

Review

Análisis automático de zooplancton utilizando imágenes digitalizadas: estado del conocimiento y perspectivas en Latinoamérica

Johanna Medellín-Mora¹ & Rubén Escribano²

¹Programa de Doctorado en Oceanografía, Departamento de Oceanografía
Universidad de Concepción, P.O. Box 160-C, Concepción, Chile

²Departamento de Oceanografía, Universidad de Concepción, P.O. Box 160-C, Concepción, Chile

RESUMEN. Los estudios de comunidades de zooplancton son de gran importancia para la biología, ecología y conservación del ecosistema marino. Sin embargo, estas investigaciones implican un proceso de alto costo en términos de tiempo y esfuerzo, requiriendo personal entrenado para la identificación, conteo y medición de numerosos grupos taxonómicos, así como para la estimación de biomasa. Actualmente, existe un creciente interés por la implementación de nuevas técnicas que permitan automatizar los análisis, incorporando tecnología informática aplicada al examen automático de imágenes digitalizadas. En este trabajo se revisa el estado del conocimiento de algunas metodologías, basadas en el estudio de imágenes digitalizadas de zooplancton. Se presenta una descripción general de los métodos conocidos, tales como ZooScan-ZooProcess y ZooImage, se analizan sus resultados para la identificación de distintos zooplancteres, se comparan con el método tradicional y se hacen propuestas para mejorar su aplicación. Adicionalmente, se resumen las experiencias con estos sistemas en el análisis de patrones de variabilidad espacial y temporal de la comunidad zooplanctónica, basados en el espectro de tamaño y pruebas para la estimación de biomasa de zooplancton. Finalmente, se elabora un listado de capacidades y limitaciones registradas en la bibliografía reciente, y se discute sobre las perspectivas de desarrollo y aplicación que ofrece esta metodología para la comunidad científica en Latinoamérica.

Palabras clave: zooplancton, identificación automática, análisis digital, estado del conocimiento, ZooImage, ZooScan.

Automatic analysis of zooplankton using digitized images: state of the art and perspectives for Latin America

ABSTRACT. The study of zooplankton communities is very important in the context of the biology, ecology, and conservation of the marine ecosystem. However, research on zooplankton implies a highly costly process in terms of time and effort, requiring trained personnel for identification, counting and measuring of various taxonomic groups, including biomass estimates. At present, there is an increasing interest for implementing new techniques allowing automatic analyses of zooplankton by means of informatics technology and assessment of digitized images. In this work, the state of the art of some methodologies applied to digital images of zooplankton is revised describing the general methods used, such as ZooScan-ZooProcess and ZooImage, and an analysis of their results for identification, a comparison with traditional methods, and recommendations to improve the identification process. Additionally, a brief summary of the experiences with these systems is presented, focused on the analysis of spatial and temporal variability of the zooplankton community by means of its size spectrum and tests for deriving biomass estimates. Finally, a list of capacities and limitations of the methods is discussed using recent literature, as well as the perspectives of development and applications of this new technology can offer to the scientific community of the Latin American region.

Keywords: zooplankton, automatic identification, digital analysis, state of the art, ZooImage, ZooScan.

INTRODUCCIÓN

El zooplancton como componente basal de las tramas tróficas marinas, está conformado por organismos de tamaño pequeño de diversos grupos taxonómicos que se encuentran en suspensión en la columna de agua, cuya distribución está condicionada principalmente por las corrientes (Suthers & Rissik, 2009; Chavance, 2011). Tiene gran importancia ecológica puesto que es un componente esencial de la bomba biológica de carbono, puede ser indicador de la calidad ambiental y variabilidad climática (Beagraund *et al.*, 2002), y en el ecosistema pelágico presenta una alta variabilidad espacial y temporal (Benfield *et al.*, 2007).

Debido a sus características, el zooplancton genera gran interés de investigación desde varios puntos de vista. No obstante muchos estudios quedan incompletos debido al alto número de muestras colectadas, las cuales terminan almacenadas, sin ser analizadas en su totalidad, como resultado del requerimiento de personal especializado y dedicación necesaria (tiempo) para la realización de análisis confiables de la composición taxonómica, abundancia, tamaño y distribución espacio-temporal. Aunque los aspectos taxonómicos como la descripción de especies, ciclos de vida y algunos análisis ecológicos de variabilidad han sido obtenidos, se requiere mucho tiempo y esfuerzo para analizar en detalle los patrones espacio-temporales de estas comunidades (*i.e.*, series de tiempo) (Benfield *et al.*, 2007; Bell & Hopcroft, 2008; Gorsky *et al.*, 2010).

Por las razones anteriores, desde la década de los 80's, se ha comenzado a desarrollar métodos que involucran el uso de imágenes digitales para acelerar el procesamiento de las muestras de zooplancton y obtener resultados más rápidos en la medición, conteo e identificación de organismos. Por otra parte, existen varios tipos de metodologías *in situ* que involucran el uso de sensores ópticos o acústicos tales como: sistemas de acople cámara-red, cámara de registro de imágenes de ictioplancton, videocámara para plancton (Video Plankton Recorder (VPR)), perfiladores de video, registro y evaluación de perfiles de sombras de partículas (Shadowed Image Particle Profiling Evaluation (SIPPER)), visualizador de zooplancton y sistema de imágenes (Zooplankton Visualization and Imaging System (ZOOVIS)), y la nueva tecnología de imágenes de fluido (FlowCAM), así como el contador óptico láser de plancton (Laser Optical Plankton Counter (LOPC)) (Benfield *et al.*, 2007; Sieracki *et al.*, 2010).

De igual forma, en laboratorio se han desarrollado metodologías en las cuales las muestras preservadas de zooplancton pueden ser digitalizadas con equipos

diseñados especialmente, como el ZooScan, o con un escáner convencional, obteniendo imágenes digitalizadas bidimensionales, y posteriormente analizadas mediante programas informáticos como el ZooProcess y ZooImage respectivamente (Gorsky *et al.*, 2010).

Puesto que las imágenes en 2D aún presentan algunas limitaciones para la identificación a nivel específico, actualmente se están desarrollando nuevas tecnologías para la obtención de imágenes en 3D con alta definición (imagen acústica (FishTV), estereoscopia, tomografía (resonancia magnética, rayos X), microscopios confocales y holografía), las cuales permiten rotar la imagen y observar estructuras claves para la identificación (*i.e.*, antenas y apéndices entre otras), y obtener medidas volumétricas. Actualmente se ha proyectado para el futuro, hacer una biblioteca de referencia de varios grupos de zooplancton en 3D, y hasta ahora se tiene registros digitalizados de aproximadamente 350-400 organismos en modelos 3D, en su mayoría peces, aunque todavía se requiere un programa específico para su procesamiento (Benfield *et al.*, 2007; Boistel *et al.*, 2011).

En países de Latinoamérica, con una larga trayectoria en estudios del zooplancton y donde comúnmente se cuenta con bases de datos y muestras de zooplancton preservadas por largo tiempo, derivadas de expediciones y prospecciones orientadas muchas veces a las pesquerías, el uso de estos métodos automatizados es una alternativa promisoría frente a las técnicas tradicionales de análisis. Entonces, con el objeto de motivar la aplicación de estas nuevas metodologías de análisis de zooplancton, este trabajo presenta una revisión actualizada de los métodos más utilizados para el análisis de muestras de zooplancton a partir de imágenes digitales. En esta revisión, se analizan las capacidades, limitaciones y las perspectivas de utilización de estos métodos para estudios enfocados en la biodiversidad, biogeografía y ecología de zooplancton.

Desarrollo del método

Los avances en tecnología para el análisis de imágenes digitales de zooplancton se iniciaron en la década de los 80's. En esos momentos, los programas de computación estaban diseñados para contar y medir partículas e identificar hasta ocho grupos taxonómicos de manera eficaz. Posteriormente, para mejorar los procesos de identificación en los 90's se adaptaron sistemas de aprendizaje con redes neuronales artificiales. No obstante, aún se presentaban limitaciones con imágenes de baja resolución y computadores de capacidad limitada para el manejo de un alto número de imágenes (Gislason & Silva, 2009).

A partir del año 2000 se observó una mayor eficiencia en la producción y análisis de imágenes, en términos de tiempo y esfuerzo para el conteo, medición y clasificación de partículas dentro de categorías taxonómicas de zooplancton con el diseño de equipos como el ZooScan, elaborado por el laboratorio de Oceanografía de Villefranche-sur-Mer, France (www.zooscan.com) (Gorsky & Grosjean, 2003). Este equipo en su versión comercial está compuesto por una cámara con fondo de vidrio impermeable para contener las muestras de zooplancton y un sensor de escáner convencional que digitaliza imágenes en alta resolución (2400 dpi) (Fig. 1a). Estas imágenes son analizadas con el programa de uso público ZooProcess, el cual es un conjunto de rutinas integradas con un programa de procesamiento de imagen digital llamado Image J (Picheral, 2010).

Por su parte el programa de uso público Zoo/FitoImage desarrollado por University of Mons-Hainaut en Bélgica, está construido a partir de varios programas tales como Image J., R o XnView, integrados en la plataforma “R”. El programa es de código abierto, que permite importar imágenes desde cualquier dispositivo digital (*i.e.*, escáner convencional o cámara), analizarlas y exportar los resultados desde y hacia varios sistemas. Se diseñó para operar con el sistema Windows XP pero se puede adaptar a Linux, Unix o Mac Osx (Grosjean & Denis, 2007).

ZooImage utiliza características como forma, tamaño, entre otras, para clasificar organismos planctónicos con una exactitud del 70-80%, cuando se trabaja con 10-20 categorías taxonómicas mayores (no específicas), usando una serie de algoritmos de aprendizaje supervisados, funciones discriminantes y otros clasificadores (Benfield *et al.*, 2007; Grosjean & Denis, 2007). Cuando se incorpora el conocimiento de los expertos en la verificación de la clasificación, la exactitud aumenta (Fig. 1b) (Bell & Hopcroft, 2008; Gislason & Silva, 2009). Este programa se puede adaptar a los requerimientos del usuario y reconfigurar. Actualmente ha sido adaptado para trabajar además con imágenes obtenidas a partir de micro y macrofotografía y también se ha modificado para procesar imágenes de FlowCAM y ZooScan (MacLeod *et al.*, 2010).

De una manera general con estos métodos se requieren tres pasos para el análisis de las muestras e imágenes de zooplancton (Fig. 2):

Adquisición y análisis de la imagen: para esto se digitaliza (escanea) la muestra, se importa y procesa la imagen por medio de la creación de viñetas que son sub-imágenes de cada partícula extraída de la imagen

original con su respectiva escala de medida. Durante este procedimiento se analiza individualmente la partícula, se obtienen todas sus características y se registra la información relevante en un archivo de metadatos. Las muestras se pueden escanear con el equipo ZooScan que puede generar imágenes en escala de grises de hasta 2400 dpi, aunque el uso de un escáner convencional no constituye una limitación en términos de calidad de la imagen. Un escáner convencional típicamente permite obtener imágenes de entre 600 a 1200 dpi en escala de colores verdaderos.

Reconocimiento automático de partículas: las viñetas y metadatos son analizados según características potenciales para discriminar creando un Entrenador de datos o “training set” que es un organizador de categorías taxonómicas y partículas no identificadas en carpetas que deben ser verificadas por el usuario. El programa usa una variedad de algoritmos clasificadores que aprenden a identificar imágenes desconocidas por construcción de mecanismos de decisión asociados a las características extractadas de las imágenes y metadatos con la información proporcionada por el taxónomo. Los errores son evaluados por medio de una matriz de confusión, la cual es una herramienta de verificación que compara los grupos taxonómicos identificados manualmente con los clasificados automáticamente. Este análisis considera el conteo de objetos de cada grupo por cada método (manual y automático), muestra un valor de coincidencia entre estos en una matriz de celdas en diagonal, destacado con un color, y cuando se presenta un valor de no coincidencia por fuera de la diagonal en otro color (Fig. 2).

Análisis de series para información biológica y ecológica: los programas desarrollan estándares para la representación de metadatos, los cuales son utilizados también para producir informes de abundancia de taxa, clases de tallas para obtener área corporal, el Diámetro Circular Equivalente (ECD), espectro de tamaño y biomasa de cada muestra sobre la base de relaciones alométricas. Esta información en el caso del ZooImage puede ser exportada a archivos Excel o Matlab. La versión actualizada de los manuales para su uso específico pueden ser consultados en internet: *ZooImage* versión en inglés y español: <http://www.sciviews.org/zooimage>; <http://www.sciviews.org/zooimage/docs/ZooPhytoImageManualSpanish.pdf>; ZooScan: <http://www.obsvlfr.fr/-LOV/ZooPart/ZooScan/>.

Avances recientes en el desarrollo del método

Gorsky & Grosjean (2003) y Grosjean *et al.* (2004) describieron el procesamiento de imágenes con el

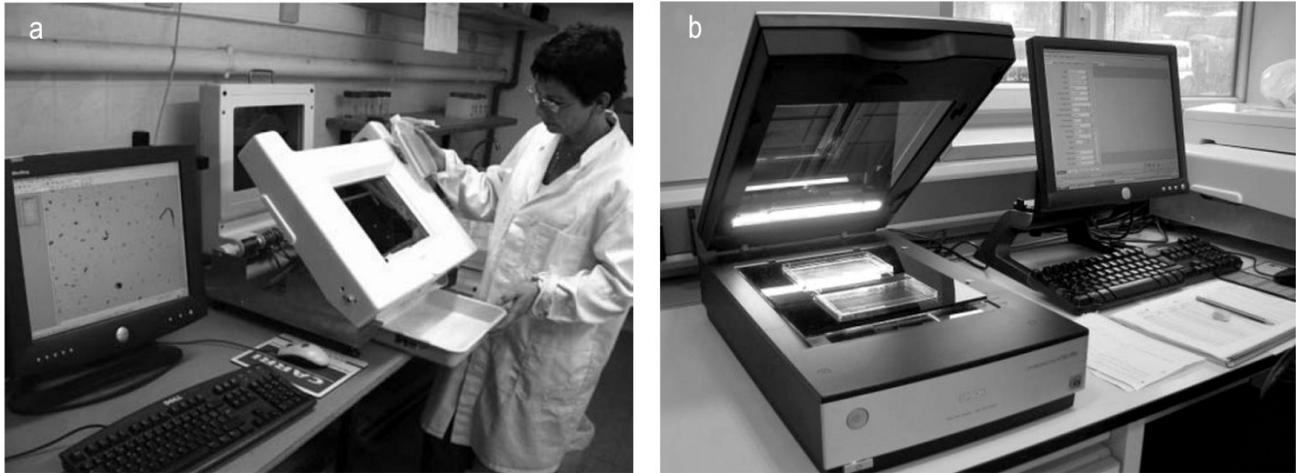


Figura 1. a) ZooScan y computador con el programa ZooProcess, b) Escáner convencional y computador con el programa ZooImage (Tomado de Gorsky *et al.*, 2010; Bachiller & Fernandes, 2011).

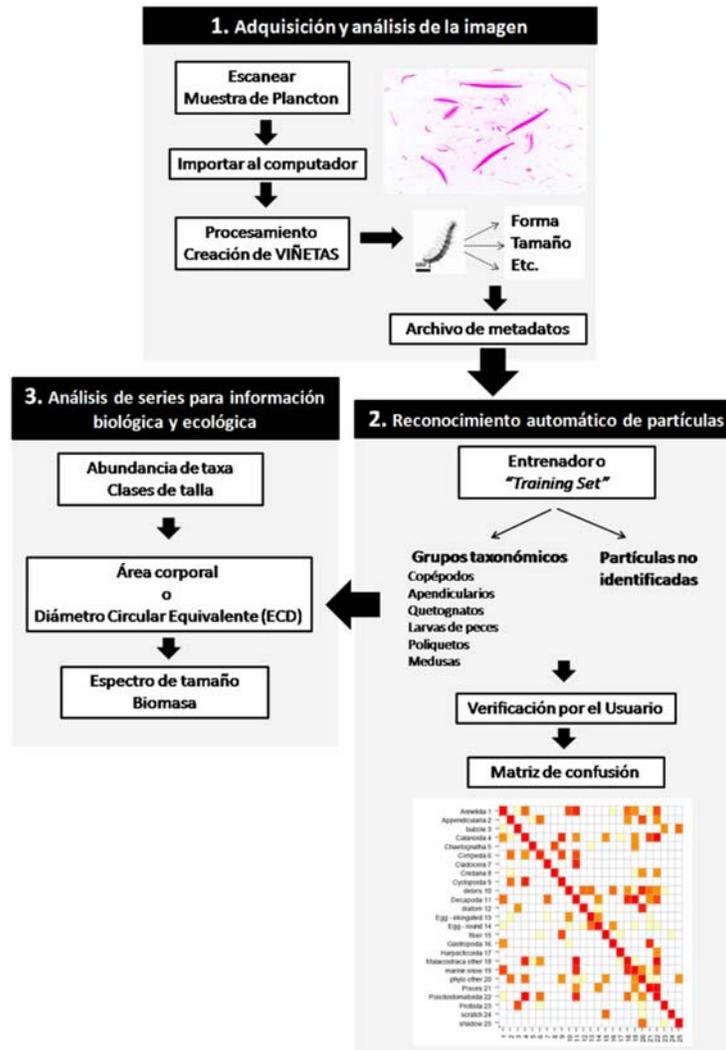


Figura 2. Esquema general de los pasos metodológicos para el análisis de las imágenes digitales de zooplancton.

ZooScan y los resultados de identificación con varios algoritmos para el aprendizaje de máquina. Ellos sugieren analizar varias sub-muestras y separar los organismos en dos o tres categorías de tamaño. También encontraron que la validación del Entrenador (“training set”) por parte de un experto aumenta de 70 a 85% la exactitud de la identificación.

En el 2005 en Villefranche-sur-Mer en Francia se realizó un taller sobre el análisis de imágenes y del conteo e identificación del zooplancton. En esta reunión el programa ZooImage fue presentado como plataforma de trabajo. Se divulgó la iniciativa RAPID (Research on Automated Plankton Identification) con un amplio apoyo de la comunidad científica en el campo del plancton, diseñada para ampliar y adaptar las capacidades de ZooImage y convertirlo en un sistema de libre disposición, altamente flexible y potente, para procesar y clasificar los conjuntos de datos de imágenes planctónicas. Paralelamente, se inició el desarrollo de la investigación sobre algoritmos de clasificación, formas de cuantificar y reducir las fuentes de error por los seres humanos y máquinas, el desarrollo de bases de datos de alta calidad y distribución, y la exploración de las características taxonómicas basadas en las propiedades intrínsecas de la imagen (ICES, 2006).

En los años 2007 y 2011 se efectuaron el cuarto y quinto Simposio Internacional de Producción de Zooplancton, en los cuales se dedicaron sesiones y grupos de trabajo a discutir sobre los avances en la tecnología de imágenes y su aplicación para el conteo e identificación de plancton y el estudio de su distribución. Se presentaron varias ponencias que describieron las experiencias con los métodos ZooScan y ZooImage (Dagg *et al.*, 2008), así como, la propuesta de herramientas para mejorar la exactitud y la confiabilidad de las medidas de zooplancton (*i.e.*, remoción de los apéndices de la elipse ajustando a la línea del cuerpo), como el programa *Plancton J* desarrollado por medio de ZooImage e Image J (Benfield *et al.*, 2007). Se efectuaron otras ponencias más específicas que serán comentadas en cada uno de los temas que se describen a continuación.

Identificación y conteo de zooplancton: comparación entre los métodos tradicional y automático

El análisis automático de imágenes digitales logra clasificar el zooplancton en las principales entidades taxonómicas como Clase, Familia o Género. El enfoque tradicional aún es necesario para explicar la estructura, desarrollo e historia de vida de la comunidad zooplanctónica (Benfield *et al.*, 2007; Gislason & Silva, 2009), así como las migraciones verticales que realizan algunos organismos en la

columna de agua, que pueden afectar la estructura espacial de la comunidad (Manríquez *et al.*, 2012). Por su parte Gorsky *et al.* (2010) afirman que con este método se obtienen buenos resultados para la estimación del espectro de tamaño y la biomasa. Estos autores concluyen que lo más importante para la identificación es establecer correctamente el Entrenador, confirmando los resultados de la clasificación y la compilación de viñetas por parte de un especialista (método semi-automático). Además, se ha demostrado que estos métodos reconocen con buena exactitud las partículas no biológicas (*i.e.*, nieve marina, fibras, materiales no orgánicos) (Culverhouse *et al.*, 1994; Bell & Hopcroft, 2008).

En varias investigaciones se han efectuado comparaciones entre la exactitud lograda en la identificación a través de los métodos tradicional y automático, encontrando valores similares (Bell & Hopcroft, 2008; Gorsky *et al.*, 2010; Di Mauro *et al.*, 2011). No obstante, Manríquez *et al.* (2009) encontraron diferencias de casi un orden de magnitud en algunos taxa, pero afirman que en general la dominancia de los grupos se mantiene. Por su parte, Bell & Hopcroft (2008) encontraron que la clasificación por tamaño aumentó la exactitud, los copépodos de talla media fueron mejor identificados (73%), en comparación con los copépodos pequeños (62,5%) y grandes (54,9%). De igual forma, Di Mauro *et al.* (2011) registraron 100% de exactitud en la identificación de huevos de peces y valores bajos cuando el número de viñetas es reducido en el Entrenador (*i.e.*, poliquetos, anfípodos, decápodos y larvas de peces). Su estudio se enfocó en tres categorías de copépodos: ciclopoidea, calanoida grandes y calanoida pequeños, en las cuales se obtuvo una exactitud de 85,7; 79,5 y 85,7%, respectivamente.

Se ha encontrado que la exactitud de la identificación por el método automático depende de la naturaleza y el número de viñetas en cada clase (Gislason & Silva, 2009). Estudios detallados como el de Gorsky *et al.* (2010) han demostrado que el número óptimo de viñetas por categoría es entre 200 y 300 y el mejor método de clasificación es el “Random forest algorithm”, el cual ha mostrado buenos resultados en todos los estudios revisados. Por su parte, Chang *et al.* (2012) sugieren un clasificador balanceado con el mismo número de viñetas en cada categoría, si el objetivo de la investigación es identificar correctamente categorías raras en adición a grupos dominantes.

Otro factor influyente en la exactitud es la subestimación de la abundancia de un taxon raro debido a la presencia de otro muy abundante, o la confusión en la identificación de organismos muy

pequeños, incluso con una resolución de 2400 dpi (Gorsky *et al.*, 2010). Por ejemplo, Gislason & Silva (2009) encontraron una subestimación mínima de la abundancia de calanoideos pequeños (<1 mm) que fueron identificados como nauplios o copépodos ciclopoideos del género *Oithona*. También se tiende a subestimar *Oithona*, y a sobre-estimar a *Oncaea*, debido a que el programa no puede diferenciar entre estos dos grupos. Asimismo, los quetognatos son incorrectamente identificados como larvacea. Di Mauro *et al.* (2011) al examinar la clasificación automática del *Zoolmage* encontraron que la identificación de pequeños copépodos ciclopoidea y calanoidea no es acertada. Esto sugiere que cuanto mayor sea el número de categorías, más difícil es la optimización del clasificador.

Teniendo en cuenta la distribución de las masas de agua, Chang *et al.* (2012) en el Mar Este de China, analizaron los aspectos específicos de la construcción de un Entrenador y su influencia en la capacidad para relacionar la variación de la composición taxonómica del zooplancton con la heterogeneidad de las propiedades hidrográficas. Determinaron que la precisión y exactitud de un entrenador diseñado con información de una masa de agua específica disminuye, cuando es usado en otras regiones con características hidrográficas diferentes. Para este fin se debería crear un clasificador global que abarque la variabilidad de diferentes subregiones.

Evaluación de metodologías para mejorar la identificación automática del zooplancton

Se ha evidenciado dificultad en el reconocimiento y clasificación automáticos debido a la selección del número de clases (Tabla 1). Por esta razón Fernandes *et al.* (2009), sugirieron un método que ayuda a balancear el aumento de categorías y el rendimiento (exactitud, correcta identificación), por medio del agrupamiento de categorías que son evaluadas y finalmente aceptadas por el investigador. Según Di Mauro *et al.* (2011) para aumentar el rendimiento en la clasificación de algunas categorías de mayor tamaño, se debería aumentar el número de viñetas en el Entrenador o modificar la alícuota correspondiente, para obtener más viñetas de los organismos erróneamente clasificados.

Recientemente, Bachiller & Fernandes (2011), propusieron una nueva metodología para el control interno del método que permite detectar cualquier error durante el procesamiento de imágenes para obtener una calidad de chequeo segura para los procedimientos de los análisis de identificación de zooplancton. La metodología consiste en adicionar previamente una cantidad conocida de esferas de

control de resina (Amberlite Polymeric Adsorbent) a la muestra de zooplancton, para detectar anomalías durante el proceso. Se espera tener un determinado rango de abundancia de estas esferas en las submuestras (Fig. 3). Esta técnica permite evaluar si el volumen de la submuestra es suficiente para organismos raros, o de otra manera si el porcentaje de partículas sobrepuestas es razonable, y si el Entrenador es igual de efectivo en todas las muestras.

La acción de aumentar la resolución de la imagen puede mejorar la clasificación produciendo un Entrenador más definido, el cual proporcionaría una mejor identificación de las categorías y mayor calidad de las viñetas en el entrenamiento. La clasificación manual se haría más fácil y rápida, reduciendo el error, ya que se podrían identificar organismos pequeños de zooplancton (Fig. 4). No obstante, una mayor resolución implica más tiempo en el proceso de digitalización y mayor espacio en el computador para almacenar las imágenes. Por esta razón el investigador debe definir bien el objetivo del estudio. Por ejemplo, para estudios enfocados en una categoría taxonómica es importante mejorar la resolución, para poder detectar otras características de interés taxonómico de los organismos como antenas, anténulas y mejorar el reconocimiento de plancton gelatinoso (Bachiller *et al.*, 2012).

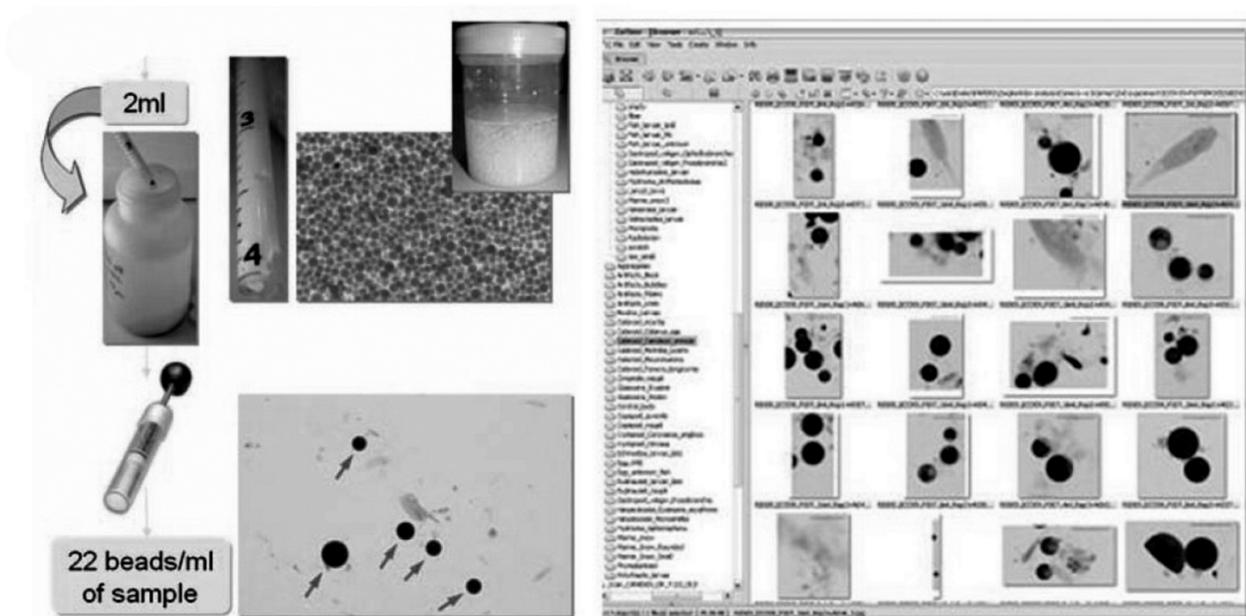
En las investigaciones revisadas se encontraron varios valores de resolución de la imagen obtenidas con el *ZooScan* y escáner convencional que van desde 600 hasta 4800 dpi (Tabla 1). Según Bachiller *et al.* (2012) la obtención de imágenes con una cámara digital ha mostrado mejores resultados en comparación con el escáner en términos de exactitud en la identificación taxonómica y costo, además de permitir un amplio rango de resoluciones (Fig. 4).

Adicionalmente, Fernandes (2010) recomienda teñir la muestra con eosina o rosa de bengala por 24 h antes de escanear, la primera sustancia tiene afinidad por el citoplasma y las proteínas del músculo, y la segunda tiene afinidad por los lípidos. Este proceso facilita la tarea de identificación del zooplancton al reducir el número de partículas no vivas entre un 50 y 75%. La mayoría de los estudios han adoptado el uso de la eosina, la cual al parecer ha dado buenos resultados y sería adecuada para las formas gelatinosas puesto que estos organismos en su contenido bioquímico presentan un alto contenido proteico (Lucas, 2009). No obstante se podrían hacer ensayos con los dos tipos de tinción puesto que presentan una tonalidad similar.

Para disminuir el tiempo de preparación de la muestra para escanear y mejorar la resolución, Bell & Hopcroft (2008) sugieren hacer pruebas acoplado al

Tabla 1. Comparación de metodologías entre los diferentes autores.

Autor	Programa	Número de muestras analizadas	Número categorías o clases	Número viñetas	Resolución de la imagen	Tipo de tinción	Exactitud (%)
Bell & Hopcroft (2008)	ZooImage	53	53	100	2400	Ninguna	85,0
Gislason & Silva (2009)	ZooImage	17	25	16 - 208	2400	Ninguna	75,0
Irigoién <i>et al.</i> (2009)	ZooImage	4124	17	12 - 228	600	Eosina	88,2
Fernandes <i>et al.</i> (2009)	ZooImage	-	37	8 - 50	-	Eosina	64,7
		-	24	12 - 3043	600		85,7
Manríquez <i>et al.</i> (2009)	ZooImage	-	30	12 - 2288	2400	Rosa de Bengala	82,0
		44	16	50	800		-
Gorsky <i>et al.</i> (2010)	ZooScan	-	20	200 - 300	2400	Ninguna	80,0
Di Mauro <i>et al.</i> (2011)	ZooImage	18	13	200 - 600	1200	Rosa de Bengala	83,9
Chang <i>et al.</i> (2012)	ZooScan	-	29	200 - 300	2400	Ninguna	-
Bachiller <i>et al.</i> (2012)	ZooImage	-	28	30	4800	Eosina	72,6
Manríquez <i>et al.</i> (2012)	ZooImage	-	29	50	800	Rosa de Bengala	-

**Figura 3.** Esquema de la metodología de control interno adicionando perlas de resina (Modificado de Bachiller & Fernandes, 2011).

escáner una celda fija con facilidad para la evacuación de la muestra con el fin de distribuir el zooplancton directamente sobre el vidrio. Escanear la muestra en placas separadas dificulta la manipulación para muestras grandes y aumenta el tiempo de obtención de las imágenes.

Ejemplos de aplicación

Patrones de variabilidad espacial y temporal de zooplancton uso del tamaño

Diversos estudios han evidenciado que el uso del ZooImage ofrece buenos resultados para evaluar los

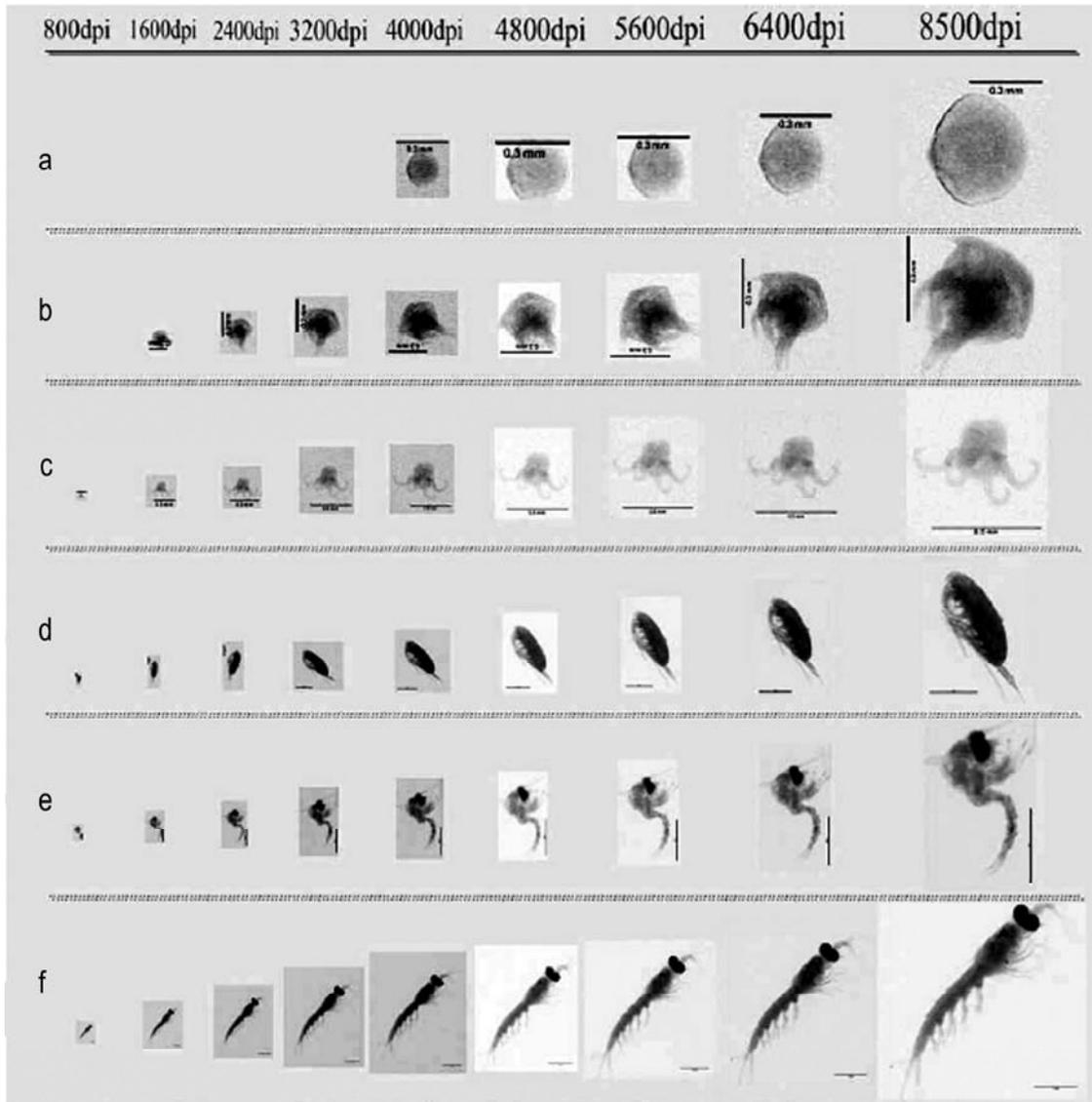


Figura 4. Viñetas en diferente calidad de resolución de cinco categorías de mesozooplankton a) Larva de bivalvo, b) nauplio de cirripedio, c) larva de cefalópodo, d) copépodo, e) larva de decápodo y f) eufáusido (Modificado de Bachiller *et al.*, 2012).

patrones espacio-temporales de la comunidad zooplanctónica. Según Manríquez *et al.* (2009) e Irigoien *et al.* (2009), este método permite una rápida evaluación de la estructura de tamaños representada por el espectro normalizado y sus pendientes asociadas. Las variaciones en la pendiente de los espectros permiten inferir cambios en la estructuración espacial de las comunidades y la influencia de factores ambientales en la distribución del zooplankton.

Este método ha resultado ser una herramienta apropiada para analizar los patrones temporales y espaciales de zooplankton en un sistema de surgencia. Tal es el caso del ecosistema de surgencia frente a la bahía de Concepción, donde el Centro de Inves-

tigación Oceanográfica en el Pacífico Sur Oriental-COPAS realiza el seguimiento hidrográfico de una serie de tiempo en una estación fija (Estación 18; 36°30,80'S, 73°7,75'W). En esta estación se estudió la comunidad de mesozooplankton durante los años 2002-2005. La pendiente del espectro de tamaño fue altamente variable en el tiempo y sus cambios se atribuyeron a las variaciones estacionales en la intensidad de la surgencia y la Zona de Mínimo Oxígeno (ZMO). De esta forma, se determinó que, cuando la surgencia era activa, la ZMO era más superficial y la pendiente del espectro de tamaños del zooplankton se incrementó (más positiva), tal que la regresión lineal se volvía menos pronunciada, en una

condición de una distribución más uniforme de las clases de tamaños. En contraste, durante el periodo de no surgencia, cuando la ZMO era más profunda, dominaban las clases de tamaño menores, el zooplancton de mayor tamaño era más escaso y la regresión lineal manifestaba mayor inclinación (Manríquez *et al.*, 2009).

En la misma zona de Concepción, durante el periodo de surgencia de 2004 se realizó un muestreo en 29 estaciones distribuidas en la zona costera y oceánica. En la zona costera se presentaron valores altos de clorofila, una pendiente del espectro de tamaño negativa mostrando valores bajos de diversidad y abundancia de zooplancton. La comunidad estuvo mejor representada en la zona del frente de surgencia, donde se registraron valores moderados de clorofila, una mayor profundidad de la ZMO, una pendiente del espectro más positiva con muchas clases de tamaño. Los frentes de surgencia se caracterizan por congregarse alimento y zooplancton. En la zona oceánica se presentaron valores bajos de clorofila y al igual que en la costa, una pendiente negativa, representada en pocas clases de tamaño. No obstante, los cambios espaciales del espectro de tamaño también pueden ocurrir por variaciones temporales como la migración diurna vertical de algunos copépodos y eufausiáceos (Manríquez *et al.*, 2012).

Por otra parte, en la bahía de Biscay localizada entre España y Francia en el Océano Atlántico oriental, Irigoien *et al.* (2009) analizaron durante la primavera una serie de zooplancton de ocho años de 1998-2006. Según este estudio la estructura de la comunidad zooplanctónica mostró un patrón recurrente de variaciones espaciales año tras año, con elevados valores de biomasa de organismos pequeños (<1 mm ECD) en la zona costera y organismos grandes (>1 mm ECD) en la plataforma media y talud. Estos resultados fueron corroborados con la pendiente del espectro que fue menos empinada en el talud y en áreas oceánicas.

Irigoien *et al.* (2009) también estudiaron la relación entre la biomasa de mesozooplancton y el reclutamiento de la anchoveta, un importante recurso pesquero, encontrando relaciones negativas entre ambos. La falta de relación mostró que no existía un control *top down* por parte de los adultos de anchoveta sobre el mesozooplancton.

Biomasa de zooplancton

Las medidas de biomasa de zooplancton son necesarias para cuantificar los flujos de energía hacia los niveles tróficos superiores. Sin embargo, este procedimiento analítico es dispendioso y toma mucho tiempo y además requiere la destrucción de la muestra

para obtener el peso húmedo o seco, así como análisis elementales de carbono y nitrógeno (Alcaraz *et al.*, 2003). Al respecto, Lehette & Hernández-León (2009) han realizado estimaciones de la biomasa de zooplancton a partir de imágenes digitalizadas, usando el área de los organismos, relacionando sus resultados con registros analíticos de biomasa en peso seco. Los autores encontraron buenos resultados con los crustáceos zooplanctónicos, pero hallaron diferencias significativas con el grupo de los gelatinosos (quetognatos, salpas y sifonóforos), enfatizando la necesidad de discriminar entre ambos grupos.

En el norte del Mar Argentino, Di Mauro *et al.* (2011) aplicaron nuevos cálculos y ecuaciones que incluyen parámetros alométricos para obtener el biovolumen, el cual se puede transformar a otras unidades de biomasa usando factores de conversión obtenidos en estudios previos. La estimación del biovolumen utiliza el ECD (mm) e involucra el largo y ancho del animal. Esto permite involucrar la variabilidad espacial y temporal en la talla de copépodos de aguas templadas en los cálculos de biovolumen como parte de la aplicación reciente del programa. Los parámetros alométricos podrían ser extendidos a otros grupos de zooplancton.

Ventajas y limitaciones

A continuación se presenta un resumen de algunas capacidades y limitaciones que han surgido de la experiencia del uso del método de análisis de zooplancton a partir de imágenes escaneadas registrada por varios autores.

Ventajas

- Rápido y no destructivo, realiza conteo y medición, el usuario puede seleccionar el método para analizar las imágenes, que puede ser automático o semiautomático. El investigador puede revisar las viñetas y modificar su identificación, aumentando la exactitud a un 85% (Grosjean *et al.*, 2004).
- Permite construir bases de datos para futuras series de tiempo; los metadatos son útiles para organizar la información y las muestras (Gorsky & Grosjean, 2003; Grosjean *et al.*, 2004).
- Las comparaciones efectuadas de los conteos taxonómicos y biomasa con métodos tradicionales y automáticos han evidenciado una buena relación, no obstante todavía se presentan algunas inconsistencias (Bell & Hopcroft, 2008).
- Permite obtener el tamaño de los organismos que es una de las variables que requieren más tiempo cuando se analizan las muestras mediante el método tradicional. Con esta variable se puede

calcular el Diámetro Circular Equivalente (ECD) y con éste el tamaño del espectro de cada muestra. La abundancia y el ECD se normalizan con logaritmo y el tamaño del espectro se construye por medio de una regresión lineal simple. Se usa la pendiente de esta regresión para describir el espectro de la comunidad (Manríquez *et al.*, 2012).

- El espectro de tamaño obtenido por el *ZooImage* es una herramienta útil para observar variabilidad espacial y temporal en la estructura del zooplancton en zonas de surgencia (Manríquez *et al.*, 2009, 2012) y otras regiones marinas.

Limitaciones

- Hasta el momento la identificación es adecuada para grupos faunísticos y taxa mayores. No obstante, se requiere perfeccionar la identificación para niveles taxonómicos de género y especie, por esta razón no es útil para colecciones biológicas (Gorsky & Grosjean, 2003; Grosjean *et al.*, 2004). En este sentido, se recomienda hacer análisis tradicionales simultáneos de las muestras, haciendo énfasis por ejemplo en cierto tipo de organismos que presentan migración vertical diurna-nocturna, dado que esta conducta puede afectar la estructura espacial de la comunidad de mesozooplancton (Manríquez *et al.*, 2009).
- El reconocimiento automático del zooplancton es difícil para todos los métodos, puesto que la diversidad de los grupos es alta y cualquier método debe reconocer diferentes formas, orientación del cuerpo, extensión de los apéndices, daño en los apéndices, formas amorfas y agregadas, entre otros (Gorsky *et al.*, 2010). Por estas razones el entrenamiento se puede contaminar con errores en el reconocimiento manual (Grosjean *et al.*, 2004).
- Se ha identificado limitaciones cuando el número de taxa aumenta y/o el número de viñetas cada taxón disminuye (Grosjean *et al.*, 2004).
- Para estimar la biomasa de imágenes digitalizadas se debe diferenciar crustáceos y formas gelatinosas. El biovolumen presenta algunos errores y problemas debido a que los apéndices de los copépodos se incluyen en el cálculo de la elipse y a que los organismos gelatinosos poseen baja biomasa por unidad de área por la alta cantidad de agua, variabilidad en el contenido orgánico de sus tejidos y dificultad del programa para detectar con precisión los bordes de estos organismos transparentes. Se ha encontrado diferencias significativas entre los parámetros de regresión de salpas, quetognatos y sifonóforos. Por esta razón, una relación general entre área y biomasa no puede

ser aplicada para el grupo de gelatinosos (Lehette & Hernández-León, 2009).

- Puede existir sobre-estimación de la abundancia de los taxa raros debido a una marcada diferencia entre categorías dominantes y raras (Bell & Hopcroft, 2008; Gislason & Silva, 2009; Gorsky *et al.*, 2010; Chang *et al.*, 2012). No obstante, la fusión de categorías podría ayudar a mejorar la sobre-estimación (Fernandes *et al.*, 2009).
- Se ha evidenciado ciertas inconsistencias en la identificación detallada de algunos organismos, como pequeños copépodos, que confunden el algoritmo de reconocimiento automático, debido posiblemente a un umbral de tamaño bajo y que el escáner no captura suficiente detalle en términos del número de píxeles. Copépodos de los géneros *Pseudocalanus*, *Metridia* y *Oithona* fueron erróneamente clasificados como restos, así como huevos de eufausiáceos, nauplios de copépodos y cirripedios (Bell & Hopcroft, 2008). También se han registrado confusiones entre pequeños calanoideos y ciclopoideos (Di Mauro *et al.*, 2011).
- Mientras la resolución de las imágenes no pueda ser aumentada considerablemente estos métodos son incapaces de identificar el microzooplancton. Sin embargo, con la nueva tecnología de FlowCAM y el código abierto del *ZooImage* es posible incorporar y procesar imágenes de protozoos y nauplios de copépodos, entre otros.
- Según Chan *et al.* (2012) si se desea mantener la resolución taxonómica mientras se minimiza la contaminación probablemente se necesita incluir nuevas características para identificar el zooplancton (con y sin apéndices y forma del rostro, etc.), entonces es necesario mejorar la resolución de la imagen para extraer más características.
- Bell & Hopcroft (2008) encontraron que el programa reduce su eficiencia cuando se analizan muestras de campo recientes con un clasificador diseñado a partir de muestras preservadas por mayor tiempo.

Perspectivas de aplicación y estudios futuros

Teniendo en cuenta la alta importancia del zooplancton, se espera con estos métodos obtener datos de composición, abundancia, distribución y biomasa de manera rápida y con la mayor exactitud para la comprensión de la comunidad y de su aplicabilidad como indicador de variabilidad ambiental, cambio climático, pesquerías y ciclo del carbono.

Sin embargo, la mayor limitación de los análisis automáticos de imágenes es lograr la correcta identi-

ficación de los organismos, particularmente en el caso de los gelatinosos. Los taxónomos aún son esenciales para identificar las especies, incluso en la técnica del ADN, el código de barras no es útil hasta que no haya sido identificada la especie (MacLeod *et al.*, 2010).

Los Investigadores de la ecología del zooplancton en oceanografía requieren identificar cientos de especies, los sistemas automatizados aún no están capacitados a este nivel de diversidad. Estos sistemas por ahora identifican objetos entre 2 a 30 categorías y entregan identificación coherente, rápida y exacta con métodos semi-automáticos (MacLeod *et al.*, 2010) proponen el uso del ZooImage como un proyecto para ser desarrollado con la comunidad científica logrando cooperación para el análisis de imágenes de zooplancton.

Una concertada investigación interdisciplinaria y desarrollo de esfuerzos en la siguiente década podrían impulsar el desarrollo de sistemas automáticos capaces de obtener una alta eficiencia en la identificación de cientos o miles de categorías vivientes o no vivientes. Como punto de partida los taxónomos deben trabajar con especialistas en patrones de reconocimiento, aprendizaje de máquinas e inteligencia artificial, ingenieros, diseñadores de programas de computación y matemáticos. Actualmente, la iniciativa de la comunidad científica Research on Automated Plankton Identification (RAPID) propone realizar esfuerzos para el desarrollo de programas e integración de los paquetes existentes de análisis de imagen, mejora de hardware, series de entrenamiento verificadas taxonómicamente que se puedan utilizar para la evaluación de clasificadores existentes o nuevos y estudios psicológicos diseñados para comprender cómo los seres humanos y computadoras clasifican imágenes (Benfield *et al.*, 2007; MacLeod *et al.*, 2010).

La identificación automática liberaría a los taxónomos de la monotonía de las identificaciones y acumulación de muestras, esto les permitiría a los ecólogos centrarse en preguntas más difíciles conceptualmente de descubrir, describir y revisar los conceptos de una especie, y de establecer cómo las especies funcionan dentro de los sistemas naturales.

En Latinoamérica Chile, Argentina y Brasil han sido los primeros en implementar este tipo de metodologías para el estudio del zooplancton, resultando una herramienta valiosa para el análisis de algunos aspectos de la estructura de comunidad. No obstante, por el momento debe ser utilizado en conjunto con los análisis tradicionales que entregan o complementan la investigación en términos de diversidad. Todavía existe una dependencia con los avances del diseño de esta tecnología, que podría ser

mejorada creando un grupo interdisciplinario en cada centro de investigación a nivel latinoamericano, en continua comunicación y capacitación con los expertos internacionales. Una extensión colaborativa podría ser por ejemplo la creación de una base de datos merísticos y morfométricos de la información publicada de las especies descritas, y que forman parte de las claves taxonómicas, y de alguna forma incluirla en los cálculos que efectúa el programa para mejorar la identificación. Esto sin dejar de considerar que como fin último lo importante es mejorar los resultados, teniendo en cuenta las experiencias registradas sobre la base de estudios previos, sin dejar de lado el uso e implementación con equipos de última tecnología.

AGRADECIMIENTOS

La implementación de estos métodos en Chile ha sido el resultado de la colaboración internacional con investigadores como P. Grossjean, P. Culverhouse and X. Irigoien y nacionales como G. Claramunt, L. Castro, P. Hidalgo, K. Manríquez y varios entusiastas estudiantes. Los estudios de zooplancton con aplicaciones del método han sido financiados por el Centro COPAS y Fondecyt 1110539. Estudios de graduación de J. Medellín-Mora son apoyados por Fondecyt 1120478. Este trabajo es una contribución para el desarrollo de Proyecto Fondecyt 1110539 que ha financiado la gestación y elaboración de esta revisión.

REFERENCIAS

- Alcaraz, M., E. Saiz, A. Calbet, I. Trepal & E. Broglio. 2003. Estimating zooplankton biomass through image analysis. *Mar. Biol.*, 143: 307-315.
- Bachiller, E. & J.A. Fernandes. 2011. Zooplankton image analysis manual: automated identification by means of scanner and digital camera as imaging devices. *Rev. Invs. Mar.-ATZI, Tecnalia*, 18(2): 16-37.
- Bachiller, E., J.A. Fernandes & X. Irigoien. 2012. Improving semiautomated zooplankton classification using an internal control and different imaging devices. *Limnol. Oceanogr. Methods*, 10: 1-9.
- Beauregard, C., P.C. Reid, F. Ibañez, J.A. Lindeley & A. Edwards, 2002. Reorganization of north Atlantic marine copepod biodiversity and climate. *Science*, 295: 1692-1694.
- Bell, J. & R.R. Hopcroft. 2008. Assessment of *ZooImage* as a tool for the classification of zooplankton. *J. Plankton Res.*, 30(12): 1351-1367.

- Benfield, M., P. Grosjean, P.F. Culverhouse, X. Irigoien, M.E. Sieracki, A. Lopez-Urrutia, H.G. Dam, Q. Hu, C. Davis, A. Hansen, C.H. Pilskaln, E.M. Riseman, H. Schultz, P.E. Utgoff & G. Gorsky. 2007. Research on Automated Plankton Identification (RAPID). *Oceanography*, 20(2): 172-187.
- Boistel, R., J. Swoger, U. Krzic, V. Fernandez, B. Gillet & E.G. Reynaud. 2011. The future of three-dimensional microscopic imaging in marine biology. *Mar. Ecol.*, 32: 438-452.
- Chang, Ch-Y., P.-Ch. Ho, A.R. Sastri, Y.-Ch. Lee, G.-Ch. Gong & Ch.-H. Hsieh. 2012. Methods of training set construction: towards improving performance for automated mesozooplankton image classification systems. *Cont. Shelf Res.*, 36(2): 19-28.
- Chavance, Y. 2011. Tara Sciences 1: Definition of Plankton. Tara Oceans. <http://oceans.taraexpeditions.org/en/tara-sciences-1-definition-of-plankton.php?id>. Reviewed: 1 June 2012, pp. 876.
- Culverhouse, P.F., R.E. Ellis, R.G. Simpson, R. Williams, R.W. Pierce & T.W. Turner. 1994. Categorization of 5 species of *Cymatocylis* (Tintinnidae) by artificial neural network. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 107: 273-280.
- Culverhouse, P.F., R. Williams, M. Benfield, P.R. Flood, A.F. Sell, M.G. Mazzocchi, I. Buttino & M. Sieracki. 2006. Automatic image analysis of plankton: future perspectives. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 312: 297-309.
- Dagg, M., S. Uye, L. Valdés & R. Harris. 2008. Human and climate forcing of zooplankton populations: Introduction. *ICES J. Mar. Sci.*, 65(3): 277-278.
- Di Mauro, R., G. Cepeda, F. Capitanio & M.D. Viñas. 2011. Using *ZooImage* automated system for the estimation of biovolume of copepods from the northern Argentine Sea. *J. Sea Res.*, 66: 69-75.
- Fernandes, J.A., X. Irigoien, G. Boyra, J.A. Lozano & I. Inza. 2009. Optimizing the number of classes in automated zooplankton classification. *J. Plankton Res.*, 31(1): 19-29.
- Fernandes, J.A. 2010. Data analysis advances in marine science for fisheries management: Supervised classification applications. PhD. Tesis Computer Science. University of the Basque Country, San Sebastian, 169 pp.
- Gislason, A. & T. Silva. 2009. Comparison between automated analysis of zooplankton using *ZooImage* and traditional methodology. *J. Plankton Res.*, 31(12): 1505-1516.
- Gorsky, G. & P. Grosjean. 2003. Qualitative and quantitative assessment of zooplankton samples. *Globec Int. Newsl. Plymouth*, 5 pp.
- Gorsky, G., M. Ohman, M. Picheral, S. Gasparini, L. Stemmann, J.-B. Romagnan, A. Cawood, S. Pesant, C. García-Comas & F. Prejger. 2010. Digital zooplankton image analysis using the *ZooScan* integrated system. *J. Plankton Res.*, 32(3): 285-303.
- Grosjean, P. & K. Denis. 2007. *ZooImage* users manual. www.sciviews.org/zooimage.
- Grosjean, P., M. Picheral, C. Warembourg & G. Gorsky. 2004. Enumeration, measurement, and identification of net zooplankton samples using the *ZooScan* digital imaging system. *ICES J. Mar. Sci.*, 61: 518-525.
- International Council for the Exploration of the Sea (ICES). 2006. Report of the Working Group on Zooplankton Ecology (WGZE), 27-30 March 2006, Villefranche, France. *ICES CM 2006/OCC*, 03: 53 pp.
- Irigoien, X., J.A. Fernandes, P. Grosjean, K. Denis, A. Albaina & M. Santos. 2009. Spring zooplankton distribution in the Bay of Biscay from 1998 to 2006 in relation with anchovy recruitment. *J. Plankton Res.*, 31(1): 1-17.
- Lehette, P. & S. Hernández-León. 2009. Zooplankton biomass estimation from digitized images: a comparison between subtropical and Antarctic organisms. *Limnol. Oceanogr. Methods*, 7: 304-308.
- Lucas, C.H. 2009. Biochemical composition of the mesopelagic coronate jellyfish *Periphylla periphylla* from the Gulf of Mexico. *J. Mar. Biol. Assoc. U.K.*, 89(1): 77-81.
- MacLeod, N., M. Benfield & P. Culverhouse. 2010. Time to automate identification. *Nature*, 467: 154-155.
- Manríquez, K., R. Escribano & P. Hidalgo. 2009. The influence of coastal upwelling on the mesozooplankton community structure in the coastal zone off Central/Southern Chile as assessed by automated image analysis. *J. Plankton Res.*, 31(9): 1075-1088.
- Manríquez, K., R. Escribano & R. Riquelme-Bugueño. 2012. Spatial structure of the zooplankton community in the coastal upwelling system off central-southern Chile in spring 2004 as assessed by automated image analysis. *Prog. Oceanogr.*, 92-95: 121-133.
- Picheral, M. 2010. *ZooProcess* manual. Laboratoire d'Océanologie de Villefranche-sur Mer (updated for version 6.16), pp. 106.
- Sieracki, M.E., M. Benfield, A. Hanson, C. Davis, C.H. Pilskaln, D. Checkley, H.M. Sosik, C. Ashjian, P. Culverhouse, R. Cowen, R. Lopes, W. Balch, X. Irigoien. 2010. Optical plankton imaging and analysis systems for ocean observation. In: J. Hall, D.E. Harrison & D. Stammer (eds.). *Proceedings of ocean*

Obs '09: sustained ocean observations and information for society, Venice, 21-25. September 2009, ESA Publication WPP-306. doi:10.5270/OceanObs 09.

Suthers, I. & D. Rissik. 2009. Plankton: a guide to their ecology and monitoring for water quality. CSIRO Publishing, Australia, 249 pp.

Received: 15 June 2012; Accepted: 26 February 2013