



**UNIVERSIDAD
DEL AZUAY**

Universidad del Azuay

Facultad de Ciencia y Tecnología

Escuela de Biología, Ecología y Gestión

Desarrollo de protocolo para la organización y análisis de cantos
del Grupo Anura (Clase Anfibia).

Trabajo de graduación previo a la obtención del título de
Biólogo con mención en Ecología y Gestión

Autores:

Daniel Renato Segovia Moscoso

Ricardo Javier Goyes Carrillo

Director:

Ecol. David Christopher Siddons

Cuenca, Ecuador

2019

DEDICATORIAS

Daniel,

Quiero dedicar este trabajo a mi hermana Ma. Dolores, por ser un pilar fundamental en mi desarrollo tanto humano como profesional; a mi hermano Xavier por no dejar de empujarme a ser una mejor persona; a mi sobrina Sofi por apoyarme día tras día a seguir mis sueños; a mi cuñado Rodrigo por su paciencia a lo largo de estos años.

A mi madre Ma. Soledad, por sembrar en mi la fuerza, y la convicción para luchar por mis metas.

Ricardo,

Quiero dedicar este trabajo a mi familia en especial a mi abuelita Dora y mami Mónica que me apoyaron para seguir adelante en este camino.

AGRADECIMIENTO

Nuestra gratitud a la Escuela de Biología, y a todo el cuerpo docente que la integra; a nuestro director Ecol. David Siddons, por su incondicional apoyo en el desarrollo de este trabajo, así como la paciencia a lo largo del mismo; y la confianza entregada para dejarnos ser parte del proyecto de Bioacústica.

A nuestras familias que se esforzaron por permitirnos conseguir este logro académico.

A nuestros amigos que nos han apoyado incondicionalmente a lo largo de estos años, en los que hemos compartido gratos momentos. y a los pasantes del laboratorio.

Contenido	
DEDICATORIAS	ii
AGRADECIMIENTO.....	iv
RESUMEN	vii
ABSTRACT	viii
INTRODUCCIÓN	1
OBJETIVOS	2
Objetivo General.....	2
Objetivos Específicos	2
MATERIALES Y METODOS	3
AREA DE ESTUDIOS	3
METODOLOGÍA.....	3
1.1 Base de datos - Guía de la Fonoteca.....	3
1.2 Corte de audios originales	5
2 Análisis de audios	6
2.1 Limpieza de audios para análisis	6
2.2 Graficación de espectrogramas	7
2.3 –Medidas acústicas	7
Resultados	9
Organización de archivos de audio	9
Graficar Espectrogramas	9
Bases de datos	10
Discusiones	13
Bibliografía	14
Anexos	17
Anexo 1 – Paso a paso, corte de archivos de audio obtenidos por W. Duellman en la década de 1970. El mismo fue desarrollado en base al programa Audacity versión 2.3.0	17
Anexo 2 – Tutorial para la limpieza de grabaciones de audio.	21
Anexo 3 - Guion para ingresar archivos de audios al software R Project (R Core Team, 2019)	26
Anexo 4 - Guion de códigos para Graficar espectrogramas en R Project (R Core Team, 2019).....	26
Anexo 5 - Correlación entre sonidos mediante el software R Project (R Core Team, 2019).....	27
Anexo 7 – Jerarquía de carpetas de archivos de audio (R Core Team, 2019)	31

Anexo 8 – Espectrogramas extraídos en el proceso de análisis.....	32
Anexo 9 - Base de datos de variables Ambientales	32
Anexo 5 - Base de datos con medidas.....	32

Índice de figuras

<i>Figura 1- Mapa referencia de los sitios muestreados por Duellman.....</i>	<i>3</i>
<i>Figura 2. Flujoograma del proceso desarrollado con los datos colectados por Duellman. Con los cuales primero se extraen los metadatos, para luego analizar y extraer las medidas, las mismas que serán vinculadas según la codificación.</i>	<i>4</i>
<i>Figura 3. Explicativo del sistema de codificación de archivos.</i>	<i>6</i>
<i>Figura 4. Mosaico ejemplo de los espectrogramas generados (espectrogramas restantes en Anexo 1) a) Pithecopus palliatus; b) Dendropsophus sayayacuensis; c) Dendropsophus sayayacuensis; d) Pristimantis e) Scinax sugillatus; f) Gastrotheca weilandii.</i>	<i>10</i>
<i>Figura 15. Esquema jerárquico de organización de archivos de audio. Autoría propia</i>	<i>31</i>

Índice de tablas

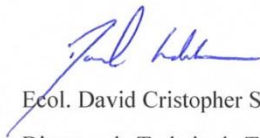
<i>Tabla 1. Metadatos de la fonoteca necesarios para el ingreso de nuevos registros. 5</i>	<i>5</i>
<i>Tabla 2. Metadatos generados por las funciones analyze y analyzefolder</i>	<i>8</i>
<i>Tabla 3. Tabla resumen de especies de las cuales se extrajo exitosamente metadatos ambientales.</i>	<i>10</i>
<i>Tabla 4. Resumen de medidas generadas mediante analyze,</i>	<i>12</i>

RESUMEN

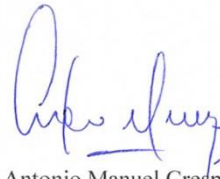
RESUMEN

En el presente exponemos un modelo de protocolo para la organización y análisis de los cantos/llamados de los anuros, a fin de generar una fonoteca del cual se tenga acceso a diferentes niveles de datos; tanto los metadatos (por ejemplo, variables ambientales) como grabaciones originales de las especies con su respectivo espectrograma. Además, consta una base de datos de las medidas de los llamados, los cuales servirán para análisis posteriores.

Palabras clave: protocolo, análisis, bioacústica, anuros, ranas



Ecol. David Christopher Siddons.
Director de Trabajo de Titulación



Antonio Manuel Crespo Ampudia
Cordinador de Escuela



Daniel Renato Segovia Moscoso



Ricardo Javier Goyes Carrillo

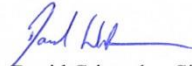
Autores

ABSTRACT

ABSTRACT

This work presents a protocol model for the organization and analysis of the songs/calls of the anurans to generate a library with access to different levels of data, metadata (for example, environmental variables) and original recordings of species with their respective spectrogram. In addition, there is a database of measures of the calls, which will serve for subsequent analysis.

Keywords: protocol, analysis, bioacoustics, anurans, frogs



Ecol. David Cristopher Siddons.

Thesis Director



Antonio Manuel Crespo Ampudia

Faculty Coordinator

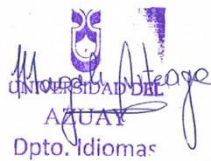


Daniel Renato Segovia Moscoso

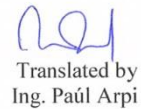


Ricardo Javier Goyes Carrillo

Authors



UNIVERSIDAD DEL
AZUAY
Dpto. Idiomas



Translated by
Ing. Paúl Arpi

Segovia Moscoso Daniel Renato, Goyes Carrillo Ricardo Javier

Trabajo de Titulación

Ecólogo. David Christopher Siddons.

Noviembre, 2019

DESARROLLO DE PROTOCOLO PARA LA ORGANIZACIÓN Y ANÁLISIS DE CANTOS DEL GRUPO ANURA (CLASE ANFIBIA).

INTRODUCCIÓN

La bioacústica es una rama de la biología que se encarga de estudiar y analizar las emisiones vocales de distintos organismos como por ejemplo insectos, aves, anfibios y mamíferos. Esta ciencia tiene distintas aplicaciones y puede ayudar a entender los distintos sistemas de comunicación, monitoreo acústico e inclusive es utilizada como una herramienta de identificación taxonómica (Angulo 2006). El estudio del entorno acústico en sus diferentes aplicaciones se caracteriza por ser poco invasivo al momento obtener información, esto facilita la toma de datos sin alterar en gran medida el comportamiento del grupo estudiado, además de facilitar el manejo y análisis de una gran cantidad de datos gracias (Bardeli et al., 2010; Caycedo-Rosales et al., 2013). Históricamente varias investigaciones sobre bioacústica se han centrado en el estudio de grupos de organismos ampliamente conocidos, eg., aves debido a que es un grupo con vocalizaciones desarrolladas y fácil de reconocer. En la actualidad, las investigaciones en bioacústica han abordado nuevos enfoques que incluyen el estudio de murciélagos y anfibios, grupos que han sido escasamente estudiados debido la dificultad en el monitoreo de sus vocalizaciones.

Particularmente, el estudio bioacústico de los anfibios ha tomado un creciente interés en la comunidad científica debido a que son organismos altamente sensibles a los cambios del hábitat (Fleming et al., 1972; Angulo, 2006). En este sentido, la bioacústica se transforma en una herramienta que considera a las vocalizaciones como parte integral de su ecología permitiendo entender la dinámica de las poblaciones. Adicionalmente, varios estudios también se han enfocado en la sistemática y taxonomía en anfibios (Hutter & Guayasamin, 2015; Batallas & Brito, 2016). Así, la información que se genera a partir de estos estudios demanda la creación de mecanismos que optimicen el procesamiento y análisis de datos (Bee, 2016).

En consecuencia, dado el creciente interés en las grabaciones bioacústicas de anfibios, estas se encuentran dispersas requiriendo de un manejo y almacenamiento adecuado (Toro & Giraldo, 2006). En adición, el incremento en las grabaciones resulta en la necesidad de una estandarización metodológica faciliten el estudio de la bioacústica en anfibios. Por ejemplo, estudios sobre poblaciones de anuros y su relación con diversos factores ambientales evidencian, en base de un protocolo estandarizado de grabaciones, el impacto de las actividades humanas (eg.,Toro & Giraldo, 2006) sobre los patrones de vocalización y comunicación (Márquez, Llusia, & Beltrán, 2014; Obrist et al., 2010).

Es evidente la necesidad de protocolos bien formados para el monitoreo bioacústico de anfibios. Dentro de este marco, las fonotecas (i.e., mantenimiento y operación de documentos y registros acústicos) son indispensables herramientas que generan bancos de información que resultan en la condensación de señales bioacústicas para un manejo más eficiente de los protocolos de monitoreo (Toro et al., 2006; Piñero et al., 2013).

El presente estudio expone un protocolo para la operación y análisis de medidas acústicas de registros vocales de anfibios en el Norte del Ecuador, datos que fueron obtenidos mediante el convenio de vinculación a través del proyecto “Uso de Ecología Acústica para desarrollar novedosos indicadores de diversidad en comunidades de anfibios y murciélagos a través de gradientes de altitud y disturbio” entre la Universidad del Azuay y el Instituto Ecuatoriano de Biodiversidad (INABIO), colectadas por William Duellman alrededor de la década de 1970, sitio estudiado por el alto valor biológico que se presenta en los mismo pues se destaca que en dicha zona, en un área alrededor de tres kilómetros se encuentra alrededor de 173 especies (Duellman, 1978).

OBJETIVOS

Objetivo General

Elaboración de un protocolo de clasificación y análisis de cantos de anuros

Objetivos Específicos

1. Organizar datos colectados por Duellman en la década de 70s y vincular con su archivo de audio.
2. Organizar archivos de audio a diferentes escalas (especie e individuo).
3. Crear una base de datos de los parámetros en mediciones automáticas a lo largo de las secuencias de vocalizaciones.
4. Graficar espectrogramas que muestran la variación en las vocalizaciones de especies de anuros grabados.

MATERIALES Y METODOS

AREA DE ESTUDIOS

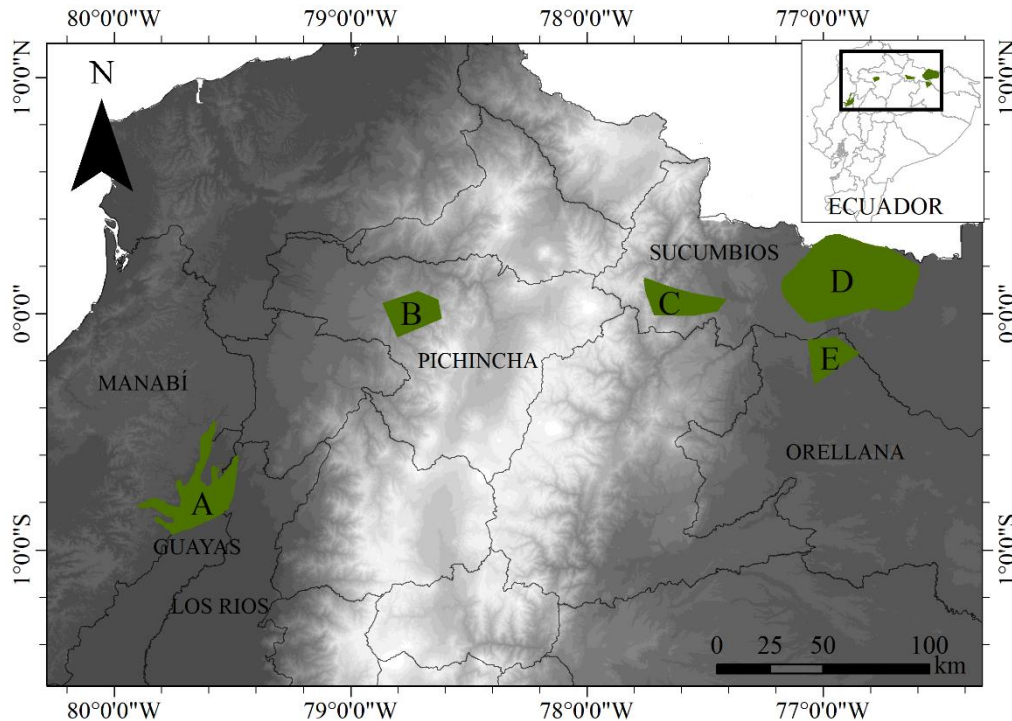


Figura 1- Mapa referencial de los sitios muestreados por Duellman.

W. Duellman desarrollo proyectos en el Ecuador entre 1964 y 1978, las cuales se vieron enfocadas en el muestreo de anfibios en áreas abiertas, bosques primarios y secundarios, registradas en las zonas de Santa Cecilia (Provincia Sucumbíos, Ecuador), Valle de Mindo a 80 km al noroeste de la Quito (Provincia de Pichincha, Ecuador), Bosque húmedo tropical Río Palenque (Provincia de los Ríos, Ecuador), Cordillera del Due (Provincia Sucumbios, Ecuador), Río Coca (Provincia de Orellana, Ecuador). a una altura entre los 340 m.s.n.m y los 2945 msnm, a una temperatura anual promedio que oscila entre los 22°C y 28° C (Duellman (Trueb, 1986)

METODOLOGÍA

1.1 Base de datos - Guía de la Fonoteca

Los registros de campo fueron validados siempre que siguieran la ruta presentada en la Figura 1. Nótese que la toma de variables ambientales es esencial para garantizar la fiabilidad de estos a futuro, como también su correcta georreferenciación.

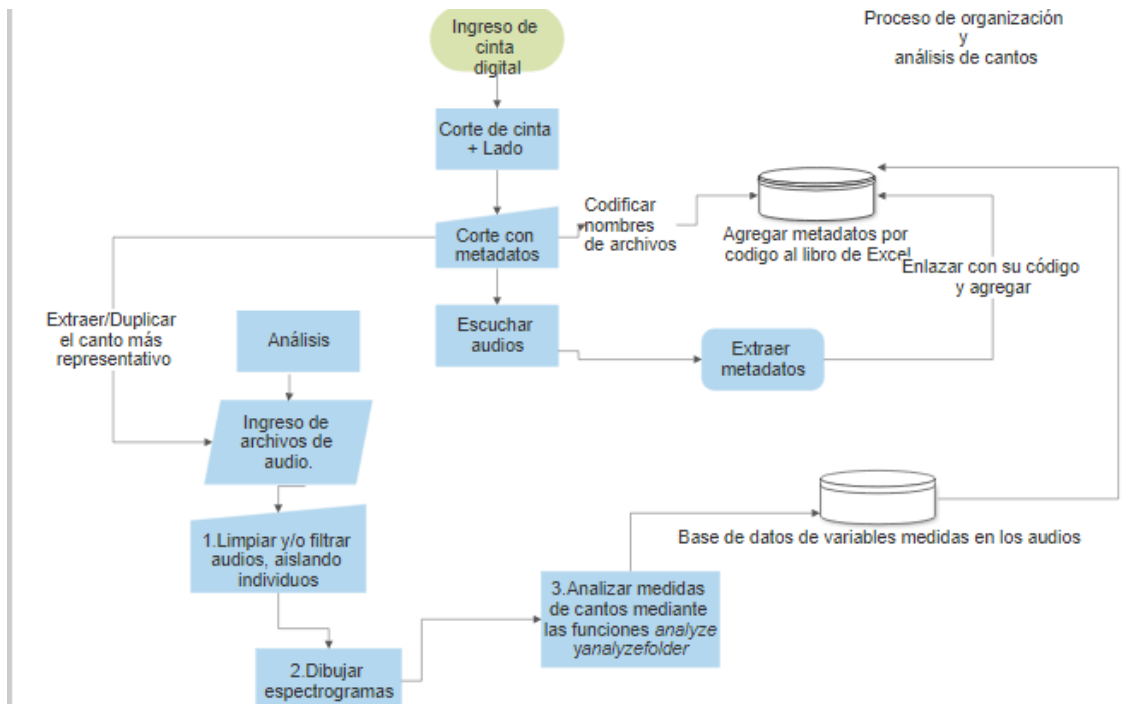


Figura 2. Flujograma del proceso desarrollado con los datos colectados por Duellman. Con los cuales primero se extraen los metadatos, para luego analizar y extraer las medidas, las mismas que serán vinculadas según la codificación.

Una vez que la ruta ha ingresado todos los registros previos, se sintetizó en un formulario (Tabla 1) las variables requeridas para el ingreso de nuevos datos en un futuro.

Tabla 1. Metadatos de la fonoteca necesarios para el ingreso de nuevos registros.

Nombre de la columna	Descripción
Nombre del Archivo	Nombre con el cual se encuentra el archivo en la carpeta matriz
Formato	Audio y/o Video
Familia	Familia taxonómica al cual pertenece
Género	Género taxonómico al cual pertenece
Nombre_científico	Nombre científico ya sea a nivel de especie y/o subespecie
Nombre_comun	Nombre común con el que se identifique localmente.
Especies de Fondo	Especies en el
Nombre de Grabador	Investigador(es) y/o colaborador(es) que tomen el registro
Fecha	fecha completa de toma del registro en formato dd/mm/aaaa
Año	Año en el que se toma el registro
Mes	Mes en el que se toma el registro
Día	Día en el que se toma el registro
Hora	Hora a la que se toma el registro
País	País donde se tomó el registro
Provincia	Provincia donde se tomó el registro
Localidad	Localidad donde se tomó el registro
Latitud	Latitud en las cual se encontró al individuo
Longitud	Longitud a la que se encontró el individuo
Altura	Altura a la que se tomó el registro
Edad_Sexual	Edad Sexual el individuo registrado
Comportamiento	Comportamiento registrado
Grabadora	Grabadora con la que se tomó el registro
Micrófono	Micrófono usado para ese registro
Temperatura_Aire_°C	Temperatura ambiental

1.2 Corte de audios originales

El equipo de grabación usado por Duellman, no permitía seccionar en pistas por defecto de configuración del equipo o por la misma facilidad y agilidad necesaria al momento de colecta de datos en el campo. Es así que usualmente se obtenían extensas grabaciones que debían ser clasificadas por cinta/tape completo de cada salida. Es así que por efectos de clasificación de archivos debemos recortar en pistas según la guía expuesta en el Anexo 1. Actualmente los nuevos equipos prestan una increíble facilidad y agilidad para ser usados en el campo, así como la

gran capacidad de almacenamiento que las mismas poseen momento de guardar archivos o pistas por cada individuo.

2 Análisis de audios

2.1 Limpieza de audios para análisis

Dado que las grabaciones son realizadas *in situ*, parte del proceso necesario para conservar registros vocales, es guardar un archivo, que permita apreciar las diferentes características que puedan tener las mismas.

El proceso mediante el cual se “limpia” los archivos se expone en el Anexo 2, donde para efectos de uso de los archivos en el futuro se aclara que es necesario cortar 200 milisegundos (ms) antes y después de la vocalización del individuo registrado.

Los mismos que fueron guardados en su carpeta a diferente nivel jerárquico como se observa en la Figura 9.

Codificación			
N° de Cinta o salida	Lado del cassette	Track con el dictado de metadatos	Nombre de especie o grado mas alto de clasificacion
1	1	1	Pristimantis
1	1	2	Scinax sugillatus
1	2	1	Dendropsophus triangulum
1	2	2	Gastrotheca weinlandii
1	2	3	Boana _boana

Figura 3. Explicativo del sistema de codificación de archivos.

Cada archivo de sonido fue codificado como se puede observar en el Figura 26, para poder ser enlazado según este código a las diferentes bases de datos en formato excel generados con los datos físicos del lugar de muestreo y las respectivas variables analizadas.

2.2 Graficación de espectrogramas

Esta es una prueba de correlación cruzada entre archivos de sonido, siendo esta una forma de comprobación de similitud entre los mismos archivos. El aplicativo de esta función será que al dudar de la especie a la que pertenece un sonido.

Para el mismo los archivos de audio deben ser poseer dimensiones iguales, lo cual se obtiene con la función *cutw*. Modificación que demos realizar en las mismas dimensiones para ambos archivos, comprobando que se empiece en la misma fracción de segundo antes de iniciar el canto y el final al mismo tiempo

2.3 –Medidas acústicas

El paquete *soundgen*(Anikin,2019) tienen herramientas para síntesis de sonido y análisis acústico. es de gran ayuda para realizar síntesis paramétrica de sonidos con componentes armónicos y de ruido, como las vocalizaciones de animales o la voz humana. También incluye herramientas para análisis espectrales, seguimiento de tono, segmentación de audio, auto similitud matrices, morphing, entre otras que nos pueden resultar muy útiles en el desarrollo de análisis de bioacústica.

Mediante las funciones *analyze* y *analyzefolder*, que producen una variedad de medidas acústicas, para cualquier tipo de registro en formato de archivo de audio.

Mediante la función *analyze* se puede realizar el análisis acústico de un solo archivo de sonido, evaluando variables como: seguimiento de tono, características espectrales básicas y sonoridad estimada. Los valores predeterminados de los argumentos están optimizados para las vocalizaciones humanas no lingüísticas.

Si dentro de las funciones antes mencionadas ingresamos la variable de código “summary = TRUE”, devuelve un marco de datos con una fila y tres columnas por variable acústica (media / mediana / desviación estándar); Si summary = FALSE, devuelve un marco de datos con una fila por cuadro STFT, y una columna por variable acústica. La mejor aproximación al contorno del tono considerando toda la información disponible se almacena en la variable llamada “pitch”. Además, la salida contiene estimaciones de tono por algoritmos separados incluidos en *pitchMethods* y varios otros descriptores acústicos.

Tras analizar los cantos con el guion descrito en el Anexo 6 mediante las funciones ya descritas, se obtiene el set de datos de 25 medidas las cuales son explicadas a continuación:

Tabla 2. Metadatos generados por las funciones *analyze* y *analyzefolder*

Variable	Descripción
<i>duration:</i>	Duración total del audio, s
<i>Duration_noSilence:</i>	Duración desde el comienzo de la primera trama de canto no silenciosa hasta el final de la última trama canto no silenciosa (s: NB: depende en gran medida de la configuración de longitud de ventana y silencio)
<i>ampl:</i>	Raíz cuadrada de amplitud media por cuadro, calculada como $\sqrt{\text{media}(\text{cuadro}^2)}$
<i>amplVoiced:</i>	Lo mismo que “ <i>ampl</i> ” para marcos sonoros y NA para cuadros sordos
<i>entropy:</i>	Entropía de Weiner del espectro del marco actual. Cerca de 0: tono puro o sonido tonal con casi toda la energía en armónicos; cerca de 1: ruido blanco
<i>f1_freq,f1_width,f2_freq,f2_width,f3_freq,f3_width</i>	la frecuencia y el ancho de banda de los primeros pulsos del audio ingresado.
<i>harmony:</i>	La cantidad de energía en los armónicos superiores, es decir, la relación entre la masa espectral total por encima de $1,25 \times F_0$ y la masa espectral total por debajo de $1,25 \times F_0$ (dB)
<i>HNR:</i>	Relación armónicos a ruido (dB) o HNR por sus siglas en inglés (harmonics-to-noise ratio), una medida de la armonicidad devuelta por <code>soundgen :: getPitchAutocor</code> . Si $HNR = 0$ dB, hay tanta energía en armónicos como en ruido.
<i>loudness:</i>	Ruido sonoro subjetivo, en tonos variantes en el canto, correspondiente al SPL_medido elegido.
<i>medianFreq:</i>	50º cuartil del espectro de la forma.
<i>peakFreq</i>	La frecuencia con potencia espectral máxima (Hz)
<i>peakFreqCut</i>	La frecuencia con potencia espectral máxima por debajo de <code>cutFreq</code> (Hz)
<i>pitch</i>	Contorno de tono postprocesado basado en todas las estimaciones de F_0
<i>quartile25, quartile50, quartile75 :</i>	Cuartil 25, 50 y 75 respectivamente.
<i>specCentroid</i>	El centro de gravedad del espectro del marco, primer momento espectral (Hz)

<i>specCentroidCut</i>	El centro de gravedad del espectro del marco debajo de cutFreq
<i>specSlope</i>	La pendiente de la regresión lineal se ajusta al espectro debajo de cutFreq
<i>voiced</i>	Indica con valores entre 0 y 1 la porcentaje del audio ingresado representa el canto.

Resultados

Organización de archivos de audio

Los archivos de audio fueron cortados y organizados como se puede observar en el Anexo 7, donde al llegar a canto por individuo se aplicó la limpieza de audios de cantos de los individuos listos para ser medidos y graficados según se propone en los Anexos 5, 6 y 7.

Graficar Espectrogramas

Según la metodología expuesta en el Anexo 3, ya sea mediante la función *spectro*, o validando el guardado de los plots generados mediante las funciones *analyze* y/o *analyzefolder*, el espectrograma de cada archivo fue guardado, en los mismos se observa título y nombre del grafico el código antes especificado para que pueda ser ubicado en las bases de datos de medidas acústicas y/o las variables físicas y ambientales del entorno donde se grabó. Acción mediante la cual se obtuvo un total de 141 Figuras que corresponde a cada archivo de audio usado en el presente, como se puede observar en la Figura 4, el eje de la X es el tiempo en milisegundos y el eje Y es la Frecuencia en Hertz (Hz).

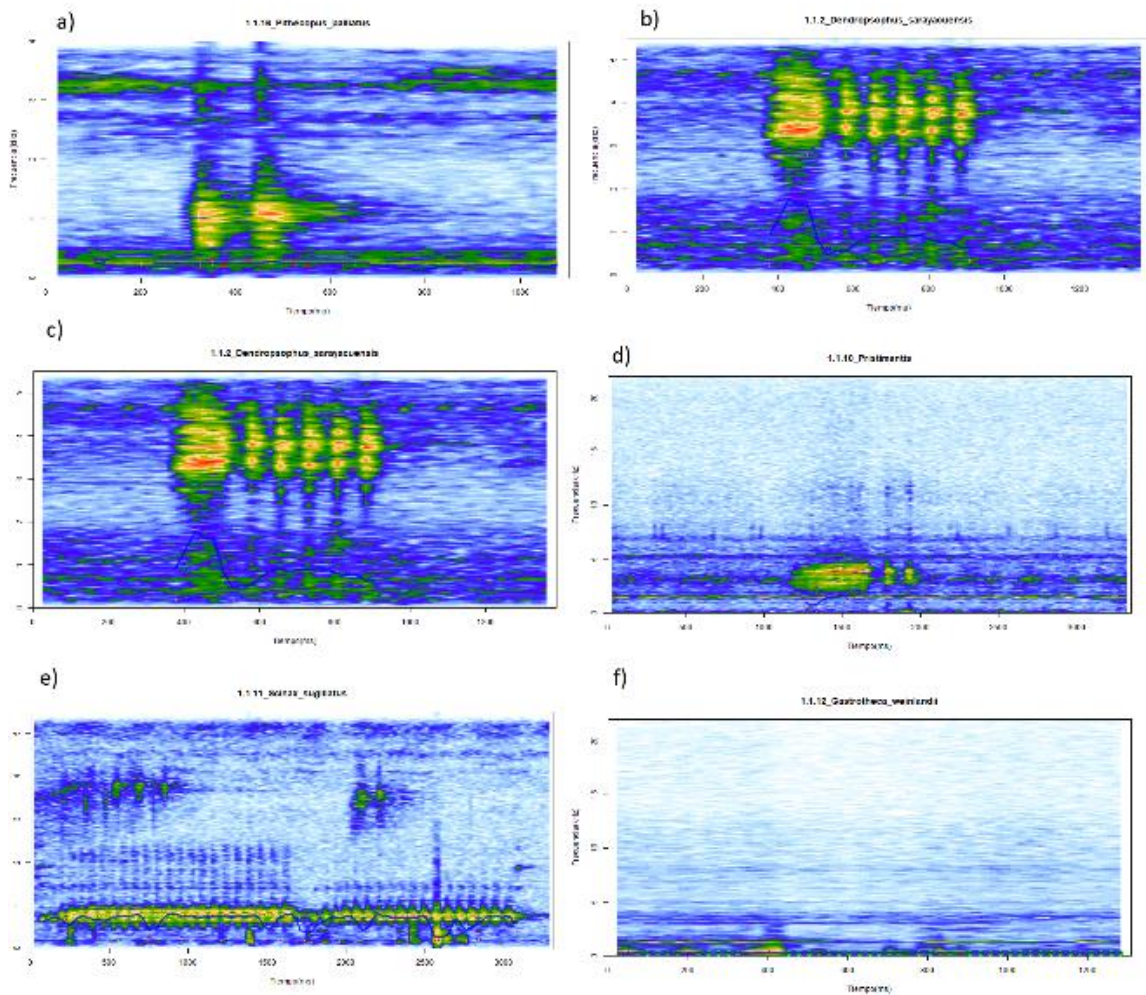


Figura 4. Mosaico ejemplo de los espectrogramas generados (espectrogramas restantes en Anexo 1) a) *Pithecopus palliatus*; b) *Dendropsophus sayayacuensis*; c) *Dendropsophus sayayacuensis*; d) *Pristimantis* e) *Scinax sugillatus*; f) *Gastrotheca weilandii*.

Bases de datos

Cada archivo de audio, debe ser complementado con la adecuada metadatos para facilitar su futuro análisis, la base de datos incluye la metadata recomendada (Tabla 1). Siendo así cómo se obtuvieron datos para todos los registros, 7 Géneros correspondientes a 15 Familias y 55 Especies, de las que se obtuvo las variables correspondientes de acuerdo a su lugar de colección (Tabla 3).

Tabla 3. Tabla resumen de especies de las cuales se extrajo exitosamente metadatos ambientales.

Genero	Familia	Especie	Número
Centrolenidae	Centrolenidae	Sin Identificar	1
Craugastoridae	Pristimantis	Sin Identificar	1
Dendrobatidae	Colostethus	Colostethus_jacobuspetersi	1
	Epipedobates	Epipedobates_anthonyi	3
Hemiphractidae	Gastrotheca	Gastrotheca_cornuta	1
		Gastrotheca_orophylax	1
		Gastrotheca_pseustes	2
		Gastrotheca_weinlandii	1
Hylidae	Boana	Boana_albopunctatus	1
		Boana_boans	2
		Boana_calcaratus	3
		Boana_cinerascens	6
		Boana_geographicus	6
		Boana_lanciformis	5
		Boana_punctatus	3
		Dendropsophus	Dendropsophus
	Dendropsophus_bifurcus		9
	Dendropsophus_bokermanni		6
	Dendropsophus_brevifrons		4
	Dendropsophus_carnifex		2
	Dendropsophus_gryllatus		1
	Dendropsophus_leucophyllatus		4
	Dendropsophus_marmoratus		13
	Dendropsophus_parviceps		1
	Dendropsophus_sarayacuensis		2
	Dendropsophus_triangulum	3	
	Hyloscirtus	Hyloscirtus_alytolylax	5
		Hyloscirtus_phyllognathus	2
	Nyctimantis	Nyctimantis_rugiceps	1
	Osteocephalus	Osteocephalus_verruciger	2
	Phyllomedusa	Phyllomedusa_tarsius	1
	Scinax	Scinax	1
		Scinax_garbei	8
		Scinax_quinquefasciatus	2
		Scinax_sugillatus	8
Sphaenorhynchus	Sphaenorhynchus_carneus	3	

Leptodactylidae	Leptodactylus	Leptodactylus_melanonotus	1
		Leptodactylus_pentadactylus	4
Phyllomedusidae	Pithecopus	Pithecopus_palliatus	3
Especie sin identificar			16

Mediante el uso de la función *analyze* (explicada en Metodología) extrajimos las medidas de los cantos, y obtuvimos las 28 medidas (Tabla 4), de las cuales pedimos la función *median* que devuelve la mediana de dichas medidas como se puede observar en la misma tabla.

Tabla 4. Resumen de medidas generadas mediante *analyze*,

	Media	Desviación estándar	Mínimo	Máximo
<i>duration</i>	5.67537392	13.3774296	0.517	136.188209
<i>duration_noSilence</i>	4.67135922	13.4489273	0.05	135.75
<i>voiced</i>	0.42854027	0.32457	0.00490196	1
<i>ampl_median</i>	0,05	0.04136583	0.00242463	0.19118256
<i>amplVoiced_median</i>	0.10121476	0.04117835	0.04198459	0.20038784
<i>entropy_median</i>	0.52170945	0.14434409	0.02978477	0.76604335
<i>f1_freq_median</i>	1240.78339	546.647857	260.18	3201.82
<i>f1_width_median</i>	200.914061	128.614587	19.8967807	491.642599
<i>f2_freq_median</i>	1992.34479	685.263969	745.79	4338.02
<i>f2_width_median</i>	245.134249	103.980356	13.4509516	521.448535
<i>f3_freq_median</i>	2915.9336	608.412577	1779.865	4644.95
<i>f3_width_median</i>	269.779614	96.6826084	48.7474447	492.111792
<i>harmonics_median</i>	8.25057572	6.15668044	- 6.70425009	20.0435237
<i>HNR_median</i>	5.21800226	3.84503	- 5.66866293	15.8717479
<i>loudness_median</i>	10.9233459	2.95312377	4.48761848	20.6959319
<i>medianFreq_median</i>	2333.59619	1089.15157	205.250627	4690.86466
<i>peakFreq_median</i>	2084.11398	1263.35018	125.301508	4824.69949
<i>peakFreqCut_median</i>	2160.66982	1261.9917	205.502513	4905.02762
<i>pitch_median</i>	863.416115	575.928867	125.12136	2523.92092
<i>quartile25_median</i>	1671.76079	936.122272	165.200501	4260.32582
<i>quartile50_median</i>	2227.17148	1069.82151	225.275689	4670.8396
<i>quartile75_median</i>	2906.30641	966.15402	345.426065	4871.09023
<i>specCentroid_median</i>	2580.98182	849.135335	336.892832	4482.56315
<i>specCentroidCut_median</i>	2392.16236	805.798538	356.892719	4279.68169
<i>specSlope_median</i>	0.00028546	0.0004395	0.00158773	0.00085681

Discusiones

El protocolo propuesto fue creado por una recopilación de datos, clasificación que nos servirá para el almacenamiento de grabaciones, permitiendo conservar y actualizar los registros acústicos, proporcionando un libre acceso para aportaciones de estudiantes e investigadores (Aparicio, Moreno & Macías, 2015). En las fonotecas todas las grabaciones son sometidas a un proceso de digitalización y posterior edición y análisis espectrográfico para separar los distintos registros correspondientes a cada individuo registrada en la grabación, a más de estos procesos frecuentes, nuestro estudio extrajo las medidas acústicas que nos servirá para que la diferenciación entre individuos sea más eficaz (Toro, Giraldo & Salazar, 2006).

Según diversos autores (Toledo, Emmrich, Glaw, y Haddad, 2017), para el estudio de la bioacústica es necesario tener completas bases de datos, que contengan diferentes tipos de medidas acústicas como así también variables ambientales. El presente protocolo se ajusta a este supuesto ya que ha permitido integrar registros de bioacústicos en anfibios. En consecuencia, dichos registros acústicos fueron susceptibles de ser analizados para generar espectrogramas donde se observe su distribución entre los ejes de frecuencia y tiempo (duración del llamado). Por lo tanto, es importante la estandarización de un protocolo para futuros monitoreos, ya muestra la forma de mantener y generar datos en el campo estables a lo largo del tiempo, análisis de las grabaciones obtenidas, evitando sesgos y alteraciones en cualquiera de los niveles en los que dichos datos pueden ubicarse (Crandall, et al., 2000).

La fonoteca es un elemento muy importante para el reconocimiento de las especies. Los cantos de anuros son una de las fuentes de información más útiles en su clasificación e identificación de especies. Debido a su valor en la biología de los anfibios (Bee, 2004; Silva & Elosa, 2013; Hutter & Guayasamin, 2015). En consecuencia, los espectrogramas generados desde el protocolo propuesto han permitido explorar cambios en las frecuencias de cantos. Estos cambios son usados para el reconocimiento de especies como así también son herramientas importantes en la separación taxonómica de grupos crípticos y muy relacionados morfológicamente (eg., *Pristimantis*) (Silva & Elosa, 2013). En adición, la ruta utilizada para procesar, ordenar y clasificar el sonido queda para disposición de otros investigadores, principalmente para aquellos interesados en hacer inventarios biológicos, monitoreo de comunidades y poblaciones, comparaciones de nicho acústico, determinación de espacios reproductivos y en general aplicaciones de la ecología acústica a la conservación (Bee, 2004; Duellman, 1976).

Las fonotecas se realizan con el fin de que su acceso sea público y que sea aprovechado por estudiantes, académicos e investigadores teniendo así un registro asequible y ordenado sobre las especies y sus características ambientales más

relevantes. Dentro del campo de la bioacústica, diversas universidades alrededor del mundo han generado fonotecas de libre acceso, también así con la facilidad de agregar nuevos registros. Por ejemplo, *Macaulay Library* de Cornell University, la cual no solo alberga sonidos si no también videos y fotografías correspondientes a especies de diferentes lugares del mundo. A un nivel local tenemos *Bioweb* de la Pontífice Universidad del Ecuador y la Secretaria Nacional de Ciencia y Tecnología, la cual, a pesar de condensar datos como la antes mencionada, no permite a usuarios externos agregar nuevos registros a la misma. El protocolo generado y en consecuencia la fonoteca resultante puede aportar significativamente a bases de datos regionales, dedicadas al manejo y conservación de la biodiversidad.

Bibliografía

- Angulo, A., La Marca, E., Rueda-Almonacid, J. V., & Rodríguez-Mahecha, J. V. (2006). *Técnicas de inventario y Monitoreo para los anfibios de la región Tropical Andina. Historia*. Bogotá-Colombia.
- Anikin, A. (2019). Soundgen: an open-source tool for synthesizing nonverbal vocalizations. *Behaviour Research Methods*, 51(2), 778-792.
- Aparicio, C. F., Moreno, A. S., & Macías, E. C. M. (2015). Solución Computacional Para La Parametrización De Señales Bioacústicas.
- Audacity Team. (2018). Audacity(R): Free Audio Editor and Recorder [Computer application]. Version 2.3.0.
- Batallas, D., & Brito, J. (2016). Análisis bioacústico de las vocalizaciones de seis especies de anuros de la laguna Cormorán, complejo lacustre de Sardinayacu, Parque Nacional Sangay, Ecuador. *Revista Mexicana de Biodiversidad*, 87(4), 1292–1300. <https://doi.org/10.1016/j.rmb.2016.10.005>
- Bardeli, R., Wolff, D., Kurth, F., Koch, M., Tauchert, K. H., & Frommolt, K. H. (2010). Detecting bird sounds in a complex acoustic environment and application to bioacoustic monitoring. *Pattern Recognition Letters*, 31(12), 1524-1534.
- Bee, M.A. (2004) Sound Ruler acoustical analysis: a free, open code, multi-platform sound analysis and graphing package. *Bioacoustics*, 14, 171–178. <https://doi.org/10.1080/09524622.2004.9753520>
- Bioacoustics Research Program. (2014). Raven Pro: Interactive Sound Analysis Software (Version 1.5) [Computer software]. Ithaca, NY: The Cornell Lab of Ornithology. Available from <http://www.birds.cornell.edu/raven>.

- Caycedo-Rosales, C., Ruiz-Muñoz, J. F., & Orozco-Alzate, M. (2013). Reconocimiento automatizado de señales bioacústicas: Una revisión de métodos y aplicaciones. *Ingeniería y Ciencia*, 9(18), 1–18.
- Crandall, K. A., Bininda-Emonds, O. R. P., Mace, G. M., & Wayne, R. K. (2000). Considering evolutionary processes in conservation biology. *Trends in Ecology & Evolution*, 15(7), 290–295. [https://doi.org/10.1016/S0169-5347\(00\)01876-0](https://doi.org/10.1016/S0169-5347(00)01876-0)
- Duellman, W. E. 1978. The Biology of an Equatorial Herpetofauna in Amazonian Ecuador. University of Kansas, Misc. Publ. No. 65: 1-352.
- Duellman, W. E., Thomas, R. 1996. Anuran Amphibians from a Seasonally Dry forest in Southeastern Peru and comparisons of the Anurans Among sites in the Upper Amazon Basin. *Occas. Pap. Nat. Hist. Mus. Kansas* 180: 1-34.
- Duellman, W.E., Trueb, L. 1986. *Biology of Amphibians*. McGraw-Hill. New York.
- Herrán Borja, J. G., & Muñoz Pinilla, J. H. (2018). La bioacústica: una herramienta investigativa para el conocimiento y conservación de especies de aves focales en las Cascadas de Sueva (Junín, Cundinamarca).
- Hutter, C. R., & Guayasamin, J. M. (2015). Cryptic diversity concealed in the Andean cloud forests: two new species of rainfrogs (Pristimantis) uncovered by molecular and bioacoustic data. *Neotropical Biodiversity*, 1(1), 36-59.
- Marchal, J., Fabianek F., & Scott C.. (2019). bioacoustics: Analyse Audio Recordings and Automatically Extract Animal Vocalizations. R package version 0.2.1. <https://CRAN.R-project.org/package=bioacoustics>
- Márquez, R., Llusia, D., & Beltrán, J. F. (2014). Aplicación de la bioacústica al seguimiento de anfibios. *Boletín de La Asociación Herpetológica Española*, 25(2), 52–58.
- Morris, G., Montealegre, F. (2001), *Los Tettigonidae (Orthoptera: Ensinedae) del Parque Nacional Ucumari: Aspectos interesantes de la comunicación acústica* *Revista Colombiana de Entomología*. Vol 27. 93-105.
- Obrist, M. K., Pavan, G., Sueur, J., Riede, K., Llusia, D., & Márquez, R. (2010). *Bioacoustics approaches in biodiversity inventories*. *Abc Taxa* (Vol. 8).
- Ossa, G., Forero, L., Novoa, F., & Bonacic, C. (2015). Caracterización morfológica y bioacústica de los murciélagos (Chiroptera) de la Reserva Nacional Pampa de Tamarugal. *Biodiversidata*, 3, 21-29
- Piñero, F. N. E., Michelena, A. L., & Pérez, K. V. FONOTECA DE AVES CUBANAS:

UNA VÍA PARA SU ESTUDIO Y CONSERVACIÓN.

- R Core Team (2019). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <https://www.R-project.org/>.
- Silva, A., & Eliosa, H. (2013). Comunicación acústica en anfibios y su trascendencia evolutiva. *Revista Ciencias*, (109–110), 20–27.
- Sueur J, Aubin T, Simonis C (2008). seewave: a free modular tool for sound analysis and synthesis. *Bioacoustics*, 18: 213-226
- Toledo, L. F., Emmrich, M., Glaw, F., & Haddad, C. F. B. (2017). The use of bioacoustics in anuran taxonomy: theory, terminology, methods and recommendations for best practice (Vol. 4251).
- Toro, N., Giraldo, S., & Salazar, T. (2006). RECONOCIMIENTO DE ESPECIES DE ANUROS POR SUS CANTOS, EN ARCHIVOS DE AUDIO , MEDIANTE TÉCNICAS DE PROCESAMIENTO DIGITAL DE SEÑALES. *Scientia Et Technica*, XII(32), 1–6. Retrieved from <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=84911652002>
- Wildlife Acoustics Inc. (2014). *Song Meter SM3 Marine Bioacoustics Recorder User Guide*. Retrieved from www.wildlifeacoustics.com

Anexos

Anexo 1 – Paso a paso, corte de archivos de audio obtenidos por W. Duellman en la década de 1970. El mismo fue desarrollado en base al programa Audacity versión 2.3.0

1.- Abrir el archivo en el programa Audacity.

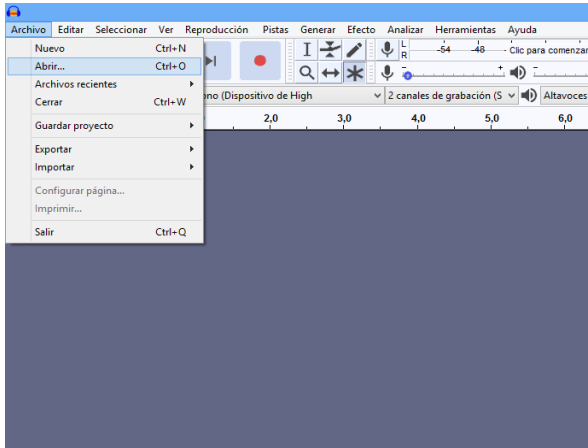


Figura 1

2.- Escogemos el archivo con el que deseamos trabajar.

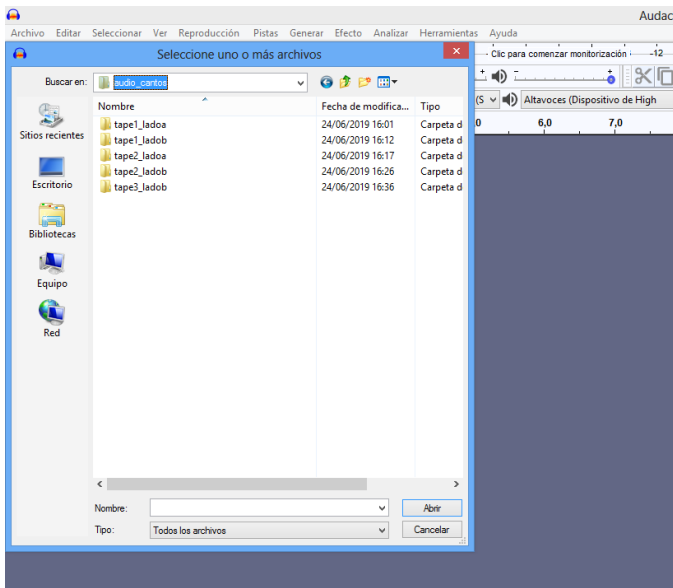


Figura 2

3.- Seleccionado el archivo, aparece una ventana en donde debemos de elegir la segunda opción.

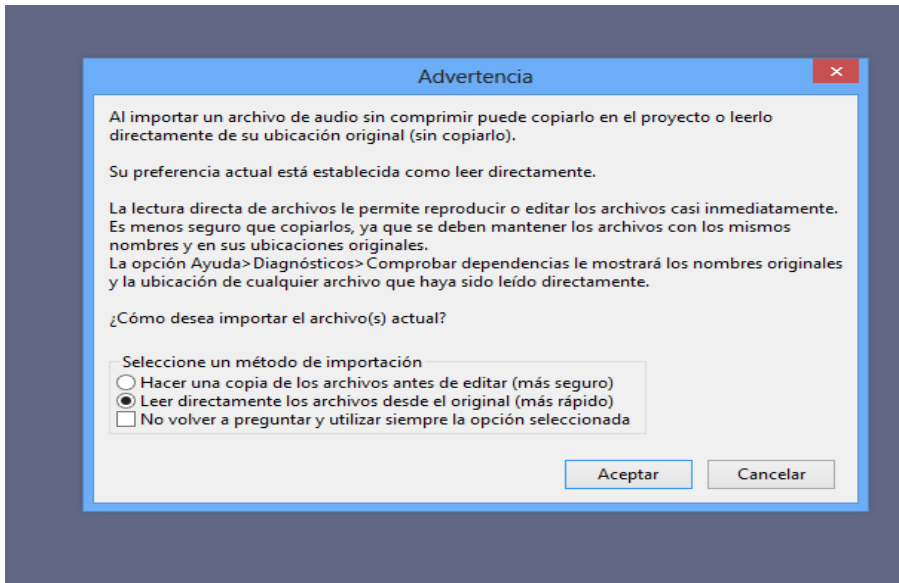


Figura 3

4.- El canto se abrirá en forma de onda.

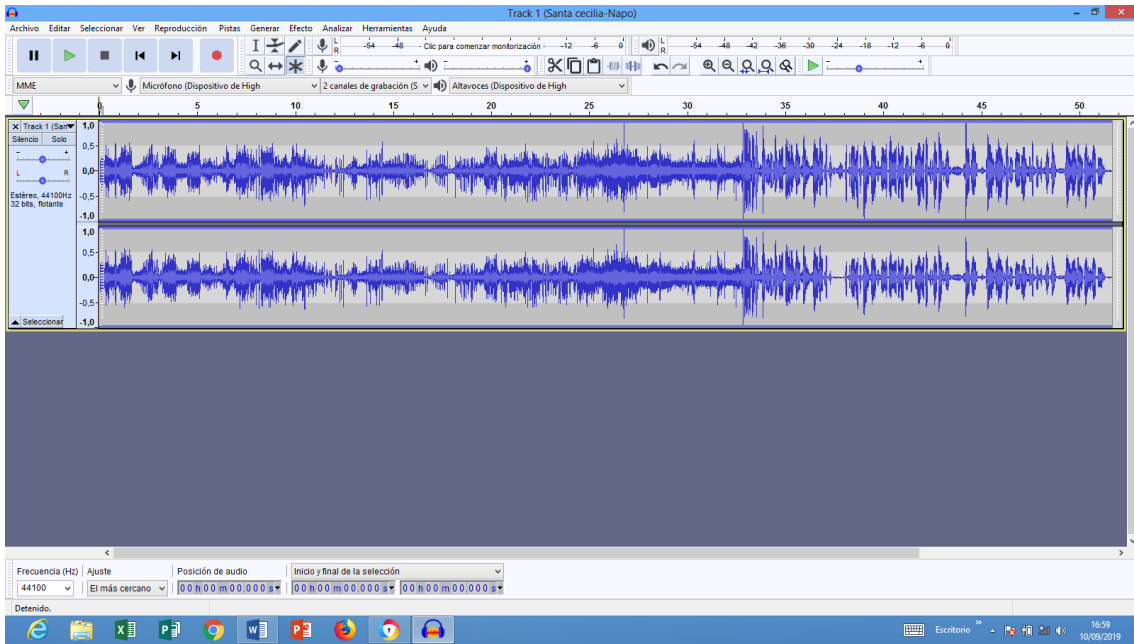


Figura 4

5.- Para facilitar su manipulación en la pantalla lo vamos a cambiar a espectrograma.

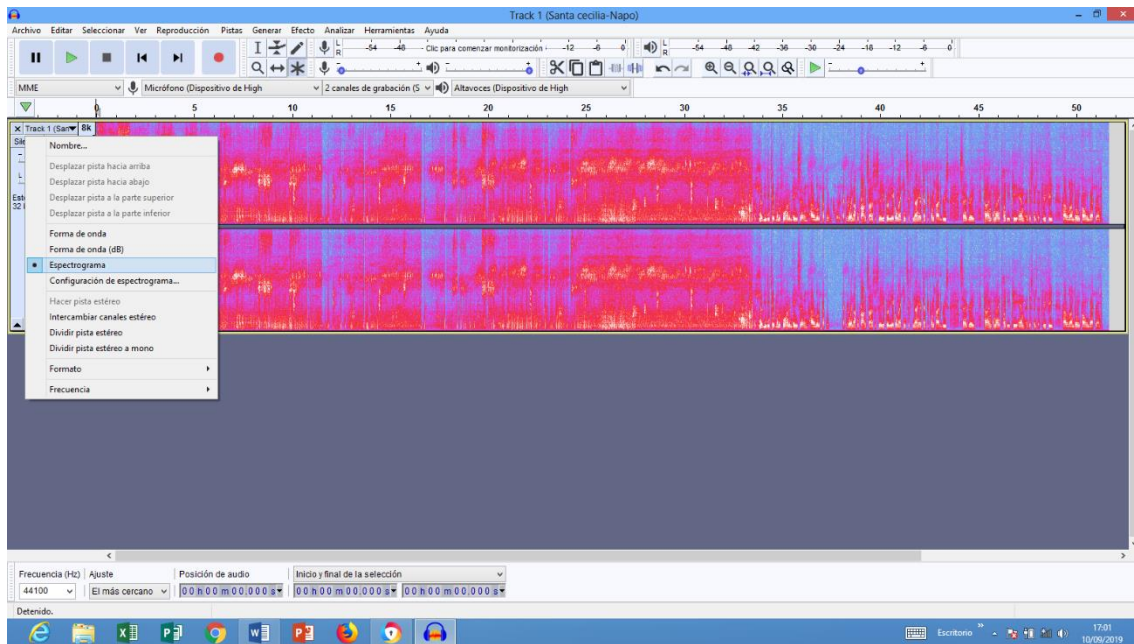
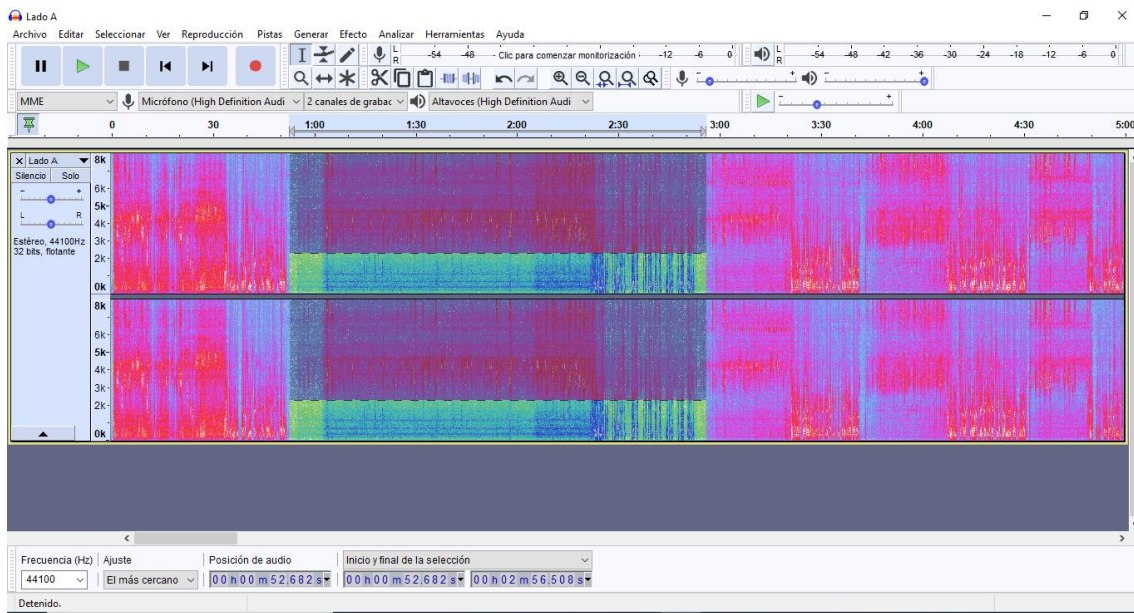


Figura 5

6.- Una vez que identificamos el inicio del canto del individuo, y fin de la grabación de dictado de metadatos.



Figuras 6

7.- Mediante la función de duplicado de la ventana *Editar* o su atajo de combinación *Ctrl+D*.

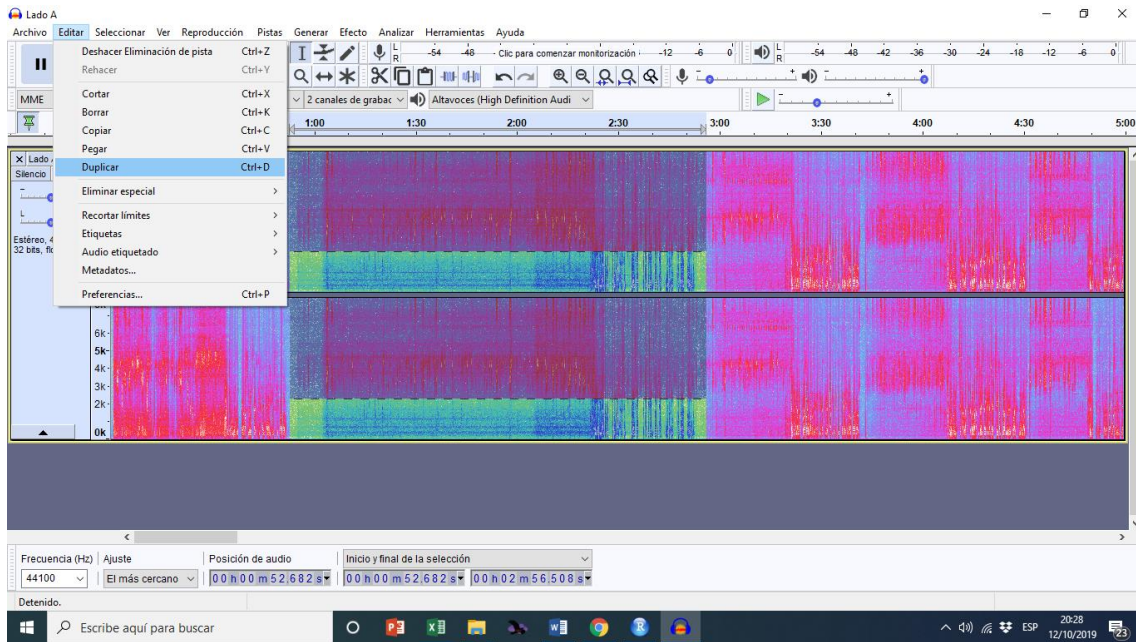


Figura 7

8.- Una vez separada cada sección deseada, hemos cumplido con el aislamiento de cada Pista.

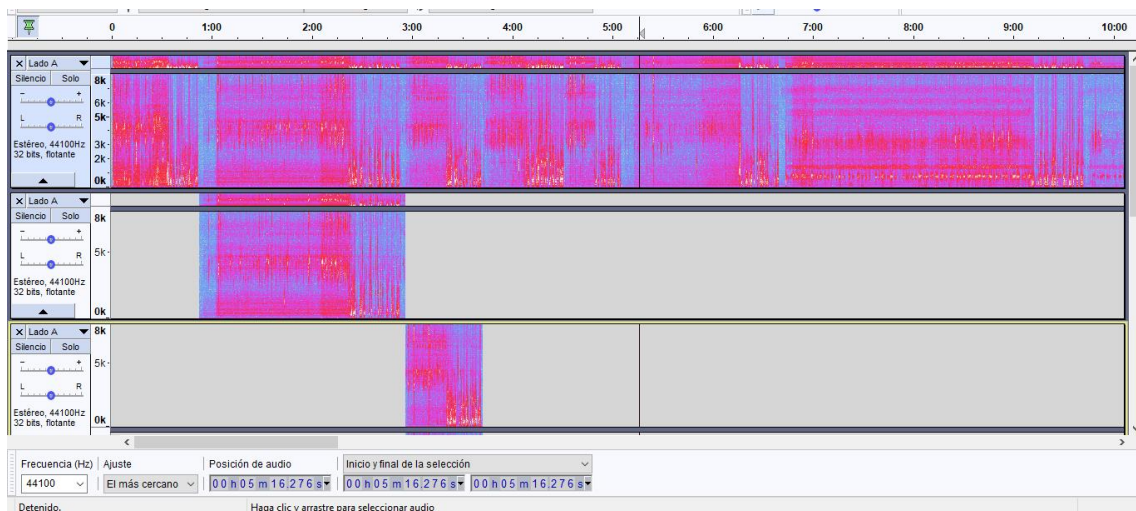


Figura 8

9.- Nos ubicamos en cada Pista y procedemos a exportar todo el proyecto en archivos tipo .wav; mediante la función *Exportar* de la ventana *Archivo*.

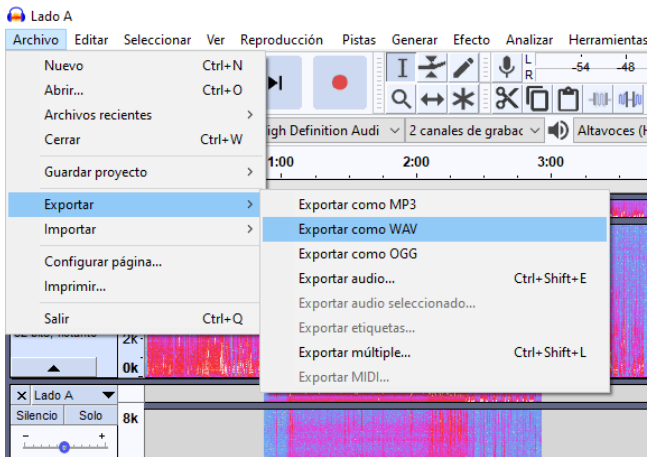


Figura 9

10.- Aparecerá una ventana, donde seleccionas la carpeta y asignas el nombre del archivo.

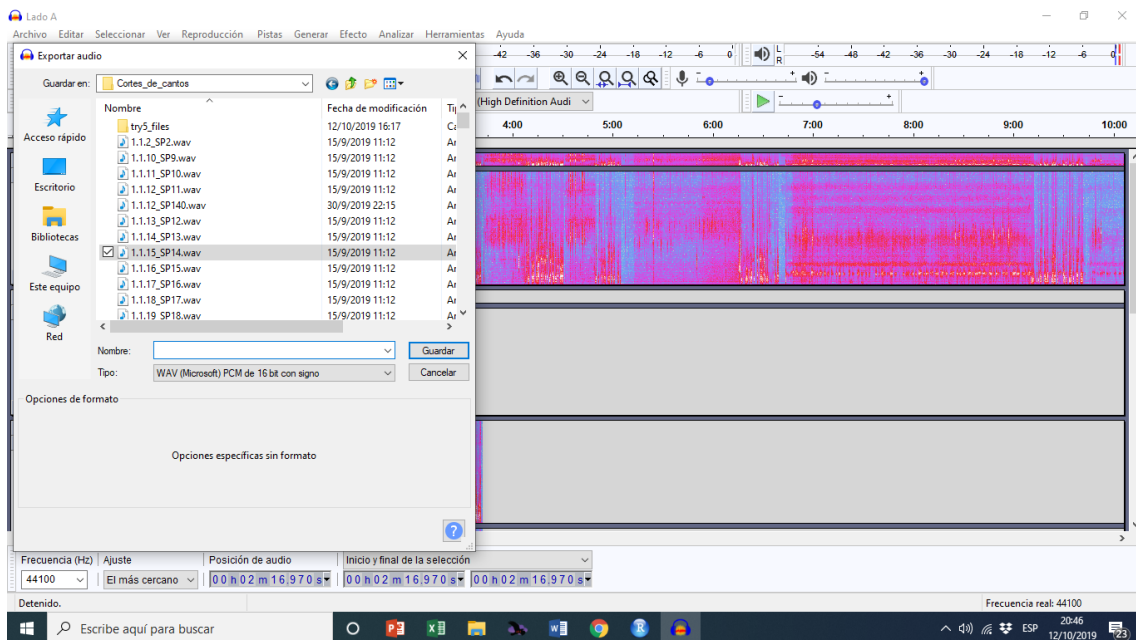


Figura 10

Anexo 2 – Tutorial para la limpieza de grabaciones de audio.

El tutorial se realizó mediante el software Audacity versión 2.3.0

1.- Lo siguiente que hacemos es oprimir CTRL-D para duplicar la sección del canto seleccionada. La misma que debe ser cortada en un espacio inicial de 300 milisegundos (ms) antes del inicio del canto y 300 ms al final de la vocalización.

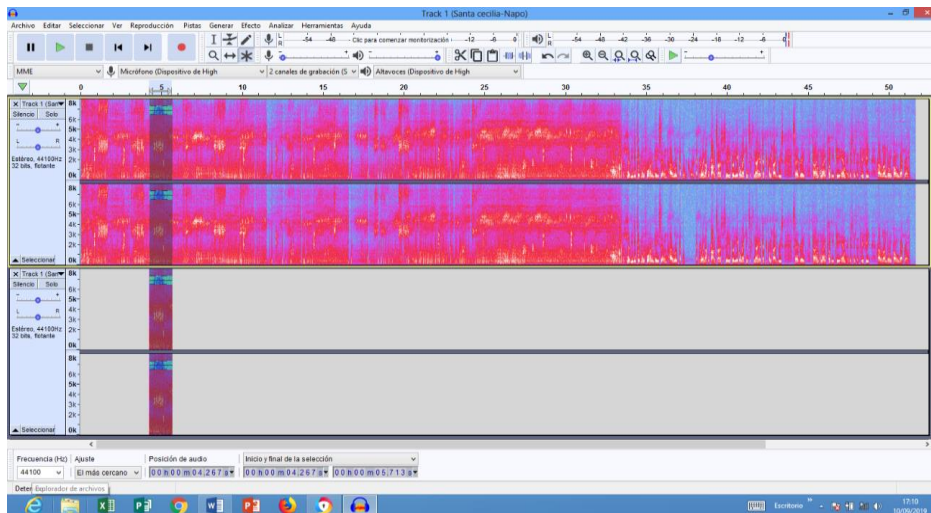


Figura 1. Ventana donde se observa el duplicado de la sección deseada del audio.

2.- Nos quedamos con el canto duplicado y lo expandimos con la lupa o ctrl-1 para poder observar lo cambios que tenemos conforme lo vayamos limpiando.

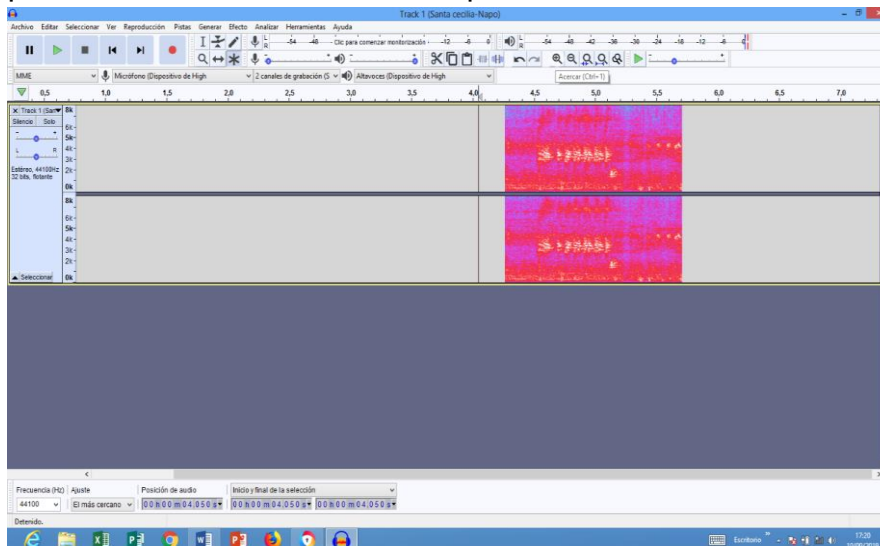


Figura 2. Corte de audio duplicado.

3.- A continuación, vamos a dirigirnos a la pestaña efecto en la barra superior.

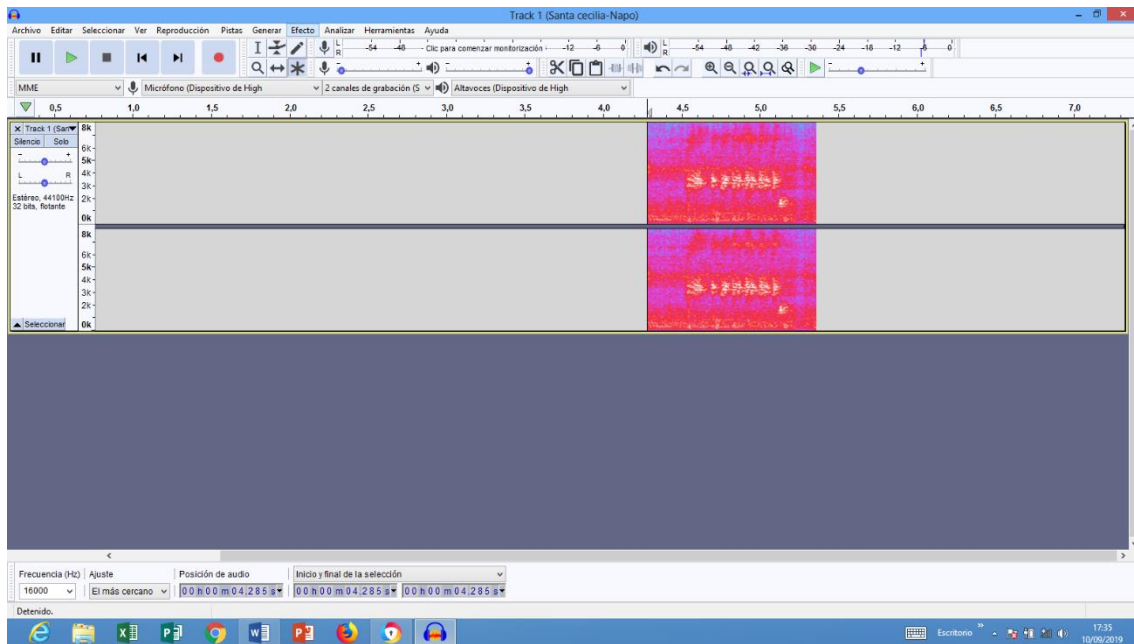


Figura 3. Sección de audio cortada

4.- Buscamos la opción wahwah. La misma que pretende aumentar la nitidez del archivo, ejecutando un oscilador de baja frecuencia (LFO, por sus siglas en inglés) lo mismo que modifica el espectro de frecuencia mediante filtros.

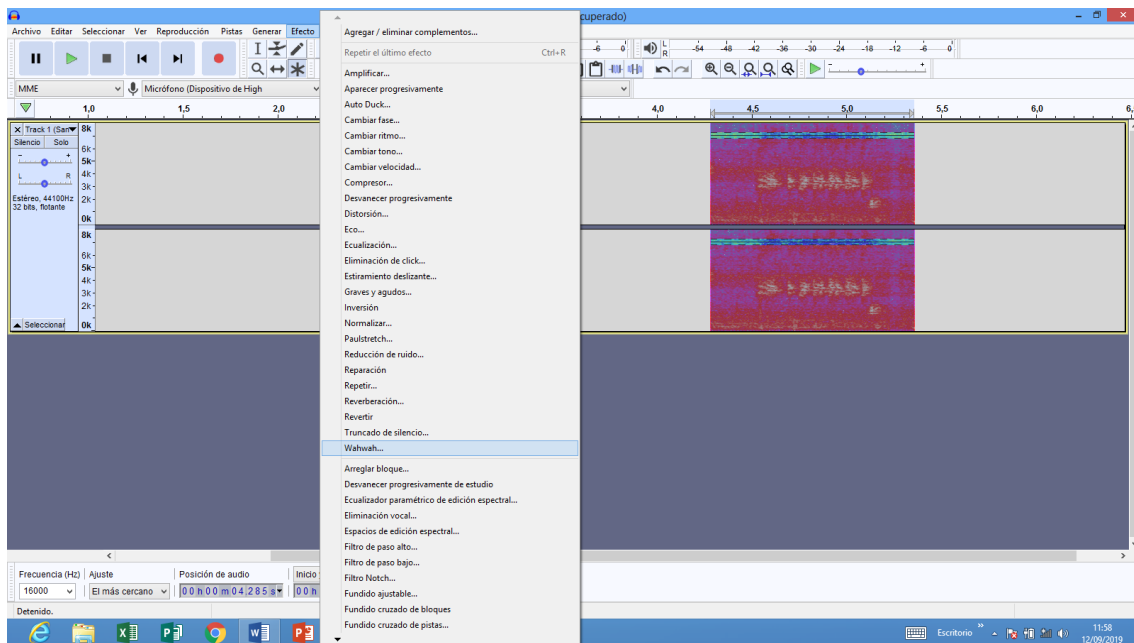


Figura 4. Pantalla de Audacity, donde se observa desplegada la pestaña efectos.

5.- Observamos los valores originales del canto.

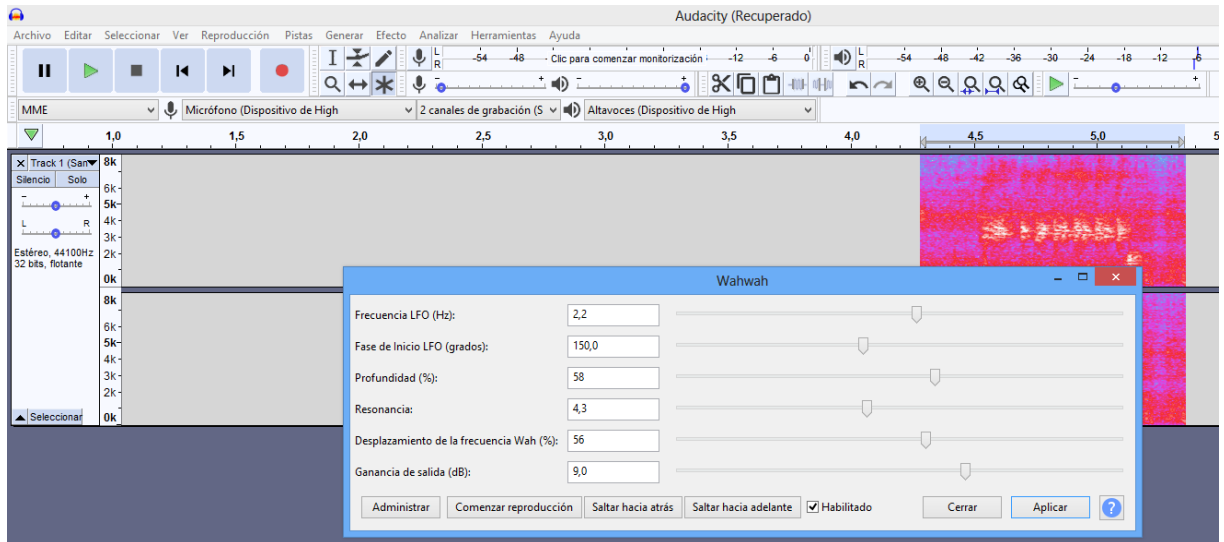


Figura 5. Cuadro de dialogo de la función Wahwah, con los valores originales de archivos de audio.

6.- Modificamos las variables, reduciendo a cero Frecuencia LFO (Hz), la Fase de Inicio LFO, Resonancia y la Profundidad.

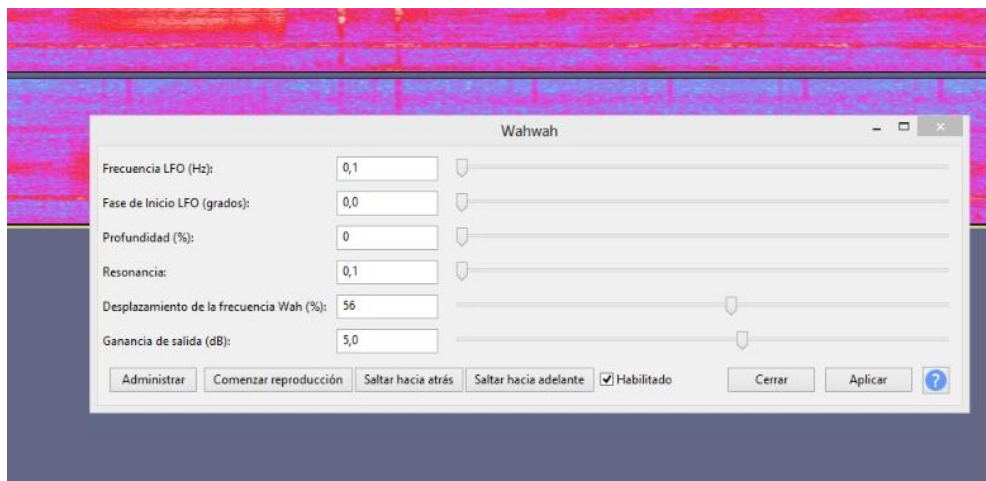


Figura 6. Cuadro de dialogo de la función wahwah, donde se muestran los valores alterados.

7.- Finalmente exportamos como WAV

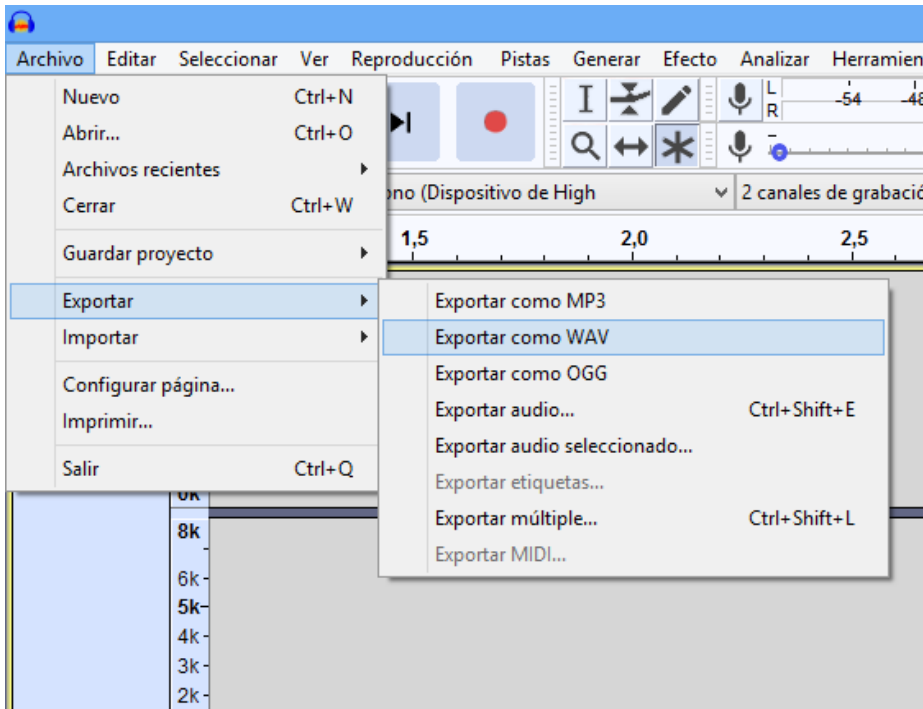


Figura 7. Ventana Archivo, del programa Audacity, donde se indica el formato para exportar.

8.- Al momento de renombrar el archivo ya limpio, constatamos que el archivo sea guardado en 16bits

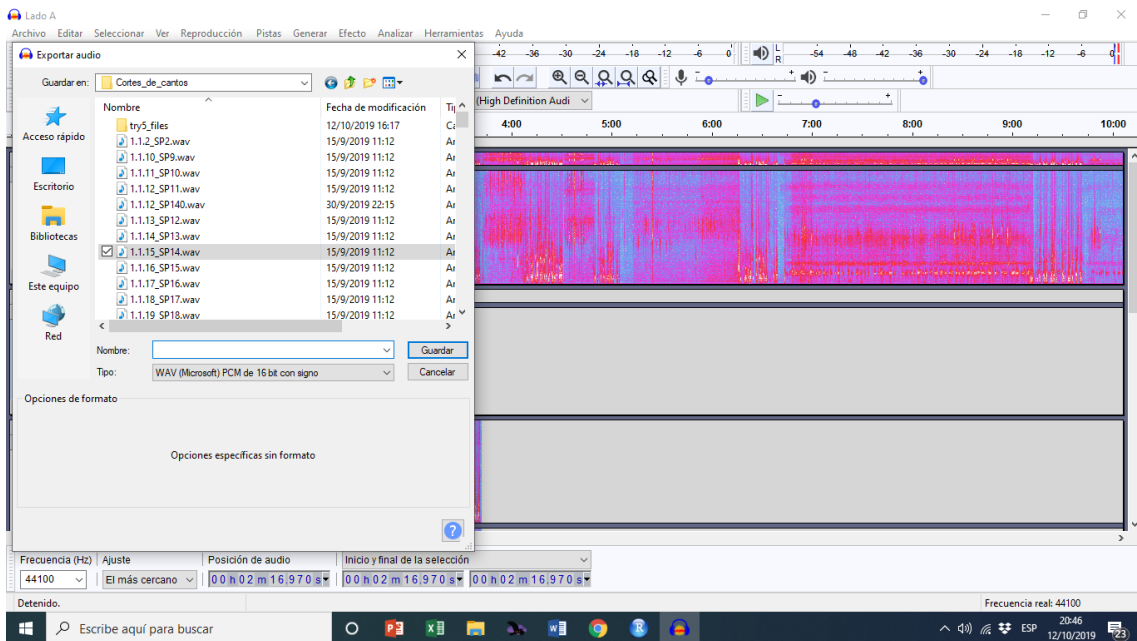


Figura 8. Ventana donde se elige la calidad del formato.

Anexo 3 - Guion para ingresar archivos de audios al software R Project (R Core Team, 2019)

Debemos instalar y activar la librería *bioacoustics* (Marchal, Fabianek & Scott 2019); la misma que contiene variedad de funciones útiles para el procesamiento de audio de animales tales como lectores de audio para el uso de los mismos en el software R Project. D

```
install.packages("bioacoustics")  
library(bioacoustics)
```

readaudio es la función que usaremos para llamar archivos de audio ya sean en formatos.wav, wac, .mp3 Donde "a" es el nombre del objeto en el que se almacenara el archivo de audio.

Entre comillas colocaremos la ruta al archivo con los formatos indicados previamente; en caso de tener un directorio activo que contenga el o los archivo(s) deseados solo debemos colocar el nombre del archivo.

```
a<-read_audio("3.2.41_SP114.wav")  
b<-read_audio( "2.1.18_SP68.wav" )
```

Anexo 4 - Guion de códigos para Graficar espectrogramas en R Project (R Core Team, 2019)

El paquete *seewave*(Seuer et.al, 2008) incluye diferentes funciones para analizar, manipular, mostrar, editar y sintetizar ondas de tiempo (particularmente sonido). Este paquete procesa análisis de tiempo (oscilogramas y envolventes), contenido espectral, factor de calidad de resonancia, entropía, correlación cruzada y auto correlación, frecuencia dominante, señal analítica, coherencia de frecuencia, espectrogramas 2D y 3D y muchos otros análisis.

```
install.packages("seewave ")  
library(seewave)
```

La función *spectro* cumple la función de dibujar un espectrograma en dos dimensiones; el eje de la X presenta el tiempo en el que se se desarrolla el sonido, y el de la Y muestra la frecuencia con el que el mismo sonido se efectúa. Adicionalmente mediante una escala de colores visualiza los decibeles (dB).

```
spectro(a , #Objeto de R llamado con la función antes indicada  
        flab = "Frecuencia (kHz)", #Etiqueta en el eje Y  
        tlab = "Tiempo (s)" , #Etiqueta en el eje X  
        alab = "Amplitud (dB)" , #Etiqueta de la leyenda es opcional
```

```
palettepalette= "seewave")#Color para diferenciar la escala de la leyenda.
```

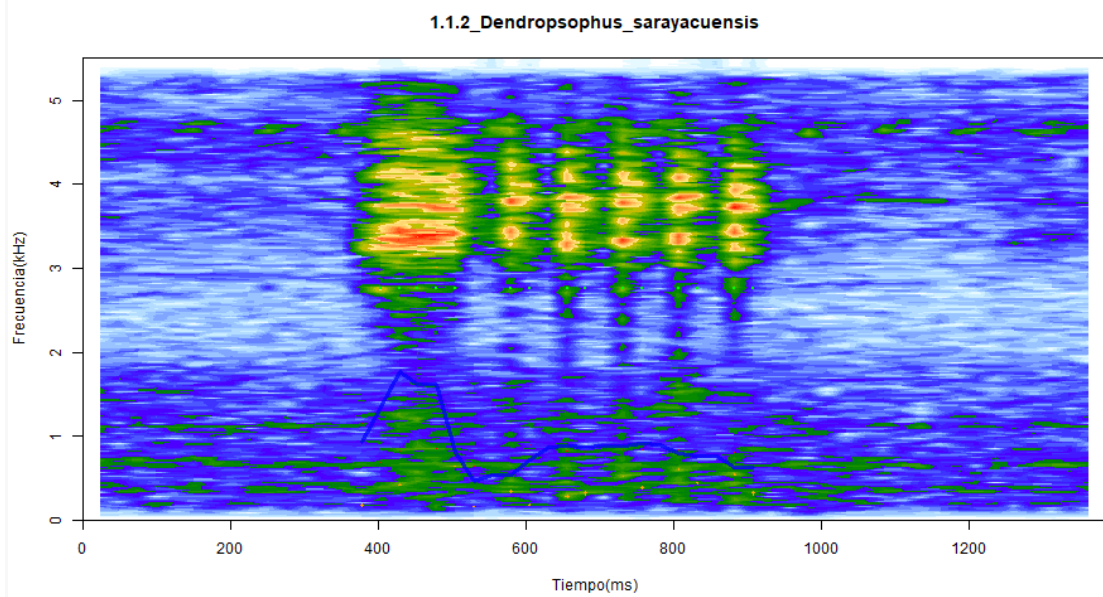


Figura 1- Espectrograma realizado con la función *spectro*

Anexo 5 - Correlación entre sonidos mediante el software R Project (R Core Team, 2019)

```
wave1<-cutw(a,#Primer objeto de R llamado con la función antes indicada  
f=22050,#Frecuencia maxima para el sonido a ser comparado.  
from=0.350,#Corte de inicio para la duración en segundos.  
to=1.05,#Corte de final para la duración en segundos.  
plot=FALSE) #Es necesario negar la creación del plot.  
wave2<-cutw(b, #Segundo objeto de R llamado con la función antes indicada  
f=22050,from=0.350, to=1.05,plot=FALSE)
```

```
corenv(wave1,#Primer objeto de R con el formato final que entrega la función cutw.  
wave2,#Segundo objeto de R con el formato final que entrega la función cutw.  
f=22050)#Frecuencia a la que se desea realizar la correlación, en Hertz como  
unidad; argumento que no es necesario si los objetos a ser comprados son objetos  
creados a partir de la función cutw.
```

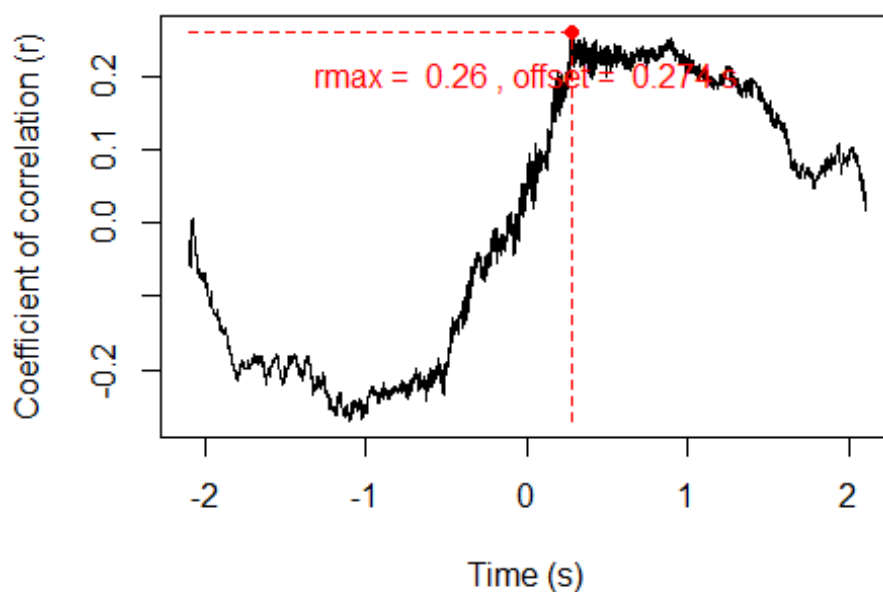


Figura 1

Como podemos observar en el grafico N al comparar dos cantos totalmente diferentes, el plot de la correlación nos indica un $r_{max}=0.26$, valor que al acercarse al 1 indica mayor similitud entre dichos archivos de canto.

Es así que, al comparar archivos de canto iguales, como se observa en el Grafico N, nos devuelve un $r_{max} = 1$, expresando así la máxima similitud en dichos archivos.

```

wave1<-cutw(a,f=22050,from=0.4,to=1,plot=FALSE)
wave2<-cutw(a,f=22050,from=0.4,to=1,plot=FALSE)
corenv(wave1,wave2,f=1050)

```

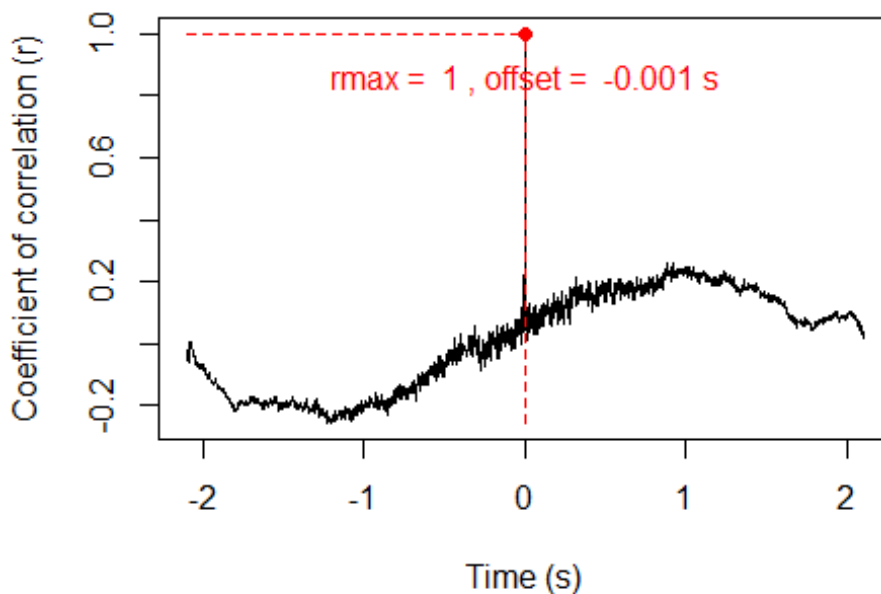


Figura 2- Correlación con alto grado de similitud ($r_{max}=1$).

Anexo 6 – Guion para análisis de medidas R Core Team, 2019)

```
install.packages("soundgen ")
```

```
library(soundgen)
```

1 Análisis de archivos

FILE3.2.42_SP115= **analyze** ("3.2.42_SP115.wav",#Nombre y/o ruta al archivo que deseamos analizar.

summary = T, #si es TRUE, solo devuelve un resumen de las variables acústicas medidas (media, mediana y Desviación Estándar). Si es FALSO, devuelve una lista que contiene valores cuadro por cuadro.

summaryFun = c('median', 'mean','sd'),#Un vector de nombres de funciones utilizadas para resumir cada característica acústica

smooth = T ,#si smooth es un número positivo, los valores atípicos de las variables en smoothVars se ajustan con suavizado medio. smooth de 1 corresponde a una

ventana de aproximadamente 100 milisegundos y desviación tolerada de aproximadamente 4 semitonos. Para deshabilitar, establezca smooth en NULL

```
xlab = "Tiempo(ms)",#Etiqueta del eje X.
```

```
ylab = "Frecuencia(kHz)",#etiqueta del eje Y. #Parámetros de graficos
```

```
colorTheme = 'seewave', showLegend = F, #Parámetro de colores en Figuras.
```

```
plot = TRUE ,#Si es igual a TRUE generara espectrogramas que muestren todos los archivos analizados
```

```
savePlots = TRUE) #Si es igual a TRUE guardara en la misma carpeta todos los espectrogramas realizados anteriormente.
```

3.2.42_SP115

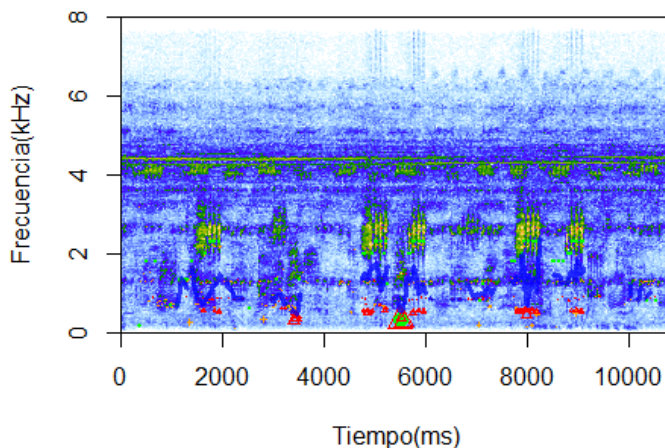


Figura 1 – Espectrograma generado al momento de usar la función *analyze*, en una especie sin identificar.

FILE3.2.42_SP115

```
## duration duration_noSilence voiced ampl_median amplVoiced_median
## 1 10.851 10.5 0.4872979 0.04630763 0.05678347
## dom_median entropy_median f1_freq_median f1_width_median
f2_freq_median
## 1 1266.579 0.5548146 1208.12 219.266 2243.99
## f2_width_median f3_freq_median f3_width_median harmonics_median
## 1 213.2528 2727.35 204.7178 9.85819
## HNR_median loudness_median medianFreq_median peakFreq_median
## 1 3.69114 8.137151 3509.386 4190.238
```

```
## peakFreqCut_median pitch_median pitchAutocor_median pitchCep_median
## 1 4270.338 1112.329 2000 NA
## pitchSpec_median quartile25_median quartile50_median quartile75_median
## 1 849.3943 2287.857 2888.609 4190.238
## specCentroid_median specCentroidCut_median specSlope_median
## 1 3187.145 3114.079 2.260802e-05
```

2 Análisis de carpetas que contenga varios archivos de audio.

Para analizar carpetas con varios archivos de audio, se usó la función *analyzefolder*, la misma que funciona de igual manera que *analyze*, devolviendo el mismo set de variables.

Guardamos nuestros resultados como un objeto tipo `data.frame`, con la finalidad de una exportación ágil; ya que esta función creo un objeto tipo matriz.

```
base<-data.frame(FILE3.2.42_SP115)
```

Procedimos a exportarlo al directorio de trabajo, función mediante la cual podemos indicar con que formato deseamos el archivo exportado.

```
write.table(base,file = "~/medidas.txt" )
```

Anexo 7 – Jerarquía de carpetas de archivos de audio (R Core Team, 2019)

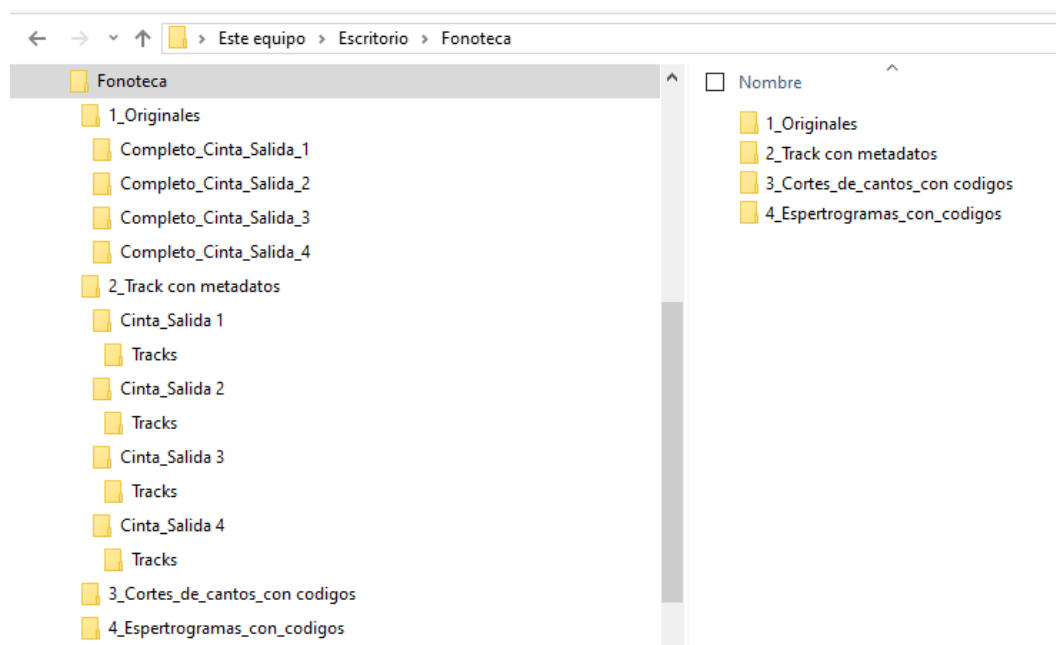


Figura 15. Esquema jerárquico de organización de archivos de audio. Autoría propia

Anexo 8 – Espectrogramas extraídos en el proceso de análisis.

Se encuentra como un archivo adjunto en formato de Word, con el nombre Anexo 2 – Espectrogramas

Anexo 9 - Base de datos de variables Ambientales

Se encuentra como un archivo adjunto de Excel; con el nombre Fonoteca_Variables

Anexo 5 - Base de datos con medidas

Se encuentra como un archivo adjunto de Excel., bajo el nombre Fonoteca_Medidas