

Sistema de seguimiento y análisis de la calidad del agua para consumo humano mediante el estudio de la respuesta comportamental en peces expuestos a sustancias tóxicas*

Inmaculada Martínez-Morales¹, David Verdiell-Cubedo¹, Raúl Montoliu-Colás² & Isabel M. Hurtado-Melgar³

1 Departamento de Zoología y Antropología Física, Facultad de Biología, Universidad de Murcia, 3100 Murcia.

2 Departamento de Ingeniería y Ciencia de los Computadores, Universidad Jaume I, Campus de Riu Sec E-12071, Castelló de la Plana.

3 Estación de Tratamiento de Agua Potable La Contraparada (EMUASA). SEDELAM, Pl. Cetina 6 2º Entresuelo, 30001 Murcia.

Resumen

Correspondencia

D. Verdiell-Cubedo

E-mail: verdiell@um.es

Recibido: 5 enero 2010

Aceptado: 15 marzo 2010

Publicado on-line: 22 marzo 2010

La obtención de variables relacionadas con cambios comportamentales en los estudios sobre los efectos subletales de sustancias tóxicas en animales, constituyen una herramienta fundamental para la evaluación del riesgo ambiental y el análisis del impacto de sustancias tóxicas. En el presente trabajo se presenta un sistema de seguimiento y análisis mediante técnicas de visión artificial que permite cuantificar alteraciones en el comportamiento en peces expuestos a concentraciones subletales de sustancias tóxicas. El sistema permite la obtención de una serie de variables comportamentales a partir de un grupo de peces expuestos a una sustancia tóxica, en este caso el insecticida organofosforado clorpirifos, que posteriormente son analizadas para comprobar su desviación frente a un grupo control. Los resultados obtenidos muestran como las variables registradas proporcionan información muy valiosa sobre el comportamiento en peces y constatan que dicho sistema puede ser utilizado para caracterizar las respuestas comportamentales frente a la exposición de sustancias tóxicas y en la evaluación del riesgo ambiental.

Palabras clave: Toxicología, Biomonitorización, Comportamiento en peces, Pesticidas, Clorpirifos, Movimiento.

Abstract

Water quality monitoring and analysis system through study of fish behavioral response to toxic compounds

Behavioral alterations can be assessed as variables for sublethal toxicity tests, and serve as a tool for environmental risk assessment and analysis of toxicological impact. In order to investigate contaminant-induced behavioral alterations in fish, a video analysis system was designed to obtain relevant behavioral variables. Data from fish exposed to a reference toxicant, organophosphorus pesticide chlorpyrifos, are presented to exemplify alterations in fish behavior associated with exposure to this pesticide. The developed system provides valuable information on parameters associated with fish behavior and can be used to identify characteristic behavioral responses to a variety of toxicants and assist in risk assessment.

Key words: Toxicology, Biomonitoring, Fish behavior, Pesticides, Chlorpyrifos, Movement.

*Este trabajo ha recibido el Premio Laboratorio Medioambiental 2010, convocado por la Facultad de Biología, en el marco de la XXIII Semana de Biología, bajo el patrocinio de la empresa Laboratorio Medioambiental S.L.

Introducción

El estudio del comportamiento ha sido utilizado ampliamente como herramienta en el estudio de los efectos de sustancias químicas tóxicas en animales. La observación directa de los efectos de estos compuestos sobre el comportamiento animal constituye una aproximación necesaria y relevante para la evaluación del riesgo ambiental, debido principalmente a que las alteraciones en el comportamiento representan una respuesta integrada de los procesos bioquímicos y fisiológicos a nivel de individuo y que, en última instancia, pueden tener consecuencias negativas a nivel poblacional, debido por ejemplo, a la reducción de las tasas de crecimiento y supervivencia (Kane et al. 2005). Las variables que reflejan cambios comportamentales asociados a la exposición frente a concentraciones subletales de sustancias tóxicas, proporcionan una información muy valiosa y complementaria a los estudios de toxicología tradicionales basados en el establecimiento de concentraciones letales (Saglio et al. 2001; Kane et al. 2004).

Los peces están considerados como excelentes organismos centinelas en los estudios de comportamiento animal frente a la presencia de factores estresantes y compuestos químicos tóxicos en el agua (Little et al. 1990, Saglio & Trijasse 1998, Saglio et al. 2001, Kane et al. 2004, Kavita & Venkateswara 2007, Cazenave et al. 2008). La idoneidad del uso de estos organismos en dichos estudios se basa en diversos factores: 1) estar la superficie corporal en contacto directo y constante con el ambiente acuático donde tiene lugar la exposición al tóxico, 2) facilidad para mantenerlos en cautividad, 3) posibilidad de obtener un número relativamente elevado de ejemplares para la realización de los ensayos y 4) existencia de una amplia experiencia en el uso de estos organismos como indicadores. Además, y debido al papel relevante que juegan en la mayor parte de sistemas acuáticos, los resultados de dichos estudios pueden ser de gran ayuda en la interpretación científica de los efectos que la contaminación puede ejercer sobre las comunidades de organismos en el medio natural (Kane et al. 2005).

Los trabajos realizados en toxicología del comportamiento en peces son relativamente escasos y la mayor parte de ellos versan sobre el estudio de los efectos en la orientación de la natación,

mayormente movimientos de evitación, en respuesta a la presencia de contaminantes (Kane et al. 2005). Sin embargo, trabajos desarrollados recientemente resaltan la importancia de profundizar en el estudio de variables comportamentales más complejas que pueden ser indicadoras de contaminación química del agua, como son la distancia recorrida, velocidad, aceleración, posición, etc., ya que este tipo de variables pueden resultar más sensibles a la presencia de bajas concentraciones de tóxicos (Saglio et al. 2001, Kane et al. 2004, Cazenave et al. 2008).

Los recientes avances en informática y en el tratamiento de imágenes han permitido el desarrollo de estudios mucho más precisos y fiables sobre el análisis del movimiento en peces. Dichos estudios incorporan técnicas de visión artificial que permiten cuantificar diversos parámetros del movimiento que, a su vez, ayudan a discernir cambios en el comportamiento en respuesta a la exposición frente a una sustancia tóxica (Kane et al. 2004, Kavita & Venkateswara 2007, Cazenave et al. 2008). Actualmente, se están desarrollando sistemas de biomonitorización en continuo de la calidad del agua que utilizan variables relacionadas con el análisis del movimiento en peces, debido a su elevada sensibilidad frente a la presencia de contaminantes (Kane et al. 2005).

Clorpirifos es un pesticida organofosforado de amplio espectro que es utilizado intensivamente en el control de plagas de insectos en la agricultura, así como para el control de ectoparásitos del ganado vacuno y ovino. Debido a esta circunstancia, su presencia en los sistemas acuáticos naturales es cada vez más frecuente, con consecuencias nefastas sobre las comunidades faunísticas (invertebrados y peces) de dichos sistemas (Odenkirchen & Eisler 1988). La toxicidad del clorpirifos reside en su capacidad para inhibir irreversiblemente la actividad de la enzima acetilcolinesterasa en vertebrados, situación que produce efectos negativos sobre la actividad del sistema nervioso del organismo, debido a una excesiva acumulación del neurotransmisor acetilcolina en las sinapsis nerviosas (Pope et al. 1992, Karen et al. 2000, López-Crespo et al. 2007, Mehler et al. 2008). Los síntomas de intoxicación aguda por este pesticida son diversos e incluyen efectos tales como espasmos musculares, hiperactividad, parálisis, pérdida de equilibrio y, eventualmente, la muerte del individuo, mientras que exposiciones a

concentraciones inferiores han sido relacionadas con alteraciones en el comportamiento y en la fisiología de diversas especies vertebrados, incluyendo mamíferos (Odenkirchen & Eisler 1988, De Silva & Samayawardhena 2005; Karen et al. 2000, López-Crespo et al. 2007, Mehler et al. 2008). La aparición cada vez más frecuente de dicho pesticida en los sistemas acuáticos naturales y sus efectos potencialmente negativos sobre la salud humana y el medio ambiente en general (Odenkirchen & Eisler 1988), hacen que este tóxico sea un buen candidato para la realización de estudios de toxicología.

Resulta imprescindible, por tanto, ampliar el conocimiento científico sobre las alteraciones en el comportamiento animal frente a la presencia de sustancias tóxicas en el agua en concentraciones subletales y desarrollar herramientas que permitan cuantificarlas de forma precisa (Kane et al. 2005). En este contexto, la integración de este tipo de estudios es fundamental para el desarrollo de sistemas de biomonitorización de la calidad del agua destinada al consumo humano que permitan la detección de dichas sustancias.

El objetivo principal de este estudio es desarrollar un sistema automatizado de seguimiento y análisis mediante técnicas de visión artificial, que permita cuantificar alteraciones en el comportamiento en peces expuestos a concentraciones subletales de sustancias tóxicas. En síntesis, el sistema permite la obtención de una serie de variables comportamentales a partir de un grupo de peces expuestos a una sustancia tóxica, en este caso el insecticida clorpirifos, que posteriormente son analizadas mediante pruebas estadísticas para comprobar su desviación frente a un grupo control.

Material y Métodos

Especie y tóxico empleados

La especie empleada para la realización de los ensayos fue *Lepomis gibbosus* (perca sol). Esta especie de centráquido, procedente de Norteamérica, se encuentra actualmente aclimatada a las aguas continentales peninsulares, extendiéndose su distribución por todas las cuencas fluviales (Doadrio 2002). En la Región de Murcia su distribución se restringe básicamente al eje del río Se-

gura, manteniendo poblaciones abundantes en la mayor parte de éste (Torralva et al. 2005). Esta especie es muy tolerante en cuanto a las condiciones del hábitat, y soporta bien la falta de oxígeno y las altas temperaturas (Torralva et al. 2005). Por otro lado, resulta ser una especie que se adapta fácilmente a las condiciones de cría en cautividad y su captura en el medio natural puede llevarse a cabo sin grandes dificultades.

Los ejemplares utilizados en el presente estudio fueron capturados, mediante trampas tipo nasa, en el embalse que la estación potabilizadora de La Contraparada posee para almacenar el agua que posteriormente será potabilizada para el consumo humano. Una vez capturados, los ejemplares de *L. gibbosus* se mantuvieron en un acuario de aclimatación de unos 300l de capacidad, durante un periodo de 30 días, previamente a la experimentación, y fueron alimentados regularmente con larvas de quironómido. Gradualmente, los peces fueron aclimatados a un fotoperiodo de 14/10h (luz/oscuridad).

El tóxico empleado en los ensayos fue el pesticida clorpirifos, producto comercial Clorifos (48% clorpirifos) (Probelte®).

Diseño del sistema de video-monitorización

El sistema consiste principalmente en dos módulos: el módulo de captura de imágenes y el módulo de monitorización.

El módulo de captura de imágenes consta de 6 cámaras de la marca Allied® modelo Guppy con ópticas de 6 mm, que funcionan bajo la norma IEEE 1394. Dichas cámaras están conectadas mediante una tarjeta de captado de imágenes a un ordenador Intel Core 2 Duo 2.99Ghz, con 3GB de memoria RAM (sistema operativo Windows XP®). Las imágenes fueron registradas a una velocidad de 5 fotogramas por segundo.

El módulo de monitorización permite obtener datos del comportamiento de los peces calculando una serie de valores en función de la posición de cada pez en cada imagen del video. Para ello se han usado técnicas de seguimiento de objetos en movimiento basadas en algoritmos de sustracción del fondo (Piccardi 2004, Kim et al. 2005). Una vez conocida la posición del centroide del pez se calculan una serie de variables relacionadas con su comportamiento (Tabla 1).

Variable	Definición
Distancia total (DT)	Distancia media recorrida en cada fotograma
Distancia horizontal (DH)	Distancia media horizontal recorrida en cada fotograma
Distancia vertical (DV)	Distancia media vertical recorrida en cada fotograma
Estático (ES)	Porcentaje de fotogramas que el pez está estático
Movimiento horizontal (MH)	Porcentaje de fotogramas de entre los que el pez se mueve y el movimiento es horizontal
Movimiento vertical (MV)	Porcentaje de fotogramas de entre los que el pez se mueve y el movimiento es vertical
Posición arriba (PA)	Porcentaje de fotogramas que el pez está en la parte superior de la pecera
Movimiento "Burst" (MB)	Porcentaje de fotogramas en los que el movimiento es considerado como "Burst" o movimiento de muy alta velocidad

Tabla 1. Variables comportamentales registradas durante el ensayo de toxicidad

Table 1. Behavioral variables measured in the toxicity test.

Diseño experimental

El montaje del sistema y la realización de los ensayos se llevaron a cabo en las instalaciones que EMUASA (Empresa Municipal de Aguas y Saneamiento de Murcia) posee en la estación potabilizadora de La Contraparada (Murcia).

Para el desarrollo de la experimentación se utilizaron un total de 24 acuarios con una capacidad individual aproximada de 40l, cada uno de los cuales contaba con un sistema de filtrado de fondo e iluminación superior mediante tubos fluorescentes (24W). Los acuarios se dispusieron en seis grupos, cada uno de los cuales estaba formado por cuatro acuarios, de forma que cada una de las seis cámaras instaladas registraba las imágenes procedentes de cada uno de estos grupos.

Dichos acuarios fueron rellenados con agua "bruta" procedente del embalse que la estación posee para almacenar el agua que posteriormente será potabilizada para el consumo humano. Debido a la elevada turbidez del agua en el momento del llenado de los acuarios, se dejó que el sistema de filtrado actuara durante un mínimo de 24h para que el agua alcanzara la transparencia adecuada para la grabación de los vídeos. Pasado este periodo de tiempo se introdujo un ejemplar de *L. gibbosus* en cada uno de los acuarios, iniciándose la realización de la experimentación 48 horas después.

El ensayo se realizó utilizando un grupo Control de 8 acuarios a los que no se les añadió ningún tipo de tóxico y otros dos grupos de 8 acuarios cada uno a los que se añadió el clorpiri-

fos a distintas concentraciones. De estos dos grupos, en el primero se trabajó a una concentración final de 0,075mg/l y en el segundo a una concentración final de 0,15mg/l.

Una vez añadido el pesticida a los acuarios todo el personal del laboratorio abandonó la estancia con la finalidad de no interferir en el comportamiento de los peces durante el periodo de grabación. Durante el ensayo se registraron un total de 300 min (=5h) de grabación.

Procesado de los ejemplares y obtención de parámetros biológicos

Inmediatamente después de la grabación de los vídeos los ejemplares utilizados fueron anestesiados, sacrificados y conservados mediante congelación de forma individual para su posterior procesamiento en el laboratorio.

Los parámetros biológicos registrados para cada uno de los ejemplares fueron: Longitud furcal (Lf), Peso total (Pt), Peso eviscerado (Pe), Peso de las gónadas (Pg) y Peso del digestivo (Pd). Para la obtención de la Lf se utilizó un ictiómetro con una precisión de ± 1 mm y para las variables de peso (Pt, Pe, Pg y Pd) se utilizó una balanza modelo Sartorius® con una precisión de $\pm 0,1$ g.

Durante el procesado de los ejemplares, se procedió a la determinación del sexo mediante observación directa de las gónadas en una lupa binocular modelo Nikon® (40x) y la obtención de una muestra de escamas (6-8) para la determinación de la edad. La lectura de las escamas se realizó en

base a la localización de los *annuli* o anillos de crecimiento que se forman en las escamas, mediante su montaje entre portaobjetos y posterior lectura en un visor de microfilms (modelo Cannon®).

Análisis estadísticos

Para cada una de las variables obtenidas se calculó su valor promedio en fracciones de diez minutos para cada uno de los ejemplares de *L. gibbosus*, por lo que se obtuvieron un total de 30 valores para cada individuo y para la totalidad del ensayo. Con posterioridad, se calculó el valor promedio para cada hora de grabación (1-5h) y para cada uno de los individuos, creándose una nueva matriz de datos sobre la que se realizaron los análisis estadísticos.

Para comprobar las posibles diferencias en las variables calculadas, en función del tratamiento, se utilizó el test de ANOVA de dos vías. Cada una de dichas variables se utilizó como variable dependiente en el análisis, y las variables independientes tratamiento (Control, concentración de 0,075mg/l y concentración de 0,15mg/l) y hora de grabación (1-5h) se introdujeron como factores independientes. Además, se analizó la interacción entre estas últimas variables. Cuando se detectaron diferencias significativas se empleó el análisis post-hoc de Tukey para comprobar qué valores de la variable dependiente diferían unos de otros. Previamente al análisis las variables porcentuales fueron transformadas (transformación arco seno) y el nivel de significación fue ajustado a $p < 0,01$ para minimizar la existencia de errores Tipo I.

Por otro lado, para testar las diferencias entre tratamientos en los parámetros biológicos (Lf, Pt, Pe, Pg y Pd) se utilizó un test ANOVA. Las variables sexo y edad se testaron mediante el uso del test de la χ^2 (Chi cuadrado). El nivel de significación empleado en estos análisis fue de $p < 0,05$.

El paquete estadístico utilizado fue el SPSS 15.0®.

Resultados

En la tabla 2 se muestran los valores promedio de las variables obtenidas tras el procesado en el laboratorio de los ejemplares de *L. gibbosus* utilizados en el ensayo.

Los resultados del análisis de ANOVA muestra-

Variables	Tratamiento		
	Control	0,075mg/l	0,15mg/l
Longitud furcal (cm)	10,5 ± 0,4	10,4 ± 0,5	10,4 ± 0,4
Peso total (g)	23,8 ± 2,9	22,9 ± 3,3	23,8 ± 3,5
Peso eviscerado (g)	22,3 ± 2,7	21,6 ± 3,2	22,0 ± 3,2
Peso gónada (g)	0,24 ± 0,05	0,16 ± 0,03	0,24 ± 0,04
Peso digestivo (g)	0,91 ± 0,11	0,81 ± 0,25	1,10 ± 0,47

Tabla 2. Valores promedio (\pm E.S.) de los parámetros biológicos de los ejemplares de *Lepomis gibbosus* utilizados en el ensayo de toxicidad en función de los distintos tratamientos a los que fueron expuestos.

Table 2. Mean values (\pm S.E.) of the measured biological parameters of the *Lepomis gibbosus* individuals used in toxicity test according to the treatments they were exposed to.

ron la no existencia de diferencias significativas en los valores promedio para dichas variables (ANOVA Lf: $F=0,01$; $p > 0,05$; ANOVA Pt: $F=0,03$; $p > 0,05$; ANOVA Pe: $F=0,01$; $P > 0,05$; ANOVA Pg: $F=1,14$, $p > 0,05$; ANOVA Pd: $F=1,31$, $p > 0,05$).

Tras la lectura de las escamas, se detectaron un total de 4 clases de edad: 2+, 3+ 4+ y 5+ para los ejemplares procesados. En este sentido, el análisis de χ^2 no detectó diferencias significativas en la proporción de individuos para cada clase de edad ($\chi^2=4,09$; $p > 0,05$) entre tratamientos (Fig. 1).

Igualmente, la proporción de sexos no mostró diferencias significativas entre tratamientos ($\chi^2=1,00$; $p > 0,05$) (Fig. 2).

En la Tabla 3 se muestran los resultados del análisis de ANOVA de dos vías realizado con las variables obtenidas tras la monitorización y procesado de los datos registrados durante el ensayo.

La variable que mostró diferencias significativas entre los distintos tratamientos fue el movimiento "Burst" (MB) (Tabla 3). El MB fue significativamente superior en el tratamiento con concentración de 0,15mg/l de clorpirifos con respecto a los otros dos tratamientos (Control y concentración de 0,075mg/l) (Fig. 3), no existiendo diferencias significativas entre estos dos últimos tratamientos (Test post-hoc de Tukey, $p=0,861$)

Con respecto al resto de variables, se detectaron diferencias significativas en función de la hora

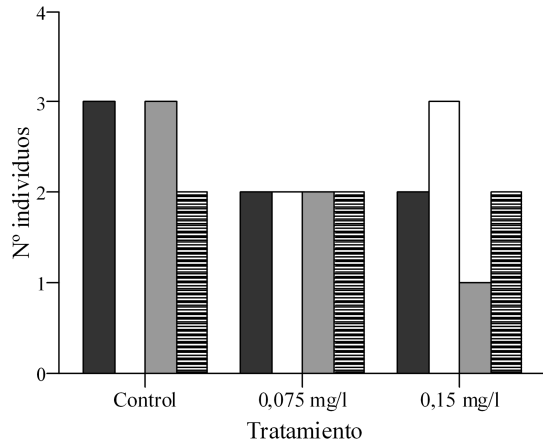


Figura 1. Distribución de frecuencias de las clases de edad de los individuos de *Lepomis gibbosus* utilizados en el ensayo de toxicidad en función de los tratamientos a los que fueron expuestos.

■ 2+ □ 3+ ■ 4+ ▨ 5+

Figure 1. Age class frequency distribution of the *Lepomis gibbosus* individuals used in toxicity test according to the treatments they were exposed to.

■ 2+ □ 3+ ■ 4+ ▨ 5+

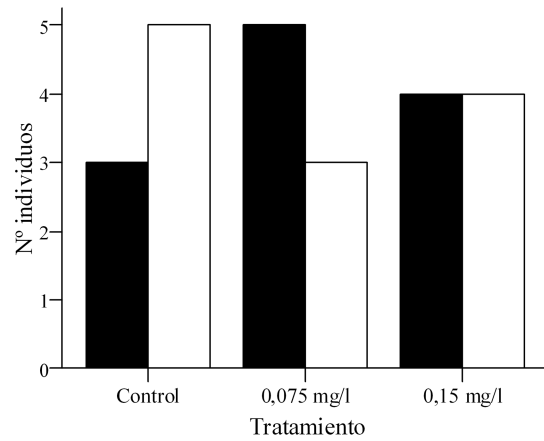


Figura 2. Distribución de frecuencias de sexos de los individuos de *Lepomis gibbosus* utilizados en el ensayo de toxicidad en función de los tratamientos a los que fueron expuestos.

■ Machos □ Hembras

Figure 2. Sex frequency distribution of the *Lepomis gibbosus* individuals used in toxicity test according to the treatments they were exposed to.

■ Males □ Females

Variables	gl	F	Variables	gl	F
Distancia total			% Movimiento horizontal		
Tratamiento	2	1,239 _{ns}	Tratamiento	2	1,021 _{ns}
Hora	4	0,725 _{ns}	Hora	4	2,751 _{ns}
Tratamiento x Hora	8	0,711 _{ns}	Tratamiento x Hora	8	0,755 _{ns}
Distancia horizontal			% Movimiento vertical		
Tratamiento	2	0,831 _{ns}	Tratamiento	2	2,350 _{ns}
Hora	4	5,585**	Hora	4	2,525 _{ns}
Tratamiento x Hora	8	1,040 _{ns}	Tratamiento x Hora	8	0,962 _{ns}
Distancia vertical			% Posición arriba		
Tratamiento	2	0,762 _{ns}	Tratamiento	2	0,264 _{ns}
Hora	4	5,685**	Hora	4	2,866 _{ns}
Tratamiento x Hora	8	0,786 _{ns}	Tratamiento x Hora	8	1,291 _{ns}
% Estático			Movimiento "Burst"		
Tratamiento	2	1,772 _{ns}	Tratamiento	2	11,170**
Hora	4	5,219*	Hora	4	0,170 _{ns}
Tratamiento x Hora	8	0,732 _{ns}	Tratamiento x Hora	8	0,117 _{ns}

Tabla 3. Resultados del ANOVA de dos vías realizado con las variables comportamentales obtenidas durante el ensayo de toxicidad. Niveles de significación: ns= no significativo; * p<0,01; ** p<0,001.

Table 3. Results of two-way ANOVA performed on behavioral variables obtained during the toxicity test. Significance level: ns=not significant, ** p<0.01, ** p<0.001.

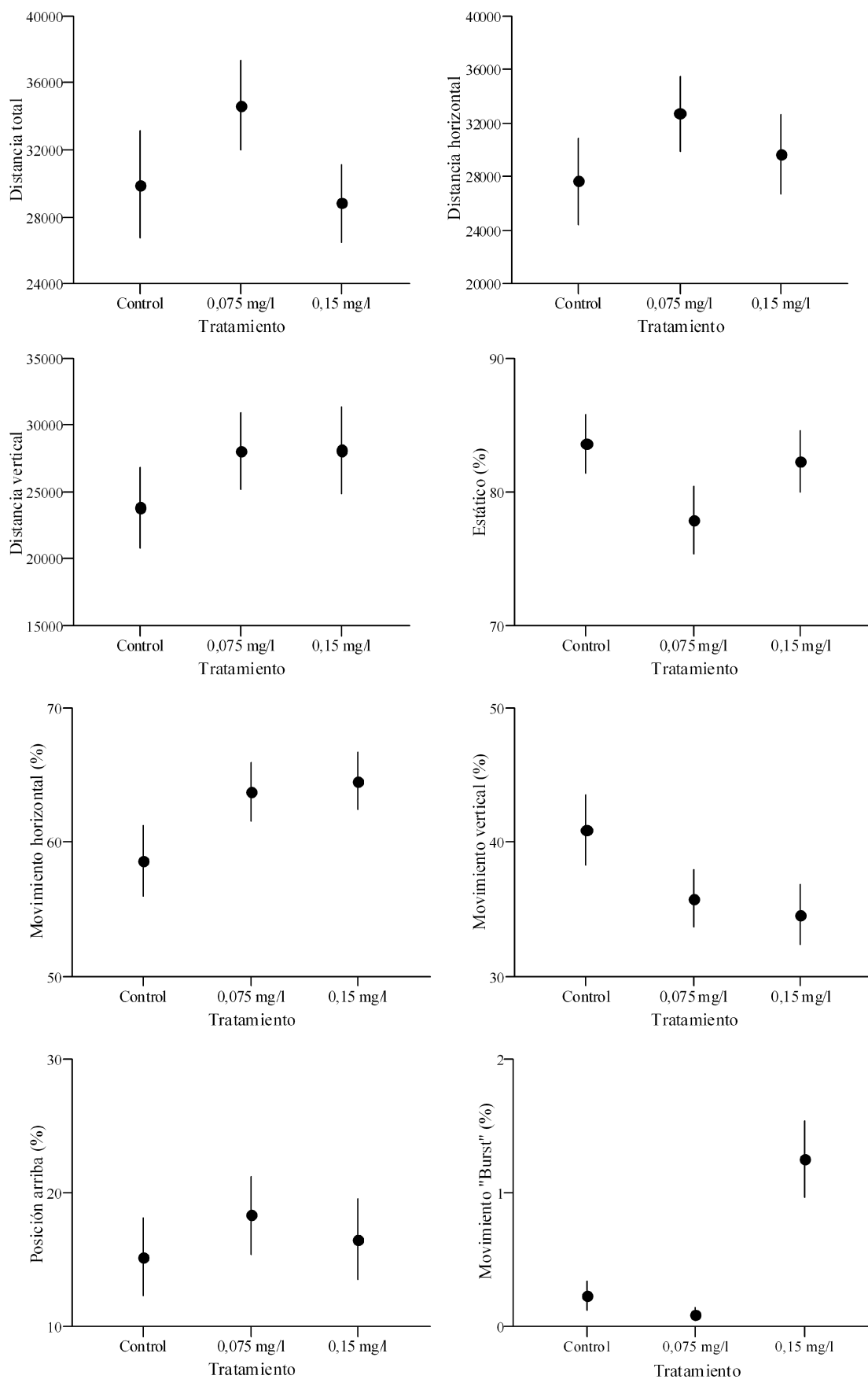


Figura 3. Valores promedio (\pm E.S.) de las variables comportamentales obtenidas en función de los distintos tratamientos.

Figure 3. Mean values (\pm S.E.) of the measured behavioral variables within treatment.

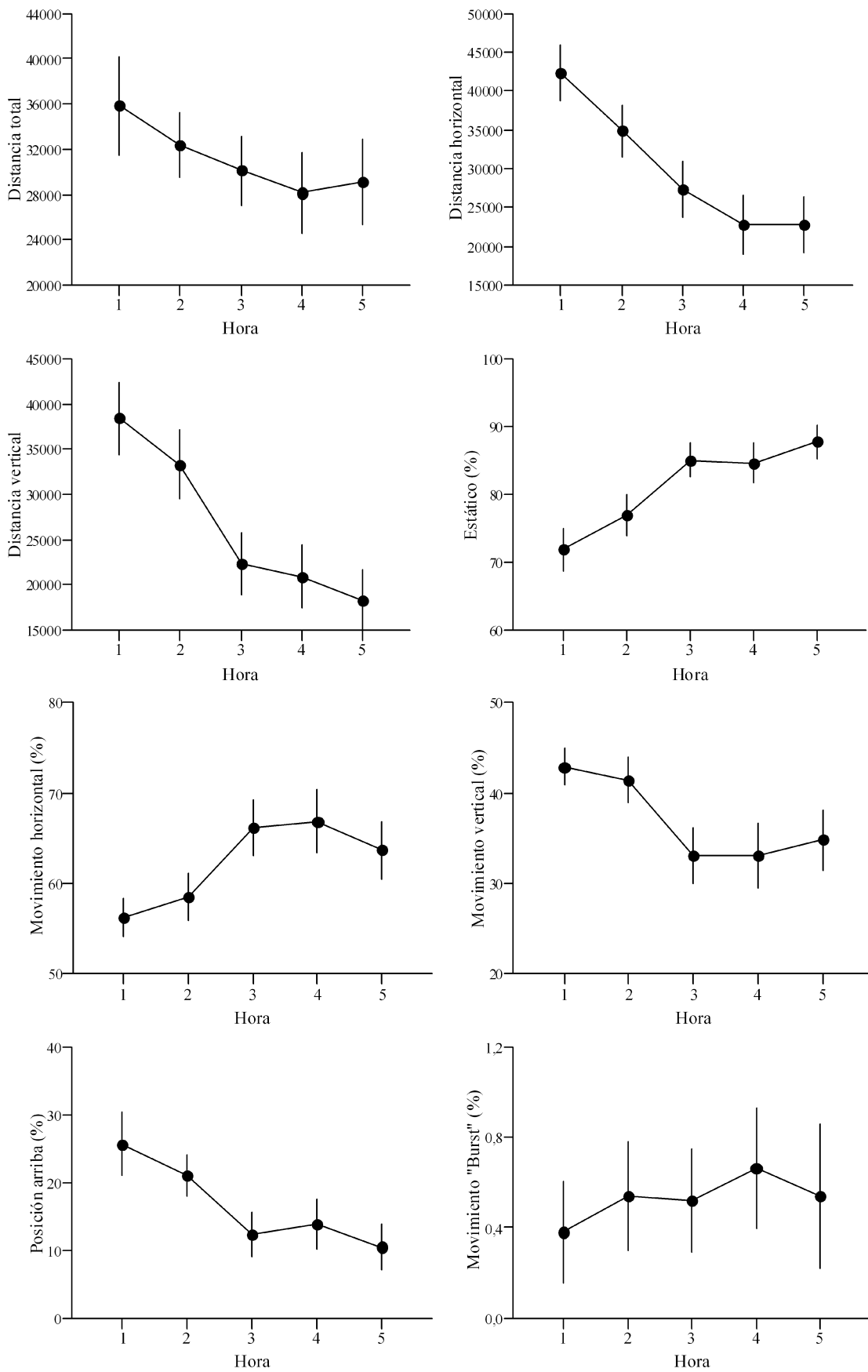


Figura 4. Valores promedio (\pm E.S.) de las variables comportamentales obtenidas en función de las distintas horas de grabación.
 Figure 4. Mean values (\pm S.E.) of the measured behavioral variables over recording hours.

de grabación para las siguientes variables: distancia horizontal (DH), distancia vertical (DV), y estático (ES) (Tabla 3). Así, tanto la DH como la DV fueron significativamente inferiores durante las dos últimas horas de grabación con respecto a la primera (Test post-hoc de Tukey, $p < 0,01$), no existiendo diferencias significativas entre el resto de horas de grabación (Test post-hoc de Tukey, $p > 0,01$) (Fig. 4).

Con respecto al porcentaje de tiempo que el pez permaneció estático se observaron diferencias significativas entre la primera hora y la última hora de grabación (Test post-hoc de Tukey, $p < 0,01$), siendo los valores promedio más elevados durante esta última (Fig. 4).

Las variables distancia total (DT), movimiento horizontal (MH), movimiento vertical (MV) y posición arriba (PA) no mostraron diferencias significativas en función del tratamiento y la hora de grabación (Tabla 3).

Discusión

Con respecto a los resultados del procesado de los ejemplares de *L. gibbosus*, en primer lugar cabe destacar que el análisis de los parámetros biológicos ha permitido constatar la homogeneidad en los valores promedio para estas variables, entre los distintos grupos de acuarios o tratamientos. Esta circunstancia resulta fundamental para una correcta interpretación de los resultados obtenidos en los ensayos de toxicidad, ya que permite eliminar la posible variación en la respuesta comportamental de los ejemplares en función de dichos parámetros (tamaño, sexo, edad, etc.).

Por otro lado, los resultados obtenidos ponen de manifiesto que el sistema de seguimiento y análisis aquí presentado permite cuantificar de forma precisa diversas variables relacionados con el movimiento de los peces. A su vez, la obtención de dichas variables, junto con un análisis estadístico apropiado, ha permitido la detección de cambios en el comportamiento de los ejemplares de *L. gibbosus* expuestos al pesticida clorpirifos, con respecto al grupo control. Si bien solo se han detectado cambios comportamentales en el tratamiento a concentraciones elevadas (0,15 mg/l), cabe señalar que el periodo de grabación fue relativamente breve (5 horas), circunstancia que probablemente ha influido negativamente en la detección de dichas alteraciones comportamentales.

Así, en estudios realizados con metodologías similares y periodos de exposición más prolongados se detectaron cambios significativos en distintos tipos de variables comportamentales, como la actividad reproductora, la distancia recorrida y la velocidad de natación (De Silva & Samayawardhena 2005, Kavitha & Venkateswara 2007, Cazenave et al. 2008). Probablemente, las diferencias temporales existentes en el presente trabajo, como la reducción de la distancia horizontal y vertical recorridas durante la última hora de grabación, así como el incremento del porcentaje de tiempo en el que el pez permanece estático, estén relacionadas con los efectos tóxicos del clorpirifos a medio-largo plazo, reduciendo la actividad de los ejemplares debido al estrés fisiológico inducido por el tóxico.

En este sentido, la variable que mostró mayor sensibilidad frente a la presencia del tóxico fue el movimiento tipo "Burst". Estos resultados coinciden con los expuestos en otros estudios comportamentales, en los que este tipo de variable presentó una elevada sensibilidad frente a la exposición del tóxico durante periodos de exposición breves (Saglio & Trijasse 1998, Saglio et al. 2001).

En cualquier caso, cabe destacar que los resultados aquí presentados tienen un carácter preliminar, por lo que en un futuro es necesaria la realización de ensayos de toxicidad con periodos de grabación más prolongados y la aplicación de modelos matemáticos más sensibles (modelos de recurrencia y algorítmicos), circunstancia que probablemente permitirá detectar diferencias significativas en un mayor número de variables comportamentales.

Agradecimientos

Mostrar nuestro agradecimiento a la empresa EMUASA (Grupo Agbar) por la financiación recibida para la ejecución del proyecto "*Vigilancia de la toxicidad del agua por medios biológicos*", y que ha permitido la realización del trabajo aquí presentado.

Referencias

- Cazenave J, Nores ML, Miceli M, Díaz MP, Wunderlin DA & Bistoni MA. 2008. Changes in the swimming activity and the glutathione S-transferase activity of *Jenynsia multidentata* fed with microcystin-RR. Wa-

- ter Research 42: 1299-1307.
- De Silva PMCS & Samayawardhena LA. 2005. Effects of chlorpyrifos on reproductive performances of guppy (*Poecilia reticulata*). *Chemosphere* 58: 1293-1299.
- Doadrio I. 2002. Atlas y Libro Rojo de los Peces Continentales de España. Madrid: Dirección General de Conservación de la Naturaleza. Museo Nacional de Ciencias Naturales.
- Kane AS, Salierno JD, Gipson GT, Molteno TCA & Hunter C. 2004. A video-based movement analysis system to quantify behavioural stress responses of fish. *Water Research* 38: 3993-4001.
- Kane AS, Salierno JD & Brewer SK. 2005. Fish models in behavioural toxicology: Automated techniques, updates and perspectives. In *Methods in Aquatic Toxicology* (Ostrander GK, ed.). Boca Raton, Florida: Lewis Publishers, pp. 559-590.
- Karen DJ, Dancik JA, Skipper SL, Smink JA & Klaine SJ. 2000. Influence of episodic exposures of chlorpyrifos to an estuarine cyprinodontid, *Fundulus heteroclitus*. *Marine Environmental Research* 50: 125-126.
- Kavitha P & Venkateswara R. 2007. Oxidative stress and locomotor behaviour response as biomarkers for assessing recovery status of mosquito fish, *Gambusia affinis* after lethal effect of an organophosphate pesticide, monocrotophos. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 87: 182-188.
- Kim K, Chalidabhongse TH, Harwood D & Davis L. 2005. Real-time foreground-background segmentation using codebook model. *Real-time Imaging* 11(3): 167-256.
- Little EE, Archeski RD, Flerov BA & Kozlovskaya VL. 1990. Behavioral indicators of sublethal toxicity in rainbow trout. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 19: 380-385.
- López-Crespo GA, Carvajal F, Flores P, Sánchez-Santed F & Sánchez-Amate MC. 2007. Time course of biochemical and behavioural effects of a single high dose of chlorpyrifos. *NeuroToxicology* 28: 541-547.
- Mehler WT, Schuler LJ & Lydy MJ. 2008. Examining the joint toxicity of chlorpyrifos and atrazine in the aquatic species: *Lepomis macrochirus*, *Pimephales promelas* and *Chironomus tentans*. *Environmental Pollution* 152: 217-224.
- Odenkirchen EW & Ronald E. 1988. Chlorpyrifos hazards to fish, wildlife, and invertebrates: a synoptic review. U.S. Fish and Wildlife Research Service. Biological Report 85 (1.13).
- Pope CN, Chakraborti TK, Chapman ML & Farrar JD. 1992. Long-term neurochemical and behavioral effects induced by acute chlorpyrifos treatment. *Pharmacology Biochemistry and Behavior* 42: 215-256.
- Piccardi M. 2004. Background subtraction techniques: a review. In *Proceedings of IEEE SMC 2004 International Conference on Systems, Man and Cybernetics*. The Hague, The Netherlands.
- Saglio P & Trijasse S. 1998. Behavioral responses to atrazine and diuron in goldfish. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 35: 484-491.
- Saglio P, Olsén KH & Bretaud S. 2001. Behavioral and olfactory responses to prochloraz, bentazone, and nicosulfuron-contaminated flows in goldfish. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 41: 192-200.
- Torralva M, Oliva-Paterna FJ, Andreu-Soler A., Verdiell-Cubedo D, Miñano PA & Egea A. 2005. Atlas de Distribución de los Peces Continentales de la Región de Murcia. Dirección General del Medio Natural. CARM.