Aplicación del análisis de imagen de crecimiento del zooplancton

IRENE LIDIA MONTERO GONZÁLEZ

RESUMEN

El crecimiento del cladócero de agua dulce *Daphnia sp.* fue estudiado a partir de las tallas corporales, las cuales fueron determinadas con el sistema de análisis de imagen y comparadas con las medidas por el método tradicional del microscopio estereoscópico. Las tasas de crecimiento obtenidas por ambas técnicas fueron equivalentes, lo que indica la validez de aplicación de los sistemas de análisis de imagen en estos estudios biológicos.

ABSTRACT

Application of image analysis of zooplankton growth

The growth of the freshwater cladoceran Daphnia sp. was studied from body sizes using stereomicroscope and image analyzing system. Growth rates determined from both technicals were equivalent, suggesting the image analyzing systems are useful to be applied to these biological studies.

INTRODUCCIÓN

n los estudios taxonómicos de muestras de zooplancton en los que se realizan medidas de contaje, identificación de es-

pecies y determinación del espectro de talla de los organismos, el microscopio ha sido el método tradicionalmente empleado. Sin embargo, éste es un proceso muy laborioso que consume mucho tiempo de trabajo en el proceso de las muestras. Un importante paso en el desarrollo metodológico de los análisis de frecuencia de talla de muestras de plancton fue la incorporación de aparatos electrónicos como el Coulter Counter. No obstante, su aplicación está limitada por el hecho de no facilitar información cualitativa de las partículas que mide. No es capaz de discernir entre un organismo del plancton y una partícula de detrito. Además, subestima la talla de los organismos delgados, por lo que se hace necesario un examen de la muestra al microscopio. En 1979 Ortner, entre otros, sugiere emplear la técnica de fotografía de siluetas en los estudios taxonómicos del zooplancton.



El zooplancton requerido para efectuar este experimento de crecimiento comparativo, fue recolectado en la Presa de Chira.

Con ella, se consigue un registro permanente de las muestras, no provoca su deterioro puesto que permite trabajar con organismos vivos, y por otro lado, reduce el tiempo de análisis. Esta técnica, por las características que la definen, puede ser aplicada tanto en estudios de distribución de talla de la comunidad pelágica (Davis y Wiebe, 1985), como de crecimiento del zooplancton (Hernández-León *et al.*, 1995; Montero-González, 1996).

El más reciente e innovador avance metodológico en los estudios de medida de talla corporal de organismos planctónicos, son los Sistemas de Análisis de Imagen automatizados como el que se presenta en este estudio. Combinan la rapidez de los contadores electrónicos con el control visual de los análisis microscópicos. La importancia de los sistemas de visión artificial estriba en la posibilidad de obtener un gran número de datos de forma flexible y automatizada, así como el eliminar procesos que sean repetitivos y tediosos, como las medidas de talla corporal bajo el microscopio. Esta es la ventaja fundamental que supone esta nueva metodología en los estudios de crecimiento del zooplancton, así como en los estudios de biomasa, abundancia y distribución de talla de estos organismos (Rolke y Lenz, 1984; Welsch *et al.*, 1991).

El presente trabajo tiene como objetivo fundamental estimar y valorar la capacidad de aplicación del sistema de análisis de imagen como metodología de trabajo en estudios de crecimiento del zooplancton. Para ello, se realizó un análisis comparativo del crecimiento del cladócero *Daphnia sp.* obtenido a partir de, por un lado, la técnica de fotografía de siluetas microscopio estereoscópico y por otro, el sistema de análisis de imagen.

MATERIAL Y MÉTODOS

E l zooplancton requerido para efectuar este experimento de crecimiento comparativo, fue recolectado en la Presa de Chira con una red WP-2 estándar (UNESCO, 1968) simple de 100 µm, en arrastres verticales desde 10 m de profundidad hasta la superficie. Una vez llegada la muestra al laboratorio, se procedió a la selección de una fracción de talla de entre 500 y 1000 µm, constituida únicamente por Daphnia sp. (Cladocera). Posteriormente, los organismos fueron concentrados en un recipiente de incubación e instalados en un baño termostático a la temperatura constante de 20°C. La fuente de alimentación se basó en un cultivo multiespecífico de fitoplancton. Diariamente se renovó el agua del recipiente de incubación y se añadió el alimento a la concentración establecida. Debido a que la concentración de alimento varió de un día a otro, se estimó la concentración media en todo el período de estudio (555 \pm 327 10⁶ células/día; n = 4). Con el mismo intervalo de tiempo, se tomó una muestra de los organismos incubados para estudiar su crecimiento.

Fotografía de Silueta Microscopio Estereoscópico

nmediatamente después de la toma de la muestra diaria, se realizó la fotografía de silueta (Ortner *et al.*, 1979; Edgerton,

1981a; 1981b) en un cuarto oscuro iluminado con luz roja. La muestra de organismos fue transferida a una placa de petri transparente y colocada sobre una lámina de película. La lámpara estroboscópica fue disparada a 50 cm de distancia de la película, y seguidamente fue revelada siguiendo los procedimiento tradicionales. Las longitudes de las siluetas de los organismos fotografiados (longitud total, no incluida la espina apical) fueron medidas con un microscopio estereoscópico (Wild M8) calibrado a seis aumentos.

Sistema de Análisis de Imagen

A través del sistema de análisis de imagen se midieron las longitudes de las siluetas de los organismos que habían sido fotografiados con la técnica de fotografía de siluetas.

El sistema de análisis presentado en este estudio, se compone de las siguientes unidades (Figura1):

I) Unidad de toma de imagen: constituida por una vídeo cámara CCD conectada al microscopio estereoscópico (Wild M8) mediante una rosca-C. La función de esta unidad es la obtención de las imágenes de los organismos con los que se va a trabajar. En este caso, se hizo uso de las fotografías de siluetas de los organismos incubados. Se empleó el microscopio estereoscópico (Wild M8, trabajando a 6 aumentos) con el propósito de incrementar el tamaño real de los individuos, para así conseguir una mejor y más detallada imagen de los mismos.

II) Unidad de monitor externo RGB: en él se visualiza, a tiempo real, la imagen de los organismos tomada a partir del microscopio estereoscópico (Unidad I).

III) Unidad informática: configurada por un ordenador (Pentium), una tarjeta de adquisición de imagen, y el software de adquisición, proceso y análisis de imagen (*Global Lab Image* de Data Translation). Tras la selección y visualización de



la imagen del organismo o grupo de organismos que se desea estudiar, se procede, en esta unidad, a la captura y digitalización de la misma. Posteriormente, se efectúa el proceso de la imagen original, con el propósito de eliminar los posibles errores y conseguir una imagen final en óptimas condiciones para su análisis. El análisis que el Global Lab Image (G.L.I.) lleva a cabo sobre la imagen de los organismos fuente de estudio, se fundamenta en la identificación y determinación automática del número total de objetos que configuran una imagen, y en la cuantificación de

56 medidas diferentes, entre las que se destaca la longitud, la anchura y el área. Para ello, el sistema define al objeto a analizar por un número de pixeles que se conectan entre sí por pertenecer a un rango particular de valores de grises dentro de la escala de 256 valores. Partiendo de esta base, efectúa las medidas morfológicas de los diferentes objetos. En el estudio que se presenta en este trabajo, se midió la longitud total del organismo sin incluir la espina apical. Esta medida fue realizada trazando una línea desde la cabeza del animal hasta el inicio de la espina apical (Figura 2). De esta



manera, pudo hacerse efectiva la comparación del crecimiento obtenido a partir de las medidas calculadas con el microscopio estereoscópico y las del sistema de análisis de imagen.

Para conseguir la información de las diversas medidas. el sistema debe ser calibrado a priori. La calibración es un componente primordial en todo proceso de análisis de imágenes. La precisión de las medidas obtenidas depende de una buena calibración. El G.L.I. es calibrado a partir de la imagen de una cuadrícula milimetrada de tamaño conocido. Tras la adquisición y proceso de la imagen de calibración, el sistema transforma las medidas reales de las coordenadas «X» e «Y» de la cuadrícula introducidas por el operario, en unidades de pixel.



De esta manera, las medidas determinadas por el sistema vendrán dadas en unidades reales (mm). La calibración del sistema debe llevarse a cabo en las mismas condiciones en las que se va a trabajar con las imágenes de los organismos. Es decir, deben tenerse en cuenta los componentes con los que se realizan las tomas de las imágenes de los objetos que se analizarán posteriormente (componentes de la unidad I: tipo de vídeo cámara utilizada e instrumentación de ampliación de la imagen real que se ha empleado).

Tras proceder a la determinación de la talla corporal de los organismos incubados mediante las dos técnicas reseñadas anteriormente, se realizó la conversión de ésta a peso seco haciendo uso de la relación talla-peso establecida por Bottrell *et al.* (1976) para *Daphnia pulex*: ln PS = 1.47 + 3.19 ln L (N=245; rango de longitudes= 0.95 - 3.40mm); donde PS es el peso seco (en µg) y L es la longitud total sin incluir la espina apical (en mm).

RESULTADOS

l histograma de frecuencia de talla de la totalidad de datos computados durante los diez días de experimentación (Figura 3) muestra un leve aumento de las medidas extraídas a partir del microscopio estereoscópico en relación con las del sistema de análisis de imagen (incremento medio de 0.04 ± 0.006 mm; Tabla 1). Esta pequeña diferencia se observa en la evolución de la talla media (mm) y del peso seco medio (µg) a lo largo del período de incubación

Comparativa entre la totalidad de longitudes medidas a través del microscopio estereoscópico y el sistema de análisis de imagen

Tabla 1

| N _i | L _A (mm) | L _B (mm) | L _A -L _B (mm) = I | (L _A +L _B)/2 (mm) = II | (I/II) · 100 % |
|-----------------|---------------------|---------------------|--|--|-------------------|
| 1 | 1.693 | 1.641 | .052 | 1,697 | 3.14 |
| 2 | 1.532 | 1.446 | .086 | 1.489 | 5.78 |
| 3 | 1.613 | 1.658 | 045 | 1.635 | -2.77 |
| 4 | 1.774 | 1.730 | - 017 | 1.752 | 2.51 |
| 6 | 1.613 | 1.554 | .059 | 1.583 | 3.71 |
| 7 | 1.532 | 1.496 | .036 | 1.514 | 2.38 |
| 8 | 1.935 | 1.885 | .050 | 1.910 | 2.63 |
| 9 | 1.613 | 1.556 | .057 | 1.584 | 3.58 |
| 11 | 1.935 | 1.657 | 022 | 1.946 | -1.12 |
| 12 | 1.693 | 1.627 | .066 | 1.650 | 4.00 |
| 13 | 1.855 | 1.823 | .032 | 1.839 | 1.72 |
| 14 | 2.097 | 2.020 | .077 | 2.058 | 3.72 |
| 15 | 2.097 | 2.016 | .081 | 2.056 | 3.92 |
| 17 | 2.097 | 2.035 | .062 | 2.066 | 2.98 |
| 18 | 1.693 | 1.652 | .041 | 1.673 | 2.47 |
| 19 | 1.935 | 1.870 | .065 | 1.903 | 3.43 |
| 20 | 2.016 | 1.997 | .019 | 2.006 | .94 |
| 21 | 2.016 | 1.961 | .055 | 1.988 | 2.76 |
| 23 | 2.177 | 2.111 | .066 | 2.144 | 3.08 |
| 24 | 2.097 | 2.010 | .087 | 2.053 | 4.21 |
| 25 | 2.097 | 2.039 | .058 | 2.068 | 2.78 |
| 26 | 1.935 | 1.871 | .064 | 1.903 | 3.38 |
| 21 | 2.001 | 2.549 | .112 | 2.605 | 4.30 |
| 29 | 2.419 | 2.394 | .025 | 2.407 | 1.04 |
| 30 | 1.935 | 1.618 | .017 | 1.927 | .89 |
| 31 | 2.097 | 2.018 | .079 | 2.057 | 3.82 |
| 32 | 2.742 | 2.649 | .093 | 2.695 | 3.44 |
| 33 | 2500 | 2.527 | 027 | 2.513 | -1.09 |
| 35 | 2.500 | 2.470 | .030 | 2.485 | 1.19 |
| 36 | 2.661 | 2.619 | .042 | 2.640 | 1.59 |
| 37 | 2.338 | 2.328 | .010 | 2.333 | .45 |
| 38 | 2.016 | 2.037 | 021 | 2.026 | -1.04 |
| 40 | 2.001 | 2.624 | - 017 | 2.642 | - 64 |
| 41 | 2.500 | 2.447 | .053 | 2.473 | 2.13 |
| 42 | 2.580 | 2.660 | 080 | 2.620 | -3.04 |
| 43 | 2.742 | 2.631 | .111 | 2.686 | 4.12 |
| 44 | 2.580 | 2.568 | .012 | 2.574 | .48 |
| 45 | 3.064 | 2.978 | .086 | 2.021 | 2.80 |
| 47 | 2.580 | 2.527 | .053 | 2.554 | 2.09 |
| 48 | 2.419 | 2.425 | 066 | 2.422 | 25 |
| 49 | 2.822 | 2.733 | .089 | 2.778 | 3.21 |
| 50 | 2.500 | 2.419 | .081 | 2.459 | 3.28 |
| 52 | 2.882 | 2.861 | 039 | 2.842 | -1.36 |
| 53 | 2.097 | 2.057 | .040 | 2.077 | 1.90 |
| 54 | 2.500 | 2.545 | 045 | 2.522 | -1.80 |
| 55 | 2.742 | 2.835 | 093 | 2.788 | -3.35 |
| 50 | 2.742 | 2.678 | .064 | 2.710 | 2.35 |
| 58 | 2.903 | 2.864 | .039 | 2.883 | 1.35 |
| 59 | 2.258 | 2.145 | .113 | 2.201 | 5.12 |
| 60 | 2.580 | 2.647 | 067 | 2.614 | -2.55 |
| 61 | 2.419 | 2.365 | .054 | 2.392 | 2.26 |
| 63 | 2.500 | 2.493 | .007 | 2.490 | .27 |
| 64 | 2.580 | 2.752 | 172 | 2.666 | -6.44 |
| 65 | 2.258 | 2.383 | 125 | 2.320 | -5.40 |
| 66 | 2.580 | 2.545 | .035 | 2.563 | 1.38 |
| 67 | 2.742 | 2.746 | 004 | 2.744 | 16 |
| 60 | 2.380 | 2.433 | .147 | 2.507 | 2.88 |
| 70 | 2.500 | 2.437 | .063 | 2.468 | 2.54 |
| 71 | 2.742 | 2.700 | .042 | 2.721 | 1.53 |
| 72 | 2.601 | 2.608 | .053 | 2.634 | 2.01 |
| 73 | 3.064 | 2.935 | .129 | 3.000 | 4.30 |
| 74 | 2.742 | 2.713 | .029 | 2.121 | 6.21 |
| 76 | 2.742 | 2.655 | .087 | 2.698 | 3.21 |
| 77 | 2.661 | 2.594 | .067 | 2.627 | 2.55 |
| 78 | 2.258 | 2.202 | .056 | 2.230 | 2.50 |
| 79 | 2.661 | 2.600 | .061 | 2.630 | 2.32 |
| 0U 81 | 2 742 | 2 672 | .040 | 2 707 | 2.57 |
| Media | 2.329 | 2.291 | .039 | 2.310 | 1.73 |
| Erreur estimada | .046 | .046 | .006 | .046 | 2.65 |



(Figura 4). Sin embargo, el comportamiento de dichos parámetros a lo largo del tiempo de estudio es análogo para ambas técnicas. Este hecho se pone de manifiesto en la semejanza de las tasas de crecimiento obtenidas para la primera fase del crecimiento (Tabla 2,). El crecimiento de las daphnias en la segunda fase no fue significativo para un nivel de confianza del 95 % (p > 0.05), como puede observarse en la Figura 4, por lo que no fue examinado. Por otro lado, las tasas de crecimiento diarias en función de la talla, exhiben la misma pauta en el crecimiento, tanto para las medidas obtenidas con el microscopio estereoscópico, como para las extraídas del sistema de análisis de imagen (Figura 5).

DISCUSIÓN

os resultados presentados muestran la efectividad de la aplicación del sistema de análisis de imagen en los estudios de crecimiento del zooplancton. Si bien las tallas corporales determinadas a través de esta técnica son ligeramente inferiores a las calculadas con las fotografías de siluetas y el microscopio estereoscópico (0.04 ± 0.006 mm, valor medio), esta diferencia es sólo del 1.7 ± 0.26 % (Tabla 1) en relación a la media de longitudes (en mm) obtenidas con ambas técnicas. Esta pequeña desigualdad puede ser debida esencialmente al error humano que se comete, TABLA 2

Semejanzas de las tasas de crecimiento obtenidas

Regresiones entre la longitud media (L_t ,mm) y el tiempo (t, d) para las medidas obtenidas a través del microscopio estereoscópico (M.E.) y el sistema de análisis de imagen (S.A.I.): 1n $L_t = 1n L_0 + g_L \cdot t$; $g_L =$ estimación de la tasa de crecimiento de función de la talla para la *primera fase del crecimiento*; r = coeficiente de correlación; n = número de determinaciones

| Técnica de medida | g _∟ ± error est. (d⁻¹) | r | n |
|-------------------|-----------------------------------|------|---|
| M.E. | -0.12 ± 0.01 | 0.99 | 4 |
| S.A.I. | -0.13 ± 0.01 | 0.99 | 4 |

Regresiones entre peso seco medio (PS_t, mm) y el tiempo (t, d) para las medidas obtenidas a través del microscopio estereoscópico (M.E.) y el sistema de análisis de imagen (S.A.I.): 1n PS_t = 1n PS₀ + g_{PS}·t; g_{PS} = estimación de la tasa de crecimiento de función de la talla para la *primera fase del crecimiento*; r = coeficiente de correlación; n = número de determinaciones

| Técnica de medida | g _{ps} ± error est. (d ^{.1}) | r | n |
|-------------------|---|--------------|---|
| M.E. S.A.I. | 0.39 ± 0.02 0.40 ± 0.02 | 0.99 0.99 | 4 |
| | | | |

tanto en la calibración como en la determinación de las medidas al microscopio estereoscópico. En ambas operaciones, las condiciones ópticas y los criterios de apreciación del operario juegan un papel primordial. En los sistemas de análisis de imagen este error puede incidir en la calibración, pero no en la determinación de medidas, ya que es el propio sistema quien las efectúa y evalúa, reduciéndose de esta manera el error en las medidas.

El valor diferencial observado en las tallas medidas por las dos metodologías, carece de importancia significativa a la hora de establecer el crecimiento experimentado por los organismos incubados, ya que las ta-



sas de crecimiento obtenidas por ambas nos llevan a resultados finales equivalentes, alcanzándose por tanto, el objetivo fundamental de este experimento.

CONCLUSIÓN

1 sistema de análisis de imagen supone un avance sustancial en la metodología de proceso y examen de muestras de zooplancton, tal y como se ha podido comprobar en este estudio. La importancia de su aplicación en los estudios biológicos se fundamenta en la amplia variedad de información que ofrecen al investigador, de forma automatizada y en un corto período de tiempo. En los análisis de una muestra de zooplancton, estos sistemas permiten obtener el número de organismos que la configuran, las me-



didas reales de los parámetros morfológicos que caracterizan a cada individuo, y además, son capaces de establecer diferencias entre los diversos objetos estudiados, con lo que alcanzan la facultad de clasificarlos. La utilización de estos sistemas de análisis en los estudios de crecimiento es sólo una parte mínima en su aplicación, teniendo en cuenta la extensa exploración que efectúa sobre las identidades que examina. El tiempo consumido en las clasificaciones, contajes e identificaciones de organismos del plancton realizados con metodologías tradicionales, ha sido un factor determinante en el considerablemente lento progreso en las investigaciones relativas a la estructura de los ecosistemas pelágicos y a las interrelaciones de los distintos componentes de la cadena trófica. Por tanto, los sistemas de análisis de imagen pueden favorecer enormemente un cuantioso despliegue de información, y por consiguiente, adquirir un mejor conocimiento de los ecosistemas marinos.

BIBLIOGRÁFÍA

- BOTTRELL, H.; DUNCAN, A., et al. (1976): A review of some problems in zooplank-ton production studies. Norw. J. Zool., núm.24, págs.456-491.
- DAVIS, C. y WIEBE, P. (1985): Macrozooplankton Biomass in Warm-Core Gulf Steam Ring: Time Series Changes in Size Structures, Taxonomic Composition, and Vertical Distribution. J. Geophys. Res., Vol. 90, Núm.C5: págs.8871-8884.
- EDGERTON, H. (1981a.): Use of blue-sensitive film. Photo-

methods. Vol. 24, Núm.5: págs.38-40.

- EDGERTON, H. (1981b.): Electronic flash sources and films for plankton photogra-phy. J. Biol. Photogr. Vol. 49, Núm.1: págs.25-26.
- HERNÁNDEZ-LEÓN, S.; ALMEI-DA, C. y MONTERO, I. (1995): The use of aspartate transcarbamylase activity to estimate growth rates in zooplankton. ICES J. mar. Sci., Vol.52, págs.377-383.

٠

MONTERO-GONZÁLEZ, I. (1996):

Aplicación de la técnica de fotografía de siluetas en los estudios de crecimiento de Daphnia sp. y Acartia clausi en relación a la temperatura y disponibilidad de alimento. Vector Plus. Sep.1996.

- ORTNER, P.B. et al. (1979): Silhouette photography of ocean zooplankton. Nature, Vol. 277.
- ROLKE, H. y LENZ, J. (1984): Size structure analysis of zooplankton samples by means of an automated image analyzing system. J. Plankton Res.,

Vol. 6, Núm.4, págs. 637-645.

 UNESCO, (1968): Zooplanktonic sampling. Monography of Oceanographical Methods. Núm. 2, págs.1-174.

WELSCH, W. et. al.(1991/L:82): A high-speed video recording system for in-situ studies on small-scale distribution of zooplankton and ichthyoplankton; preliminary results on the distribution of plankton in the Bornholm Basin (Central Baltic). ,ICES C.M., Biol. Oceanogr. Comm.

BIOGRAFÍA

IRENE LIDIA MONTERO GONZÁLEZ

Natural de Las Palmas de Gran Canaria. Licenciada en Ciencias del Mar (1991) por la Facultad de Ciencias del Mar de la Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Realiza estudios de Tercer Ciclo para la consecución de su Tesis Doctoral en el Departamento de Biología de la Universidad de Las Palmas de Gran Canaria, bajo la dirección del Dr. D. Santiago Hernández León. Su proyecto de investigación se fundamenta en el estudio del crecimiento del zooplancton marino (copépodos) en términos de talla corporal -mediante la técnica de fotografía de siluetas y el sistema de análisis de imagen-, peso seco y contenido en carbono y nitrógeno, por géneros y/o especies, en relación con la temperatura, la cantidad y calidad de alimento. Ha estudiado el crecimiento de copépodos de diferentes áreas -Aguas de Canarias, Mar Báltico, Storfjorden (Noruega) y el Mar de Weddell y Estrecho de Bransfield (Antártida)– en las investigaciones realizadas en los tres *Workshops* que el Consejo Internacional para la Exploración del Mar (ICES) organizó en Bergen (Noruega), en las seis Campañas Oceanográficas que ha realizado y en los ocho Proyectos de Investigación a los que ha estado ligada.

Dirección:

Departamento de Biología Universidad de Las Palmas de Gran Canaria Campus Universitario de Tafira Edificio de Ciencias Básicas C.P. 35017 Las Palmas de Gran Canaria Teléfono: 928 454 546 - Fax: 928 452 922

Este trabajo ha sido patrocinado por:

ASTILLEROS CANARIOS. S.A.