

VI. Räkna organismer på en VIRTUE-skiva med ImageJ (Manuellt) Mikrofotografier

Sally Soria-Dengg, GEOMAR Helmholtz Centre for Ocean Research Kiel
Düsternbrookerweg 20 24105 Kiel, Germany

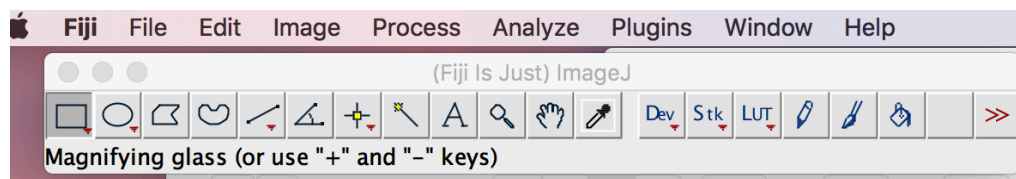
Den här guiden hjälper dig analysera bilder tagna med stereomikroskop. Objektet vi skall analysera här är ett rektangulärt substrat överväxt med en havsborstmask, *Polydora ciliata* (bilden nedan). Som alltid, så är det av avgörande betydelse att ha en referensskala avbildad vid samma förstoring som bilden du skall analysera. I exemplet sänkts referensskalan också ner i vattnet så att effekten av ljusets brytning i vatten inte skall påverka resultatet. Ta åtminstone 10 bilder på slumpmässigt valda ställen på substratet.



Bild på det rektangulära substratet överväxt med havsborstmaskar (vänster).
Till höger en närbild på en av havsborstmaskarna.

Vi skall uppskatta hur många havsborstmaskar som växer på substratets hela yta.

1. Ladda ner en version av Fiji ImageJ som är kompatibelt med operativsystemet på din dator från den här webbplatsen: <https://imagej.net/Fiji/Downloads>
2. Öppna programmet ImageJ och du ser verktygsfältet under menyraden.

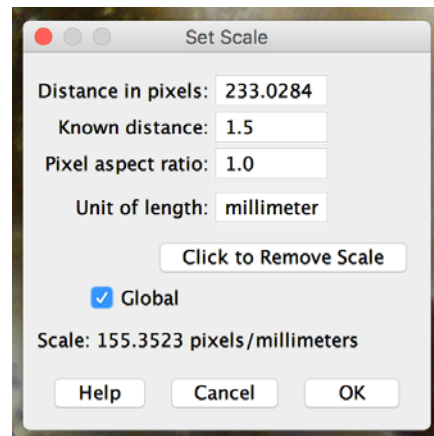
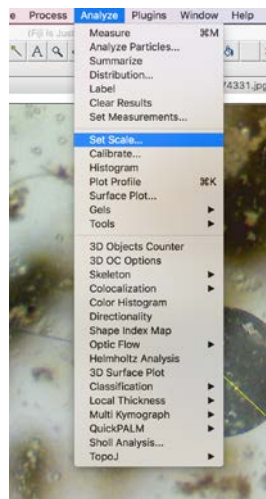


3. **Ställ in skalan.** Ladda in bilden av referensskalan genom att dra filen och släppa den i verktygsfältet. I vårt exempel har vi en prick med en diameter på 1,5 mm från en Motic 4-dot kalibreringsglas.

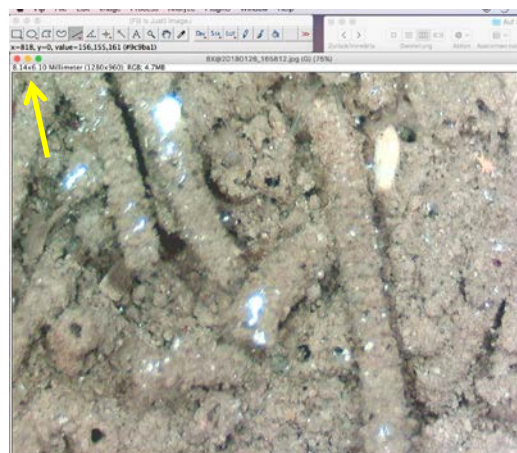
Välj **“Straight”** (svarta pilen) i verktygsfältet och rita en rät linje tvärs över pricken (gula pilen).



4. Välj **Analyze – Set Scale** och skriv in rätt värde i rutan. I vårt exempel är den **kända sträckan 1,5** och **enheten är mm (millimeter)**. Markera **“Global”** så att skalan används för alla bilder du analyserar. Klicka **“OK”**.

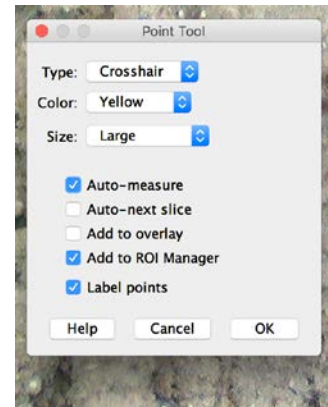
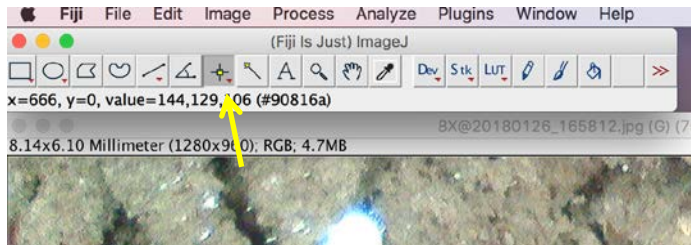


5. Öppna den första bilden genom att klicka **File – Open** och välja filen. Alternativt så kan du också direkt dra och släppa en fil i verktygsfältet.

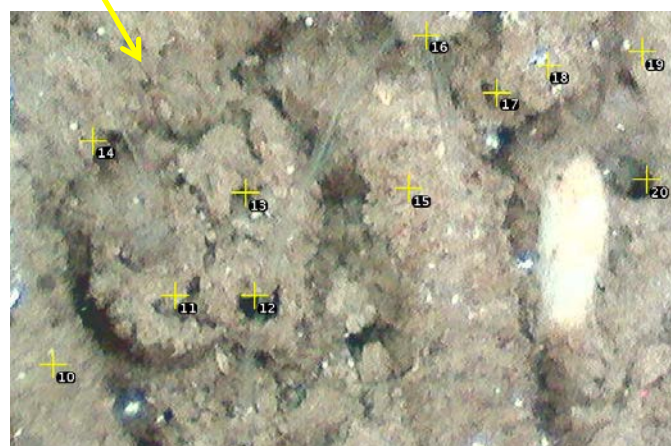
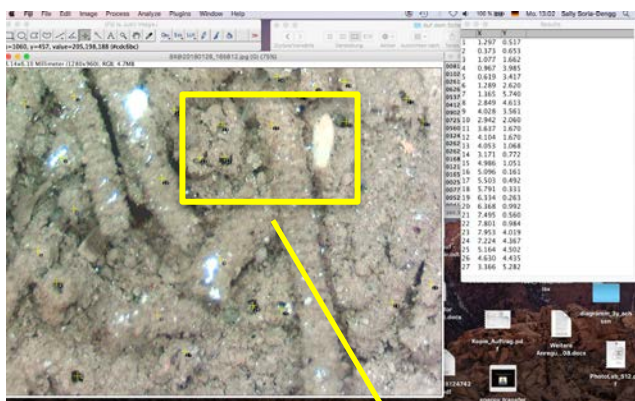


På siffrorna i det övre vänstra hörnet ser du bildens dimensioner (gula pilen). Du kan beräkna arean av substratet på bilden I exemplet: $8.14 \times 6.10 = 49.65 \text{ mm}^2$.

6. **Räkna organismerna.** Dubbelklicka på ***Point***-verktyget i verktygsfältet (pilen). Ett fönster kommer fram. Skriv in dina val. I vårt exempel: Type: **Crosshair**; Color: **Yellow** och Size: **Large**. Välj **Auto-measure**, **Add to ROI Manager** och **Label points**. Klicka **“OK”**.



7. **Börja räkna** genom att klicka på individerna i bilden. Räkna hålen och rören. För varje klick sätts ett kryss med en siffra ut i bilden. Detta hindrar dig från att räkna samma individ mer än en gång. En tabell med räkningen kommer upp till höger på skärmen. Ignorera alla andra värden. Vi intresserar oss bara för antalet individer. Ignorera även värdena i ROI-hanteraren.



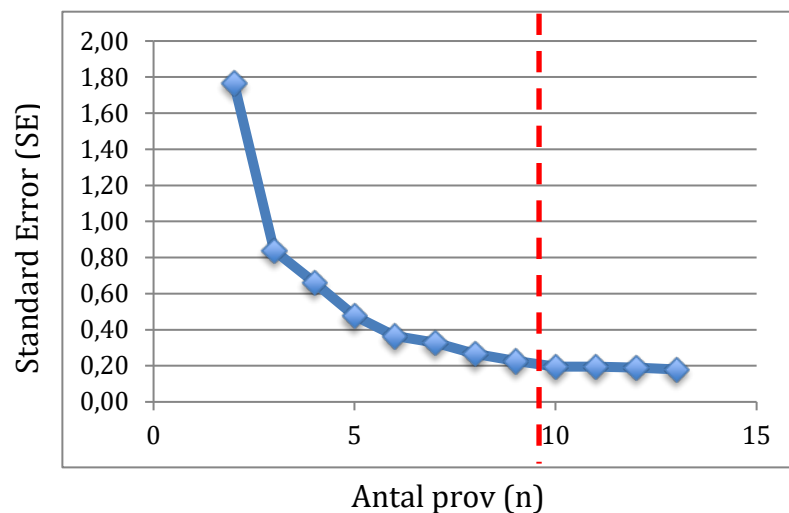
8. **Analysera de andra bilderna.** När du är klar med en bild, notera antalet organismer i tabellen nedan. Du kan stänga den färdiga bilden och tabellen på skärmen. Du behöver inte spara något.

9. **Ladda in nästa bild** och upprepa steg 7 och 8.

10. **Avgör om din provstorlek är tillräcklig** (Se guiden "Avgöra hur många rutor som skall räknas i ett rutnät"). Om värdena du får är nära varandra, räcker det kanske att räkna 10 bilder. I vårt exempel räknade vi 13 bilder. Våra värden syns i tabellen nedan:

Bildnummer (n)	Räkning (Individer)	Kumulativt Medel	Kumulativt Standardavvikelse (s)	\sqrt{n}	Standardfel (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 individuals	327				

Plottar vi SE mot n, får vi kurvan nedan. I vårt exempel bör vi räkna minst 9 bilder för att få en pålitlig uppskattning.



11. Beräkna det totala antalet organismer på substratet.

- Total area analyserad (**TAA**) = $49.65 \times 13 = 645.45 \text{ mm}^2$ (se steg 5)

- Totalt antal individer i de 13 bilderna **(TN)** = 327 individer
- Extrapolera datan till substratets totalarea **(AS)**.

Vi har ett substrat med arean of $5.5 \times 10.0 = 55.0 \text{ cm}^2$

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

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

$$= 2788.37 \text{ individer}$$

v. 012018

Contact: sdengg@geomar.de

