

Tesis de diploma

Procesamiento e interpretación  
de imágenes  
en micro-flujos bacterianos

Carlos M. Pérez Penichet

Tutor: Dr. Ernesto Altshuler  
Asesor Científico: Dr. Eric Clément

*Facultad de Física. Universidad de La Habana*

C. de La Habana, 2009



# Resumen

Se aplica un grupo de técnicas de procesamiento digital de imágenes, ideadas o modificadas para esta situación específica, a mediciones de materia activa en canales microfluídicos; estas son empleadas para estudiar las propiedades del flujo establecido en una celda microfluídica real así como para evaluar cuantitativamente un nuevo fenómeno de rompimiento de simetría en micro-flujos de bacterias.

# Índice general

Agradecimientos	IV
<b>1. Introducción</b>	<b>1</b>
1.1. Materia activa . . . . .	1
1.2. Procesamiento digital de imágenes . . . . .	2
1.3. Objetivos . . . . .	3
<b>2. Materiales y métodos</b>	<b>4</b>
2.1. Montaje experimental . . . . .	4
2.1.1. Celda microfluídica . . . . .	4
2.1.2. Bacterias y medio de natación . . . . .	6
2.2. Adquisición y procesamiento de imágenes . . . . .	8
<b>3. Caracterización de la celda</b>	<b>10</b>
3.1. Flujo a bajo número de Reynolds . . . . .	10
3.2. “Tracking” de micro-esferas . . . . .	11
<b>4. Dinámica de bacterias en la celda</b>	<b>16</b>
4.1. Identificación individual de bacterias . . . . .	16
4.2. Resultados . . . . .	19
<b>5. Conclusiones</b>	<b>23</b>
<b>Bibliografía</b>	<b>24</b>
<b>A. Algoritmo de conteo</b>	<b>26</b>

# Agradecimientos

Este trabajo no hubiera sido posible sin la ayuda de muchas personas. En primer lugar quisiera agradecer muy especialmente a mi madre y a Gilberto por todo el apoyo que me han brindado siempre; agradecer a Altshuler y a Claro por haber sido mis tutores y amigos a lo largo de toda la carrera. Quisiera expresar mi agradecimiento a Clément y a todo su equipo de trabajo en París por la enorme colaboración brindada. A Elena, Julio, Claudia y toda mi familia.

Me gustaria agradecer tambien a mis compañeros de aula y amigos por su presencia: Susana, Noslen, Ana Karla, Ernesto, Alberto, Alejandro y Arturo. A mis colegas en la investigación y a todas aquellas personas que han contribuido al desarrollo de este trabajo: muchas gracias.

# Capítulo 1

## Introducción

### 1.1. Materia activa

La actividad científica en el campo que se conoce como *materia activa* ha despertado un gran interés en los últimos años. Un creciente número de investigadores de la física está tomando parte en estas pesquisas con resultados muy favorables. Un área en que esto es especialmente cierto es la relacionada con la motilidad (o natación) de bacterias, donde la formación en biofísica y las habilidades en el procesamiento digital de imágenes son particularmente útiles.

Existen avances significativos en esta área con amplias perspectivas de aplicación. Entre ellos los más destacados están relacionados con el transporte bacteriano en la propagación de infecciones patógenas [3, 10, 17] ya sea en el tracto urinario (p.e. *pielonefritis*), en pacientes con catéter o para la contaminación de fuentes de agua potable, por solo citar algunos. La formación de biocapas bacterianas [1, 8, 11, 12, 15] tiene potenciales aplicaciones tecnológicas de importancia y por tanto recibe una gran atención investigativa. Algunos trabajos de motilidad bacteriana permiten concebir dispositivos capaces de clasificar bacterias según ciertos criterios sin necesidad de emplear complicados dispositivos de bombeo externo, válvulas o gradientes químicos para dirigir el movimiento de las bacterias. Esto constituye, quizá, el primer paso en la construcción de micro dispositivos para ensayos biológicos o biosensores.

Una herramienta universalmente utilizada para la cuantificación de la motilidad en la materia activa es el procesamiento digital de imágenes (PDI).

## 1.2. Procesamiento digital de imágenes

El procesamiento digital de imágenes es un tema apasionante desde varios puntos de vista. Se trata de una herramienta multidisciplinaria por naturaleza. En la captura de una imagen intervienen diversos procesos físicos y electrónicos [5, 6] que deben ser comprendidos para la correcta interpretación de la imagen y los resultados que eventualmente se obtengan a partir de su tratamiento. La imagen digital capturada debe entonces ser procesada por una computadora para extraer las magnitudes de interés. En estos dos procesos están involucradas muchas disciplinas; desde la física del estado sólido, óptica, dispositivos electrónicos, electrónica digital y analógica hasta la programación y el diseño de algoritmos pasando por el análisis matemático y el álgebra [4, 5, 6].

Por otra parte, el procesamiento de imágenes está muy cercanamente relacionado con otros campos, entre los cuales, uno de los más significativos es el reconocimiento de patrones. Son herramientas útiles para el procesamiento de imágenes las redes neurales y todo tipo de forma de inteligencia artificial.

Las aplicaciones son muy variadas tanto en la industria como en la academia [7]. Numerosas son las líneas de producción controladas casi totalmente por sistemas de visión por computadoras o los sistemas automatizados de control de calidad basados en procesamiento de imágenes. Una de las aplicaciones industriales más notables es probablemente en los sistemas automáticos de control de tráfico.

Para la ciencia, las bondades del procesamiento digital de imágenes resultan muy atractivas, principalmente como herramienta de medición. La posibilidad de realizar observaciones a intervalos regulares con muy alta o muy baja frecuencia y de forma automática o la habilidad de manejar grandes volúmenes de datos muy rápidamente, todo ello con una intervención mínima sobre el sistema de interés son sólo algunas de sus ventajas.

Los avances en los últimos tiempos de las tecnologías de adquisición de imágenes y de los dispositivos semiconductores en general, han hecho que estos sistemas estén al alcance de cualquier laboratorio. Hoy es posible realizar mediciones de gran calidad con sistemas de adquisición y computadoras de propósito general.

Todo lo mencionado antes hace de esta una herramienta ideal para ser aplicada al caso específico de la materia activa y particularmente en estudios de motilidad bacteriana.

En este trabajo todas las operaciones de tratamiento de imágenes se han

realizado con el apoyo de ImageJ [13], un software para el procesamiento de imágenes de dominio público (software libre) basado en Java.

### 1.3. Objetivos

La microfluídica es un campo multidisciplinario con amplias perspectivas de aplicación en la microbiología, sensores y actuadores [18]. La física del mundo de la microfluídica se caracteriza por el dominio de los efectos de tensión superficial y un muy bajo número de Reynolds, lo que trae como consecuencia la aparición de flujos laminares.

El objetivo general de esta tesis consiste en ganar familiaridad con la física de la materia activa y de la micro-fluidez, al mismo tiempo que ganar experiencia con las técnicas de procesamiento de imágenes específicas de estos dos campos. Los objetivos específicos se pueden formular así:

- Abordar la creación de métodos de procesamiento de imágenes para el análisis de flujos en celdas microfluídicas.
- Combinar estos resultados con las ecuaciones de hidrodinámica para “reconstruir” el flujo en una celda microfluídica real.
- Utilizar los resultados derivados de lo antes mencionado para investigar nuevos fenómenos en un escenario concreto de materia activa: los micro-flujos bacterianos.

# Capítulo 2

## Materiales y métodos

### 2.1. Montaje experimental

#### 2.1.1. Celda microfluídica

La celda microfluídica ha sido construida mediante la deposición de una capa de un polímero transparente llamado *polidimetilsiloxano* (PDMS) de unos 7mm de espesor, sobre una lámina de vidrio. Mediante un proceso de fotolitografía se ha creado, dentro de la capa de PDMS, un canal con sección transversal rectangular ( $\sim 200\mu\text{m}$  de ancho y  $20\mu\text{m}$  de altura) y una longitud de 1cm aproximadamente. Este canal posee, además, un estrechamiento en su centro hasta aproximadamente  $45\mu\text{m}$  en la dirección del ancho, (Figura 2.2) mientras que la altura del canal permanece inalterada ( $20\mu\text{m}$  aproximadamente). La superficie interior del canal es toda de PDMS para evitar la adherencia de las bacterias al vidrio, ya que es conocido que el fenómeno no ocurre en ese material.

A pesar de que se ha puesto gran empeño en la fabricación del canal, la naturaleza del método introduce irregularidades e imperfecciones en las paredes interiores; estos defectos habrán de tenerse en cuenta en todo momento al trabajar, en particular al intentar modelar el flujo que circula por su interior en la sección 3.2. Como se verá, es este un elemento importante que motiva la elección de una solución numérica de las ecuaciones de Navier-Stokes en lugar de una solución analítica.

En ambos extremos del canal se han insertado tubos de acero inoxidable de 1cm de longitud y 1mm de diámetro, a los que se han acoplado tubos flexibles de teflón, uno de los cuales conecta con el reservorio de fluido y el

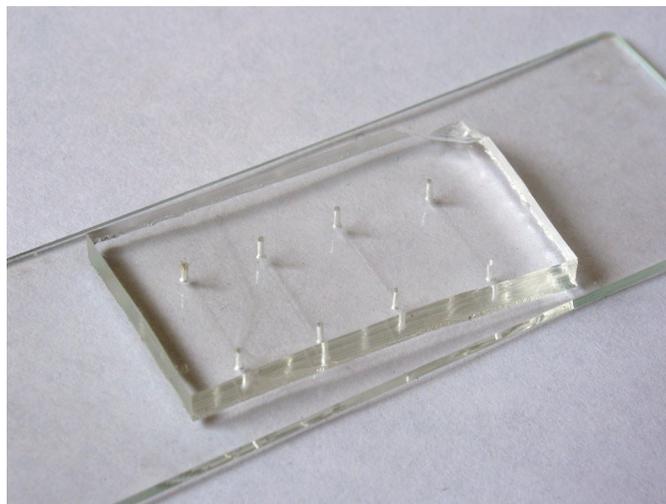


Figura 2.1: Fotografía de la celda microfluídica utilizada para los experimentos.

otro tiene el extremo abierto.

A causa de las dimensiones del canal y del estrechamiento en el centro del mismo es fácil imaginar que el flujo que circula por la celda es extremadamente pequeño. En los experimentos que aquí se presentan no se han sobrepasado los  $0,9 \mu\text{l/s}$ .

Regulando la altura de la columna de fluido en el tubo que tiene el extremo abierto en relación con la altura de la columna en el reservorio, y por tanto la diferencia de presión atmosférica entre ellas, es posible regular el flujo que atraviesa el canal. Debido a lo delicado de este procedimiento, es preciso hacerlo con un tornillo micrométrico si se desea mantener cierto control sobre el flujo.

Utilizar este mecanismo de control de flujo tiene el inconveniente de que es necesario calibrarlo de algún modo si se desea realizar un análisis cuantitativo. Es con este objetivo que al fluido donde nadan las bacterias se le ha adicionado cierta cantidad de micro-esferas de silicio de  $2\mu\text{m}$  y  $5\mu\text{m}$  de diámetro. En la sección 3.2 se describe cómo estas son utilizadas como trazadoras en la calibración del flujo que circula por la celda.

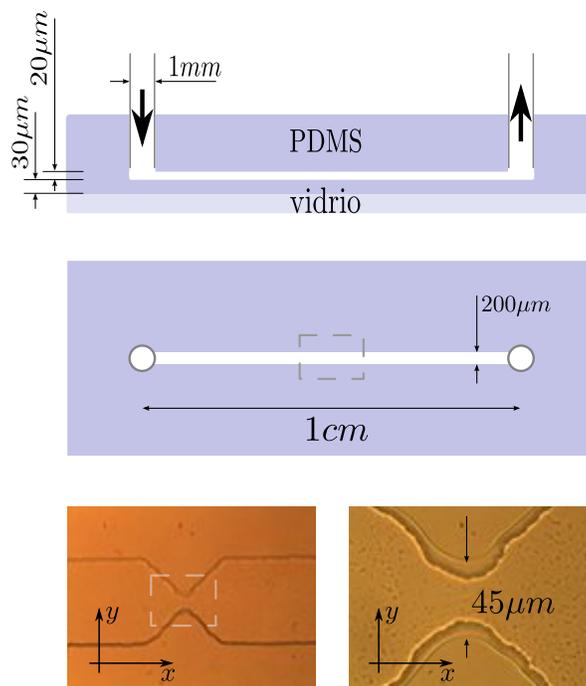


Figura 2.2: Esquema de la celda microfluídica. En el panel superior se ve un corte transversal del canal. En el panel central aparece una vista superior de la celda. La sección inferior muestra vistas superiores del estrechamiento del canal a través del microscopio a 100 y 400 aumentos (izquierda y derecha respectivamente).

### 2.1.2. Bacterias y medio de natación

El reservorio de fluido contiene un cultivo de Luria-Bertani, medio estándar en el cultivo de la *Escherichia coli*, bacteria utilizada en los experimentos. En el reservorio de fluido, además de las bacterias, se ha introducido cierta cantidad de micro-esferas de silicio para ser utilizadas como trazadoras según se mencionó en 2.1.1.

La *E. coli* habita en el intestino humano y de otros mamíferos. Desde que fue identificada en 1885 por el pediatra alemán Theodor Escherich, ha sido el objeto de innumerables investigaciones en fisiología bacteriana, virus bacterianos, genética de bacterias, síntesis de proteínas y más recientemente utilizada en la producción de proteínas con valor comercial en el campo de la ingeniería genética. Además de ser organismos relativamente simples, toda

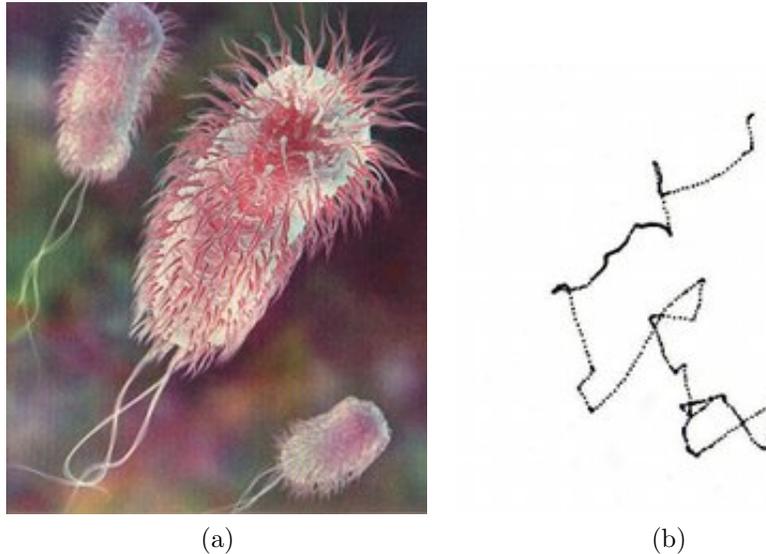


Figura 2.3: a) Recreación artística de la *Escherichia coli* mostrando sus flagelos en la forma en que los emplea para la natación. b) Ejemplo de trayectoria de una célula de *E. coli* durante el régimen de *tumble & run*.

esta atención hace de la *E. coli* uno de los organismos vivos más estudiados y mejor comprendidos; aún así, todavía es posible encontrar fenómenos muy sofisticados relacionados con ella [2].

La *Escherichia coli* es una bacteria bastante pequeña, tiene la forma de un cilindro con los extremos redondeados, de aproximadamente  $2,5\mu\text{m}$  de largo y  $0,8\mu\text{m}$  de diámetro. La parte externa de la membrana celular está cubierta por dos tipos de filamentos, unos finos y cortos le permiten adherirse a ciertas superficies mientras que otros más gruesos y largos con forma helicoidal, llamados flagelos, le permiten nadar (figura 2.3a).

Cuando nadan, estas bacterias lo hacen en la dirección paralela al eje de simetría de su cuerpo durante algo más de un segundo; pasan a un movimiento errático durante una fracción de segundo y recupera la estabilidad para comenzar el proceso en una nueva dirección (figura 2.3b). Los periodos de estabilidad se conocen como *runs* y los periodos erráticos son llamados *tumbles*. El mecanismo subyacente en el mencionado régimen de *tumble & run* es de hecho muy interesante [2]. Durante el periodo estable (*runs*) todos los flagelos rotan en la misma dirección, en contra de las manecillas del reloj si se observa la célula desde atrás. Los movimientos erráticos (*tumbles*) ocu-

ren cuando, producto de que han rotado a favor de las manecillas del reloj, los flagelos se enredan entre sí evitando que la célula se desplace. Un nuevo *run* comienza cuando la bacteria ha logrado restablecer el movimiento anti horario de los flagelos, pero para entonces su cuerpo ha tomado una nueva orientación en el espacio y por lo tanto ahora se desplazará en una nueva dirección.

## 2.2. Adquisición y procesamiento de imágenes

La celda descrita en 2.1.1 está colocada en la platina de un microscopio óptico acoplado a una cámara digital que captura videos en colores directamente a una computadora con un tamaño de  $800 \times 600$  píxeles, a una frecuencia entre 20 y 23 cuadros por segundo. Las imágenes han sido tomadas con un ocular de  $\times 10$  y objetivos entre los valores de  $\times 10$  y  $\times 40$ , obteniéndose imágenes entre 100 y 400 aumentos. La celda se ilumina desde abajo, de modo que la luz llega al lente objetivo tras atravesar el objeto de estudio. Como consecuencia de esto, se tiene un grupo de bacterias que aparecen en las imágenes como puntos brillantes mientras que el resto aparece como puntos oscuros, dependiendo de la profundidad a la que se encuentran nadando dentro de la celda. Este hecho es aprovechado en la sección 4.1 para el conteo de ambos grupos, aumentándose así la profundidad de campo “efectiva” del microscopio, lo que constituye una ventaja si se pretende contar todas las bacterias que se encuentran en la celda.

En todo el procesamiento de imágenes se ha utilizado ImageJ [13] como software para el procesamiento de imágenes. ImageJ es un software de dominio público (software libre) basado en Java, desarrollado en el *National Institute of Mental Health* en los Estados Unidos. A pesar de estar orientado inicialmente al tratamiento de imágenes medicas, su uso se ha extendido mucho más allá de las fronteras de la imagenología médica y hoy en día puede considerarse un estándar en para la ciencia. ImageJ puede correr en cualquier arquitectura que soporte una máquina virtual de Java (Windows, Linux, Mac OS, etc). El código fuente se encuentra disponible para ser modificado o estudiado, el software principal puede ser extendido mediante una arquitectura de *plug-ins*, varias decenas de los cuales están disponibles también a través de la red [9]. Existen *plug-ins* para resolver casi cualquier tarea de procesamien-

to de imágenes. Además, el trabajo con el programa puede ser automatizado en buena medida mediante *macros* que permiten ejecutar todas las funciones de ImageJ (incluida la mayoría de los *plug-ins*) de manera programática.

Se han desarrollado y modificado macros (Apéndice A) para obtener las funcionalidades específicas necesarias para nuestro objetivo de estudio. Se muestran detalles sobre el procesamiento de imágenes son mostrados en las secciones 3.2 y 4.1.

En todos los experimentos descritos se toman imágenes digitales de objetos de dimensiones micrométricas a través del sistema óptico de un microscopio y son utilizadas para realizar mediciones sobre dichos objetos. En la realización de estas mediciones es necesario establecer un vínculo entre las dimensiones de los objetos en la imagen digital y las dimensiones reales de los mismos, es decir: es necesario calibrar las coordenadas espaciales de las imágenes en relación con las coordenadas espaciales reales. Esta calibración consiste simplemente en fijar una escala que determine, por ejemplo, que  $1\mu\text{m}$  equivale a 30 píxeles en la imagen digital; de esta forma toda medición realizada sobre la imagen puede ser re-escalada a dimensiones reales muy fácilmente.

En nuestro caso se ha empleado una esfera calibrada de  $70\mu\text{m}$  de diámetro como patrón. Al comienzo de los experimentos se han tomado imágenes de este patrón fijando la óptica a ser utilizada en el ensayo. Posteriormente se ha fijado la escala de las imágenes empleando las fotografías del patrón y con la asistencia de las facilidades que posee ImageJ con este fin.

# Capítulo 3

## Caracterización de la celda microfluídica

### 3.1. Flujo a bajo número de Reynolds

El número de Reynolds  $Re$  es la razón entre las fuerzas inerciales y las fuerzas viscosas actuando en un fluido [14]. El flujo laminar ocurre cuando la componente viscosa domina sobre la inercial, que es la principal causa de que aparezcan vórtices y por tanto, turbulencia.

Dadas las dimensiones de la celda microfluídica, cabe esperar que todos los experimentos hayan sido realizados perfectamente dentro de la zona de régimen laminar; el régimen turbulento se establece, en un conducto, aproximadamente entre  $Re \sim 10^3$  y  $Re \sim 10^4$  [14]. Un análisis dimensional grueso permite calcular aproximadamente el valor del número de Reynolds en nuestro caso.

El número de Reynolds para el flujo en un conducto está dado por (3.1); donde  $Q$  es el flujo dado en  $\text{m}^3/\text{s}$ ,  $V$  es la velocidad media del fluido,  $A$  es el área de la sección transversal del conducto,  $\nu$  es la viscosidad del fluido dada en *Poise* o  $\text{m}^2/\text{s}$ ;  $D$  es una dimensión característica que se conoce como “diámetro hidráulico” y en el caso de un conducto rectangular está dado por:  $D = 4A/P$  donde  $P$  es el perímetro de la sección transversal del conducto que se encuentra en contacto con el fluido.

$$Re = \frac{QD}{\nu A} = \frac{VD}{\nu} = \frac{4VA}{\nu P} \quad (3.1)$$

de donde, luego de sustituir valores de nuestro dispositivo experimental,

se obtiene en el mayor de los casos:  $Re \sim 10^{-7}$ .

Esto significa que aún para los mayores flujos alcanzados en el experimento, el número de Reynolds permanece muy por debajo del valor crítico a partir de cual aparece la turbulencia y, por tanto, todos los experimentos pueden considerarse realizados bajo un estricto régimen laminar. En la sección 3.2, se presenta una metodología para reconstruir numéricamente el flujo de líquido en nuestras condiciones experimentales específicas, para lo que se aprovecha el resultado antes obtenido.

### 3.2. Reconstrucción del flujo a través del “tracking” de micro-esferas

Desde el punto de vista teórico, el problema de la celda microfluídica puede ser modelado como un flujo bidimensional estacionario de un líquido incompresible de viscosidad  $\nu$  que se mueve dentro del canal con velocidad  $\vec{v}(x, y)$  sujeto a una presión  $p(x, y)$ .

Como es bien conocido, el movimiento de dicho fluido está regido por las ecuaciones de Navier-Stokes:

$$\begin{aligned} \frac{\partial \vec{v}}{\partial t} + \vec{v} \cdot \nabla \vec{v} &= \nabla p + \nu \nabla^2 \vec{v} \\ \nabla \cdot \vec{v} &= 0 \end{aligned} \quad (3.2)$$

De las soluciones de estas ecuaciones se obtiene un campo de velocidades, estacionario en este caso,  $\vec{v}(x, y)$ . La solución de (3.2) en régimen laminar, es decir, sin turbulencia, para un canal sin estrechamiento (o lejos del estrechamiento) es perfectamente conocida: Se obtiene un perfil de velocidad parabólico cuyo eje de simetría coincide con el eje  $x$  (figura 2.2, de modo que la velocidad en el centro del canal es máxima y va disminuyendo hasta cero en las fronteras [14]. Sin embargo, la solución en la zona del estrechamiento requiere consideraciones especiales, máxime si se desea tomar en cuenta las irregularidades del canal producto del proceso de construcción, inevitablemente se hace necesario recurrir a una solución numérica con condiciones de contorno basadas en observaciones experimentales.

En la sección 2.1 se mencionaban las micro-esferas agregadas al fluido natatorio con el objetivo de calibrar el flujo en la celda.

Debido al bajísimo número de Reynolds del canal (sección 3.1) el flujo que se establece es casi perfectamente laminar; esto unido al tamaño y la

pequeña masa (densidad prácticamente igual a la del fluido) de las micro esferas trazadoras, permite asumir que estas son arrastradas totalmente por el flujo y por tanto son un muy buen trazador.

Siguiendo las micro-esferas a lo largo de su recorrido por el canal es posible conocer el perfil de velocidad del fluido a lo largo de la traza de la micro-esfera, es decir, la velocidad del fluido en cada punto del espacio por el que pasa la esfera.

Para el seguimiento de las micro-esferas se ha empleado el *plug-in* de ImageJ MTrack2 [16]. El programa rastrea las esferas detectando sus posiciones en cada cuadro de un video; conecta la trayectoria de cada esfera de un cuadro dado con la esfera del cuadro siguiente más cercana a su posición en el cuadro actual y repite este proceso hasta el final de la secuencia. Como resultado final se obtiene una lista de trayectorias. Una trayectoria consiste en la lista de las coordenadas de una esfera en cada cuadro del video (figura 3.1b).

Con esta información y conociendo el intervalo de tiempo que separa un cuadro del video del siguiente, se obtiene fácilmente la velocidad de la esfera a lo largo de su trayectoria.

La figura 3.1b muestra las trayectorias de varias esferas a su paso cerca del centro del estrechamiento del micro-canal. Estas trayectorias se han obtenido siguiendo el procedimiento explicado antes. La figura 3.1c muestra un ejemplo de la evolución temporal de las componentes  $x$  e  $y$  de la velocidad de una esfera a su paso por el estrechamiento del canal siguiendo una trayectoria de izquierda a derecha como las que aparecen en la figura 3.1b. Las fluctuaciones en la velocidad obtenida de esta manera son notables; para eliminar, en la medida de lo posible, los efectos indeseables de estas fluctuaciones se ha empleado un promedio local en una vecindad de unos  $4\mu\text{m}$  de ancho, a la curva obtenida le llamaremos  $\bar{v}_x$  (figura 3.1c). Es notable el aumento de velocidad en el eje  $x$  hacia el centro causado por el estrechamiento del canal; nótese también que el paso súbito de la esfera por la parte más estrecha del canal causa una disminución a cero de la componente  $y$  de la velocidad.

Este resultado permite calibrar el flujo, es decir, conocer el valor de velocidad del líquido, o lo que es equivalente el volumen de fluido que atraviesa la sección transversal del canal por unidad de tiempo ( $Q$ ). En lo sucesivo, por conveniencia, se tomará el valor máximo de  $\bar{v}_x$  como valor representativo de un flujo dado; es directo obtener a partir de  $\bar{v}_x^{max}$  el valor de  $Q$  correspondiente.

Con el objetivo de conocer en detalle las características del flujo en la celda microfluídica, se ha estudiado la solución de las ecuaciones de Navier-

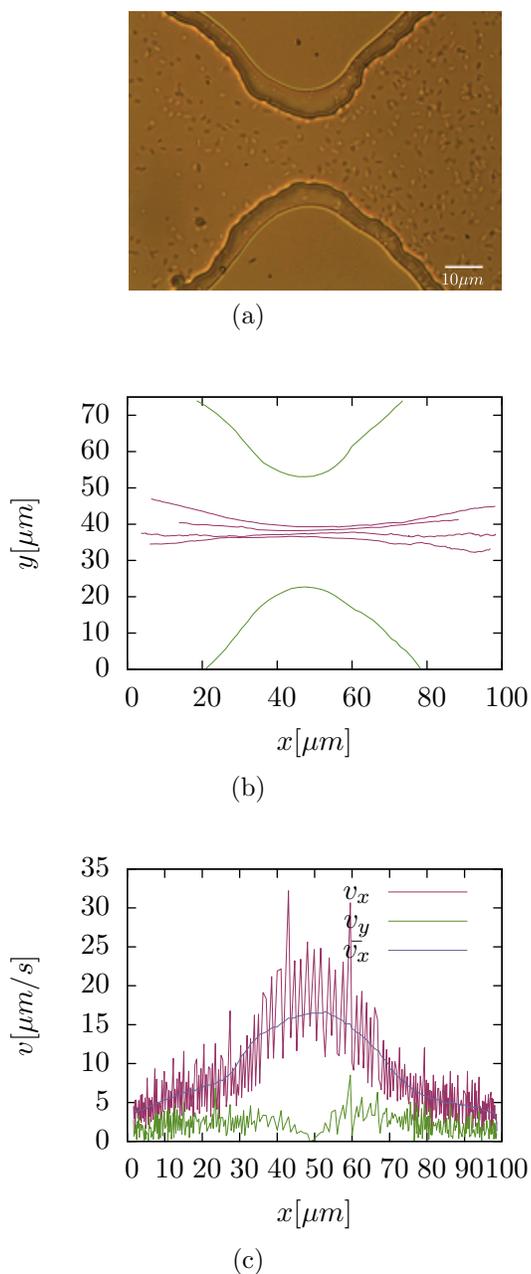


Figura 3.1: a) Fotografía del estrechamiento del canal. b) Ejemplo de trayectorias obtenidas mediante MTrack2. c) Ejemplo de velocidad de una esfera en función del tiempo a medida que atraviesa el canal longitudinalmente de izquierda a derecha siguiendo una trayectoria como las de la figura 3.1b.

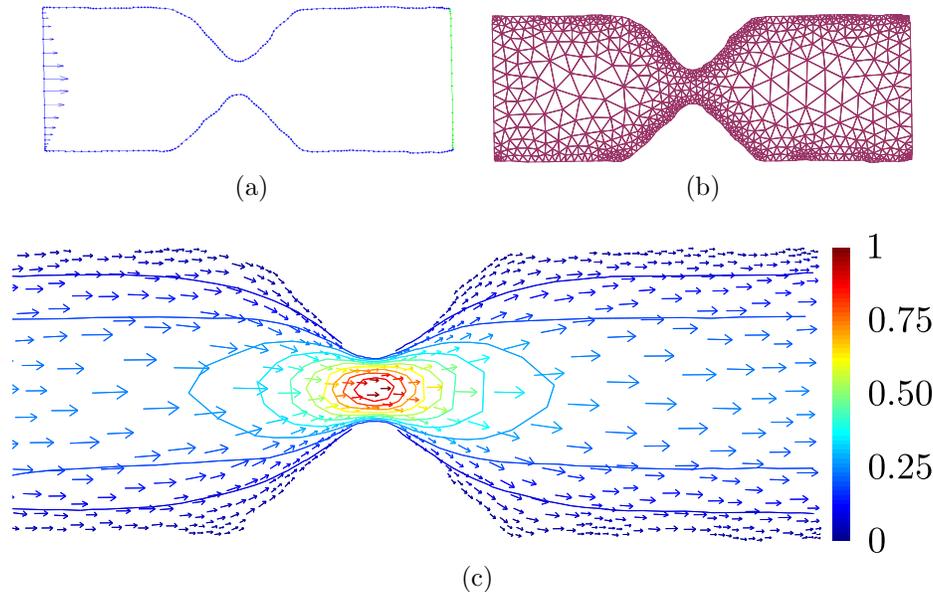


Figura 3.2: a) Condiciones de frontera impuestas para resolver las ecuaciones de Navier-Stokes. A los puntos de color azul se les ha fijado la velocidad y a los de color verde la presión. b) Malla empleada para resolver las ecuaciones de Navier-Stokes en el canal. c) Campo de velocidades resultante.

Stokes (3.2) para su geometría particular. Debido a que las fronteras del canal presentan irregularidades y asimetrías (figura 3.2a) originadas en el proceso de fotolitografía, la solución analítica ha sido descartada en favor de una solución numérica a la que se “inyectan” datos experimentales derivados del “tracking” de micro-esferas. Hasta donde sabemos, esto constituye una aproximación original al problema. La solución numérica es proporcionada por MatLab y un paquete denominado Navier2d que es capaz de resolver las ecuaciones de Navier-Stokes en dos dimensiones, como su nombre indica. El programa opera sobre una malla (figura 3.2b) que cubre el espacio que ocupa el fluido. Esta malla es generada por el propio software una vez que el usuario introduce las fronteras de la geometría de interés.

Adicionalmente, es necesario proporcionar al programa condiciones iniciales y de frontera. En el caso de las condiciones iniciales es posible simplemente introducir condiciones de flujo nulo y permitir que las condiciones de frontera estabilicen el flujo con el paso del tiempo. En el caso de las condiciones de frontera, se ha proporcionado la condición de no deslizamiento al establecer

como nula la velocidad del fluido en contacto con la frontera de la celda (puntos azules en la figura 3.2a). A lo largo del borde lateral de salida del fluido (derecha) se imponen condiciones de presión constante para permitir que el fluido escape libremente (puntos verdes en la figura 3.2a). Todas estas condiciones han sido obtenidas de datos o ligaduras existentes en el sistema, pero que no son específicas para el experimento particular. La condición de velocidad en el borde de entrada del fluido es precisamente la que puede utilizarse para establecer el nexo necesario con nuestros experimentos concretos. Teóricamente, el perfil de velocidad en este extremo ha de ser parabólico, como se vio en la sección 3.1. Esto permite realizar un ajuste por mínimos cuadrados a una parábola conociendo la velocidad del fluido (mediante las esferas trazadoras) en varios puntos de la línea de frontera (puntos azules con saeta en la figura 3.2a). Estos puntos pueden obtenerse de la velocidad de las micro-esferas trazadoras, en el instante de atravesar la línea de la frontera de entrada de fluido (izquierda).

# Capítulo 4

## Dinámica de bacterias en una celda microfluídica

### 4.1. Identificación individual de bacterias

Se utiliza un algoritmo de detección y conteo automático de bacterias, perfeccionado en este trabajo (Apéndice A), que emplea las facilidades de ImageJ. Como se verá, su uso permite detectar un interesante fenómeno de ruptura de simetría en el experimento.

El algoritmo comienza acondicionando la secuencia al eliminar de cada cuadro del video los gradientes de iluminación de fondo y los objetos mucho menores que las bacterias; esto lo hace utilizando un filtro pasa-banda en el espacio de Fourier: Las mayores longitudes de onda en el espacio de Fourier corresponden a los gradientes de iluminación de fondo producidos por una iluminación no uniforme o por defectos en la óptica del microscopio, mientras que las menores longitudes de onda corresponden a los pequeños objetos. Eliminando las longitudes de onda extremas es posible obtener imágenes carentes de gradientes de iluminación de fondo y de pequeñas características indeseables, al tiempo que se preservan suficientes detalles para el conteo de las bacterias. Luego se realiza una renormalización de los niveles de iluminación de la imagen para que todos los cuadros de la secuencia tengan la misma iluminación media (figura 4.1a). Atendiendo a los efectos que tiene sobre la secuencia de video, esta etapa pudiera llamarse “de homogeneización espacio-temporal”.

A continuación se aplica un filtro de doble umbral (figura 4.1b) a cada

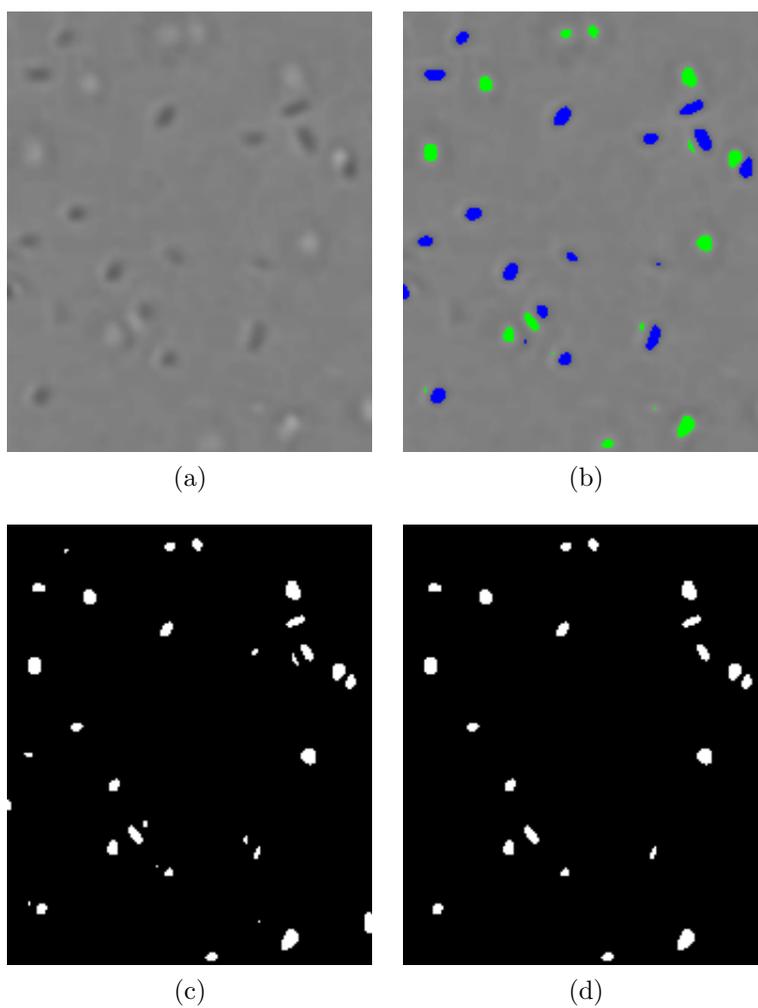


Figura 4.1: Ejemplo de aplicación del algoritmo de detección de bacterias. a) Imagen con campo homogeneizado por el filtro de Fourier. b) Filtro de doble umbral, las zonas claras aparecen señaladas en verde y las oscuras en azul. c) Filtro de doble umbral aplicado, tanto las zonas claras como oscuras aparecen como puntos blancos. d) Imagen final donde se han filtrado los puntos por tamaño, eliminándose posibles conteos espurios.

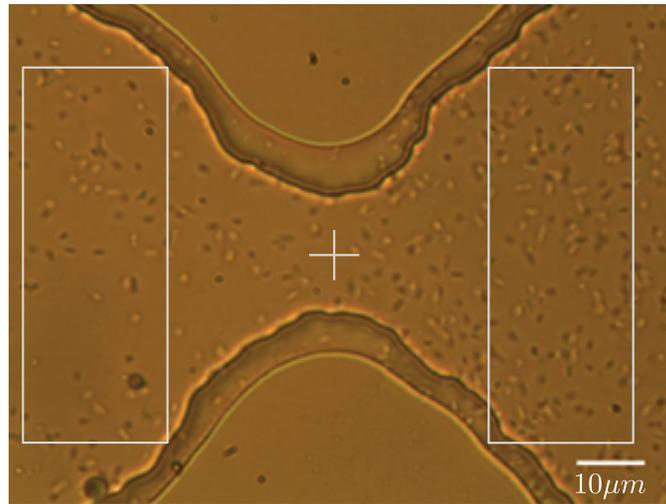


Figura 4.2: Regiones a los lados del canal en que se aplicó el procedimiento de conteo (rectángulos de contorno claro). Se muestra también el centro geométrico aproximado del canal mediante una cruz.

imagen. Este filtro transforma los píxeles de la imagen atendiendo a su nivel de iluminación. Son convertidos en píxeles blancos aquellos por encima o por debajo de los umbrales superior e inferior respectivamente. El resto los puntos de la imagen son transformados en píxeles negros. Como resultado, tanto las bacterias que aparecen como puntos brillantes como las que se muestran como puntos oscuros son transformadas en áreas de píxeles blancos (figura 4.1c). Nótese que este paso resulta en imágenes binarias (solo tiene píxeles blancos y negros) a partir de imágenes en escala de grises; por ello le llamaremos la etapa de binarización.

Este es un paso clave para aprovechar el enfoque del microscopio que ha sido elegido. Como se sabe, la profundidad de campo del objetivo de un microscopio es muy pequeña, de modo que suelen enfocarse correctamente solo las bacterias cercanas al fondo de la celda o las cercanas a la superficie superior de la misma. Aprovechando que la celda tiene solo  $20\mu\text{m}$  de altura, se enfoca aproximadamente en el centro de su altura: esto hace posible detectar las bacterias que nadan a todas las profundidades; aunque no todas queden perfectamente enfocadas, lo que no tiene consecuencias mayores en el conteo de bacterias. Probablemente debido a efectos de difracción, las que nadan cerca del fondo se ven oscuras mientras que las que lo hacen cerca de la

superficie superior se ven claras. Por tanto, se ha asumido el reto de detectar y contar tanto bacterias claras como oscuras.

Las imágenes que resultan del proceso de binarización descrito arriba son entonces suministradas al filtro de ImageJ *Analyze particles* con parámetros tales que los defectos remanentes en las imágenes (puntos blancos mucho mayores o mucho menores que el tamaño medio conocido de una bacteria) son eliminados, y cada una de las células es identificada (figura 4.1d). Este proceso da como resultado final el número de bacterias en la imagen.

En la figura 4.2 puede verse marcado con una cruz el centro geométrico aproximado del canal; las regiones de interés están colocadas equidistantes a él. Además sus centros están alineados con este punto en el eje horizontal. El algoritmo de conteo es aplicado a estas regiones en secuencias de 20s manteniendo el flujo constante para comparar la densidad de bacterias en ambas regiones. Las secuencias de 20s son seleccionadas de tal suerte que transcurren 10s antes de que una esfera trazadora cruce el centro del canal (muy cerca de la cruz de la figura 4.2) siguiendo una trayectoria como las de la figura 3.1b y los restantes 10s de la secuencia transcurren después del cruce. Esto garantiza la mejor aproximación al flujo obtenido según se mostró en la sección 3.2 durante toda la secuencia.

Se le ha llamado  $\hat{N}_l$  y  $\hat{N}_r$  al número de bacterias en la región izquierda y derecha respectivamente para un cuadro de la secuencia.

## 4.2. Procesamiento e interpretación de los resultados

Utilizando los datos de flujo obtenidos como se ha descrito en la sección 3.2 y el número de bacterias en las regiones mencionadas antes, es posible realizar un análisis cuantitativo de la dependencia de la “ruptura de simetría” en la concentración de bacterias con el flujo en la celda.

Para caracterizar la ruptura de simetría en la celda se ha definido el parámetro  $n$  según:

$$n = \frac{N_r - N_l}{N_r + N_l} \quad (4.1)$$

donde  $N_r$  es el número medio de células en la región de la derecha y  $N_l$  es el número medio de bacterias en la izquierda durante una secuencia de video de 20 segundos tomada manteniendo el flujo constante. En otras palabras,

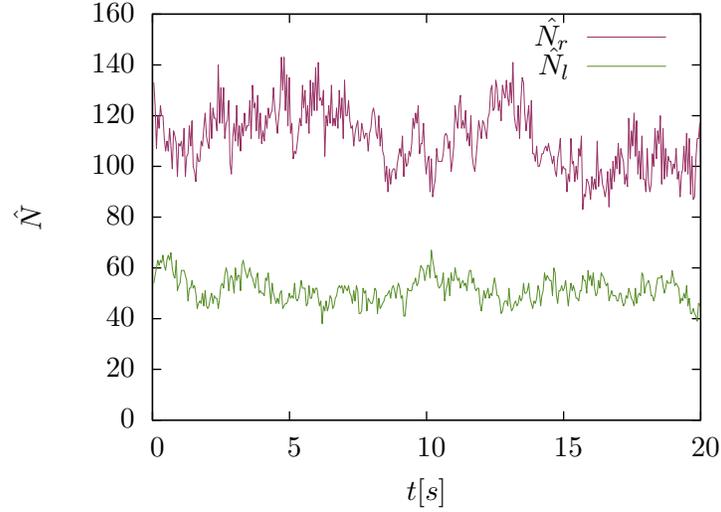


Figura 4.3: Evolución temporal de  $\hat{N}$  para las dos regiones mostradas en la figura 4.2 y para una secuencia de 20 segundos con flujo constante.

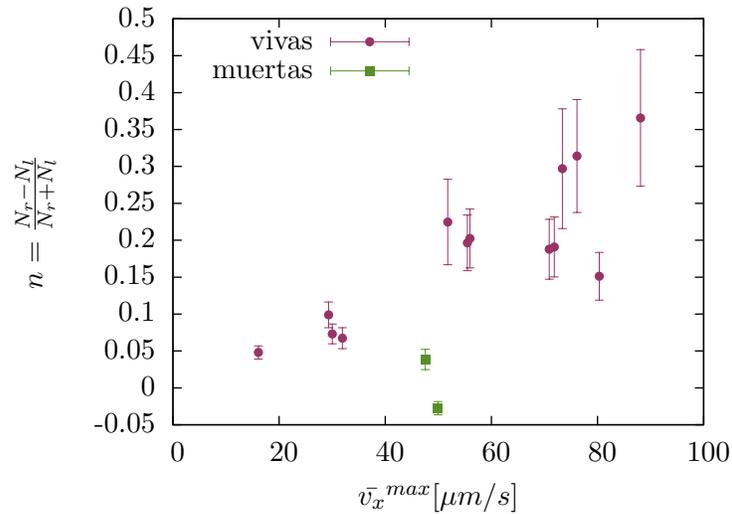


Figura 4.4: Nivel de ruptura de simetría en función de la velocidad del flujo en el centro del canal para bacterias vivas y muertas.

$N_{r|l}$  es el promedio temporal de  $\hat{N}_{r|l}$  durante la secuencia en cuestión. De este modo  $n$  varía entre  $-1$  y  $1$ , con  $n = -1$  cuando no hay bacterias en el lado derecho y  $n = 1$  cuando no hay bacterias en el lado izquierdo, es decir, cuando la ruptura de simetría sea máxima en favor del lado izquierdo o derecho respectivamente. Por otra parte,  $n$  será nulo si la diferencia entre ambos lados lo es, o sea, cuando no hay ruptura de simetría.

En la figura 4.4 puede verse la dependencia de  $n$  en función de la máxima velocidad media en  $x$  de las micro-esferas en el centro del canal  $\bar{v}_x^{max}$ , que se sabe es una medida indirecta del flujo total en la celda microfluídica. El cálculo de  $n$  se ha efectuado utilizando los valores medios de  $\hat{N}_r$  y  $\hat{N}_l$  en cada secuencia (cada punto corresponde a una secuencia) y la incertidumbre ha sido obtenida mediante la propagación de la desviación estándar de  $\hat{N}_r$  y  $\hat{N}_l$  en la ecuación (4.1). Para la incertidumbre de  $\bar{v}_v^{max}$  se ha estimado un valor siempre inferior a  $2,5\mu\text{m/s}$ . En la estimación se ha tomado en cuenta la incertidumbre introducida al realizar la calibración mencionada en la página 9, y se ha asumido un error en la detección de la posición de las esferas trazadoras no mayor que  $1\mu\text{m}$  que es el radio de las esferas trazadoras empleadas.

Es perfectamente clara la tendencia de aumento en la ruptura de simetría para bacterias vivas, respecto a los puntos de control con bacterias muertas. Sin embargo, dadas las incertidumbres y el limitado rango de flujos disponibles hacen precipitado aventurarse a reportar de forma definitiva una dependencia funcional entre las variables. Se requieren, por tanto, nuevos experimentos.

Sin embargo, este fenómeno podría ser explicado sobre la base del amplio conocimiento existente del comportamiento de la *E. coli*. Por ejemplo, se sabe que estas bacterias son sensibles tanto a altas velocidades locales de flujo como a gradientes de velocidad [3]. Se podría especular que una bacteria, al pasar el estrechamiento arrastrada por el flujo de izquierda a derecha, detecta las altas velocidades y/o gradientes de velocidad que tienen lugar y, después de cierto retardo de tiempo, comienza a nadar “a contra corriente” como impulso instintivo. La composición de velocidades de la corriente del líquido y de la natación a contra corriente de las bacterias, acentuada en la región de la derecha, pudiera explicar este fenómeno de “ruptura de simetría”. Un elemento importante a favor de esta hipótesis es que las bacterias muertas no presentan ruptura de simetría: la autopropulsión de las bacterias parece ser un ingrediente básico en la explicación.

Para comprobar dicha hipótesis, es preciso desarrollar una sencilla simulación computacional donde las bacterias nadan sobre el campo de velocidades

de la celda  $v(x, y)$  reconstruido para diversos flujos tal y como se muestra en la sección 3.2. Se espera modelar el fenómeno reportado al imponer un comportamiento a las bacterias basado en lo encontrado en la literatura [2].

# Capítulo 5

## Conclusiones

Se ha realizado una incursión en los campos de materia activa y microfluida, permitiendo ganar conocimiento válido en estos campos de intenso desarrollo hoy en día. Esto es especialmente cierto en lo que a la aplicación del procesamiento de imágenes a las mediciones en materia activa y microfluida concierne. En específico:

- Se ha evaluado el comportamiento de algoritmos de PDI sobre software libre aplicados a estas áreas, creándolos o modificándolos para la modelar el campo de velocidades del fluido dentro de una celda real y para la detección de bacterias.
- Se ha reconstruido el campo de velocidades de una celda microfluida real, combinando la solución numérica de las ecuaciones de la hidrodinámica con el procesamiento digital de imágenes.
- Mediante el PDI, se ha comprobado cuantitativamente el fenómeno de ruptura de simetría en flujos de *E. coli* dentro de una celda microfluida.

# Bibliografía

- [1] Yuehuel H. An, Jonathan B. McGlohorn, Brian K. Bednarski, Kylie L. Martin y Richard J. Friedman: *An open channel flow chamber for characterizing biofilm formation on biomaterial surfaces*, volumen Volume 337, página 79–88. Academic Press, 2001, ISBN 0076-6879. <http://www.sciencedirect.com/science/article/B7CV2-4CYWM2D-7/2/2f5fa8aab3a0b8f7e3a7972b90907515>. 1.1
- [2] Howard C. Berg: *E. coli in Motion*. Springer, New York, 2004, ISBN 0-387-00888-8. 2.1.2, 4.2
- [3] Jane Hill, Ozge Kalkanci, Jonathan L McMurry y Hur Koser: *Hydrodynamic surface interactions enable Escherichia coli to seek efficient routes to swim upstream*. Physical Review Letters, 98(6):068101, Febrero 2007, ISSN 0031-9007. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17358984>, PMID: 17358984. 1.1, 4.2
- [4] Bernd Jähne: *Digital Image Processing*. Springer, spanish5th rev. and extended ed. edición, Abril 2002, ISBN 3540677542. 1.2
- [5] Bernd Jahne y Horst Haußecker: *Computer Vision and Applications: A Guide for Students and Practitioners*. Academic Press, spanish1st edición, Mayo 2000. 1.2
- [6] Bernd Jähne, Horst Haußecker y Peter Geißler: *Sensors and Imaging*, volumen I de *Handbook of Computer Vision and Applications*. Academic Press, San Diego, CA, 1999, ISBN 0-12-379771-3. 1.2
- [7] Bernd Jähne, Horst Haußecker y Peter Geißler: *Systems and Applications*, volumen III de *Handbook of computer vision and applications*. Academic Press, San Diego, CA, 1999, ISBN 0-12-379773-X. 1.2

- [8] Hilary Lappin-Scott: *Microbial Biofilms*. Cambridge University Press, Cambridge, 2003, ISBN 052154212X. 1.1
- [9] NIH: *ImageJ Plugins*. <http://rsb.info.nih.gov/ij/plugins/>. <http://rsb.info.nih.gov/ij/plugins/>. 2.2
- [10] Karen M. Ottemann y Jeff F. Miller: *Roles for motility in bacterial-host interactions*. *Molecular Microbiology*, 24(6):1109–1117, 1997. <http://dx.doi.org/10.1046/j.1365-2958.1997.4281787.x>. 1.1
- [11] Sungsu Park, Peter M. Wolanin, Emil A. Yuzbashyan, Pascal Silberzan, Jeffry B. Stock y Robert H. Austin: *Motion to Form a Quorum*. *Science*, 301(5630):188, Julio 2003. <http://www.sciencemag.org>. 1.1
- [12] L A Pratt y R. Kolter: *Genetic analysis of Escherichia coli biofilm formation: roles of flagella, motility, chemotaxis and type I pili*. *Molecular Microbiology*, 30(2):285–293, Octubre 1998, ISSN 0950-382X. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9791174>, PMID: 9791174. 1.1
- [13] Wayne S. Rasband: *ImageJ*. NIH, Bethesda, Maryland, USA. <http://rsb.info.nih.gov/ij/>. 1.2, 2.2
- [14] Herrmann Schlichting y Klaus Gersten: *Boundary-Layer Theory*. Springer, spanish8th edición, Marzo 2000, ISBN 3540662707. 3.1, 3.2
- [15] P Singh y M Parsek: *Bacterial biofilms: an emerging link to disease pathogenesis*. *Annu. Rev. Microbiol.*, 57:677–701, 2003. 1.1
- [16] Nico Stuurman: *MTrack2*. <http://valelab.ucsf.edu/nico/IJplugins/MTrack2.html>. 3.2
- [17] Margot A.-S. Vigeant, Roseanne M. Ford, Michael Wagner y Lukas K. Tamm: *Reversible and Irreversible Adhesion of Motile Escherichia coli Cells Analyzed by Total Internal Reflection Aqueous Fluorescence Microscopy*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 68(6):2794–2801, Junio 2002. <http://aem.asm.org/cgi/content/abstract/68/6/2794>. 1.1
- [18] George M. Whitesides: *The origins and the future of microfluidics*. *Nature*, 442(7101):368–373, Julio 2006, ISSN 0028-0836. <http://dx.doi.org/10.1038/nature05058>. 1.3

# Apéndice A

## Algoritmo de conteo

A continuación se presenta el código fuente del macro utilizado para el conteo de bacterias. El macro fue originalmente desarrollado por E. Clément y extendido por el autor para soportar la detección de “bacterias claras” y “bacterias oscuras”.

El lenguaje de macro de ImageJ es muy similar a Java pero posee numerosas funciones predefinidas para el procesamiento de imágenes.

```
// This macro prepares the images from the films.
// Makes a BW filtered image sequence and then thresholds
// at two different gray levels to get a binary image
// of both "black" and "white" bacteria. This is done
// using the "over/under" threshold mode. Both threshold
// values are read from the thr_<n>.txt file just as
// before (two threshold values are now read instead of
// just one). The format of the thr_<n>.txt file is now
// changed from:
//
// <threshold>,<smallest_parts>,<largest_parts>, <#>
//
// to:
//
// <lower_threshold>,<upper_threshold>,<smallest_parts>,<
// largest_parts>, <#>
//
// To use the macro to select only "white" bacteria as
// before it is enough to set <lower_threshold> to 0
// To detect only "black" particles <upper_threshold>
// should be set to 255.
```

```

//
// Other minor modification has being done to ensure
// cross platform compatibility
// and (maybe) clarity.

if (getVersion>="1.40e")
    setOption("display_labels", true);
setBatchMode(true); // runs up to 6 times faster

// preparation of the input / output addresses
root=newArray(50);
vid=newArray(50);
Ntotal_data = 0;
store=newArray(10);

// get the data addresses
dir = getDirectory("Choose_an_INPUT_Directory");
dirinput = dir + File.separator + "Batchfiles.txt";
s1 = File.openAsRawString(dirinput);
tmp = split(s1, ",");
root[Ntotal_data] = tmp[0];
vid[Ntotal_data] = substring(tmp[1], 0, lengthOf(tmp[1])-2);
Ntotal_data += 1;

// preparation of the input / output addresses
addr_data = newArray(Ntotal_data);
addr_input = newArray(Ntotal_data);
addr_output_1 = newArray(Ntotal_data);
addr_output_2 = newArray(Ntotal_data);

//We need two arrays now to store the threshold values
// upper thresholds are stored in w_seuil while
// lower thresholds are stored in k_seuil.
w_seuil = newArray(Ntotal_data);
k_seuil = newArray(Ntotal_data);

root1 = newArray(Ntotal_data);

title = "FFT_Filter";
Dialog.create("New_Image");
Dialog.addString("Title:", title);
Dialog.addCheckbox("FFT_Filter", false );
Dialog.show();

ramp = Dialog.getCheckbox();

```

```

if (ramp==true) {
  for (i=0; i<Ntotal_data; i++) {
    //
    // get raw film images
    nv=vid[i];
    root1[i]=root[i]+ File.separator + "PIV" + File.separator +
      "PIV"+nv;
    addr_Input[i] = root[i] + File.separator + "PIV" + File.
      separator + "video_to_Image_" + nv + File.separator + "
      image_000000.JPG";

    //
    // get the threshold values
    add=root[i] + File.separator + "PIV" + File.separator + "
      thr_" + nv + ".txt";
    s1 = File.openAsRawString(add);
    tmp = split(s1, ",");
    k_seuil[i] = parseFloat(tmp[0]);
    w_seuil[i] = parseFloat(tmp[1]);

    //
    // get the number of images to be processed
    add=root[i]+ File.separator + "PIV" + File.separator + "
      nbim_"+nv+".txt";
    s1 = File.openAsRawString(add);
    nbim=parseFloat(s1);

    //
    // Store FFT filter of the images
    addr_output_1[i] = root[i]+ File.separator + "PIV" + File.
      separator + "IG_"+nv+" " + File.separator + "IG";
    //
    // Store FFT + BW filtered images
    addr_output_2[i] = root[i]+ File.separator + "PIV" + File.
      separator + "PIV"+nv+" " + File.separator + "img_seq" +
      File.separator + "I0000.jpeg";
    //
    // Start Loop on all the data files to form a BW image in
    img_seq
    addressSeq = addr_Input[i];
    run("ImageSequence...", "open="+addressSeq+"_number="+nbim+
      "_starting=1_increment=1_scale=100_file=[]_or=[]_convert_
      sort");
    run("BandpassFilter...", "filter_large=40_filter_small=0_
      suppress=None_tolerance=5_process");
  }
}

```

```

// loop over all the images of the stack
for (n=1; n<=nSlices; n++) {
    setSlice(n);
    // normalizes the gray level
    getStatistics(area, mean, min, max, std);
    print(n, nSlices, mean);
    // normalizes the gray level
    ratio=120/mean;
    setSlice(n);
    run("Multiply...", "value="+ratio);
}

addressSeq = addr_output_1[i];
run("Image Sequence...", "format=JPEG_name=IG_start=0_
    digits=4_save="+addressSeq);

//Binarize image to select both "white" and "black"
particles.
setThreshold(k_seuil[i], w_seuil[i], "over/under");
run("Convert to Mask", "");

addressSeq =addr_output_2[i];
run("Image Sequence...", "format=JPEG_name=I_start=0_digits
    =4_save="+addressSeq);
close();
}
}

// Now loop on each experiment data to filter by size
for (i=0; i<Ntotal_data; i++) {
    nv=vid[i];
    print("");
    selectWindow("Log");
    run("Close");
    //
    // Get the particle sizes to filter
    add=root[i]+ File.separator + "PIV" + File.separator + "thr_"+
        nv+".txt";
    s1 = File.openAsRawString(add);
    tmp = split(s1, ",");
    mins = parseFloat(tmp[2]);
    maxs = parseFloat(tmp[3]);
    Avs = parseFloat(tmp[4]);
}

```

```

//
// Initialize the global area distribution
Ntotal_Area=0;
nsmax=0;
nparticle=newArray(1000);
nparticlefract=newArray(1000);
Total_Number_Area=newArray(1000);
for (ns=0; ns<1000; ns++) {
    Total_Number_Area[ns]=0;
}
//
root1[i]=root[i]+ File.separator + "PIV" + File.separator + "
    PIV" + nv;
dir = root1[i];
dirinput=dir+ File.separator + "img_seq" + File.separator;
list = getFileList(dirinput);
//
// get the number of images to be processed
add=root[i]+ File.separator + "PIV" + File.separator + "nbim_"
    +nv+".txt";

s1 = File.openAsRawString(add);
nbim=parseFloat(s1);
//
///Output directory for Filtered Image
diroutput=dir+ File.separator + "Filt" + File.separator;
//
///Output directory for particle sizes
diroutputS=dir+ File.separator + "Size" + File.separator;
//
// asks for the filter range
run("Clear_Results");
npav=0;
npav2=0;
requires("1.34m");

//
// The OUTPUT IMAGE Directory MUST BE CALLED Filt
// The OUTPUT SURFACE Directory MUST BE CALLED Size
// Loop on images
for (k=0; k<nbim; k++) {
    print(i+"_"+Ntotal_data+"_"+nbim+"_"+list[k]) ;
    pathin = dirinput+list[k];
    pathout=diroutput+"F"+list[k];
    pathoutS=diroutputS+"S"+list[k];
}

```

```

//
dotIndex = lastIndexOf(pathoutS, ".");
if (dotIndex!=-1)
    pathoutS = substring(pathoutS, 0, dotIndex); // remove
        extension
pathoutS=pathoutS+".dat";
//showProgress(k, list.length);
//
open(pathin);

//setAutoThreshold();
//setThreshold(0, 128);
run("Convert_to_Mask");
run("Set_Measurements...", "area_slice_redirect=None_decimal
=3");
run("Analyze_Particles...", "size=0-499_circularity
=0.00-1.00_show=Masks_clear");

for (row = 0; row < nResults(); row++) {
    ng = parseInt(getResult("Area", row));
    Total_Number_Area[ng] = Total_Number_Area[ng]+1;
    if (ng>nsmax) {
        nsmax=ng;
    }
    Ntotal_Area=Ntotal_Area+1;
}
run("Clear_Results");
//

run("Analyze_Particles...", "size="+mins+"-"+maxs+"_
circularity=0.00-1.00_show=Masks_clear");
// Attention LUT inversi_æ
black = 255;
white = 0;
getHistogram(0, hist, 256);
npfract=hist[255]/Avs;
np=nResults;
npav=npav+np/nbim;
npav2=npav2+np*np/nbim;
nparticle[k]=np;
nparticlefract[k]=npfract;
saveAs("Jpeg", pathout);
run("Input/Output...", "jpeg=75_gif=-1_file=.dat");
saveAs("Measurements", pathoutS);
run("Clear_Results");

```

```

    // Displays the titles of image windows.
    close();   close();   close();
}

// Storage of the nb of particle as a function of time
// A second calculation
selectWindow("Log");
run("Close");

Dirpart=dir + File.separator + "Nb_Bact.txt";
for (k=0; k<nbim; k++) {
    print(k+1, nparticle[k], nparticlefract[k]);
}
selectWindow("Log");
saveAs("Text", Dirpart);
selectWindow("Log");
run("Close");
//
// Storage of the average nb of particle and rms
npav2=sqrt(10000*(npav2-npav*npav)^(0.5)/100);
print(list.length, mins, maxs, npav, npav2);
selectWindow("Log");
Dirpart=dir + File.separator + "Av_Nb_Bact.txt";
saveAs("Text", Dirpart);
run("Close");
//
// Storage of the average nb distribution of particle sizes
for (ns=0; ns<nsmax; ns++) {
    fractns=Total_Number_Area[ns]/Ntotal_Area;
    print(ns, fractns);
}
selectWindow("Log");
Dirpart=dir + File.separator + "Av_Distr.txt";
saveAs("Text", Dirpart);
selectWindow("Log"); run("Close");
}

```



