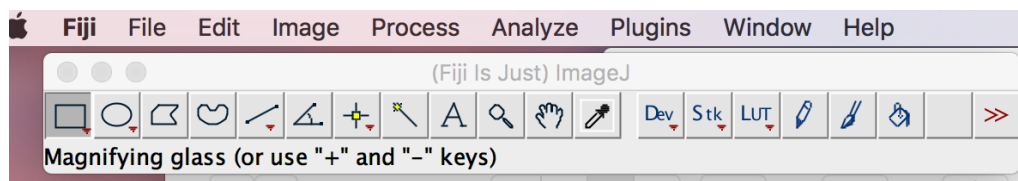


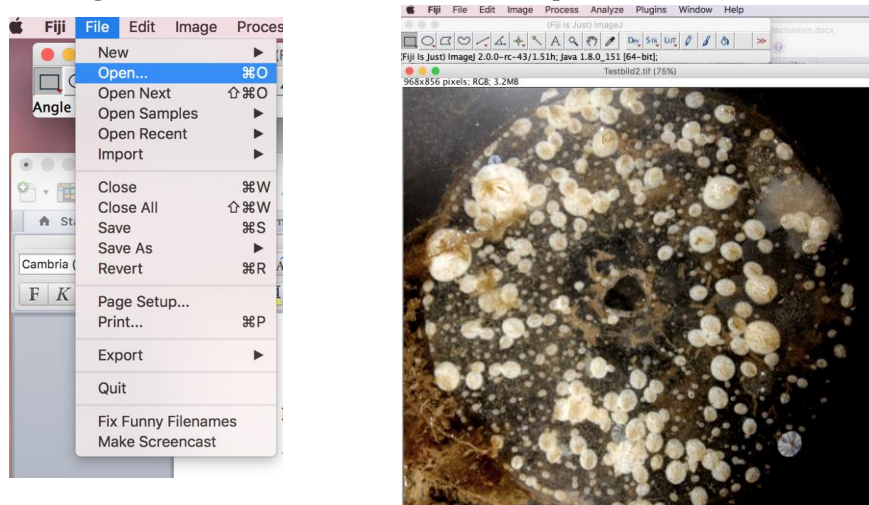
II. Contando los Organismos Creciendo en un Disco Usando ImageJ (Automatizado)

1. Descargue la versión de *Fiji ImageJ* que sea compatible con el sistema operador de su ordenador desde esta web: <https://imagej.net/Fiji/Downloads>
2. Abra el programa *Fiji* y verá esta barra de selección de herramientas bajo la barra de menú.

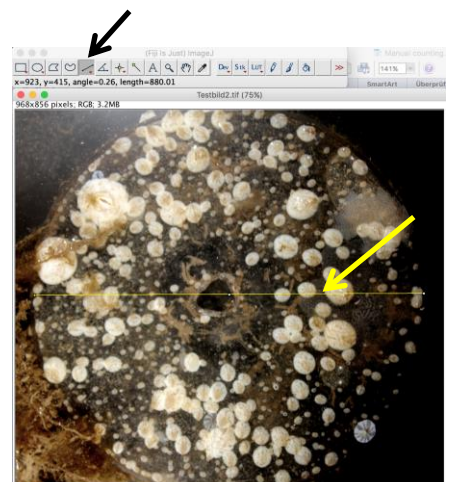


3. Abra la imagen clicando en **File - Open**. Alternativamente, también puede abrir una imagen en *ImageJ* arrastrando el archivo directamente en la barra de selección de herramientas.

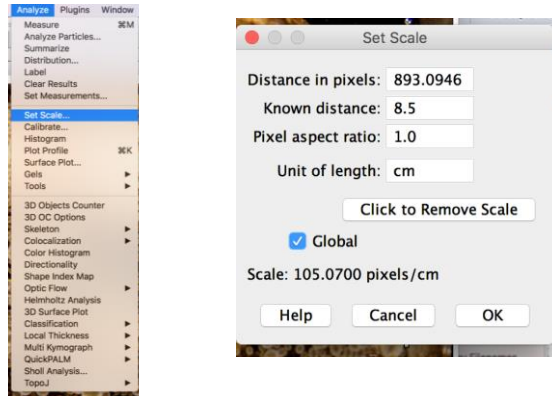
Como ejemplo, tenemos una imagen de un disco cubierto por percebes, que están distribuidos irregularmente. Queremos contar los percebes individuales en el disco.



4. Primero, establece la escala. Clique en **“Straight”** en la barra de selección de herramientas (flecha negra) y dibuje una línea recta en una escala de referencia en su imagen. Esto podría ser una regla o una moneda puesta al lado del disco en la foto. En este ejemplo, una línea recta (flecha amarilla) es dibujada a través del diámetro del disco porque tiene una distancia conocida igual a 8.5 cm.

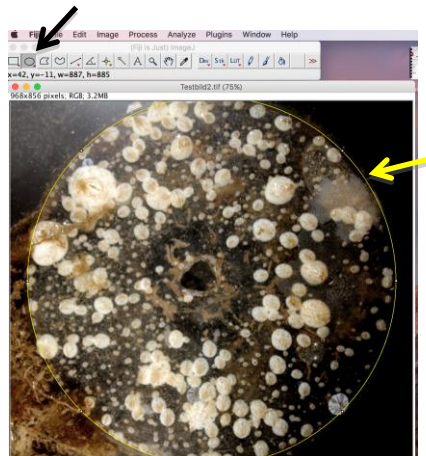


5. Clique en **Analyze – Set Scale** en la barra del menú. Aparecerá una pequeña ventana. Rellénela con la información apropiada

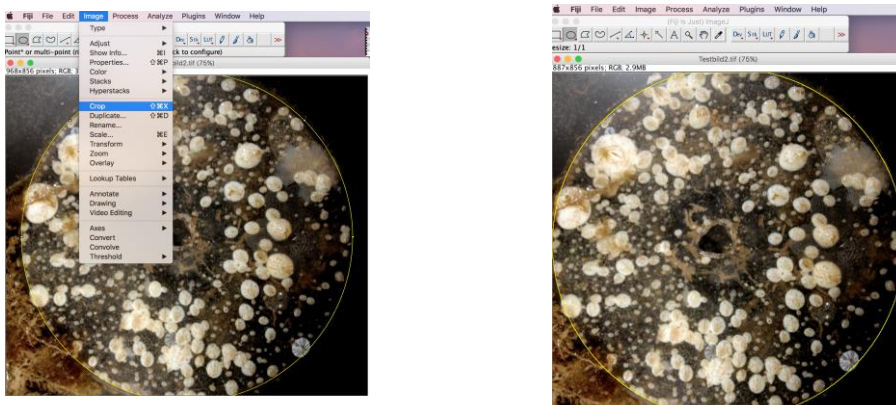


Para nuestro ejemplo, la distancia conocida es 8.5 y la unidad de longitud es cm. Clique en **Global** si varias imágenes de los discos serán analizadas y todos los discos son del mismo tamaño y aumento. El **Global** usará la misma escala para todas las imágenes y no hay necesidad de establecer la escala en las imágenes siguientes. Clique **OK**.

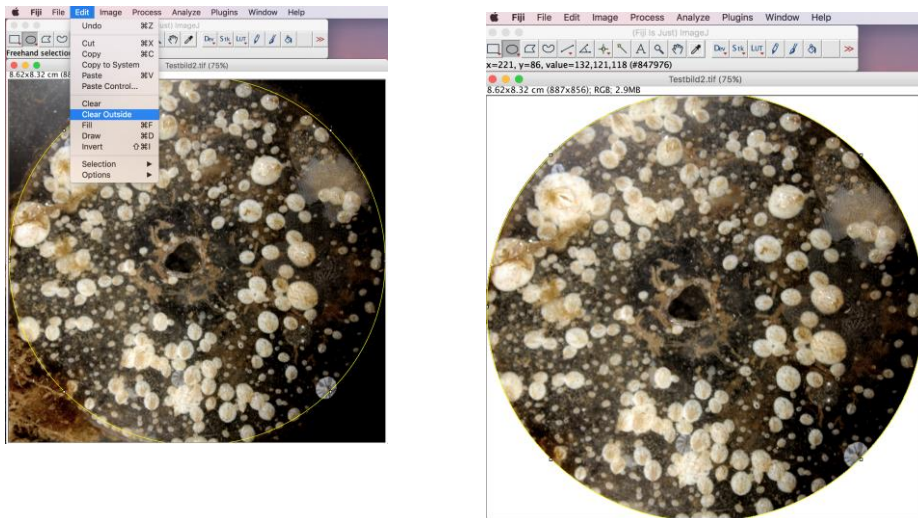
6. Prepare la imagen para el análisis. Para hacer esto, clique en el **“Oval”** en la barra de selección de herramientas (flecha negra). Después dibuje un círculo alrededor del perímetro de su disco (flecha amarilla).



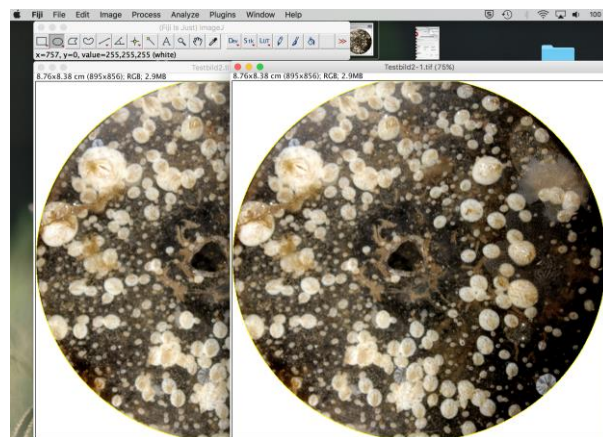
7. Elimine todo el fondo innecesario en la imagen clicando en **Image – Crop**.



8. Seleccione **Edit – Clear Outside**.



9. Seleccione **Image – duplicate**. Esto duplicará su imagen. El duplicado servirá como su imagen de referencia mientras procesa su disco. Coloque la imagen de referencia detrás.



10. Seleccione **Edit – Invert**. Esto volverá los percebes oscuros y el fondo más claro.

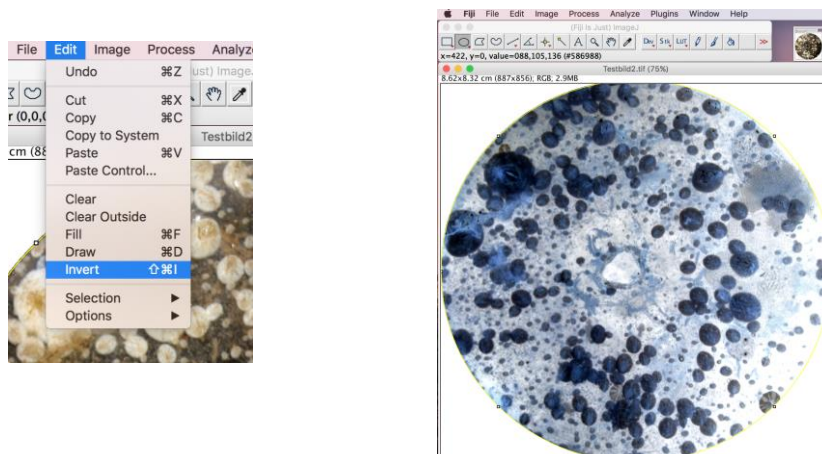
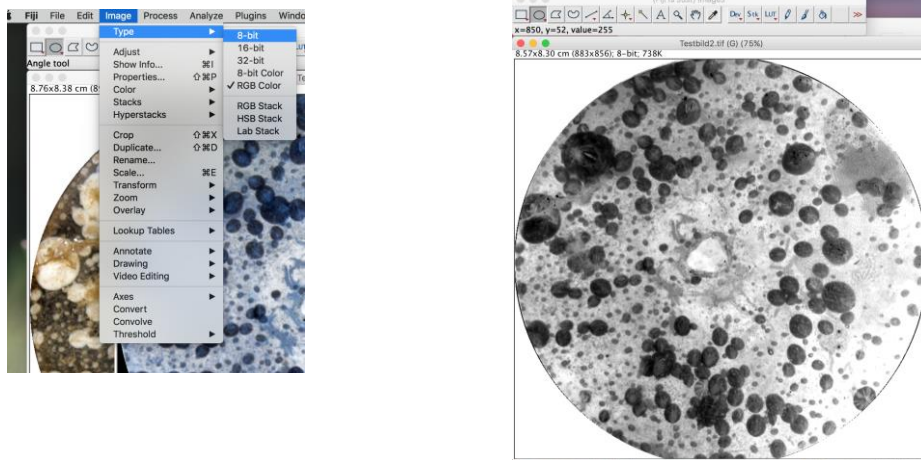
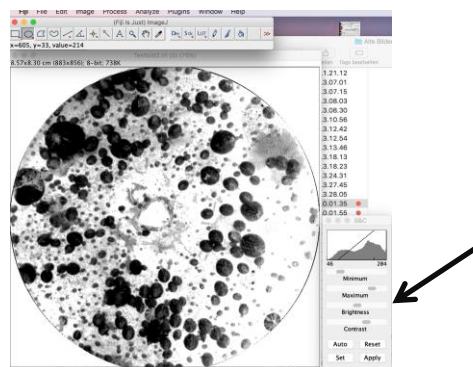


Imagen invertida

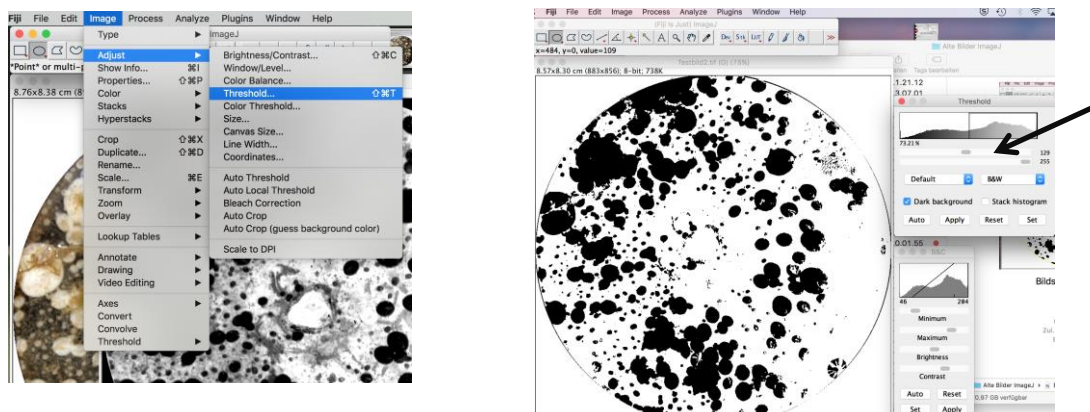
11. Convierta la imagen a 8-bit. Seleccione **Image - Type - 8 bit**. Esto hará que la imagen sea en blanco y negro.



12. Mejore la imagen a través del brillo y el contraste. Seleccione **Image - Adjust - Brightness/Contrast**. Mueva las barras deslizantes en la ventanilla (flecha) para optimizar su imagen.



13. Umbral de la imagen. Seleccione **Image - Adjust - Threshold**. Ajuste el contraste de la imagen moviendo la barra deslizante superior (flecha) hasta que los organismos que quiere contar estén negros.



14. Convierta la imagen a binario. Seleccione **Process – Binary – Make Binary**. Una ventana aparecerá. Clique a todo y seleccione OK.

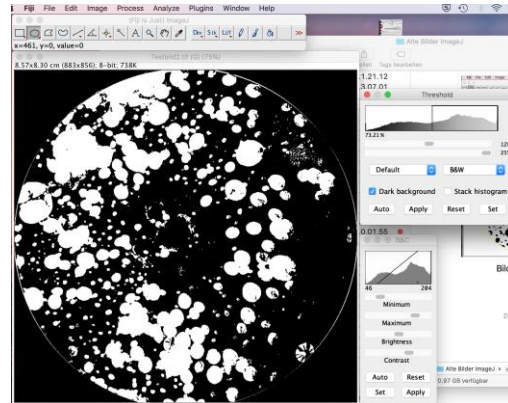
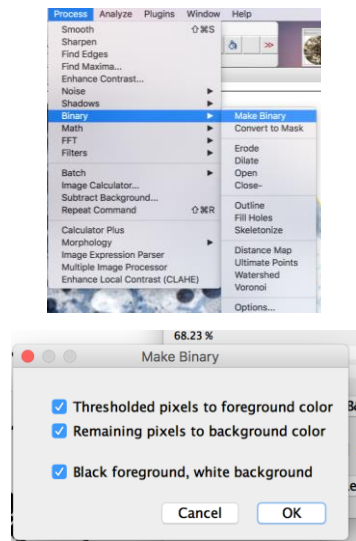


Imagen binaria

La imagen está ahora invertida. Los percebes son ahora blancos con fondo negro. En este ejemplo los percebes tienen diferentes tamaños y muchos pueden estar superpuestos. Esto llevará a una subestimación de su cantidad porque el programa contará distintos percebes como uno.

15. Para compensar esto seleccione **Process – Binary – Watershed**. Se dará cuenta de que el programa ha intentado separar percebes individuales con una línea fina de 1 pixel. Compare esto con su imagen de referencia y compruebe si las separaciones son más o menos precisas. Note, sin embargo, que la separación completa de los organismos no se puede conseguir.

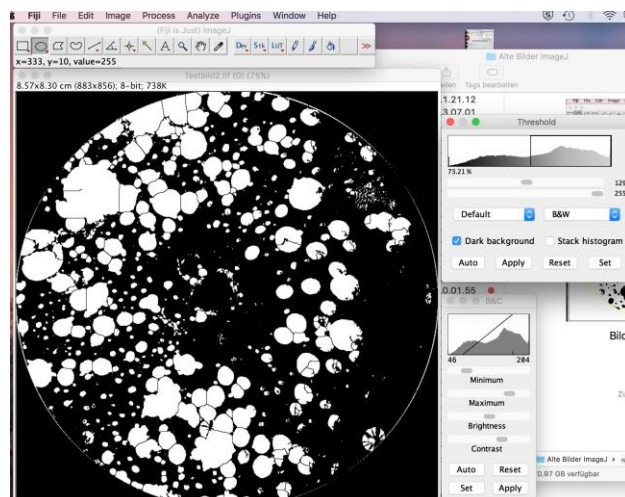
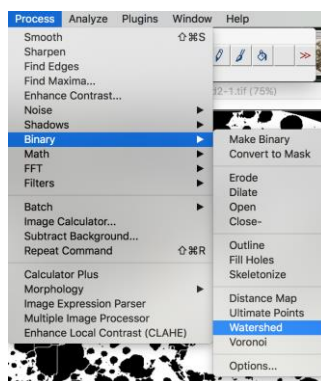
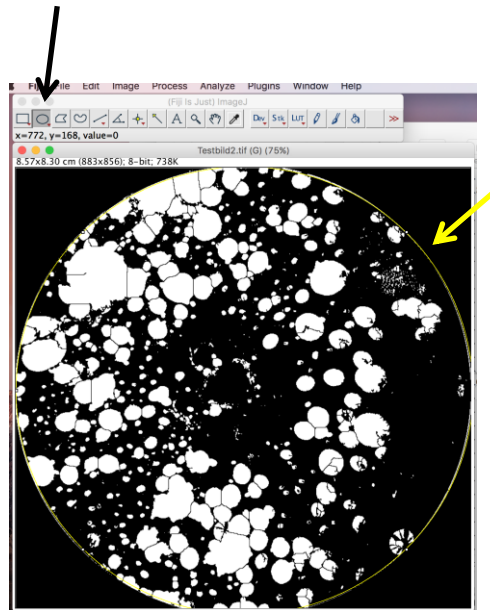
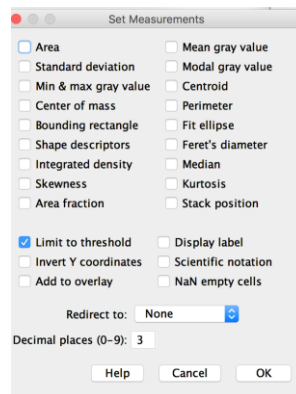


Imagen con las líneas de separación entre los percebes superpuestos

16. Defina el área que se contará. Seleccione **“Oval”** en la barra de selección de herramientas y dibuje un círculo alrededor del perímetro del disco (flecha). (Mire el paso 6).

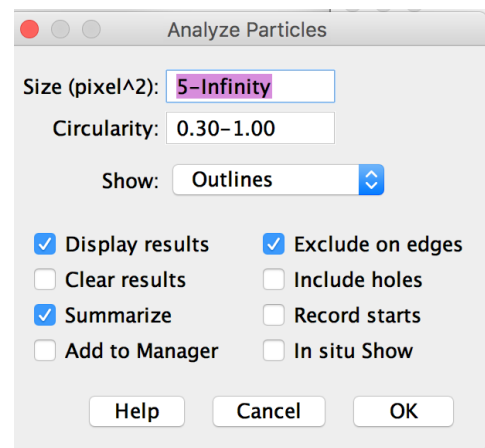


17. Seleccione **Analyze – Set measurements**.
 Clique sólo **Limit to threshold**. Clique en **OK**.



18. Seleccione **Analyze - Analyze particles**. Una ventana aparecerá. Ajuste los parámetros.

Establezca el tamaño: dependiendo de cómo de grandes sean sus percebes. Si sólo quiere contar los percebes grandes establezca el tamaño desde un número grande hasta infinito o reduzca el rango del tamaño si sólo quiere contar los percebes pequeños. Recuerde que el programa sólo cuenta las partículas pequeñas. Clique **pixel units** (si es necesario). Para nuestro ejemplo establecemos el tamaño en **5 - Infinity**. Este ajuste no contará las partículas pequeñas en la imagen, que no son percebes.



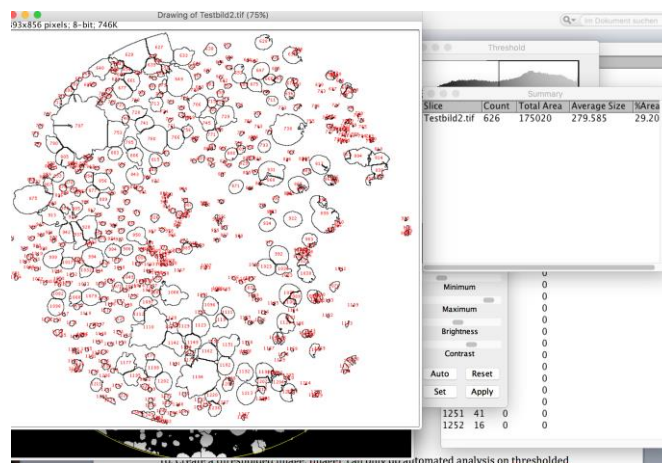
Establezca la redondez: 0.0 es un rectángulo alargado y 1.0 es un círculo perfecto. Compruebe la forma de sus percebes en la ventana. Una redondez de **0.3 o 0.4 -1.0** ya funciona.

Muestre: **Outlines**. Esto le permite ver cuáles partículas han sido contadas.

Excluir en los bordes: el programa no contará partículas en los bordes del círculo.

Display results y Summarize. Clique **OK**.

19. Aparecerá una tabla con los resultados. Una ventana con una imagen de los contornos de los elementos contados también aparecerá. Puede comprobar cómo de eficaz es contando. Las partículas contadas están marcadas con un número rojo. Compare esto con su imagen de referencia y compruebe si la suma total es más o menos correcta. Si no está satisfecho con la suma vuelva a **Analyze particles y ajuste el tamaño del píxel** en la tabla.

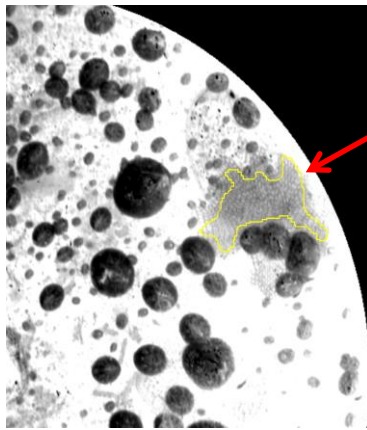


En este ejemplo el total es de 626 individuos. Esto no es muy diferente de la cuenta obtenida en el conteo manual. (Mire el tutorial sobre el conteo manual).

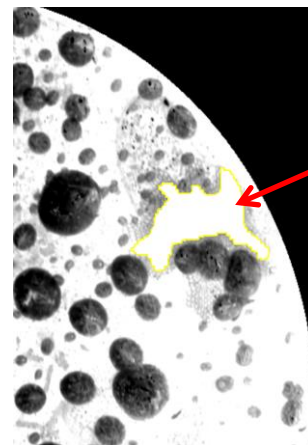
20. Con este método, puede hacer un conteo diferenciado de percebes grandes y pequeños ajustando el tamaño del píxel en el Paso 18.

Soluciones a problemas:

1. En nuestro ejemplo, hay una colonia de briozoos, que están marcados como puntos negros después de convertir la imagen a 8-bit o a binario. Puede eliminar esto marcando con un círculo la colonia con la herramienta **"Freehand"** y apretando a borrar después de marcar.



Colonia de briozoos
marcados con la
herramienta "Freehand"



La colonia borrada

2. Esto también puede ser corregido ajustando el "tamaño" y/o "redondez" en la ventana Analyze Particles.

