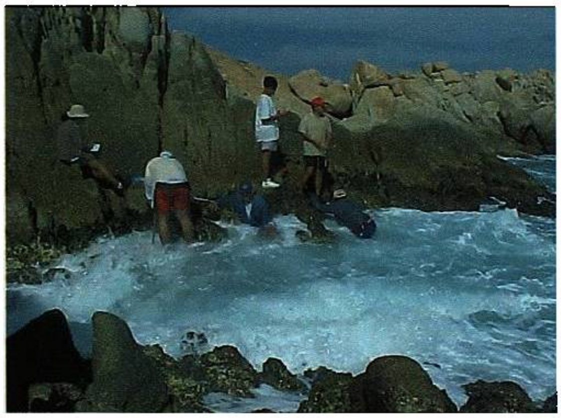
Todas las recolectas se realizaron en las fases de luna nueva y durante la marea baja. En cada playa rocosa se empleó una línea de 30 m de largo paralela a la línea de costa, con 2 m de amplitud en la zona definida como mesolitoral superior de acuerdo al criterio de zonación de Stephenson y Stephenson (1949). Verticalmente se precisaron dos niveles, llamando nivel I (inferior), a aquél que por debajo de su límite inferior, se encontraba la zona de balanos y erizos; y nivel II (superior), a aquél que por arriba de su límite superior, se encontraba la zona de neritas y litorinas.

La unidad muestral consistió en un cuadrante de 1 m de lado. El muestreo fue de tipo sistemático que Cochran (1980), Scheaffer *et al.* (1987), Perez (2000) y Badii *et al.* (2000), coinciden en mencionar que dicho diseño presenta ventajas desde el proceso de selección de la muestra, como mayor rapidez y facilidad de aplicación en campo, además de una menor varianza comparado con un muestreo aleatorio simple. El punto de partida fue seleccionado de manera aleatoria de entre tres puntos previamente definidos. El muestreo inició poniendo el cuadrante en el nivel I, procediendo a desprender manualmente los organismos y depositarlos en charolas etiquetadas. Posteriormente el cuadrante fue colocado en el nivel II, realizando la misma operación de recolecta. Al concluir los cuadrantes correspondientes al punto de inicio, se dejó un espacio de 2 metros entre el punto recién muestreado y el siguiente punto, repitiendo la misma operación hasta completar un total de 20 m^2 en cada playa rocosa (figura 15).

Las zonas de oviposición que se observaron dentro del área muestreada, fueron registradas tomando en cuenta aspectos como: posición de acuerdo a los niveles I y II, así como la morfología de la roca. Donde fue posible se registró el número de cápsulas, teniendo el máximo cuidado de no desprenderlas o dañarlas. La pendiente de cada cuadrante se registró por medio de un clinómetro. Al término de la recolecta los organismos se trasladaron a un laboratorio improvisado y en dicho lugar, fueron separados y contabilizados por sexo y nivel del mesolitoral donde fueron recolectados

El sexuado se llevó a cabo moviendo a los organismos como dados en un juego de azar, para después colocarlos con el opérculo hacia arriba. Los organismos emergían de la concha, tratando de adherirse al sustrato más cercano, para lo cual, se les ofrecía un dedo humedecido de agua marina u otro caracol. De esta manera, el sexo podía ser reconocido (figura 16). Los datos de longitud de la concha y peso total, se registraron de la siguiente manera: la longitud se midió a partir de la punta del ápice hasta la abertura del canal sifonal, con un calibrador tipo Vernier de precisión 0.02 mm; el peso se registró con una balanza digital con sensibilidad de 0.1 g.

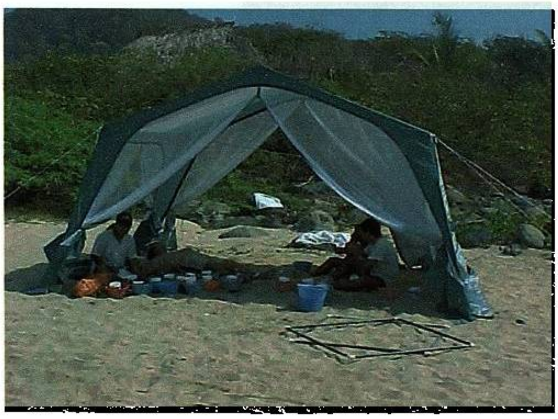
a)



b)

c)

d)



e)

f)

Figura 15. Actividades del muestreo: a, b y c, colocación del cuadrante en la zona intermareal; d, e y f, registro de datos biométricos.

A)

B)

Figura 16. A) Hembra y B) Macho, de *Plicopurpura patula pansa.*

Al término de las actividades, los caracoles fueron devueltos a la zona de estudio, teniendo cuidado en que volvieran a fijarse al sustrato.

La información sobre los promedios de temperatura (ºC) y precipitación mensual (mm), fueron proporcionados por siete sub-estaciones climatológicas de la Gerencia Regional Pacífico Centro, de la Comisión Nacional del Agua.

2.1.2 Metodología Estadística.

2.1.2.1. Calculo del tamaño de muestra.

El cálculo del tamaño de muestra se realizó de acuerdo al mejor ajuste a modelos Uniforme, Poisson y Binomial Negativa, que tuvieron las frecuencias observadas del número de organismos por cuadrante del muestreo piloto, con probabilidades de error α iguales a 0.1 y 0.05 así como errores estándar de 5, 10, 20 y 30%.

De acuerdo a a Badii *et al.* (2000), en el caso de datos ajustados a una distribución uniforme, el cálculo del tamaño de muestra se lleva a cabo con la siguiente fórmula:

$$n = \frac{\left[\left(1/m\right)-\left(1/K\right)\right]}{D^2}$$

donde:

n = Tamaño de muestra requerido para una distribución Uniforme.

m = Promedio.

D = error estándar

K = número máximo de individuos por unidad muestral o cuadrante.

Para el cálculo del tamaño de muestra a partir de modelos Poisson y Binomial Negativa, Krebs (1999) recomienda las siguientes fórmulas:

Poisson.

$$n \cong \left(\frac{200\mathrm{CV}}{r}\right)^2 = \left(\frac{200}{r}\right)^2 \frac{1}{\bar{x}}$$

donde:

n = Tamaño de muestra requerido para un modelo Poisson.

$\bar{x}$ = Promedio de organismos por cuadrante

r = Error estándar deseado (%).

CV = Coeficiente de variación = $\frac{1}{\sqrt{\bar{x}}}$

Binomial Negativa.

$$n = \frac{(100t_\alpha)^2}{r^2}\left(\frac{1}{\bar{x}} + \frac{1}{k}\right)$$

donde:

n = Tamaño de muestra requerido para un modelo Binomial Negativa.

t_α= Valor de tablas *t-Student* con n-1 grados de libertad y probabilidad α.

$\bar{x}$ = Promedio de organismos por cuadrante

r= Error estándar deseado (%).

k = Parámetro de Binomial Negativa

2.1.2.2 Patrón espacial.

Con la frecuencia de caracoles por cuadrante de los niveles I y II, se determinó el patrón espacial del caracol de tinte en cada playa rocosa y fecha de muestreo, mediante el uso de los siguientes índices:

Varianza/media (*V/m*) (Cox, 2002). Se calculó a partir de la densidad (caracoles/m^2) y varianza del número de caracoles en el área de muestreo. Toma un valor de 1 para poblaciones distribuidas de manera aleatoria; valores menores a 1 para poblaciones con tendencia a la uniformidad, y valores mayores a 1 para poblaciones agregadas Para evaluar la significancia estadística, el resultado fue multiplicado por *n*-1 (donde *n* es el número de unidades muestrales). Se rechaza H_o si $x^2_{calculada} \geq x^2_{tablas}$, con n-1 grados de libertad y probabilidad de error $\alpha = 0.05$

Índice de Morisita (I_d) (Brower, Zar y Ende, 1998). Fue calculado con la siguiente fórmula:

$$I_d = n\left[\frac{\sum x^2 - \sum x}{\left(\sum x\right)^2 - \sum x}\right]$$

donde:

I_d = Índice de Morisita.

n = Tamaño de la muestra.

Σx = Suma de las frecuencias por cuadrante = $x_1 + x_2 + x_3 \ldots$

Σx^2 = Suma de las frecuencias elevadas al cuadrado, por cuadrante = $x^2_1 + x^2_2 + x^2_3 \ldots$

La significancia estadística estuvo dada por:

$$x^2 = I_d\left(\sum x - 1\right) + n - \sum x \qquad \text{(d.f. = n-1)}$$

donde:

x^2 = Prueba estadística chi-cuadrada, y otros términos como fueron definidos.

Al igual que la razón *V/m*, un valor igual a 1 determina poblaciones con dispersión aleatoria; valores mayores a 1 significan una población agregada y valores menores que 1, una dispersión uniforme. Se rechaza H_o si $x^2_{calculada} \geq x^2_{tablas}$, con n-1 grados de libertad y probabilidad de error $\alpha = 0.05$

Índice Estandarizado de Morisita (I_p) (Krebs, 1999). Se obtuvieron dos valores críticos con las siguientes fórmulas:

$$\text{Índice de Uniformidad} = M_u = \frac{x^2_{.975} - n + \sum x_i}{\left(\sum x_i\right) - 1}$$

donde:

$x^2_{.975}$ = Valor de la tabla de x^2 con (n-1) grados de libertad que tiene 97.5% del área a la derecha.

x_i = Número de organismos en el cuadrante i (i = 1, ... n)

n = Número de cuadrantes.

$$\text{Índice de Agregación} = M_c = \frac{x^2_{.025} - n + \sum x_i}{\left(\sum x_i\right) - 1}$$

donde:

$x^2_{.025}$ = Valor de una tabla de x^2 con (n-1) grados de libertad que tiene 2.5% del área a al derecha.

Posteriormente, el Índice estandarizado de Morisita se calcula por alguna de las siguientes fórmulas:

a) $I_d \geq M_c > 1.0$, $$I_p = 0.5 + 0.5\left(\frac{I_d - M_c}{n - M_c}\right)$$

b) $M_c > I_d \geq 1.0$, $$I_p = 0.5\left(\frac{I_d - 1}{M_u - 1}\right)$$

c) $1.0 > I_d > M_u$, $$I_p = -0.5\left(\frac{I_d - 1}{M_u - 1}\right)$$

d) $1.0 > M_u > I_d$, $$I_p = -0.5 + 0.5\left(\frac{I_d - M_u}{M_u}\right)$$

El Índice estandarizado de Morisita (I_p) fluctúa de –1.0 a 1.0 con límites de confianza al 95% si $I_p \geq 0.5$. Patrones aleatorios dan un valor de I_p igual a cero; patrones agregados por arriba de cero; patrones uniformes por debajo de cero.

2.1.2.3 Ajuste a distribuciones de probabilidad.

Las frecuencias observadas de caracoles en cada playa y fecha de muestreo, fueron ajustadas a distribuciones de probabilidad Uniforme, Poisson y Binomial Negativa con la finalidad de evaluar el mejor ajuste y por lo tanto, conseguir la mejor descripción de los patrones espaciales por alguno de los tres modelos.

Modelo Uniforme.

Este tipo de dispersión es indicativo de la competencia y territorialidad entre los individuos (Badii *et al*, 2000), y está definido por la siguiente ecuación:

$$P_X = \left\{ \frac{(K!)}{X!(K-X)!} \right\} q^{(K-X)} p^{(X)}$$

con $p = m/K$ y $q = 1 - p$

donde:

P_x = probabilidad de ocurrencia de cualquier individuo de la clase X

K = máximo número de individuos por unidad muestral o cuadrante.

X = número de clase.

p= probabilidad de ocurrencia de un individuo en una unidad muestral.

q = probabilidad de ausencia de un individuo en una unidad muestral.

$!$ = Factorial

m = promedio.

Para evaluar el ajuste se utilizó la prueba x^2, bajo H_o: existe evidencia suficiente de que los datos ajustan a una distribución Uniforme y H_a: los datos no ajustan. Se rechaza H_o si $x^2_{calculada} \geq x^2_{tablas}$, con probabilidad de error $\alpha = 0.05$.

Modelo Poisson:

Este modelo supone que todos los puntos en el espacio tienen la misma probabilidad de ser ocupados por un organismo, y que la presencia de un individuo en un cierto punto no afecta la ubicación de otro (Rabinovich, 1980). De acuerdo a Krebs (1999), el modelo está definido de la siguiente manera:

$$P_x = e^{-\mu}\left(\frac{\mu^x}{x!}\right)$$

donde

P_x = probabilidad de observar x individuos en un cuadrante.

x = sucesión de números enteros representando individuos = 0, 1, 2, 3...

μ = media verdadera de la distribución

$x!$ = (x) (x-1) (x-2).....y 0! = 1 por definición.

Para evaluar el mejor ajuste, se utilizó la prueba x^2, bajo H_o: existe evidencia suficiente de que los datos ajustan a una distribución Poisson, y H_a: los datos no ajustan. Se rechaza H_o si $x^2_{calculada} \geq x^2_{tablas}$, con probabilidad de error $\alpha = 0.05$.

Modelo Binomial Negativa

Este tipo de dispersión es un indicador de atracción entre los individuos (Badii *et al* , 2000), No todos los puntos en el espacio tienen la misma probabilidad de ser ocupados por un organismo, dado que se encuentra presente un sustrato heterogéneo, es decir, de un punto a otro las condiciones y factores que afectan la supervivencia y el comportamiento de los individuos no se mantiene constante (Rabinovich, 1980).

Para el ajuste de los datos, primero fue estimado el parámetro *k*, y dado que el número de unidades muestrales fue menor a 20 y menos de 1/3 de celdas resultaron con frecuencia cero, de acuerdo a Rabinovich (Op. cit.) y Krebs (1999), se aplicó la siguiente fórmula:

$$\hat{k} = \frac{\bar{x}^2 - (s^2 / n)}{s^2 - \bar{x}}$$

donde:

$\hat{k}$ = exponente de la distribución Binomial Negativa.

$\bar{x}$ = media muestral.

s^2 = varianza muestral.

n = número de cuadrantes.

Posteriormente los datos fueron ajustados al modelo Binomial Negativa:

$$P_x = \left[\frac{\Gamma(k+x)}{x!\Gamma(k)}\right]\left(\frac{\mu}{\mu+k}\right)^x\left(\frac{k}{k+\mu}\right)^k$$

donde:

P_x = probabilidad de que un cuadrante contenga x individuos.

x= Un contador (0, 1, 2, 3...)

μ= media de la distribución.

$\hat{k}$ = exponente de la distribución Binomial Negativa.

Γ = función Gamma.

El ajuste fue evaluado con el estadístico "U", bajo H_o: existe evidencia suficiente de que los datos ajustan a una distribución Binomial Negativa, y H_a: los datos no ajustan. Se rechaza H_o si U > 2 S.E."U", donde S.E. es el error estándar de U (Krebs, 1999).

2.1.2.4 Correlación.

Para determinar el grado de asociación entre el parámetro *k* de Binomial Negativa y la densidad (caracoles/m^2) del caracol de tinte, se realizó una correlación bivariada con las frecuencias observadas por fechas de muestreo y por playas rocosas, que pudieron ser ajustadas por dicho modelo.

Coeficiente de Pearson. De acuerdo a Daniel (2002), los estadísticos de la correlación (*r*) y significancia de la prueba (*t*) se calculan con las siguientes fórmulas:

$$r = \frac{n\sum x_i y_i \left(\sum x_i\right)\left(\sum y_i\right)}{\sqrt{n\sum x_i^2 - \left(\sum x_i\right)^2}\sqrt{n\sum y_i^2 - \left(\sum y_i\right)^2}}$$

$$t = r\sqrt{\frac{n-2}{1-r^2}}$$

donde:

n= número pares

x_i= valores de la variable x

y_i= valores de la variable y

t = estadístico t-Student

El juego de hipótesis es $H_o : \rho = 0$ vs. $H_a : \rho \neq 0$, rechazando H_o si $t_{calculada} \geq t_{tablas}$ con n –2 grados de libertad y probabilidad de error $\alpha = 0.05$

Coeficiente de Spearman. Según Siegel y Castellan (1995), el valor de la correlación (r_s) se obtiene con la siguiente fórmula:

$$r_s = 1 - \frac{6\sum_{i=1}^{N} d_i^2}{N^3 - N}$$

$d_i^2 = (x_i - y_i)^2$ = diferencia de rangos.

x_i = valores de x ordenados de menor a mayor.

y_i = valores de y ordenados de menor a mayor.

N = total de elementos.

La significancia estadística se evalúo de la siguiente manera:

$$t = r_s \sqrt{\frac{N-2}{1-r^2_s}}$$

El juego de hipótesis es H_o: no existe asociación entre *x* y *y* vs. H_a: existe asociación. Rechazar Ho, si $t_{calculado} \geq t_{tablas}$ con n-2 grados de libertad y probabilidad de error α = 0.05

2.1.2.5 Estimación de un *k* común (k_c).

De acuerdo a Bliss y Owen (1958), la determinación de un *k* común (k_c) se llevó a cabo haciendo una regresión lineal de $y' = [V - m]$ sobre $x' = [m^2 - (V/N)]$, donde *N* es el número de cuadrantes, *m* es el promedio de caracoles o densidad, y *V* es la varianza muestral. La regresión fue forzada a través del origen, y k_c fue estimado del inverso de la pendiente de la regresión (k_c= 1/pendiente).

2.1.2.6 Prueba de homogeneidad de proporciones.

Sin diferenciar sexo, así como de manera independiente para machos y hembras, se llevó a cabo la comparación de las proporciones de organismos entre los niveles I y II, evaluando las diferencias con el estadístico x^2 y la prueba exacta de Fisher.

De acuerdo a Daniel (2002), x^2 (chi-cuadrada) se calcula con la siguiente fórmula:

$$x^2 = \sum_{i=1}^{k} \frac{(O_i - E_i)^2}{E_i}$$

Donde:

x^2: *estadístico chi-cuadrada*

O_i= *i-ésimo valor observado.*

E_i= *i-ésimo valor esperado.*

El juego de hipótesis se planteó como H_o: las proporciones extraídas son de poblaciones homogéneas con respecto a un criterio de clasificación vs. H_a: Las proporciones son diferentes. Se rechazó H_o si $x^2_{calculado} \geq x^2_{tablas}$, con (r-1) (c-1) grados de libertad y probabilidad de error $\alpha = 0.05$

De acuerdo a Siegel (1995), la prueba exacta de Fisher se calcula de la siguiente manera:

$$P = \frac{(A+B)!(C+D)!(A+C)!(B+D)!}{N!A!B!C!D!}$$

Donde A, B, C y D denotan las frecuencias observadas en una tabla de contingencia de 2 X 2.

Bajo el mismo juego de hipótesis, se rechaza H_o si $P \leq 0.05$.

2.1.2.7 Prueba de bondad de ajuste.

Para las longitudes y pesos del caracol de tinte de cada playa, fecha de muestreo y niveles del mesolitoral superior (I y II), se probó la bondad de ajuste a una distribución normal, sin diferenciar sexos así como para hembras y machos. Para tal efecto, se utilizó la prueba de Kolmogorov-Smirnov (*K-S*) de acuerdo a Castillo y Ojeda (1994).

2.1.2.8 Diferencia de medias.

Por cada playa y fecha de muestreo, se llevó a cabo la comparación de las longitudes y pesos promedio del caracol de tinte, entre los niveles I y II, para el conjunto de todos los organismos sin distinguir el sexo, así como para hembras y machos.

De acuerdo a los resultados de la prueba *K-S*, los promedios de los conjuntos de datos que ajustaron a la distribución normal, fueron comparados con el estadístico *t-Student* para dos muestras independientes. En caso contrario, se utilizó la prueba de *Mann-Whitney*. La comparación de los pesos promedio en todos los casos, se realizó con la prueba de *Mann-Whitney*.

Estadístico *t*-Student (varianzas desconocidas que se suponen iguales). De acuerdo a Elorza (2000), los cálculos se realizan con las siguientes fórmulas:

$$t = \frac{(\bar{x}_1 - \bar{x}_2) - (\mu_1 - \mu_2)}{\sqrt{\frac{s^2 p}{n_1} + \frac{s^2 p}{n_2}}}$$

con

$$s^2 p = \frac{(n_1 - 1)s^2{}_1 + (n_2 - 1)s^2{}_2}{n_1 + n_2 - 2}$$

donde

$\bar{x}_1$= media muestral 1

$\bar{x}_2$= media muestral 2

n_1 = tamaño de la muestra 1

n_2 = tamaño de la muestra 2

Bajo la hipótesis nula, la estadística de prueba tiene aproximadamente una distribución *t-Student* con n_1+n_2-2 grados de libertad

Estadístico *t-Student* (varianzas conocidas que se suponen diferentes).

$$t = \frac{(\bar{x}_1 - \bar{x}_2) - (\mu_1 - \mu_2)}{\sqrt{\frac{s^2{}_1}{n_1} + \frac{s^2{}_2}{n_2}}}$$

$\bar{x}_1$= media muestral 1

$\bar{x}_2$= media muestral 2

n_1 = tamaño de la muestra 1

n_2 = tamaño de la muestra 2

s_1 = desviación estándar muestral 1

s_2 = desviación estándar muestral 2

Bajo la hipótesis nula, el estadístico tiene una distribución *t-Student* con grados de libertad iguales a :

$$gl = \frac{\left(\frac{s^2{}_1}{n_1} + \frac{s^2{}_2}{n_2}\right)^2}{\frac{\left(s^2{}_1/n_1\right)^2}{n_1} + \frac{\left(s^2{}_2/n_2\right)^2}{n_2}}$$

El juego de hipótesis para ambos situaciones es H_o : $\mu_1=\mu_2$ vs H_a: $\mu_1 \neq \mu_2$, rechazando H_o si $t_{calculada} \geq t_{tablas}$, con probabilidad de error $\alpha = 0.05$.

Prueba no paramétrica de Mann-Whitney para muestras independientes. De acuerdo a Castillo y Ojeda (1994), sean R_x y R_y el total de los rangos de X y de Y en la muestra de $n+m$ observaciones respectivamente, entonces:

$$R_x+R_y= 1+2+\ldots+(n+m) = \frac{(n+m)(n+m+1)}{2}$$

En la hipótesis nula R_x toma valores que van desde n(n+1)/2 hasta (n+m)(n+m+1)/2 – m(m+1)/2.

El estadístico de prueba es la cantidad que *Rx* excede su valor mínimo n(n+1)/2 y que se representa de la siguiente manera:

$$T_x = R_x - \frac{n(n+1)}{2} = \sum_{i=1}^{n} R(X_i) - \frac{n(n+1)}{2}$$

El juego de hipótesis es H_o: $\theta_x=\theta_y$ vs H_a: $\theta_x \neq \theta_y$, rechazando H_o si $T_x \geq T_{1-\alpha/2}$ con probabilidad de error α= 0.05

2.1.2.9 Paquetería electrónica (software).

Todos los cálculos se realizaron por medio de los programas Excel (Office 2000) y SPSS Ver. 8.0. Posteriormente, para corroborar los resultados obtenidos acerca del patrón espacial y el tamaño de muestra, se utilizó el programa Ecological Methodology (Krebs, 2002). La tipografía de éste documento se llevó a cabo con el programa Word (Office 2000).