VI. Comptant Organismes Creixent en un Disc Utilitzant ImatgeJ (Manual)
Microfotografies

Salli Soria-Dengg , GEOMAR Helmholtz Centre d'Investigació Oceànica Kiel
Düsternbrookerweg 20 24105 Kiel, Alemanya

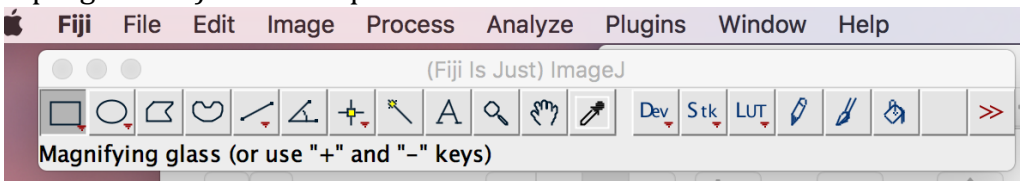
Aquest tutorial li ajudarà a analitzar les fotografies agafades sota el microscopi estereoscòpic. El que anem a analitzar aquí és un substrat rectangular cobert amb els habitants de tubs, els poliquets *Polydora ciliata* (imatge de sota). Como sempre, el més important és fotografiar una escala de referència sota el mateix augment que les imatges que va a analitzar. Aquí l'escala de referència també es va submergir en aigua com el disc per a què es minimitzin els canvis deguts a la refracció. Faci al menys 10 fotos de punts aleatoris en el substrat.




Imatge del substrat rectangular cobert de poliquets (esquerra).
A la dreta hi ha una foto de prop dels poliquets.

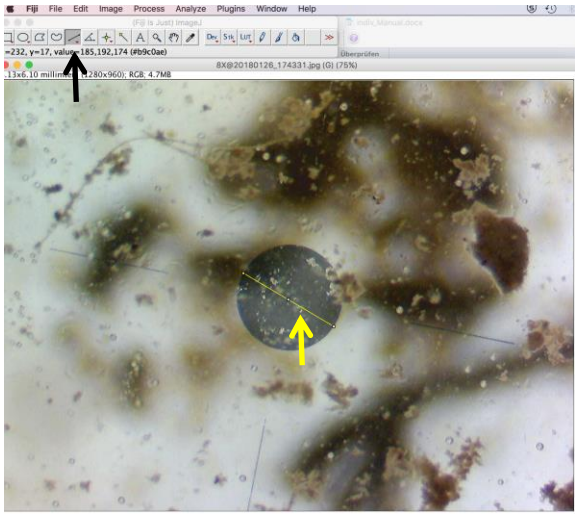
Anem a estimar quants poliquets hi ha creixent en tota la superfície del disc.

1. Descarregui la versió de *Fiji ImatgeJ* que sigui compatible amb el sistema operador del seu ordinador des d'aquesta web: https://imatgej.net/Fiji/Downloads
2. Obri el programa *Fiji* i veurà aquesta barra de selecció d'eines sota la barra de menú.

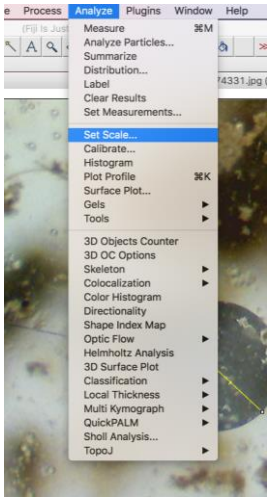


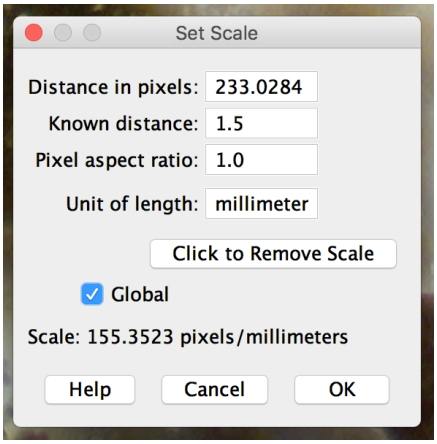
3. **Estableixi la escala.** Carregui la imatge de la seva escala de referència arrastrant l'arxiu i deixant-lo a la barra de selecció d'eines. En el nostre exemple tenim un punt amb un diàmetre de 1.5 mm d'una làmina de calibració Motic 4-dot.

   Cliqui en "**Straight"** en la barra de selecció d'eines (fletxa negra) i dibuixi una línia recta a través del diàmetre del punt (fletxa groga).

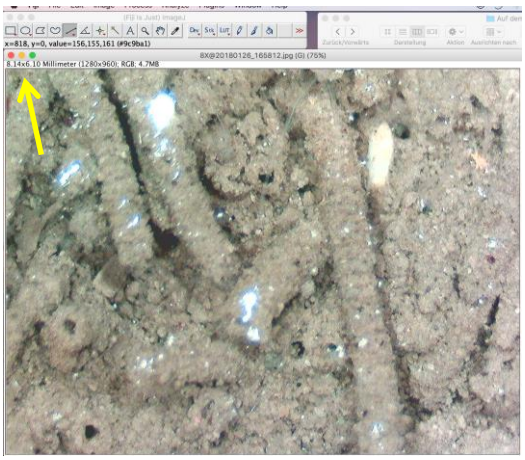


4. Cliqui en **Analyze – Set Scale** en la barra del menú. Apareixerà una petita finestra. Ompliu-la amb la informació apropiada.
   Per al nostre exemple la **distància coneguda és 1.5** i la **unitat de longitud és mm (mil·límetres).** Cliqui "**Global**" per a què aquesta escala sigui la utilitzada per les imatges que vol analitzar. Cliqui **"OK".**



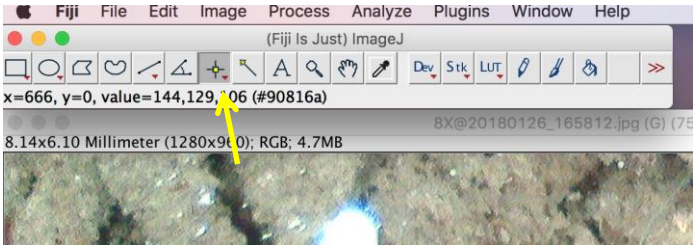


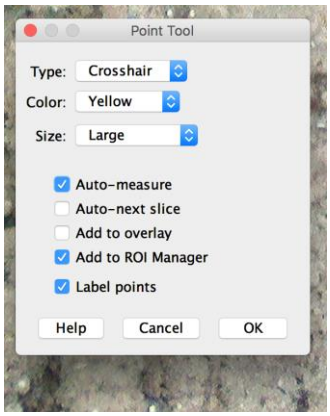
5. Obri la primera imatge clicant en **File – Open** i escolli l'arxiu apropiat. Alternativament, també pot obrir una imatge en ImatgeJ arrastrant l'arxiu directament en la barra de selecció d'eines. La primera imatge que volem analitzar es carregarà.



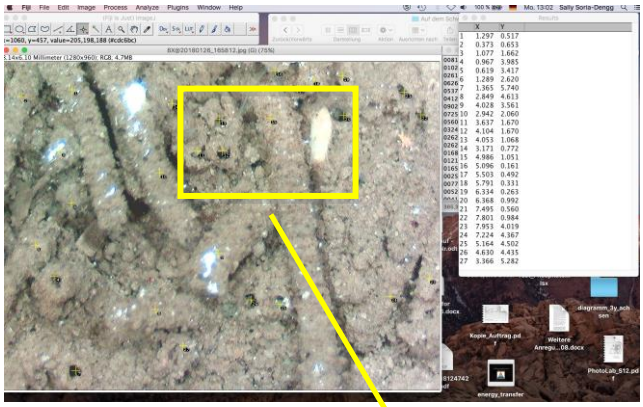
Amb el número de la cantonada superior esquerra de la imatge (fletxa), podrà veure les dimensiones de la imatge. Pot calcular l'àrea del substrat captat en la seva imatge. En el nostre exemple: 8.14 x 6.10 = 49.65 mm^2.

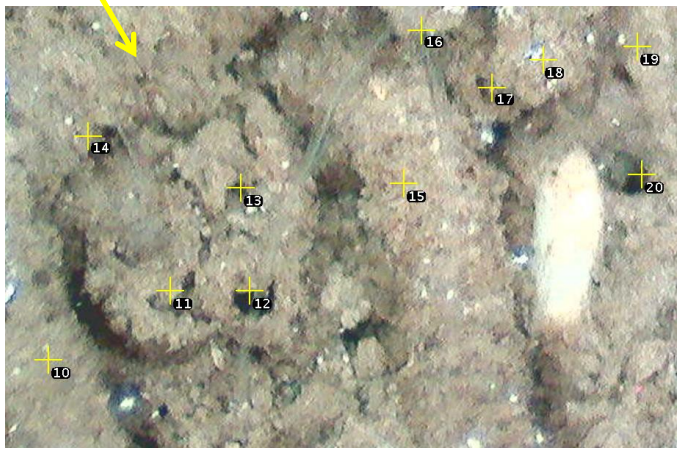
6. **Compti els organismes.** Faci doble clic en la eina *__Point__* des de la barra de selecció (fletxa). Una finestra apareixerà. Introdueixi les seves eleccions. Pels ajustos del nostre exemple: Type: **Crosshair**; Color: **Yellow** y Size: **Large.** Cliqui **Auto-measure, Add to ROI Manager i Label points**. Cliqui **"OK".**





7. **Comenci comptant** clicant en els individus en la imatge. Compti els forats i els tubs. Per a cada clic apareixerà una creu amb un número en la imatge. Això previndrà que compti el mateix individu dos cops. Addicionalment, una taula amb el total apareixerà a la dreta. Ignori tots els altres valors. Només ens interessa el número d'individus. També ignori els valors en el ROI manager.





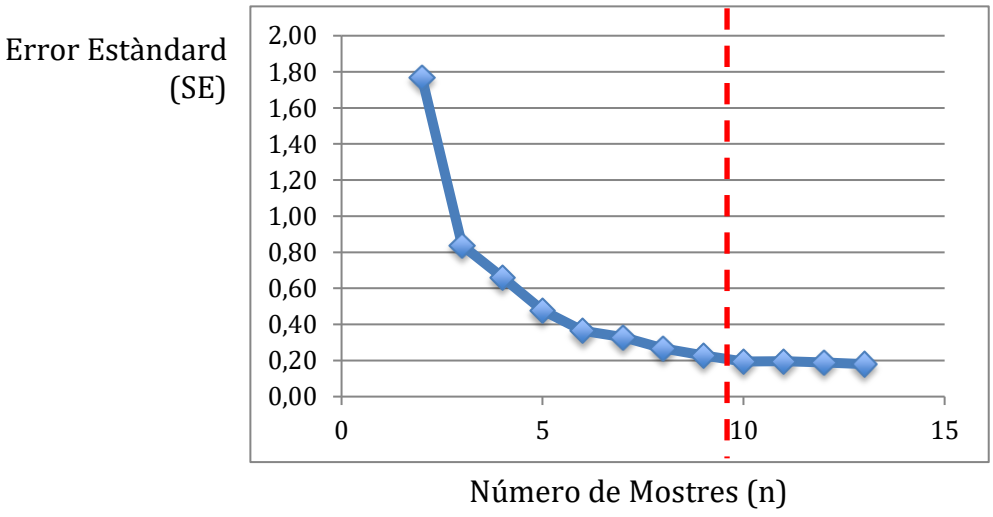
8. **Analitzi les altres imatges.** Després d'acabar amb una imatge, anoti el total i ingressi això en una taula. Pot tancar la imatge acabada i tancar totes les seves taules corresponents. No necessita guardar res.

9. Carregui la següent imatge i procedeixi com en els passos 7 i 8.

10. **Determini si la seva mida de mostra és suficient** (Miri el tutorial de "Determining Sample Size"). Si els valors obtinguts s'aproximen entre ells, pot que sigui suficient comptar 10 imatges. Pel nostre exemple, hem comptat 13 imatges. Els valors obtinguts es donen en la taula de sota:

Número d'Imatge Número de mostra (n)	Número (Individus)	Promig acumulatiu	Desviació estàndard acumulativa (s)	√n	Error Estàndard (SE) = s/√n
1	27			1.00	
2	22	24.50	3.54	1.41	1.77
3	24	24.33	2.52	1.73	0.84
4	21	23.50	2.65	2.00	0.66
5	25	23.80	2.39	2.24	0.48
6	25	24.00	2.19	2.45	0.37
7	27	24.43	2.30	2.65	0.33
8	24	24.38	2.13	2.83	0.27
9	23	24.22	2.05	3.00	0.23
10	25	24.30	1.95	3.16	0.19
11	28	24.64	2.16	3.32	0.20
12	28	24.92	2.27	3.46	0.19
13	28	25.15	2.34	3.61	0.18
Total d'individus	327				

Traçant SE amb n, obtenim la corba a continuació. Pel nostre exemple, hauríem de comptar al menys 9 imatges per obtenir una mida de mostra fiable.



11. Calculi el número total d'individus en el substrat de la mostra.

- Total de l'àrea analitzada **(TAA)** = 49.65 x 13 = 645.45 mm^2 (Miri pas 5)

- Total del número d'individus en les 13 imatges **(TN)** = 327 individus
- Extrapoli les dades per l'àrea total del substrat **(AS).**

  Tenim un substrat amb una àrea de 5.5 x 10.0 = 55.0 cm ^2

  = (TN ÷ TAA) (AS)

  = (327 individus ÷ 6.45 cm^2) (55 cm^2)

  = 2788.37 individus

www.virtuedata.se

Co-funded by the
Erasmus+ Programme
of the European Union