

Laboratorio de Electromagnetismo y Óptica (ByG)  
2do cuat. 2020

## TP Nº 5 – PARTE A - Análisis y procesamiento de imágenes

Determinación del diámetro de microesferas fluorescentes a partir de la imagen de fluorescencia, como parte de la determinación de la resolución del microscopio óptico. El procesamiento y análisis de las imágenes se efectuará en la plataforma abierta y gratuita FIJI (*Fiji Is Just ImageJ*). Además se necesitará algún software de análisis de datos para realizar ajustes gaussianos.

### Imágenes para procesar

- Empleando el objetivo 40X de AN 0.75 del microscopio, se adquirieron imágenes de microesferas de distintos diámetros (40 nm, 500 nm y 3000 nm)

microesferas\_3000nm\_40xNA075.tiff  
microesferas\_500nm\_40xNA075.tiff  
microesferas\_40nm\_40xNA075.tiff

- Además se adquirió una imagen de transmisión de una grilla de calibración (mínima división 10 $\mu$ m), para determinar el tamaño del píxel de las imágenes obtenidas empleando el objetivo 40X NA0.75 del microscopio.

40xNA075\_Grilla\_calibracion.tiff

- Optativo. Imagen del ruido de oscuridad de la cámara CCD, obtenida sin iluminar la muestra:

ruido\_oscuridad\_camara\_CCD.tiff

Todas las imágenes fueron adquiridas empleando el mismo objetivo 40X NA0.75 y la misma configuración de adquisición de la cámara CCD.

## Actividades

### PARTE A.1 - Calibración de la escala espacial

A partir del análisis de la imagen de la grilla de calibración (mínima división 10 $\mu$ m) obtenida con el objetivo de 40X, NA=0.75, determine el tamaño del píxel en las imágenes adquiridas con este objetivo y el campo observado.

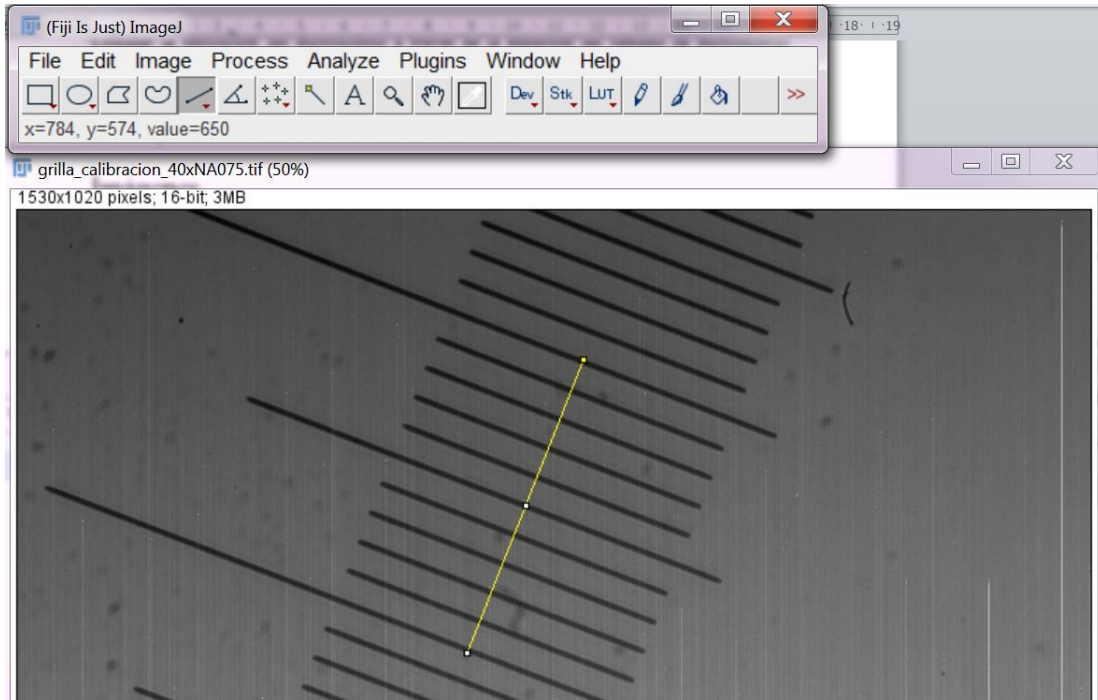
#### Pasos para calibrar la escala espacial

1. Abrir la imagen de la grilla de calibración (mínima división 10 $\mu$ m) con el software FIJI

Grilla\_calibración\_40x\_NA075.tiff

Tomar nota de las dimensiones de la imagen en píxeles, para determinar el tamaño del campo observado.

**2. Medir el tamaño del píxel.** En FIJI elegir la herramienta LINEA (ver figura 1) y trazar una línea sobre la imagen de una distancia conocida (en este caso se eligió una recta que pase por 10 mínimas divisiones, lo que equivale a una distancia de 100  $\mu\text{m}$ ). Luego seleccione la función **Analyze/Measure**. Una ventana aparecerá con los resultados de la medición, el valor en la columna **LENGHT** corresponde a la **longitud de la línea trazada en pixeles** – hacer la equivalencia con la distancia determinada por la grilla de calibración.

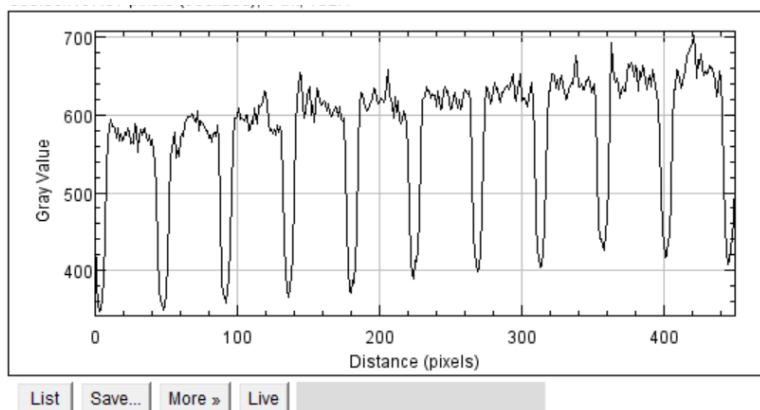


**Figura1.** Imagen capturada de la herramienta para la medición del tamaño del píxel con el software FIJI. Abajo, imagen de la grilla de calibración usada como patrón (mínima división 10 $\mu\text{m}$ ). Se trazó una línea sobre la imagen de una distancia conocida, en este caso se eligió una recta que pase por 10 mínimas divisiones, que equivale a una distancia de 100  $\mu\text{m}$ .

\*\*\*\*\*

Otra opción es, una vez trazada la línea, ir a **Analyze / Plot profile**, el programa mostrará el gráfico del perfil de intensidades de la imagen sobre la línea trazada. Con este perfil, es posible medir el tamaño del píxel tomando los picos de intensidades como referencias (ver figura 2).

**Figura2.** Imagen capturada del perfil de intensidad obtenido con el software FIJI, sobre la línea trazada en la imagen.



3. Definir la escala espacial de la imagen sabiendo el tamaño del píxel y el comando:

**Analyze - Set scale.**

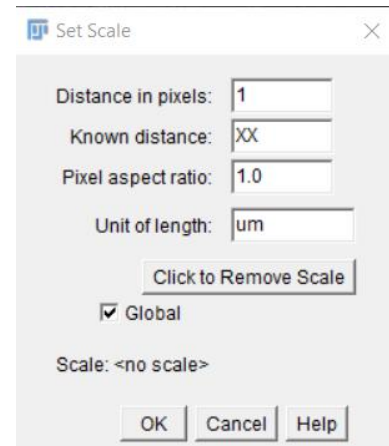
**Distance in pixels:** 1 (o distancia conocida en pixeles)

**Known distance:** el tamaño del píxel (o distancia conocida en la escala de unidad elegida)

**Pixel aspect ratio:** 1

**Unit of length:** nm ( o la unidad en que tienen el tamaño del píxel, m, cm, mm, nm etc...  $\mu\text{m}$  se anota como um)

Si todas las imágenes que se usarán tienen la misma escala, se puede definir a la escala como **Global**, de esta manera se toma la escala establecida como la misma para todas las imágenes.



**Nota para un ATAJO:** Al trazar la línea sobre la imagen de una distancia conocida (figura 1), ir directamente a **Analyze - Set scale**. El programa indicará en forma automática la distancia en pixels de la recta usada, solo se deberá indicar el resto de los parámetros.

**Resultados parte A1, completar especificando unidades:**

Para objetivo 40x NA 0.75:	
Tamaño píxel	
Tamaño del campo observado	

## PARTE A.2. Determinar el tamaño de la imagen de la microesfera

A partir del análisis de las imágenes de microesferas de distintos diámetros (40, 500 y 3000 nm) tomadas con el objetivo de 40X, NA=0.75 y calcular el diámetro de la imagen de las microesferas, empleando la calibración realizada en la parte anterior.

### Pasos para determinar el tamaño de la imagen de la microesfera

1. **Abrir las imágenes** de las microesferas de distintos diámetros (40, 500 y 3000 nm) tomadas con el objetivo de 40X, NA=0.75. Se puede arrastrar directamente el archivo tiff a la ventana del FIJI o abrir con el menú: **File – Open image** .

microesferas\_3000nm\_40xNA075.tiff  
microesferas\_500nm\_40xNA075.tiff  
microesferas\_40nm\_40xNA075.tiff

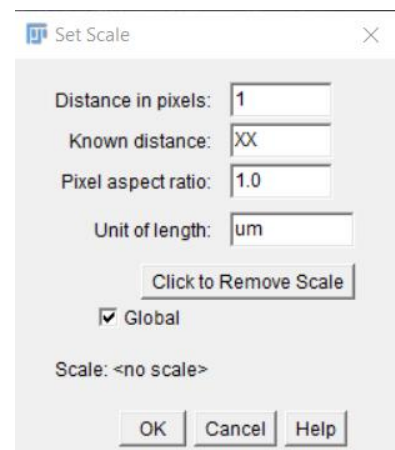
2. **Optativo – Descontar el ruido de oscuridad de la cámara CCD - Ver apéndice!**

3. **\*\*Si no lo hizo antes o no usó la opción global para definir la escala espacial.\*\***  
**Definir la escala espacial** de la imagen usando la calibración previa y el comando:

#### Analyze - Set scale.

Distance in pixels: 1 (o distancia conocida en pixeles)  
Known distance: el tamaño del pixel (o distancia conocida en la escala de unidad elegida)  
Pixel aspect ratio: 1  
Unit of length: nm ( o la unidad en que tienen el tamaño del pixel, m, cm, mm, nm etc...  $\mu\text{m}$  se anota como um)

Como todas las imágenes abiertas tienen la misma escala, se puede definir a la escala como **Global**, de esta manera se toma la escala establecida como la misma para todas las imágenes.



### 4. Confeccionar el perfil de intensidad

Para calcular el diámetro de las partículas se puede hacer un perfil de intensidades sobre la imagen. Para ello, seleccionamos una microesfera en la imagen, es importante seleccionar microesferas que estén en foco y que estén aisladas y trazamos una línea que pase por su centro. Luego, seleccionamos en el FIJI **Analyze – Plot profile** y aparecerá un gráfico del perfil de intensidad. Es conveniente hacer varios perfiles en distintas direcciones para poder informar como diámetro un promedio con su desviación.

**Exportar el perfil de intensidad** para analizarlo en algún software de procesamiento de datos. Para ello en la misma ventana del perfil, ir a **Data – Save as** – se puede guardar como archivo **csv o txt**.

## 5. Estimar el diámetro de la imagen de la microesfera

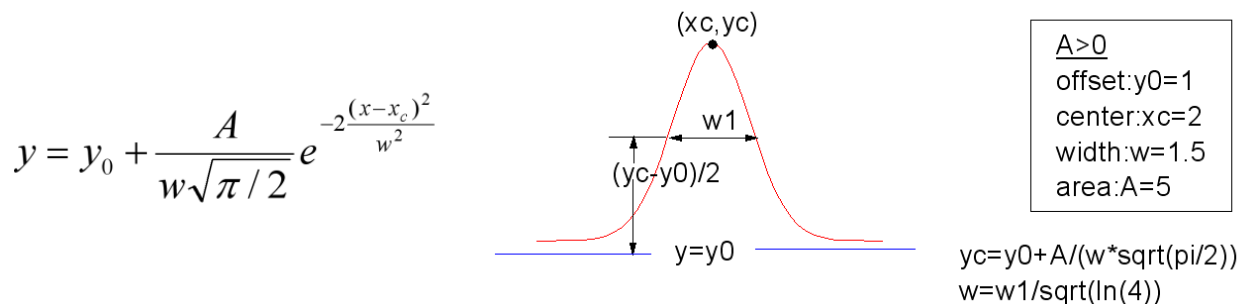
Una forma de estimar el diámetro de la imagen de la microesfera, es definirlo como el **ancho a mitad altura del perfil de intensidades**. Para determinar el ancho a mitad altura a partir del perfil de intensidades:

### Opción 1

En el perfil generado por FIJI, con el cursor podemos ver la altura. Luego nos paramos a mitad de altura y anotamos los valores laterales: la distancia entre ellos es el ancho a mitad de altura, que puede asociarse al diámetro de las esferas.

### Opción 2 – RECOMENDADO!

Otra opción (más precisa) para determinar el ancho a mitad altura, es **ajustar el perfil por una gaussiana** (ecuación de la figura 3).



**Figura 3:** Función Gaussiana para el ajuste de los perfiles de intensidad. En este caso, **w1** corresponde al ancho a mitad altura.

Para ello exportar los datos y realizar el ajuste gaussiano empleando algún software de análisis de datos. Notar que se trata de un ajuste no lineal y se debería dar una propuesta inicial para los parámetros de ajuste. Si se usa la ecuación de la figura 3 para ajustar los datos tiene 4 parámetros de ajuste:

- $y_0$  que es el nivel basal,
- $x_c$  que es el promedio y es la posición del centro de la campana,
- $A$  que es el área debajo de la curva
- $w^2$  que es la varianza y está relacionada con el ancho a mitad de altura, que en la figura 3 se nombró como **w1**.

Conociendo **w** del ajuste se puede estimar el diámetro como:  $w1 = w \cdot \sqrt{\ln(4)}$

**Resultados parte A2, completar especificando errores y unidades:**

Valor nominal del diámetro de las microesferas ( $\mu\text{m}$ )	Valor experimental promedio
0.04	
0.5	
3	

**PARTE A.3.** Compare el valor medido con el valor nominal de las microesferas y discuta las diferencias observadas. **Para responder:**

1. ¿Se puede medir el tamaño de todas las microesferas a partir de las imágenes tomadas?
2. ¿Cuál cree que es el límite de resolución del microscopio? Estime la resolución del microscopio usando el objetivo 40x NA 0.75.
3. Usando el mismo microscopio y lente objetivo: ¿De qué tamaño se observaría una microesfera de diámetro nominal 200 nm?
4. ¿Y una de diámetro nominal 1.5  $\mu\text{m}$ ?

## APENDICE

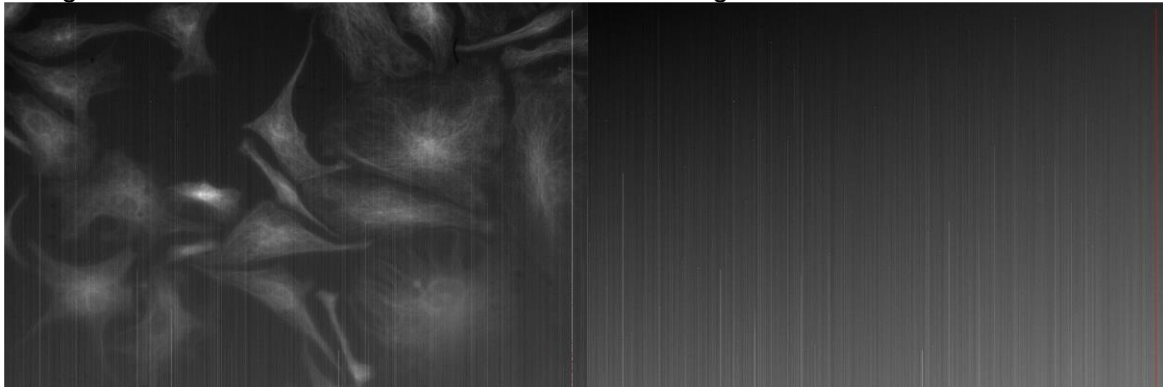
### Restar la imagen de ruido de la cámara a una imagen.

Para esta parte se utiliza la imagen del ruido de oscuridad de la cámara CCD, obtenida sin iluminar la muestra: ruido\_oscuridad\_camara\_CCD.tiff

1. Para este paso tienen abrir dos imágenes: la imagen a la cual se le quiere restar el ruido de la cámara y la imagen de ruido de la cámara CCD. Por ejemplo, tienen las imágenes:

Imagen cubo excitación en azul

imagen ruido de la cámara CCD



### 2. Convertir las imágenes a 32bit: [Image – Type –32bit](#)

Una vez abiertas ambas imágenes: PASAR IMÁGENES A 32bit - IMPORTANTE!!!

La escala **32bit o double** posibilita trabajar con números decimales y negativos (números reales).

**8bit** tiene una escala de grises de 256 niveles, todos enteros entre (0-255)

**12bit** tiene una escala de grises de 4096 niveles, todos enteros entre (0-4095)

**16bit** tiene una escala de grises de 65536 niveles, todos enteros entre (0-65535)

### 3. Restar las dos imágenes píxel a píxel:

[Process – Image Expression Parser](#) abre ventana en donde debo cargar las imágenes con las cuales quiero operar. Se nombran con letras: A, B etc. Esta ventana permite realizar muchas operaciones con múltiples imágenes al mismo tiempo. Muy útil!!

## Process – Image Expression Parser

Si  $A =$  imagen cubo y  $B =$  imagen ruido cámara entonces calculo  $A - B$

**Escribir formula** →

**Elegir imagen** →

**Hacer click para agregar imágenes (letras)** →

**Una vez escrita la formula hacer click aca** →

Image Expression Parser - v2.2

Expression: A-B

A: cubo\_azul.tif

B: control.tif

Enter an expression using canonical mathematical functions, and capital single letters as variable specifying the chosen image. ImgLib algorithms are also supported.

Examples:

- $2^*A$
- $A^*(B+30)$
- $\text{sqrt}(A^2+B^2)*\text{cos}(C)$
- $A > B$
- $\text{gauss}(A, 0.8)$

Supported ImgLib algorithms:

Description	Syntax
Gaussian convolution	$\text{gauss}(\text{img}, \text{sigma})$
Floyd-Steinberg dithering	$\text{dither}(\text{img})$
Image normalization (sum to 1)	$\text{normalize}(\text{img})$

Supported functions:

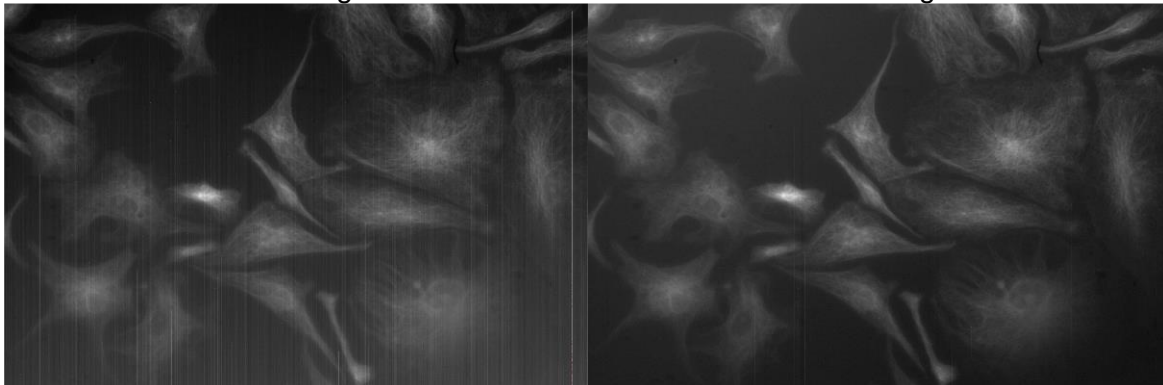
Description	Syntax
Euler constant	e
$\pi$	pi

Quit Parse

Esta función genera una nueva ventana con la imagen de  $A - B$  que se puede guardar como un tiff

### 3. Guardar la imagen obtenida en el paso anterior. **File- Save as - tiff**

**ANTES** de restarle la imagen de ruido **LUEGO** de restarle la imagen ruido!!



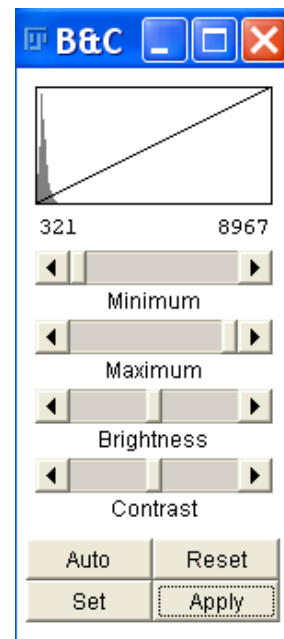


#### 4. Ajustar parámetros de la imagen

Después de realizar la resta entre imágenes es posible que se deba ajustar el rango de la escala de intensidades para mejorar el contraste y visualización de la imagen.

##### Image – Adjust – Brightness/Contrast

Variar el nivel del mínimo y máximo



También se puede cambiar la escala de colores: **Image – LookingTable—Red o HiLo o green** (por ej. Red pone escala de rojos)

Una escala MUY recomendable para usar es la: **HiLo** porque indica:

- en azul los píxeles de la imagen que tienen un valor de intensidad menor o igual al valor **mínimo** especificado en la escala de intensidades
- en rojo los píxeles tienen un valor de intensidad mayor o igual al valor **máximo** especificado en la escala de intensidades
- el resto de los píxeles con valores entre el mínimo y el máximo, lo indica en escala de grises.

Escala HiLo

