

Métodos

GENERADOR DE NÚMEROS ALEATORIOS PARA RECUEENTOS EN MICROSCOPIA ÓPTICA

Saúl Blanco

Departamento de Biodiversidad y Gestión Ambiental, Universidad de León, E-24071 León, España

E-mail: sblal@unileon.es

Prácticamente todos los métodos de recuento de organismos en microscopía óptica presuponen un reparto uniforme y homogéneo de los elementos a enumerar en las preparaciones, pero esta condición rara vez se cumple, lo cual puede introducir sesgos importantes en los subsiguientes análisis estadísticos (Kelly 1999). Por ejemplo, las preparaciones microscópicas permanentes de diatomeas suelen montarse dejando evaporar un cierto volumen de una suspensión de frústulos sobre cubreobjetos circulares (Blanco et al. 2008). Eaton y Moss (1966) y Battarbee (1973) demostraron que las diatomeas en estas preparaciones no se distribuyen aleatoriamente debido a los efectos de la tensión superficial del agua. Acelerar el proceso con calor normalmente empeora esta uniformidad, ya que las corrientes de convección que se forman aumentan la cohesividad de las partículas y la formación de agregados, obteniéndose muestras con repartos heterogéneos de las distintas clases de tamaño presentes (Schrader 1974; McBride 1988). Alverson et al. (2003) mostraron además que la densidad celular suele ser mayor en la zona central de los cubreobjetos.

Los microscopistas normalmente elaboran recuentos realizando transectos sistemáticos en dirección horizontal, comenzando por uno de los bordes de la preparación, hasta haber contabilizado un número determinado de elementos y/o campos visuales. En muestras especialmente densas, se corre el riesgo de completar la enumeración habiendo barrido una fracción no representativa de toda la preparación, con lo cual no se obtiene una imagen realista de las verdaderas proporciones numéricas existentes entre los diferentes taxones. Una forma de compensar la falta de uniformidad en el reparto de los elementos a contabilizar consiste en realizar un muestreo aleatorio por toda la preparación, y de hecho los protocolos normalizados de análisis diatomológicos recomiendan el uso de generadores de números aleatorios para realizar recuentos (European Committee for Standardization, 2004).

La mayoría de los microscopios ópticos modernos están provistos de unos ejes coordenados graduados (escala de Vernier) que dan cuenta de la posición de la pletina donde se coloca la muestra en sentido vertical y horizontal. Aprovechando esto, he diseñado una sencilla hoja de cálculo en Excel para generar aleatoriamente coordenadas de campos visuales, aplicable para preparaciones con cubreobjetos o cubetas de decantación circulares (Tabla 1). Introduciendo las coordenadas del borde superior ("Initial position") (Fig. 1) y el diámetro de la preparación ("Coverslip diameter"), la hoja calcula sucesivamente diferentes campos visuales ("FOVs") distribuidos al azar por toda la muestra, haciendo uso de la función de generación de números pseudoaleatorios de este programa (Fig. 2). El algoritmo consiste simplemente en calcular el centro de la preparación y generar a partir de esa posición diferentes coordenadas polares aleatorias que posteriormente se transforman en coordenadas rectangulares (Tabla 1). No se tiene en cuenta la posible repetición en el tiempo de pares de coordenadas, pero esto es en cualquier caso altamente improbable en muestras suficientemente densas. La hoja también contabiliza el número de campos visuales acumulados (Fig. 3), lo cual es de utilidad en análisis cuantitativos. Ya que esta característica emplea celdas autorreferenciadas, para que funcione correctamente es necesario tener habilitado el cálculo iterativo en Excel, con los parámetros propuestos por defecto (100 iteraciones máximas y 0,001 unidades de cambio máximo). Esta opción se encuentra disponible en Menu Herramientas / Opciones ' Cálculo ' Iteración (Excel 2003), o bien Archivo ' Opciones ' Fórmulas (Excel 2007 y 2010). Para conservar esta funcionalidad, es necesario no guardar los cambios al cerrar la hoja.

Los interesados pueden solicitar al autor una copia del correspondiente archivo.

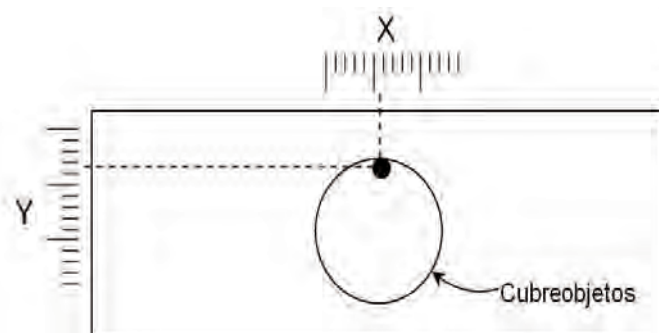


Figura 1. . Posición inicial.

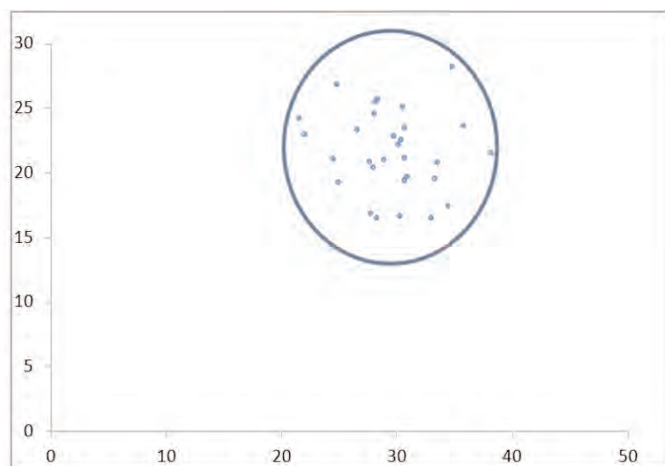


Figura 2. Ejemplo de 30 campos visuales generados en un cubreobjetos de 18 mm de diámetro..

	A	B
1	Initial position X	30
2	Initial position Y	12
3	Coverslip diameter (mm)	18
4	FOV X	29
5	FOV Y	28
6	Press F9 for new FOV	18
7	Number of FOVs --->	12
8		

Figura 3. Captura de pantalla de la hoja de cálculo funcionando en Excel 2010.

Referencias

Alverson AJ, Manoylov KM, Stevenson RJ 2003. Laboratory sources of error for algal community attributes during sample preparation and counting. *J Appl Phycol* 15: 357-369.

Battarbee RW 1973. A new method for the estimation of absolute microfossil numbers, with reference especially to diatoms. *Limnol Oceanogr* 18: 647-653.

Blanco S, Álvarez I, Cejudo C 2008. A test on different aspects of diatom processing techniques. *J Appl Phycol* 20: 445-450.

European Committee for Standarization 2004. Water quality - *Guidance standard for the identification, enumeration and interpretation of benthic diatom samples from running waters. European Standard prEN 14407.* European Committee for Standardization, Brussels, 12 pp.

Eaton JW, Moss B 1966. The estimation of numbers and pigment content in epipellic algal populations. *Limnol Oceanogr* 11: 584-595.

Kelly MG 1999. Progress towards quality assurance of benthic diatom and phytoplankton analyses in the UK. In: Prygiel J, Whitton BA, Bukowska J (eds) *Use of algae for monitoring rivers III.* Agence de l'Eau Artois-Picardie, Douai, pp 208-215.

McBride TP 1988. Preparing random distributions of diatom valves on microscope slides. *Limnol Oceanogr* 33: 1627-1629.

Schrader HJ .1974. Proposal for a standardized method for cleaning deep-sea and land-exposed marine sediments. *Nova Hedw Beih* 45: 403-409.

Tabla 1. . Hoja de cálculo para la versión en castellano de Excel.

	A	B
1	Posición inicial X	
2	Posición inicial Y	
3	Diámetro	
4	FOV X	=B1+(ALEATORIO()*(B3/2))*COS(ALEATORIO()*2*PI())
5	FOV Y	=(B2+B3/2)+(ALEATORIO()*(B3/2))*SENO(ALEATORIO()*2*PI())
6		=B6+0,01
7	Nº de campos	=B6-6