

ECOLOGÍA GENERAL

DISEÑO EXPERIMENTAL

Debido a que la validez de los experimentos, como aporte al entendimiento racional del mundo que nos rodea, está afectada directamente por su construcción y ejecución, es extremadamente importante prestar atención a su diseño. Un experimento es el cambio deliberado de un sistema, de manera de permitir contrastar hipótesis que intentan explicar las posibles causas de algún fenómeno, patrón o regularidad observado en la naturaleza. Si luego del cambio se produce un resultado que concuerda con lo esperado (de manera lógica) para una y sólo una de estas hipótesis, se podría pensar que ésta está “probada”, pero esto será cierto únicamente si al momento de planear el experimento se tomaron en cuenta ciertos recaudos. Estos recaudos son de alguna manera obvios y parece superfluo describirlos, pero es muy común observar como son violados regularmente, incluso en trabajos publicados.

Cuanto más complejo es un experimento, mayores serán los requerimientos que habrá que tener en cuenta al momento de diseñarlo, pero existen ciertos requerimientos mínimos que son compartidos por todos, estos son: controles adecuados, condiciones iniciales homogéneas y réplicas.

Controles

El objetivo de un experimento ecológico es comprobar si el cambio en una o más variables afecta significativamente al sistema. Para esto, es esencial conocer qué hubiera pasado con el sistema si no se hubieran modificado la o las variables experimentales. Supongamos que se quiere probar si el fósforo (P) es limitante en el crecimiento de las plantas que crecen en el intermareal de la laguna de Mar Chiquita. Para eso se decide agregar P a ciertas zonas, dejando otras zonas como controles. Lo esperado sería que la vegetación de las zonas con P aumente de tamaño. Sin embargo, la comparación válida sería entre los tamaños de la vegetación de zonas con y sin P, no entre los tamaños iniciales y finales de vegetación de zonas con agregado de P. Esto es así porque uno no tiene control sobre muchísimas variables que pueden afectar al experimento pero puede asegurar que no hay nada que haga pensar que, salvo por la(s) variable(s) experimental(es), existen diferencias en las variables que afectaron a tratamientos y controles. Suponga que la realidad es que el P no afecta el crecimiento de estas plantas y que, durante la realización del experimento de agregado de P, aumentó la cantidad de lluvias (luego de un período de sequía) y esto llevó a un aumento en la producción primaria vegetal. De no existir controles, el aumento en el tamaño de las plantas habría sido erróneamente interpretado como por efecto del agregado de P.

En algunos experimentos es necesario agregar controles que nos permitan evaluar el efecto de ciertas cuestiones que hacen directamente al diseño en sí y no a la naturaleza del sistema. Pensemos por ejemplo en el siguiente caso: En la parte vegetada del intermareal de la laguna de Mar Chiquita, se puede observar la presencia de la gramínea halófila *Spartina densiflora* en las zonas más bajas, mientras que en las zonas altas esta planta es remplazada por huncos o cortaderas. Debido a las periódicas inundaciones, las zonas bajas del intermareal presentan altos niveles de stress abiótico (salinidad, falta de oxígeno en el sedimento, etc.) mientras que las partes altas son consideradas de mejor calidad para el crecimiento vegetal. Para explicar la ausencia de *S. densiflora* en las zonas altas, uno podría plantearse que es excluida competitivamente pero que las condiciones abióticas permitirían su crecimiento. Para poner a prueba esto, se deberían transplantar plantas de *S. densiflora* a la parte alta en presencia o ausencia de otras plantas (competidoras) y

comparar la supervivencia o biomasa de esas plantas con plantas creciendo en la zona baja. Sin embargo, si el trasplante realizado al momento de montar el experimento tiene un efecto sobre la supervivencia o crecimiento de las plantas, un resultado posible es que todas las plantas transplantadas a la parte alta presenten una baja biomasa y supervivencia haciéndonos concluir, erróneamente, que *S. densiflora* no puede crecer en la zona alta incluso sin competidores. Una solución simple para esto es diseñar controles que sirvan para medir el efecto del trasplante en sí, o sea realizar trasplantes idénticos pero en la zona baja. De haber realizado esos controles, se habría concluido que el diseño de trasplante no es muy bueno y no permite evaluar nuestra pregunta.

Recuerde siempre que los controles són un tratamiento más y al igual que el resto es necesario tener réplicas del mismo.

Condiciones iniciales homogéneas

Es muy importante que los diferentes tratamientos de un experimento presenten las mismas, o al menos la misma variabilidad de, condiciones iniciales. Para esto es necesario conocer medianamente las condiciones que existen antes que el experimento comience y tener cierto conocimiento sobre los organismos con los que se está trabajando. En el ejemplo de experimento de trasplante de plantas descrito en la sección anterior, suponga que los trasplantes a la zona alta se realizaron un día muy soleado con mucha evaporación, mientras que los trasplantes control se realizaron un día lluvioso. Esto generará que inicialmente las plantas transplantadas a la zona alta sufran un stress hídrico mayor que los controles pudiendo afectar el experimento entero. Una solución es asignar los tratamientos de manera aleatoria. En el ejemplo, si no se puede evitar tener que trabajar 2 días para montar el experimento, deberían realizarse trasplantes de ambos tratamientos ambos días.

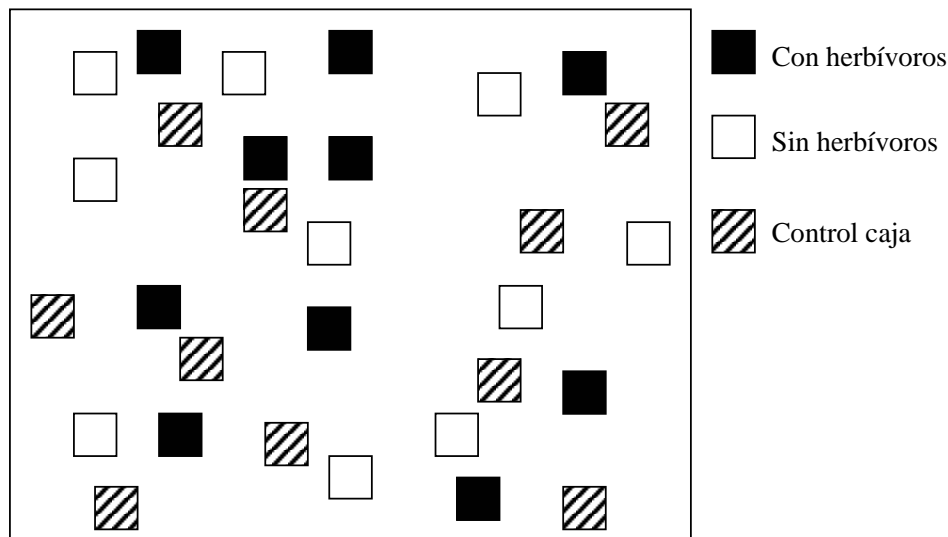
Réplicas

Las hipótesis que generalmente se plantea el ecólogo no suelen ser tan categóricas o definitivas que permitan ser rechazadas con una simple observación o experimento. Por ejemplo, la hipótesis '*Spartina densiflora* nunca sobrevive en zonas altas del intermareal' podría ser rechazada con al menos una planta que no muera. Sin embargo la hipótesis 'La supervivencia de *S. densiflora* en zonas altas es menor que en zonas bajas' requiere medidas cuantitativas y, como se sabe, es muy poco común trabajar con poblaciones suficientemente pequeñas y manejables como para medir todos los individuos. Por lo que se debe trabajar con estimaciones y comparaciones estadísticas y un requisito indispensable para esto es $n \geq 2$.

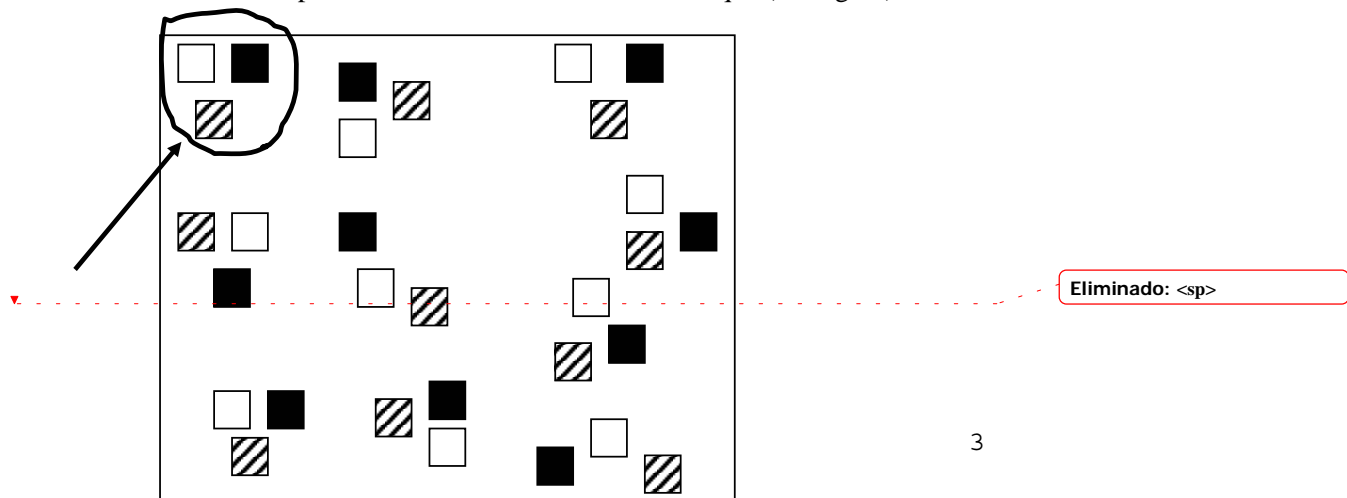
Al momento de planear un experimento es necesario saber qué cantidad de réplicas incluir. Esto depende de la variabilidad de los datos. El poder estadístico de las pruebas (1- probabilidad de aceptar una hipótesis nula cuando es falsa) es inversamente proporcional a la varianza y directamente proporcional al tamaño muestral (número de réplicas en un experimento). Por lo que al trabajar con sistemas donde existe mucha variabilidad deberemos aumentar la cantidad de réplicas.

La distribución lógica de tratamientos y réplicas: El diseño más sencillo es cuando se dividen aleatoriamente las unidades experimentales en tantos grupos como tratamientos haya, y se asigna aleatoriamente un tratamiento a cada grupo. Suponga que se quiere evaluar el efecto de 2 tipos de dieta en el crecimiento de ratones, si se cuenta con 100 ratones, se dividen aleatoriamente en 2 grupos de 50 y luego se asigna un tipo de dieta a cada grupo.

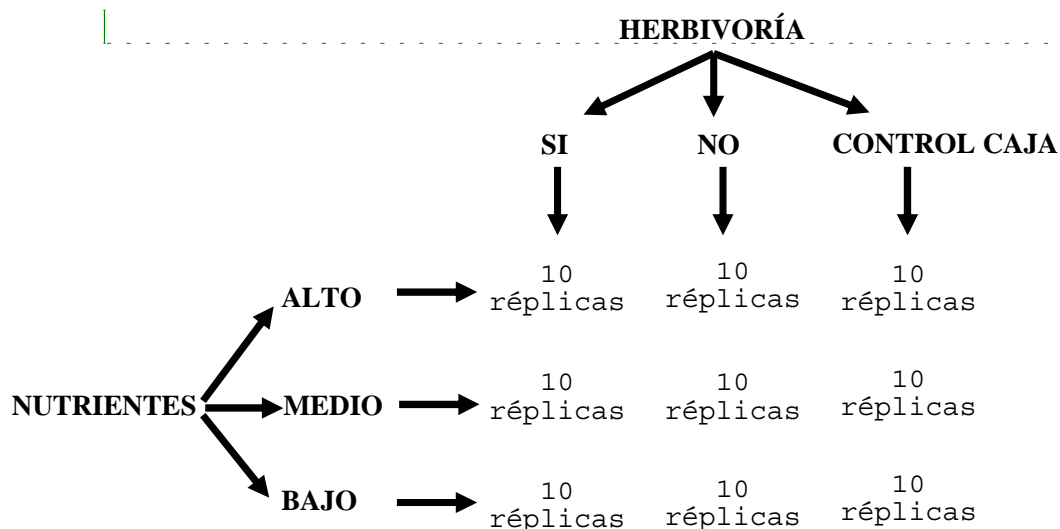
Espacialmente es el mismo principio. Suponga que quiere ver el efecto de la herbivoría en el crecimiento de cierta planta que crece homogéneamente sobre el terreno y decide realizar un experimento de exclusión de herbívoros. Diseña y construye entonces 10 cajas de exclusión de 1 m x 1 m y 10 cajas idénticas pero que permiten el acceso de los herbívoros. Además marca 10 parcelas de 1 m x 1 m para usar de control. El diseño lógico del experimento consta de 3 tratamientos: (1) Caja + exclusión de herbívoros; (2) Caja sin exclusión (este control permitirá estudiar el efecto de la caja en sí); y (3) Sin caja ni exclusión. Un **diseño totalmente aleatorio** distribuiría aleatoriamente en el terreno las 30 unidades, separaría aleatoriamente las unidades en 3 grupos de 10 y asignaría un tratamiento a cada grupo (ver figura). El mismo principio puede aplicarse a más de 2 tratamientos y a más de un factor.



Sin embargo, existen casos donde se sabe o sospecha que existe variabilidad que responde a ciertos factores que se pueden tomar en cuenta en el diseño. Suponga que, en el ejemplo anterior, existe mucha variabilidad en el tamaño inicial de las plantas y que esto responde a cuestiones de micro escala (plantas que están juntas tienen tamaños parecidos) o están distribuidas en parches, etc. Una forma de que esta variación (que no responde a las variables a evaluar con el experimento) no afecte la interpretación de los resultados es colocar las réplicas y tratamientos de forma que una réplica de cada tratamiento quede junto con una réplica de los demás tratamientos. Este diseño se llama diseño aleatorizado en bloques y consiste en dividir la zona en bloques arbitrarios y colocar aleatoriamente una réplica de cada tratamiento en cada bloque (ver figura).



Diseños experimentales para estudiar el efecto de más un de factor a la vez: Una de las herramientas más versátiles y poderosas en el diseño experimental es el conjunto de procedimientos conocido como análisis de la varianza (ANOVA). El primer ejemplo de la sección anterior intenta evaluar el efecto de la herbivoría sobre la producción de una planta y ha sido diseñado teniendo en cuenta los requerimientos para un ANOVA de una vía (evaluación del efecto de un solo factor, herbivoría en este caso, sobre una variable). Existen casos donde se quiere evaluar simultáneamente el efecto de más de un factor sobre una variable. Suponga que se quiere evaluar el efecto de la herbivoría pero a su vez el efecto de los nutrientes sobre la producción primaria. Uno podría realizar dos experimentos por separado pero nunca podría evaluar el efecto relativo o sus interacciones (ejemplo: puede ser que la herbivoría afecte mucho la producción primaria sólo si los niveles de nutrientes son bajos, cuando hay muchos nutrientes la producción primaria es tan grande que los herbívoros no tienen un efecto significativo). Para estos casos, existen los diseños factoriales cuya lógica responde a los requerimientos del ANOVA de más de una vía y consiste en la combinación de más de un factor experimental.. Volviendo al ejemplo, si se quiere estudiar el efecto de tres niveles de nutrientes, se deberá hacer el triple de cajas (suponiendo que quiere tener el mismo número de réplicas) y asignar 10 réplicas de cada tratamiento (con herbivoría, sin herbivoría, control caja) a 1 de 3 tratamientos de nutrientes (alto, medio, bajo por ejemplo). De tal manera que se tienen en verdad 9 tratamientos que responden a un diseño factorial:



Comentario:

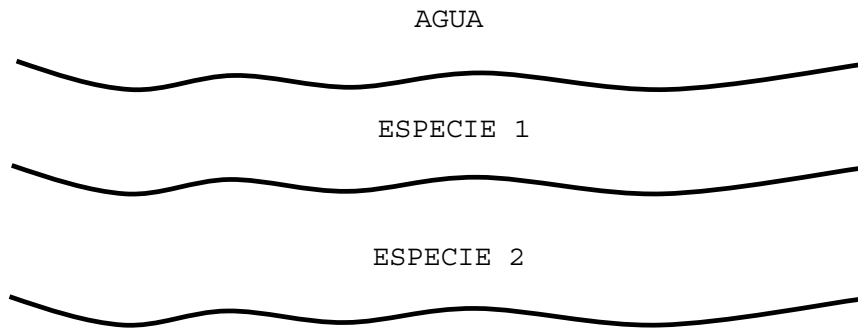
Bibliografía

- Hairston, N.G., 1989. Ecological experiments: Purpose, design, and execution. Cambridge University Press, Cambridge, UK
- Hulbert, S.H., 1984. Pseudoreplication and the design of ecological field experiments. Ecological Monographs 54:187-211
- Underwood, A.J., Experiments in ecology: Their logical design and interpretation using analysis of variance. Cambridge University Press, Cambridge, UK

1) Diseñe experimentos para cumplir los siguientes objetivos

- a- Evaluar si la densidad de cangrejos violinistas (*Uca uruguayensis*) está influida por predación por parte de aves.
- b- Evaluar si un alga incrustante limita la presencia de otras algas epífitas sobre ella debido a defensas químicas o simplemente porque la microestructura del alga incrustante evita el anclaje de otras algas.
- c- Evaluar si el tamaño de los mejillines en zonas más bajas del intermareal es más pequeño que en zonas más altas debido a que en esas zonas existe mayor densidad y aumenta la competencia intraespecífica.

2) En las marismas es muy común observar patrones de zonación de especies vegetales paralelos a la línea de costa, como los que se observan en la figura:



Un experimento clásico para evaluar el efecto de la competencia entre especies y factores abióticos en la determinación de los límites superiores de la especie 1 (las marismas son inundadas por las mareas y las zonas más bajas presentan mayores niveles de estrés como salinidad y falta de oxígeno) consistió en transplantar 10 plantas de la especie 1 a la zona de la especie 2, 10 de la especie 1 a la de la especie 2, pero removiendo a los individuos de la especie 2 en un radio de 1 m alrededor del transplante, 10 de la especie 1 a zonas de la especie 1, 10 de la especie 1 a zonas de la especie 1, pero removiendo a los individuos en un radio de 1 m, marcar 10 individuos de la especie 1 (sin transplantarla, obviamente esta dentro de la zona de la especie 1), y marcar 10 individuos de la especie 1 (sin transplantarla, obviamente esta dentro de la zona de la especie 1), pero removiendo a los individuos en un radio de 1 m.

Identifique las partes lógicas del experimento (factores, tratamientos, réplicas).

3) Explique la figura y dé un ejemplo de cada tipo de diseño

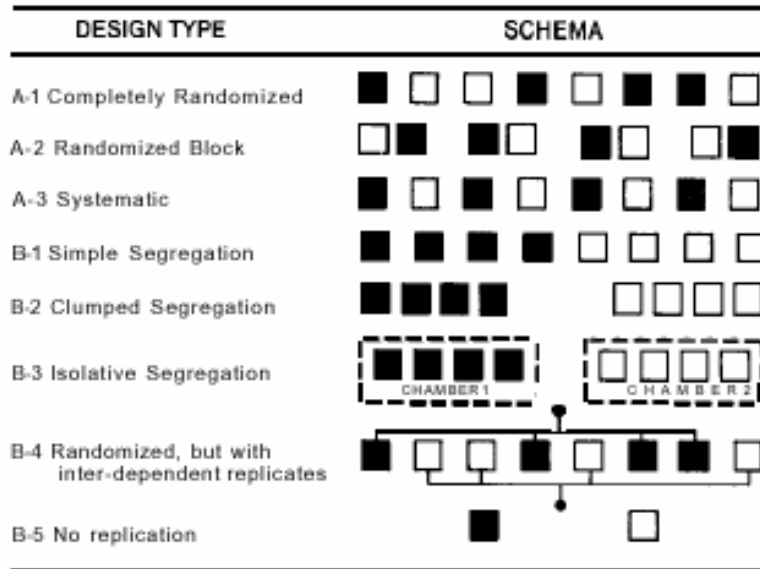


FIG. 1. Schematic representation of various acceptable modes (A) of interspersing the replicates (boxes) of two treatments (shaded, unshaded) and various ways (B) in which the principle of interspersation can be violated.