

Revista de

Investigación Marina

[24.1]

Comparación de
herramientas de análisis
de imagen: eficiencia y uso
en ecología bentónica de
sustrato duro

Lidia González Goñi
Ángel Borja
María C. Uyarra



Lidia González Goñi, Ángel Borja, María C. Uyarra, 2017. Comparación de herramientas de análisis de imagen: eficiencia y uso en ecología bentónica de sustrato duro. *Revista de Investigación Marina, AZTI*, 24(1): 1-12.

La serie '*Revista de Investigación Marina*', editada por la Unidad de Investigación Marina de AZTI, cuenta con el siguiente Comité Editorial:

Editor: Javier Franco

Adjuntos al Editor: Edorta Aranguena e Irantzu Zubiaur

Comité Editorial: Haritz Arrizabalaga
Oihane C. Basurko
Ángel Borja
Guillem Chust
Almudena Fontán
Ibon Galparsoro
Arantza Murillas

La '*Revista de Investigación Marina*' de AZTI edita y publica investigaciones y datos originales resultado de la Unidad de Investigación Marina de AZTI. Las propuestas de publicación deben ser enviadas al siguiente correo electrónico jafranco@azti.es. Un comité de selección revisará las propuestas y sugerirá los cambios pertinentes antes de su aceptación definitiva.



Edición: 1.^a Junio 2017

© AZTI

ISSN: 1988-818X

Unidad de Investigación Marina

Internet: www.azti.es

Edita: Unidad de Investigación Marina de AZTI

Herrera Kaia, Portualdea

20110 Pasaia

Foto portada: © AZTI

© AZTI 2017. Distribución gratuita en formato PDF a través de la web: www.azti.es/RIM

Comparación de herramientas de análisis de imagen: eficiencia y uso en ecología bentónica de sustrato duro

Lidia González Goñi, Ángel Borja y María C. Uyarra

AZTI, Unidad de Investigación Marina, Herrera Kaia, Portualdea s/n, 20100 Pasaia (España) | aborja@azti.es

Resumen

La necesidad de un monitoreo efectivo del medio marino hace necesario optimizar las herramientas utilizadas para obtener información de los ecosistemas de manera sistemática y repetible. Las técnicas de análisis de imagen suponen un gran avance a la hora de afrontar un estudio de monitoreo ecológico, ya que permiten realizar un seguimiento no destructivo del medio ofreciendo, a la vez, datos fiables. De la amplia variedad de programas disponibles para realizar análisis de imagen, se han seleccionado tres: ImageJ, Coral Point Count (CPCe) y Photoquad, sobre los que se ha realizado una comparación de efectividad mediante un análisis de la cobertura, riqueza y diversidad de las comunidades bentónicas que colonizaron los ARMS (Autonomous Reef Monitoring Structures), en tres localidades de la costa vasca. Los resultados demuestran que todos ellos aportan datos similares tras el análisis, con diferencias entre las localidades estudiadas, pero no entre los programas. Teniendo en cuenta el tiempo necesario para realizar los análisis, existen diferencias significativas entre los programas, siendo CPCe el programa más rápido y, por lo tanto, el más efectivo.

Palabras clave: análisis de imagen, bentos, sustrato duro, Photoquad, ImageJ, CPCe.

Abstract

There is a need for effective monitoring of the marine environment, optimizing the tools used to obtain ecosystems information in a systematic and repeatable way. Image analysis techniques represent a breakthrough in addressing ecological studies, as they allow non-destructive sampling while providing reliable data. From the wide variety of software available for image analysis, three have been selected and used: Image J, Coral Point Count (CPCe) and Photoquad. A comparison of their effectiveness has been made, by analyzing coverage, richness and diversity of benthic communities that colonised ARMS (Autonomous Reef Monitoring Structures) installed in three locations on the Basque coast. The results show that all of them provide the same outcomes after analysis, with differences among study sites but not among softwares. There are, however, significant differences in the time required to perform the analysis with the three softwares, being CPCe the fastest. Therefore it can be conclude that it is the most effective.

Keywords: image analysis, benthos, hard bottom, Photoquad, ImageJ, CPCe.

Introducción

Los océanos han tenido una gran relevancia en el desarrollo social y económico. En la actualidad casi el 50% de la población europea (Douvere, 2008) y más del 60% de la población mundial (Von & Turner, 2001) vive próxima a la línea de costa. Esta estrecha relación ha supuesto una fuerte presión en los ecosistemas marinos, encontrándose en declive como resultado de la sobreexplotación, la contaminación y los efectos del cambio climático (Hughes et al., 2005). Reducir estos impactos y mitigar la degradación del medio es fundamental para recuperar el buen estado de los ecosistemas. Para ello, es necesaria la implementación de medidas de gestión y sistemas de monitoreo estandarizados, que homogeneicen las medidas a tomar por parte de todos los países y permitan evaluar la evolución de los ecosistemas marinos (Turner, 2005).

La evaluación del estado ambiental del medio marino y la gestión adecuada de los recursos (como pesquerías, depósitos minerales...) debe estar asociada siempre con un

buen programa de monitoreo (Van Rein et al., 2009; Borja et al., 2016). El monitoreo es una herramienta fundamental para documentar los impactos ambientales, tanto naturales como antropogénicos, así como para evaluar la efectividad y eficiencia de la gestión realizada (Day, 2008). Sin embargo, es necesario que los datos recogidos en una determinada zona puedan ser analizados en comparación con otros estudios de diferentes zonas, para lo que se precisan la identificación de componentes biológicos comunes y la estandarización de las técnicas de monitoreo (por ejemplo, ISO 19493, 2007).

La gran relevancia de los organismos bentónicos para el buen funcionamiento de los ecosistemas marinos hace que sean muy adecuados para evaluar su estado (Pearson & Rosenberg, 1978). Suponen gran parte de la producción primaria bentónica (algas y fanerógamas), son formadores de hábitats para otros organismos, proporcionando refugio y superficies para la puesta, además de ser parte fundamental de la cadena trófica

(Rees et al., 2009). La vulnerabilidad de estas comunidades a los efectos de la actividad humana, sobre todo en las zonas más cercanas a la costa, las convierte en buenos indicadores del estado ecológico, siendo necesario un seguimiento controlado de ellas como medio de evaluación (Zubikarai et al., 2014).

Las comunidades bentónicas de sustrato duro tienden a ser muy heterogéneas, con comunidades dominadas por dos o tres especies estructurantes y muchas acompañantes (Borja et al., 2004). Esto hace que sea difícil establecer un monitoreo efectivo, que recoja toda la diversidad y muestre de manera adecuada los cambios a través del tiempo, siendo necesario conocer, mediante estudio previo, la variabilidad natural de la zona o contar con una comunidad de referencia con la que comparar los resultados (Rees et al., 2009). Tradicionalmente, el conocimiento de la biodiversidad marina y las comunidades bentónicas se ha visto limitado por las dificultades logísticas y el elevado coste de la realización de muestreos, sobre todo en áreas muy profundas o alejadas de la costa (Solan et al., 2003).

Como herramienta para monitorizar la biodiversidad en sustratos duros se han desarrollado instrumentos como los ARMS (Autonomous Reef Monitoring Structures), que permiten un seguimiento continuado y comparable (Brainard et al., 2009). La utilidad de estas estructuras radica en que pueden ser colocadas prácticamente en cualquier superficie de sustrato duro, permiten realizar un muestreo no destructivo del hábitat marino, extraer fácilmente organismos sésiles difíciles de muestrear manualmente y son un método estandarizable (Knowlton et al., 2010). La simplicidad del método permite incrementar la efectividad del monitoreo a escala local, regional o global con un bajo coste. Además constituyen una herramienta para el estudio sistemático de cambios temporales y espaciales en la biodiversidad (Brainard et al., 2009). De los ARMS se pueden obtener datos mediante análisis de imagen, microscopía, técnicas genómicas, etc.

Con el avance tecnológico se ha incrementado el uso de técnicas digitales para el monitoreo del medio marino, ya que requieren menos tiempo de muestreo submarino y permiten una descripción del medio más efectiva (Dumas et al., 2009). Las técnicas fotográficas y de análisis de imagen han demostrado proporcionar información igual de válida que las técnicas visuales tradicionales de análisis, a la hora de caracterizar una comunidad o detectar cambios (Pech et al., 2004; Parravicini et al., 2009). Además, gran parte de las técnicas tradicionales son destructivas, mientras que los métodos observacionales son no-destructivos y permiten realizar un seguimiento de los cambios acaecidos a lo largo del tiempo (Rumohr, 1995). Las técnicas digitales no sólo han demostrado ofrecer resultados válidos comparados con las técnicas manuales, sino que, al requerir menos tiempo y esfuerzo, permiten ampliar el número de datos procesados (Šaškov et al., 2015), tanto cuantitativos como cualitativos (biodiversidad, tipo de hábitat, sustratos, entre otros), lo que aporta robustez a los resultados obtenidos (Booth et al., 2005). Estos pueden ser almacenados fácilmente y de manera efectiva, si bien ello requiere una estandarización (Althaus et al., 2015).

A pesar de las numerosas ventajas que aporta el análisis de

imagen frente a los muestreos in situ, es cierto que parte de la información puede perderse al no poder examinar directamente los organismos, lo que puede dificultar en ocasiones la identificación específica (Flannery & Przeslawski, 2015).

Tanto en el estudio de la biodiversidad, como en el estudio de procesos biológicos como la bioturbación, la regeneración de nutrientes, y el comportamiento de la fauna pueden utilizarse diferentes métodos de análisis de imagen (Smith & Rumohr, 2005).

La oferta de programas disponibles para realizar análisis científicos de imágenes es muy amplia, desde los creados con el fin de analizar aspectos ecológicos hasta los de análisis de imagen más simples que pueden ser adaptados para extraer los resultados deseados. Sin embargo, no existe ningún tipo de guía o protocolo que permita determinar cuál es el programa más adecuado y efectivo que se ha de utilizar al afrontar un estudio biológico con objetivos concretos. Por ello, este estudio tiene como objetivo principal determinar si existen diferencias en los resultados obtenidos del análisis de imagen mediante tres programas (ImageJ, Photoquad y CPCE, Coral Point Count), y evaluar cuál de ellos ofrece una mejor relación entre los resultados obtenidos y el menor coste de tiempo invertido en el estudio de la biodiversidad. También se pretenden evaluar las diferencias existentes entre los tres programas que puedan explicar su diferente eficacia.

Material y métodos

Área de estudio

La fisiografía de la costa vasca se caracteriza por la dominancia del sustrato rocoso, presentando acantilados y plataformas de abrasión intercaladas con playas arenosas (Borja et al., 2004). Es una costa muy expuesta, que además se ve afectada por presiones humanas (Cearreta et al., 2004; Zubikarai et al., 2014). Las localidades de muestreo para este estudio fueron Lekeitio, Zumaia y Pasaia (Fig.1).



Figura 1. Localización de los puntos de muestreo

Para obtener una muestra de la comunidad en cada localidad se han utilizado ARMS. El diseño de un ARMS consiste en una estructura formada por nueve placas de PVC de 22,5 x 22,5 cm superpuestas, y separadas las unas de las otras por unos espaciadores, que proporcionan un sustrato artificial susceptible de ser colonizado. Cada una de las nueve placas puede ser colonizada tanto por la cara superior como por la

inferior, a excepción de la última placa, que se apoya sobre una placa de mayor tamaño sin espaciadores (la cual sirve para anclar la estructura al sustrato), quedando solo expuesta su cara superior (Figura 2).

En cada localidad se instalaron tres ARMS a 10 m de profundidad y separados por una distancia aproximada de 5 m. Las estructuras fueron colocadas en mayo de 2013 y retiradas

un año después. Transcurrido este tiempo las estructuras fueron llevadas al laboratorio, donde se soltaron las placas, se separaron los especímenes móviles y se fotografió cada placa por ambas caras para la posterior identificación de los organismos sésiles de visu (Figura 3). Se obtuvieron 17 fotografías (3008x2000 píxeles) por cada ARMS instalado, lo que supone un total de 51 imágenes para cada localidad.



Figura 2. Componentes de los ARMS (izquierda y medio) y ARMS completo (derecha).



Figura 3. Esquema del protocolo de colocación de los ARMS. a) Montaje de los ARMS. b) Colocación de las estructuras en las localidades de estudio. c) Proceso de colonización durante un año. d) Proceso de retirada. e) Procesado en el laboratorio.

Programas utilizados

Los tres programas comparados han sido los siguientes:

CPCe (Coral Point Count with Excel extension)

CPCe es un programa creado específicamente para el análisis de la cobertura de coral, u otras comunidades bentónicas, utilizando imágenes fotográficas. El proceso básico que lleva a cabo consiste en lanzar un número determinado de puntos sobre una imagen (o una zona delimitada de la misma), para realizar después la identificación visual de las especies sobre las cuales recae cada punto. Los datos obtenidos del análisis pueden ser automáticamente guardados en formato Excel para un posterior análisis estadístico aportando valores de abundancia relativa, media, desviación estándar e índices de diversidad para cada especie (Kohler & Gill, 2006).

Photoquad

Un programa diseñado para el procesamiento y análisis de imágenes de alta resolución, utilizado en biología marina y ecología para el estudio de comunidades sésiles a través de muestras fotográficas. Este programa opera en un sistema basado en capas, lo que simplifica el manejo de los datos permitiendo realizar varios análisis simultáneos sobre una misma imagen (Trygonis & Sini, 2012).

ImageJ

Es un programa de procesamiento de imágenes centrado

en la utilización de estas técnicas en imágenes científicas. Este programa cuenta con una serie de plugins (más de 500 disponibles), extensiones del programa que permiten realizar acciones más específicas ofreciendo comandos y opciones adicionales (Ferreira & Rasband, 2012).

Análisis de imagen

El objetivo del análisis de imagen era caracterizar la comunidad bentónica encontrada en cada placa para determinar, por un lado, si los resultados obtenidos son los mismos con los tres programas y, por otro, estudiar la eficiencia de los distintos programas en función del tiempo empleado en realizar dichos análisis. Para ello, se realizó el análisis de todas las fotografías por triplicado, una vez con cada programa, siguiendo los siguientes pasos: calibrado de la imagen, selección de área, identificación de especies y área ocupada y guardado de los resultados, además de los dos pasos previos de crear la librería y enderezar la imagen en los programas que lo requerían.

Previamente al análisis individual de cada imagen es necesaria la creación de una librería o código de especies con el que poder describir las comunidades, especificando género y especie (siempre que sea posible). En este estudio las especies identificadas para los tres puntos de muestreo quedan recogidas en la Tabla 1.

Especie	Código	Especie	Código	Especie	Código
INDETERMINATE (100)		FLORIDEOPHYCEAE, ALGAE (300)		MOLLUSCA (700)	
Brown algae indet.	108	Bonnemaisonia asparagoides	306	Anomia ephippium	701
Demospongiae or Ascidiacea colony	105	Chondria sp	302	Anomia juvenile	702
Difuse image	103	Lithophyllum incrustans	303	Fissurella sp	703
Encrusting patch	107	Lomentaria articulata	304	Gastropoda spawn	705
Indeterminate	101	Lomentaria ercegovicii	305	Haliotis tuberculata	704
Paper	106	PHAEOPHYCEAE, ALGAE (400)		CIRRIPEDIA (800) CRUSTACEA	
Plate	102	Dictyota dichotoma	401	Balanus rigonus	801
Rhodophyta indet.	104	Spatoglossum schroederi	402	Perforatus perforatus	802
Sp1	110	GYMNOLAEMATA, BRYOZOA (500)		POLYCHAETA (900) ANNELIDA	
Sp2	111	Cheilostomatida indet	501	Filograna implexa	901
Sp3	112	Reptadeonella violacea	502	Serpula sp	902
Sp4	113	Scrupocellaria sp	503	Serpula sp covered by no ID	904
Sp5	114	Umbonul aovicellata	504	Serpulidae juveniles	905
Sp6	115	STENOLAEMATA, BRYOZOA (600)		Spirobranchus polytrema	903
Sp7	116	Crisia sp	601	ULVOPHYCEAE (1000) ALGAE	
Sp8	117	Disporella hispida	602	Ulva lactuca	1001
Sp9	118	Plagioecia patina	603		
not_colonisable	109	Tubulipora sp	604		
ASCIDIACEAE (200)					
CHORDATA					
Ascidia colony no ID	202				
Ciona intestinalis	201				

Tabla 1. Listado de especies identificadas.

Posteriormente, y antes de comenzar el análisis de imagen, es necesario asegurarse de que la imagen se encuentra en las condiciones adecuadas para poder ser correctamente analizada con los tres programas. El área de la imagen que se desea analizar debe estar en posición vertical, ya que en el caso del CPCe no puede determinarse manualmente el área de estudio, solo sus dimensiones, siendo ésta un rectángulo alineado con el borde de la imagen que se puede situar en diferentes zonas de la imagen, pero no girarse. Por lo tanto, antes de comenzar el análisis se enderezaron, cuando fue necesario, las fotografías, utilizando para ello el visor de imágenes de Windows.

Cada imagen fue calibrada tomando como referencia el tamaño del borde de la placa. Posteriormente se seleccionó el

área de la imagen sobre la cual se realizó el análisis. En el caso de ImageJ no es posible realizar este paso, y los puntos se lanzan sobre toda la imagen, aunque posteriormente solo se utilizan aquellos que se encuentran dentro del área de interés.

Comúnmente, para estimar la abundancia relativa de especies en una zona, se utiliza un muestreo aleatorio, con puntos situados al azar. Sin embargo, puesto que esta acción no es posible realizarla con todos los programas y para que los resultados obtenidos con los tres programas fueran comparables, se realizó un muestreo estratificado situando 64 puntos de análisis sobre cada imagen. Después, cada punto fue asignado a una especie de la librería (Figura 4).

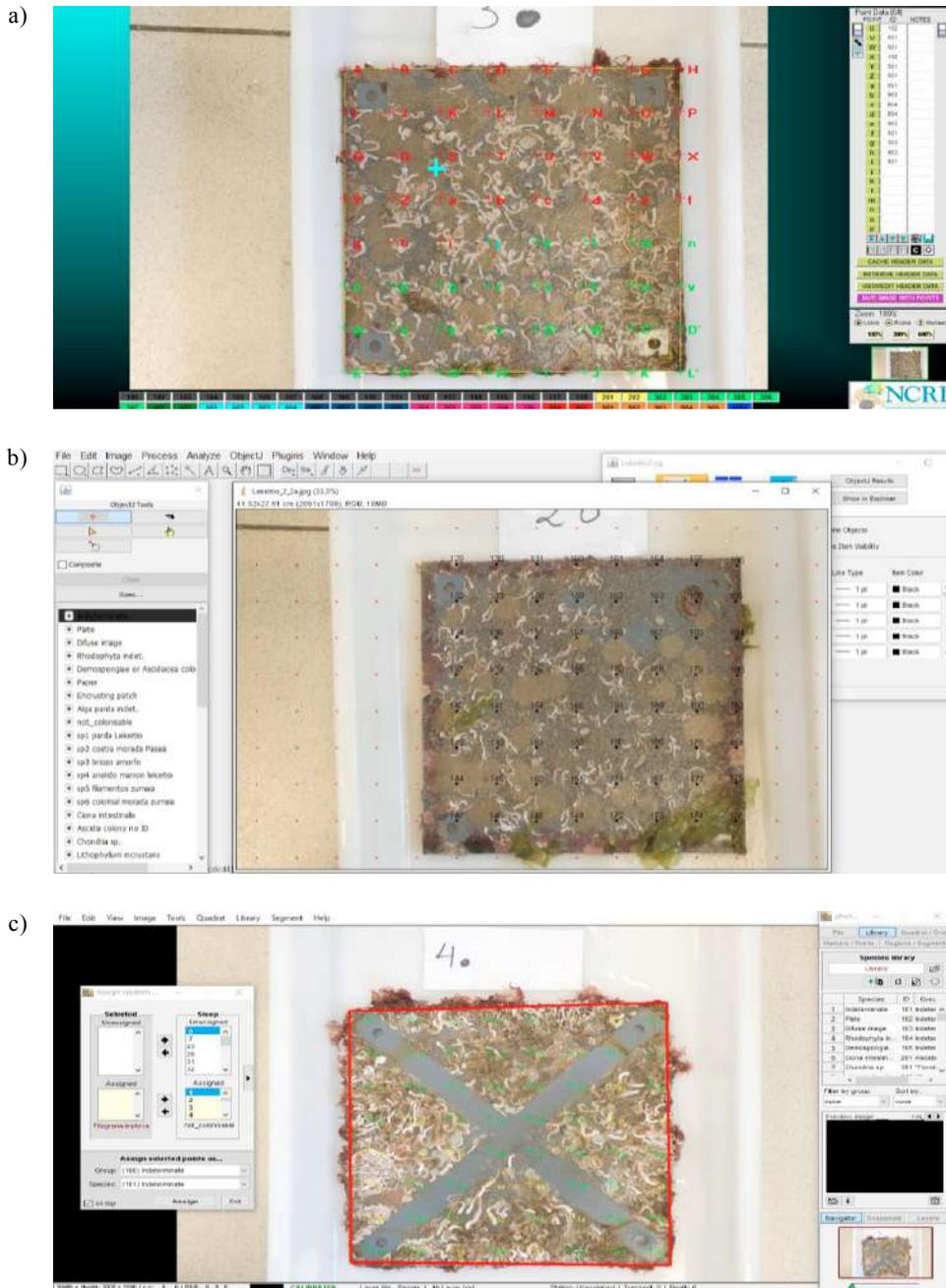


Figura 4. Ejemplo de análisis de una imagen con cada uno de los tres programas. a) CPCe: a la derecha, se muestra la tabla de puntos colocados en una de las fotografías tomadas a una muestra de Lekeitio. En rojo, aquellos que ya han sido identificados; en verde, los aún no identificados; y en azul, punto seleccionado para identificación. En la parte inferior se muestra el código de especies. En amarillo, área delimitada para el estudio; b) ImageJ: gradilla de puntos de 7,9 cm² colocada sobre una imagen de Lekeitio; en negro, puntos ya asignados a una especie. A la derecha, listado de especies asignados como objetos por el programa; c) Photoquad: puntos a analizar en una imagen de Pasaia; en verde aquellos que ya han sido identificados; en amarillo, los que no. Librería de especies en la zona derecha. En rojo, área delimitada para el estudio.

La repetición en el análisis de una misma fotografía puede crear una disminución progresiva en el tiempo invertido para analizar una misma imagen con el segundo y tercer programa. Para evitar este posible “efecto aprendizaje” el orden de aplicación de cada programa se alternó.

La diversidad de una comunidad puede explicarse en base a dos características: el número de especies (riqueza), y la heterogeneidad o abundancia proporcional de las mismas (diversidad específica). Para conocer la diversidad de esta zona se ha calculado la riqueza de especies, teniendo en cuenta el número total de especies presentes en cada una de las tres localidades, en los tres ARMS y con los tres programas. La

diversidad específica ha sido calculada mediante el índice de Shannon, que tiene en cuenta la abundancia relativa de cada especie para el global de la población. También se obtuvo el valor de la cobertura biológica (%) total para cada ARMS.

A medida que se fue realizando cada paso del análisis se anotó el tiempo necesario para llevarlo a cabo en cada imagen y con cada uno de los programas. De esta manera se obtuvo el tiempo total necesario para analizar cada imagen y el tiempo para cada paso intermedio (Tabla 2). Así mismo, se anotó el tiempo necesario para procesar los datos resultantes; es decir, el del tratamiento para su posterior análisis estadístico.

Tabla 2. Relación de pasos realizados en cada análisis y tiempo empleado en ellos (en segundos).

Coral Point Count (CPCe)

Localidad	ARMS	Enderezar imagen	Calibrar	Seleccionar área	Lanzar puntos	Asignar especie	Guardar resultados	TOTAL
Lekeitio	1	236	202	268	44	5807	1503	8240
	2	192	185	266	51	5147	1646	7667
	3	175	171	275	47	5175	1489	7512
Pasaia	1	108	187	267	53	5783	1746	8324
	2	183	180	294	46	5517	1617	8017
	3	172	180	264	50	6466	1415	8727
Zumaia	1	149	203	300	47	6363	1810	9052
	2	111	191	261	51	5439	1571	7804
	3	155	183	280	54	6121	1546	8519

Photoquad

Localidad	ARMS	Calibrar	Seleccionar área	Lanzar puntos	Asignar especie	Guardar resultados	Transformar datos	TOTAL
Lekeitio	1	291	289	161	8121	750	3348	12960
	2	295	319	132	5978	576	2946	10246
	3	296	310	139	5693	536	3040	10014
Pasaia	1	306	255	142	9116	696	2847	13362
	2	305	305	131	6222	615	2650	10228
	3	308	293	139	6769	550	2897	10956
Zumaia	1	317	346	148	7454	627	2520	11412
	2	296	306	135	6090	549	2761	10137
	3	290	296	139	6220	561	2626	10132

Photoquad

Localidad	ARMS	Crear librería	Calibrar	Lanzar puntos	Asignar especie	Guardar resultados	Transformar datos	TOTAL
Lekeitio	1	2125	279	227	7034	387	4258	14310
	2	1896	292	206	5452	350	4028	12224
	3	1901	271	168	5243	344	3277	11204
Pasaia	1	1424	273	235	7701	428	3319	13380
	2	1904	285	173	6142	321	2851	11676
	3	1820	284	182	6923	299	3156	12664
Zumaia	1	1726	300	193	6320	384	3002	11925
	2	1795	278	176	5596	341	2880	11066
	3	1854	272	172	5419	316	2758	10791

Análisis estadísticos

Por un lado, para determinar la efectividad de cada programa se ha analizado el tiempo total necesario para realizar el análisis de las fotografías de cada ARMS. Para ello es necesario comprobar la normalidad de los datos. Debido al reducido tamaño muestral (<10 ARMS por localidad), el estudio de la normalidad hay que llevarlo a cabo sobre los residuos, previa comprobación de la homogeneidad de varianzas mediante el test de contraste de Levene. Al no poder comprobarse el supuesto de distribución normal de los residuos, debido a la heteroscedasticidad, se lleva a cabo la técnica de la Descomposición de Sumas de Cuadrados de Rangos por el método de Bennett y se realiza una ANOVA multifactorial para analizar la relación de la variable tiempo

y la diversidad de la comunidad en base a los factores de la localidad y del programa utilizado. Utilizando los datos de las sumas de cuadrados obtenidos se calcula la varianza y las χ^2 , de la que se extraen los valores de p. Posteriormente se realiza el estadístico de contraste U Mann-Whitney para comprobar entre qué localidades y/o programas existen diferencias significativas, en caso de haberlas.

El porcentaje de cobertura biológica y la riqueza han sido calculados para cada ARMS con cada uno de los tres programas, y posteriormente se han comparado estos tres parámetros en función de la localidad y el programa utilizado mediante análisis de la varianza (ANOVA) multifactorial. Después se ha aplicado el método de Fisher (LSD) para discriminar las diferencias entre muestras con el software Statgraphics.

Tabla 3. Datos de riqueza específica, diversidad y porcentaje de cobertura biológica en cada uno de los ARMS analizados mediante los tres programas en cada localidad. H': diversidad.

	Photoquad			ImageJ			CPCe		
	Riqueza (n°)	H' (bit ind ⁻¹)	Cobertura (%)	Riqueza (n°)	H' (bit ind ⁻¹)	Cobertura (%)	Riqueza (n°)	H' (bit ind ⁻¹)	Cobertura (%)
Lekeitio	12	1,72	83,5	13	1,74	79,1	14	1,86	79,7
	11	1,47	86,0	15	1,59	86,3	12	1,64	81,8
	13	1,70	77,7	14	1,77	71,4	13	1,90	69,9
Pasaia	17	1,77	96,2	15	1,72	95,1	18	1,88	97,3
	14	1,92	93,0	13	1,95	90,4	13	1,91	94,7
	17	1,94	97,8	18	1,95	96,2	19	2,06	97,8
Zumaia	18	1,83	72,4	18	1,88	71,0	17	2,05	71,5
	12	1,77	58,6	13	1,83	55,4	13	1,89	57,2
	16	1,81	59,9	16	1,88	60,0	16	2,08	56,4

Resultados

Entre los tres lugares de muestreo fueron identificados 28 taxones que incluyen 2 especies de ascidias, 5 especies de algas Florideofíceas, 2 especies de Feofíceas, 1 de Ulvofíceas, 4 briozoos de la clase Gymnolaemata y 4 de la clase Stenolaemata, 4 taxones de moluscos, 2 de cirrípedos y 4 de poliquetos. Además de otros 12 taxones diferentes que no fue posible identificar. En total, doce de las especies identificadas están presentes en todas las localidades.

En Lekeitio se han identificado un total de 23 taxones diferentes, en Pasaia se han encontrado 24 taxones y en Zumaia 26. Cabe destacar que en ninguna de las tres localidades fueron halladas todas las especies en un único ARMS dado que algunas de ellas están presentes con una frecuencia muy baja, lo que las hace difíciles de detectar en algunos casos. A pesar de que el número de especies detectado puede variar ligeramente (Tabla

3), el análisis de ANOVA (Tabla 4) demuestra que no existen diferencias significativas entre los datos arrojados por los programas, sí que existen diferencias, sin embargo, entre las localidades, siendo la riqueza en Lekeitio significativamente menor que en Zumaia y Pasaia, entre las que no se encuentran diferencias (Figura 5).

Tabla 4. Resultados de ANOVA multifactorial para los datos de riqueza en función de la localidad y del programa.

Origen	Grados de libertad	F-Ratio	P-Valor
Efectos principales			
A:Programa	2	0,17	0,843
B:Localidad	2	4,94	0,019
Interacciones AB	4	0,39	0,810
Residuos	18		
Total (corregido)	26		

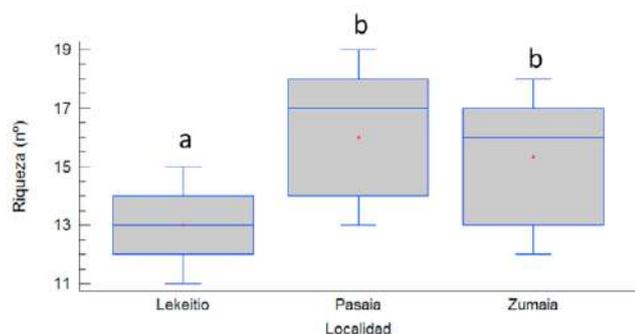


Figura 5. Comparación múltiple para determinar las diferencias de riqueza entre localidades utilizando el método de Fisher (LSD). Letras diferentes indican diferencias significativas con $p < 0,05$.

Algo similar ocurre con la diversidad. Tras calcular los valores de χ^2 en base a los valores de la suma de cuadrados calculados con ANOVA de los rangos y los valores de p , (Tabla 5) se puede observar que no existe un efecto significativo del programa utilizado en los resultados obtenidos. Existen, sin embargo, diferencias significativas entre localidades, siendo menor la diversidad en la localidad de Lekeitio (Figura 6).

Tabla 5. Análisis de la varianza para los valores de rango de la diversidad. Los valores correspondientes a la suma de cuadrados han sido utilizados para calcular la significancia.

Origen	Suma de cuadrados	Grados de libertad	χ^2	P
Modelo	1027,33	8	16,30	<0,05
Programa	312,00	2	4,95	>0,05
Localidad	644,66	2	10,23	<0,01
Programa*Localidad	70,66	4	1,12	>0,5
Residuos	610,66	18		
Total (corregido)	1638	26		

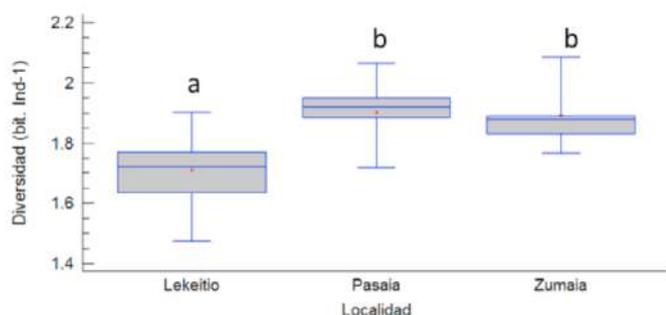
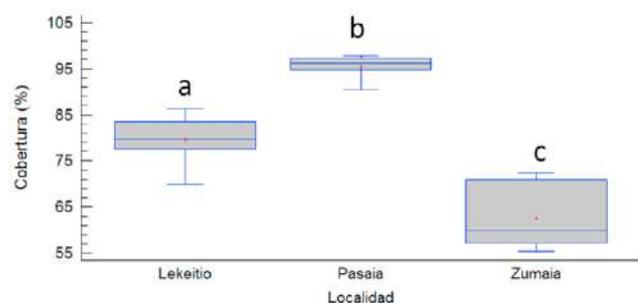


Figura 6. Comparación utilizando el método de Fisher (LSD) de las diferencias entre localidades de la diversidad de especies. Letras diferentes indican diferencias significativas con $p < 0,05$.

En cuanto a la cobertura de especies, al igual que ocurre con la riqueza y la diversidad de especies, la localidad supone un factor diferenciador (Tabla 6). Siendo en este caso la cobertura diferente en las tres localidades (Figura 7). En Pasaia, se encuentra el valor máximo alcanzando un 95% de media, en Lekeitio hay un 79% de cobertura media y el menor valor se da en Zumaia, con un 62% de cobertura media.

Tabla 6. Resultados de ANOVA multifactorial para la cobertura.

Origen	Grados de libertad	F-Ratio	P-Valor
Efectos principales			
A:Programa	2	0,39	0,679
B:Localidad	2	67,32	0,000
Interacciones AB	4	0,23	0,920
Residuos	18		
Total (corregido)	26		

Figura 7. Análisis de Fisher (LSD) para la diferencia de cobertura en base a la localidad. Letras diferentes indican diferencias significativas con $p < 0,05$.

La media (\pm DS) de tiempo empleado con CPCe para analizar una placa es de 7 min 57s (\pm 7s), con ImageJ 11 min 53s (\pm 7s) y con Photoquad 10 min 57s (\pm 7s). Para realizar los análisis, sin embargo, se ha tenido en cuenta el total de tiempo empleado por cada ARMS, que es de media 2h 12 min (\pm 5 min) para CPCe, 3h 6 min (\pm 5 min) para ImageJ y 3h 22 min para Photoquad.

Se aprecia una diferencia significativa entre el tiempo necesario para realizar el análisis con CPCe (menor) y con los otros dos programas, Photoquad e ImageJ (Tablas 7 y 8). Entre estos dos últimos no se aprecian diferencias significativas en lo que a tiempo total empleado se refiere.

Tabla 7. Resultados de ANOVA, χ^2 y significancia comparando el tiempo de análisis entre localidad y programa, utilizando los valores de rango de la variable tiempo.

Origen	Suma de cuadrados	Grados de libertad	χ^2	P
Modelo corregido	1298,00	8	20,60	<0,05
Intersección	5292,00	1		
Localidad	48,22	2	0,76	>0,5
Programa	1186,88	2	18,83	<0,001
Localidad * Programa	62,88	4	0,99	>0,9
Error	340,00	18		
Total	6930,00	27		
Total corregido	1638,00	26		

Tabla 8. Comparación 2 a 2 de los datos de tiempo en función del programa utilizado. (Sig.=Significancia)

Estadístico de contraste	Photoquad-ImageJ	Photoquad-CPCe	ImageJ-CPCe
U de Mann-Whitney	20,00	0,00	0,00
W de Wilcoxon	65,00	45,00	45,00
Z	-1,81	-3,57	-3,57
Sig. asintótica (bilateral)	0,07	0,00	0,00
Sig. exacta [2*(Sig. unilateral)]	0,07	0,00	0,00

Discusión

Algunos estudios han demostrado la efectividad del uso de imágenes digitales en el monitoreo de comunidades bentónicas, y su compatibilidad con el uso de otras técnicas (Booth et al., 2005; Josephitis et al., 2012; Tabugo, 2016). Sin embargo, la precisión de los datos puede ser menor que en la identificación directa, no pudiéndose alcanzar el nivel de especie en todas las identificaciones (Mantelatto et al., 2013). Aunque para los objetivos de este estudio no es necesario llegar a la identificación a nivel de especie, cabe destacar que parte de los especímenes sólo fueron identificados a nivel de género o no fue posible asignarlos a un taxón concreto, debido a que no se aprecian las características necesarias para la diferenciación en las imágenes o que se encontraban en zonas difusas de la misma.

La efectividad de un programa debe valorarse en función del tiempo necesario para obtener los resultados y el grado de veracidad de dichos resultados. Para ello, es necesario analizar las ventajas y desventajas que puedan presentar los programas y establecer la importancia efectiva de las diferencias que puedan existir entre ellos.

Los resultados obtenidos con los tres programas, Photoquad, ImageJ y CPCe, no muestran diferencias estadísticamente significativas en la cobertura, diversidad y riqueza de las comunidades estudiadas, por lo que todo ellos son igualmente válidos para realizar este tipo de análisis. Puesto que los resultados obtenidos son iguales, el programa más eficiente será aquel con el que el tiempo y esfuerzo empleados en el análisis sea menor.

En lo que a tiempo total invertido se refiere, los resultados obtenidos indican que CPCe permite realizar un análisis de imagen significativamente más rápido que con Photoquad e ImageJ, entre los que no se aprecian diferencias notables. Por lo tanto, en un principio CPCe sería el programa más efectivo ya que permite obtener los mismos resultados en menos tiempo.

Hay que tener en cuenta, sin embargo, que las diferencias a pesar de ser significativas no son excesivamente altas, siendo la diferencia entre las medias de entre dos y tres minutos para cada placa. Pero si se tiene en cuenta el tiempo total invertido, con CPCe se puede llegar a ahorrar hasta una hora por ARMS analizado en comparación con Photoquad e ImageJ, lo que, sin duda, supone una clara ventaja a favor de dicho programa cuando se necesita procesar grandes cantidades de datos. Por ejemplo, en este caso, para los nueve ARMS analizados la diferencia usando CPCe supone un día menos de trabajo de un investigador, con el ahorro que ello conlleva.

Analizar en qué puntos del análisis se invierte más tiempo podría permitir optimizar el proceso y reducir las diferencias existentes entre los programas. Por un lado, en los tres programas el mayor tiempo se invierte en realizar la identificación específica; este paso supone el factor principal del análisis y su rapidez dependerá en mayor medida de la calidad de la imagen tomada que permitirá distinguir con claridad los rasgos distintivos de las especies y de la experiencia del observador que realice la identificación.

Otro factor clave es el hecho de que los resultados obtenidos con CPCe se obtienen directamente en el formato necesario

para realizar los análisis estadísticos que se consideren oportunos, mientras que los resultados de Photoquad e ImageJ requieren de una adaptación previa al análisis estadístico lo que añade tiempo y esfuerzo.

Del mismo modo, en ImageJ es necesario crear una librería de especies cada vez que se comienza el estudio de un grupo de datos. En este caso los datos vienen agrupados por ARMS, lo que ha hecho necesario realizar en total nueve librerías, una para cada ARMS; mientras que en el caso de los otros dos programas puede utilizarse una misma para todos los análisis, ya que se carga en el programa independientemente de los datos que se van a estudiar.

Por último, a la hora de abordar un estudio de estas características es fundamental establecer los análisis que se van a realizar posteriormente, es decir, que al recoger los ARMS se tiene que tener en cuenta qué información se necesita y cómo se quiere extraer, de manera que la toma de datos en el laboratorio esté enfocada a optimizar el trabajo de dicho análisis posterior. De este modo, obtener las fotografías de manera correcta permite reducir pasos previos de adaptación de la imagen a las condiciones necesarias para el estudio y reduce la cantidad de trabajo necesario. Por ejemplo, tomar las imágenes en la posición adecuada, en posición centrada, y bien enfocadas evita la necesidad de tener que manipular las fotografías una vez tomadas.

Aunque los tres programas son utilizados fundamentalmente en estudios científicos relacionados con las ciencias biológicas, en el caso de CPCe y Photoquad las utilidades están más enfocadas a la realización de estudios de composición y cobertura de comunidades bentónicas que en el caso de ImageJ. Este último programa ha sido ampliamente utilizado en estudios de biología celular, microbiología y en estudios ecológicos morfométricos o de medición de áreas (Abramoff et al., 2004; Collins, 2007). Los resultados obtenidos demuestran que es un programa igual de válido para el estudio de cobertura, abundancia y diversidad mediante lance de puntos, aportando resultados igual de válidos que los otros dos programas.

Los estudios llevados a cabo hasta la fecha se centran básicamente en la comparación de las diferentes técnicas de análisis que ofrecen los diferentes programas disponibles (Yang et al., 2002; Jokiel et al., 2015); sin embargo, hasta ahora no se había llevado a cabo un estudio de comparación de los programas propiamente dichos utilizando una única técnica, por lo que no se han podido comparar con otros anteriores.

Conclusiones

Los datos obtenidos a través de los tres programas estudiados, ImageJ, Photoquad y CPCe, han resultado ser comparables. Sin embargo, el tiempo invertido en los análisis realizados con CPCe es significativamente menor que en el caso de los otros dos programas, lo que hace que este programa sea el más eficiente. Esta diferencia en la eficiencia radica principalmente en que depende de la creación de una única y en la obtención directa y síntesis de resultados en formato Excel, lo que permite la exportación directa para su posterior análisis estadístico.

Agradecimientos

A Iñigo Muxika, que ayudó en algunos análisis estadísticos, y María Korta, que enseñó a manejar las bases de ImageJ. Los revisores Iñigo Muxika y Joxe Mikel Garmendia, contribuyeron con sus comentarios a mejorar la versión inicial. Los datos han sido generados en el proyecto europeo DEVOTES (DEVELOPMENT OF innovative TOOLS for understanding marine biodiversity and assessing good Environmental Status) del 7º Programa Marco (tema ‘The Ocean of Tomorrow’) con el nº 308392 (www.devotes-project.eu). Esta es la contribución número 819 de la Unidad de Investigación Marina (AZTI).

Bibliografía

- Abràmoff, M. D., Magalhães, P. J. & Ram, S. J. (2004) Image processing with ImageJ. *Biophotonics international*, 11, 36-42.
- Althaus, F., Hill, N., Ferrari, R., Edwards, L., Przeslawski, R., Schönberg, C. H., *et al.* (2015) A standardised vocabulary for identifying benthic biota and substrata from underwater imagery: the CATAMI classification scheme. *PLoS one*, 10, e0141039.
- Booth, D. T., Cox, S. E., Fifield, C., Phillips, M. & Williamson, N. (2005) Image analysis compared with other methods for measuring ground cover. *Arid Land Research and Management*, 19, 91-100.
- Borja, A., Aguirrezabalaga, F., Martínez, J., Sola, J. C., García-Arberas, L. & Gorostiaga, J. M. (2004) Benthic communities, biogeography and resources management. *Oceanography and marine environment of the Basque Country. Elsevier oceanography series*, 70, 455-492.
- Borja, A., Elliott, M., Andersen, J. H., Berg, T., Carstensen, J., Halpern, B. S., *et al.* (2016) Overview of Integrative Assessment of Marine Systems: The Ecosystem Approach in Practice. *Frontiers in Marine Science*, 3.
- Brainard, R., Moffitt, R., Timmer, M., Paulay, G., Plaisance, L., Knowlton, N., *et al.* (2009) Autonomous Reef Monitoring Structures (ARMS): A tool for monitoring indices of biodiversity in the Pacific Islands. *Pacific Science InterCongress, Papeete*, March 4.
- Cearreta, A., Irabien, M. J. & Pascual, A. (2004) Human activities along the Basque coast during the last two centuries: geological perspective of recent anthropogenic impact on the coast and its environmental consequences. *Oceanography and Marine Environment of the Basque Country. Elsevier Oceanography Series*, 70, 27-50.
- Collins, T. J. (2007) ImageJ for microscopy. *Biotechniques*, 43, 25-30.
- Day, J. (2008) The need and practice of monitoring, evaluating and adapting marine planning and management—lessons from the Great Barrier Reef. *Marine Policy*, 32, 823-831.
- Douve, F. (2008) The importance of marine spatial planning in advancing ecosystem-based sea use management. *Marine policy*, 32, 762-771.
- Dumas, P., Bertaud, A., Peignon, C., Leopold, M. & Pelletier, D. (2009) A “quick and clean” photographic method for the description of coral reef habitats. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 368, 161-168.
- Ferreira, T. & Rasband, W. (2012) ImageJ user guide. *JJI. 46r. Natl. Inst. Health, Bethesda, MD. <http://rsb.info.nih.gov/ij/docs/guide/user-guide.pdf>*.
- Flannery, E. & Przeslawski, R. (2015) Comparison of sampling methods to assess benthic marine biodiversity.
- Hughes, T. P., Bellwood, D. R., Folke, C., Steneck, R. S. & Wilson, J. (2005) New paradigms for supporting the resilience of marine ecosystems. *Trends in ecology & evolution*, 20, 380-386.
- ISO 19493. (2007) 19493 (2007). *Water quality—Guidance on marine biological surveys of hardsubstrate communities (ISO 19493: 2007)*.
- Jokiel, P. L., Rodgers, K. S., Brown, E. K., Kenyon, J. C., Aeby, G., Smith, W. R., *et al.* (2015) Comparison of methods used to estimate coral cover in the Hawaiian Islands. *PeerJ*, 3, e954.
- Josephitis, E., Wilson, S. K., Moore, J. A. & Field, S. (2012) Comparison of three digital image analysis techniques for assessment of coral cover and bleaching. *Conservation Science Western Australia*, 8, 251-257.
- Knowlton, N., Brainard, R. E., Fisher, R., Moews, M., Plaisance, L. & Caley, M. J. (2010) Coral reef biodiversity. *Life in the World's Oceans: Diversity Distribution and Abundance*, 65-74.
- Kohler, K. E. & Gill, S. M. (2006) Coral Point Count with Excel extensions (CPCe): A Visual Basic program for the determination of coral and substrate coverage using random point count methodology. *Computers & Geosciences*, 32, 1259-1269.
- Mantelatto, M. C., Fleury, B. G., Menegola, C. & Creed, J. C. (2013) Cost-benefit of different methods for monitoring invasive corals on tropical rocky reefs in the southwest Atlantic. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 449, 129-134.
- Parravicini, V., Morri, C., Ciribilli, G., Montefalcone, M., Albertelli, G. & Bianchi, C. N. (2009) Size matters more than method: visual quadrats vs photography in measuring human impact on Mediterranean rocky reef communities. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 81, 359-367.
- Pearson, T. & Rosenberg, R. (1978) Macrobenthic succession in relation to organic enrichment and pollution of the marine environment. *Oceanography and Marine Biology Annual Review*, 16, 229-311.
- Pech, D., Condal, A. R., Bourget, E. & Ardisson, P.-L. (2004) Abundance estimation of rocky shore invertebrates at small spatial scale by high-resolution digital photography and digital image analysis. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 299, 185-199.
- Rees, H., Bergman, M., Birchenough, S., Borja, A. & de Boois, I. (2009) Guidelines for the study of the epibenthos of subtidal environments.
- Rumohr, H. (1995) Monitoring the marine environment with imaging methods. *Scientia marina*, 59, 129-138.
- Šaškov, A., Dahlgren, T. G., Rzhano, Y. & Schläppy, M.-L. (2015) Comparison of manual and semi-automatic underwater imagery analyses for monitoring of benthic hard-bottom organisms at offshore renewable energy installations. *Hydrobiologia*, 756, 139-153.
- Smith, C. J. & Rumohr, H. (2005) Imaging techniques. *Methods for the Study of Marine Benthos*, 87-111.
- Solan, M., Germano, J. D., Rhoads, D. C., Smith, C., Michaud, E., Parry, D., *et al.* (2003) Towards a greater understanding of pattern, scale and process in marine benthic systems: a picture is worth a thousand worms. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 285, 313-338.
- Tabugo, S. (2016) Coral reef assessment and monitoring made easy using Coral Point Count with Excel extensions (CPCe) software in Calangahan, Lugait, Misamis Oriental, Philippines. *Computational Ecology and Software*, 6, 21.
- Trygonis, V. & Sini, M. (2012) photoQuad: A dedicated seabed image processing software, and a comparative error analysis of four photoquadrat methods. *Journal of experimental marine biology and ecology*, 424, 99-108.
- Turner, R. K. (2005) Integrated environmental assessment and coastal futures. *In Managing European Coasts*, pp. 255-270. Springer.
- Van Rein, H. B., Brown, C. J., Quinn, R. & Breen, J. (2009) A review of sublittoral monitoring methods in temperate waters: a focus on scale. *Underwater Technology*, 28, 99-113.
- Von, B. & Turner, R. (2001) Science and integrated coastal management. *Dahlem University Press, Berlin ISBN*, 393, 4504-4502.
- Yang, Y. H., Buckley, M. J., Dudoit, S. & Speed, T. P. (2002) Comparison of methods for image analysis on cDNA microarray data. *Journal of computational and graphical statistics*, 11, 108-136.
- Zubikarai, M., Borja, A. & Muxika, I. (2014) Assessment of benthic hard substratum communities responses to changes in the management of anthropogenic pressures in the Basque coast. *Revista de Investigación Marina, AZTI-Tecnalia*, 28, 40-88.



DERIO

Astondo Bidea, Edificio 609
Parque Tecnológico de Bizkaia
48160 - Derio (Bizkaia)



SUKARRIETA

Txatarramendi ugarte z/g
48395 - Sukarrieta (Bizkaia)



PASAIA

Herrera Kaia, Portugalete z/g
20110 - Pasaia (Gipuzkoa)

