

VI. Contando Organismos Creciendo en un Disco Usando ImagenJ (Manual)

Microfotografías

Sally Soria-Dengg, GEOMAR Helmholtz Centro de Investigación Oceánica Kiel
Düsternbrookerweg 20 24105 Kiel, Alemania

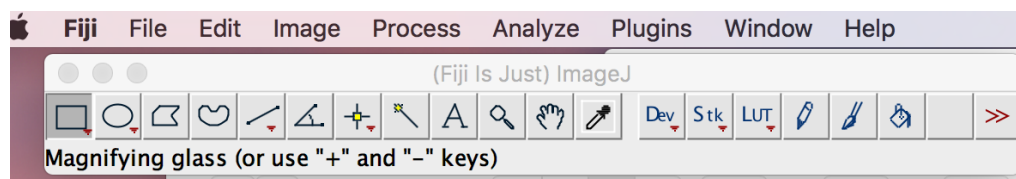
Este tutorial le ayudará a analizar las fotografías tomadas bajo el microscopio estereoscópico. Lo que vamos a analizar aquí es un sustrato rectangular cubierto con los habitantes de tubos, los poliquetos *Polydora ciliata* (imagen de abajo). Como siempre, lo más importante es fotografiar una escala de referencia bajo el mismo aumento que las imágenes que va a analizar. Aquí la escala de referencia también se sumergió en agua como el disco para que se minimicen los cambios debidos a la refracción. Tome al menos 10 fotos de puntos aleatorios en el sustrato.



Imagen del sustrato rectangular cubierto de poliquetos (izquierda).
En la derecha hay una foto de cerca de los poliquetos.

Vamos a estimar cuántos poliquetos hay creciendo en toda la superficie del disco.

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

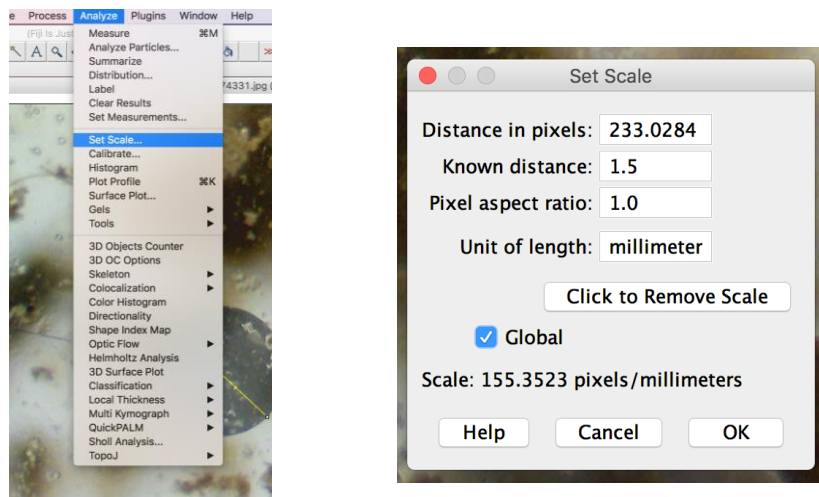


3. **Establezca la escala.** Cargue la imagen de su escala de referencia arrastrando el archivo y dejándolo en la barra de selección de herramientas. En nuestro ejemplo tenemos un punto con un diámetro de 1.5 mm de una lámina de calibración Motic 4-dot.

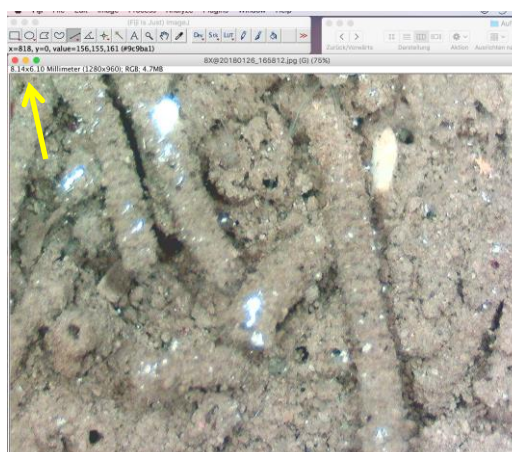
Clique en “**Straight**” en la barra de selección de herramientas (flecha negra) y dibuje una línea recta a través del diámetro del punto (flecha amarilla).



4. 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 1.5** y la **unidad de longitud es mm (milímetros)**. Clique **“Global”** para que esta escala sea la usada para las imágenes que va a analizar. Clique **“OK”**.

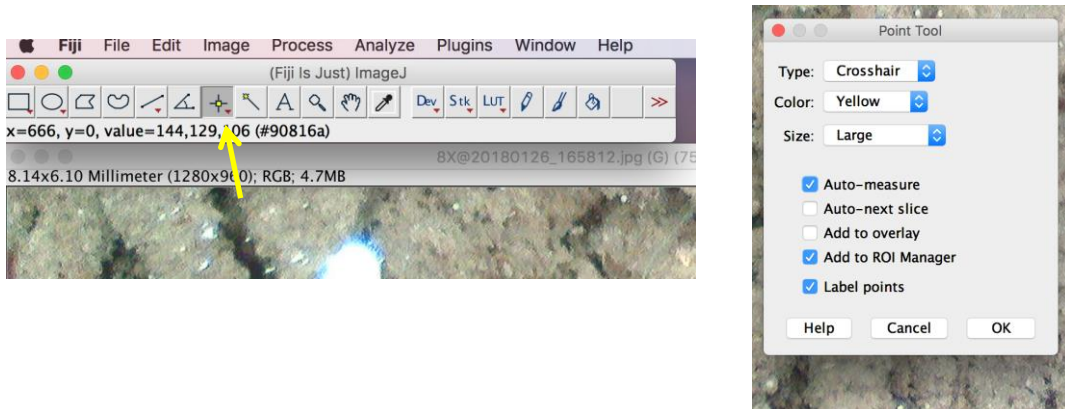


5. Abra la primera imagen clicando en **File – Open** y escogiendo el archivo apropiado. Alternativamente, también puede abrir una imagen en [Imagen] arrastrando el archivo directamente en la barra de selección de herramientas. La primera imagen que queremos analizar se cargará.

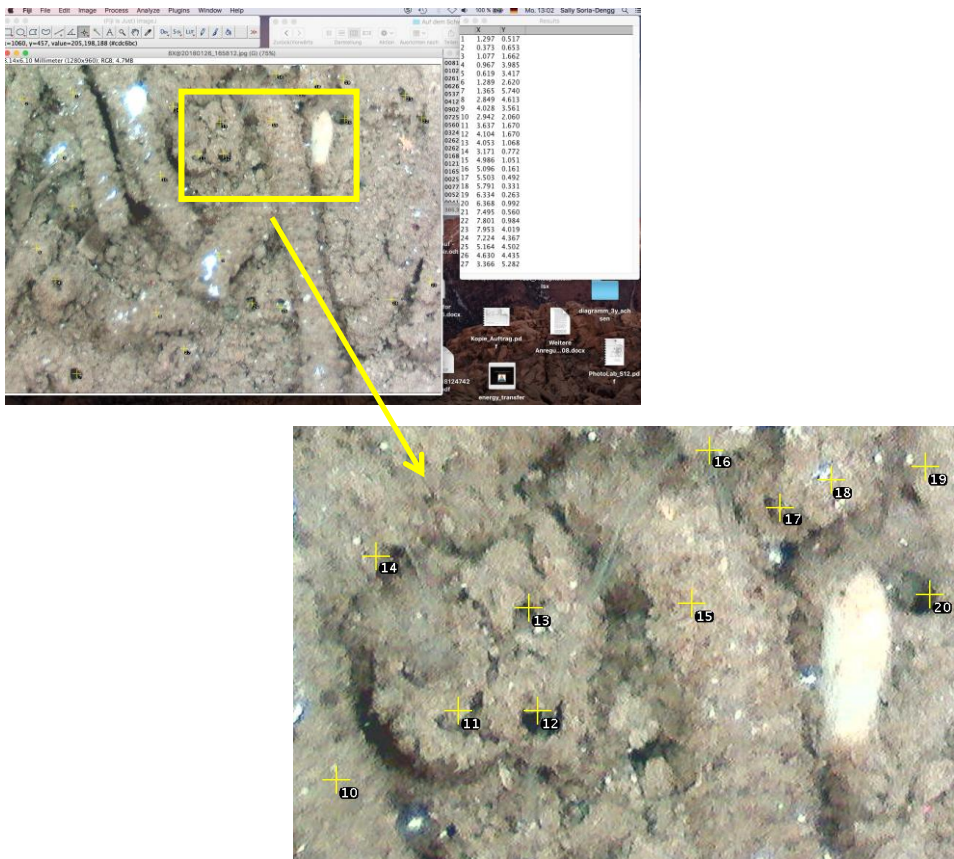


Por el número de la esquina superior izquierda de la imagen (flecha), podrá ver las dimensiones de la imagen. Puede calcular el área del sustrato captado en su imagen. En nuestro ejemplo: $8.14 \times 6.10 = 49.65 \text{ mm}^2$.

6. **Cuente los organismos.** Haga doble clic en la herramienta ***Point*** desde la barra de selección (flecha). Una ventana aparecerá. Introduzca sus elecciones. Para los ajustes de nuestro ejemplo: Type: **Crosshair**; Color: **Yellow** y Size: **Large**. Clique **Auto-measure**, **Add to ROI Manager** y **Label points**. Clique **“OK”**.



7. **Empiece contando** clicando en los individuos en la imagen. Cuente los agujeros y los tubos. Para cada clic aparecerá una cruz con un número en la imagen. Esto prevendrá que cuente el mismo individuo dos veces. Adicionalmente, una tabla con el total aparecerá a la derecha. Ignore todos los otros valores. Sólo nos interesa el número de individuos. También ignore los valores en el ROI manager.



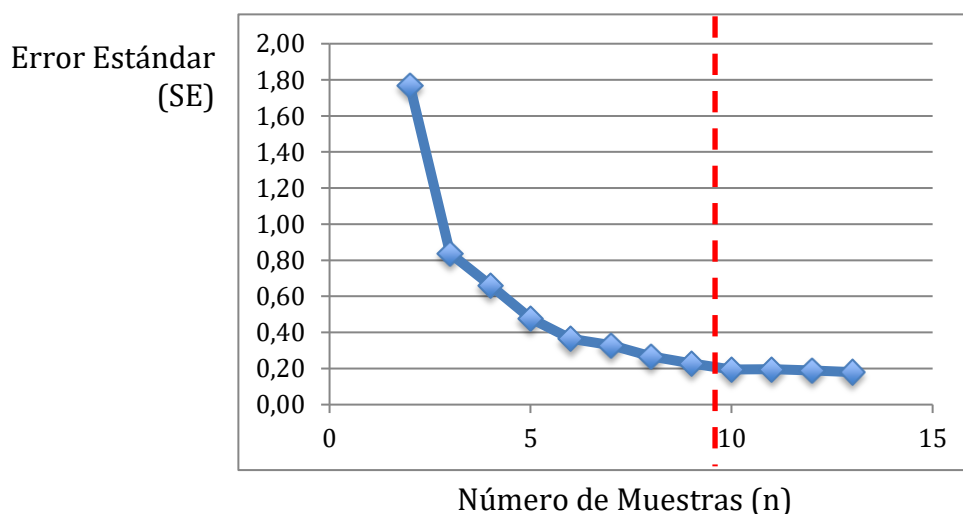
8. **Analice las otras imágenes.** Después de acabar con una imagen, anote el total e ingrese esto en una tabla. Puede cerrar la imagen acabada y cerrar todas sus tablas correspondientes. No necesita guardar nada.

9. Cargue la siguiente imagen y proceda como en los pasos 7 y 8.

10. **Determine si su tamaño de muestra es suficiente** (Mire el tutorial de “Determining Sample Size”). Si los valores obtenidos se aproximan entre ellos, puede que sea suficiente contar 10 imágenes. Para nuestro ejemplo, hemos contado 13 imágenes. Los valores obtenidos se dan en la tabla de abajo:

Número de Imagen Número de muestra (n)	Número (Individuos)	Promedio acumulativo	Desviación estándar acumulativa (s)	\sqrt{n}	Error Estándar (SE) = s/\sqrt{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 de individuos	327				

Trazando SE con n, obtenemos la curva de a continuación. Para nuestro ejemplo, deberíamos contar al menos 9 imágenes para obtener un tamaño de muestra confiable.



11. Calcule el número total de individuos en el sustrato de la muestra.

- Total del área analizada (**TAA**) = $49.65 \times 13 = 645.45 \text{ mm}^2$ (Mire paso 5)
- Total del número de individuos en las 13 imágenes (**TN**) = 327 individuos
- Extrapole los datos para el área total del sustrato (**AS**).

Tenemos un sustrato con un área de $5.5 \times 10.0 = 55.0 \text{ cm}^2$

= $(\text{TN} \div \text{TAA}) (\text{AS})$

= $(327 \text{ individuos} \div 6.45 \text{ cm}^2) (55 \text{ cm}^2)$

= 2788.37 individuos

