

Universitat de Lleida

EJERCICIOS DE BIOLOGÍA EN EL ENTORNO DE PROGRAMACIÓN R

Volumen 2: Conteo de esporas y preparación de suspensiones esporales

E. Jordán Muñoz-Adalia

2022




Universitat de Lleida

EJERCICIOS DE BIOLOGÍA CON R

Volumen 2

Conteo de esporas y preparación de suspensiones esporales

E. Jordán Muñoz-Adalia

 **0000-0002-0900-6981**

2022



Índice

Introducción	3
Ejercicio 1. Medidas repetidas, medias y desviaciones	4
Ejercicio 2: Cálculo de la densidad de esporas	9
Ejercicio 3. Cálculo de diluciones	11
Bibliografía	13

Introducción

El presente material didáctico surge con la finalidad de proveer de una herramienta práctica para estudiantes de las asignaturas de Biología en los primeros cursos de Grado en Ingenierías Agrarias, Biología, Ciencias Ambientales y afines. En este segundo volumen, se presentan tres actividades centradas en el cálculo de densidad de esporas en muestras biológicas tras el conteo al microscopio y la preparación de diluciones de concentración conocida.

Las cuestiones prácticas propuestas han sido diseñadas para ser resueltas en el entorno de programación R por usuarios sin experiencia previa en programación, pero que estén familiarizados al uso de hojas de cálculo, navegación en sistema operativo Windows y que conozcan la interfaz de R y RStudio.

Todos los ejercicios cuentan con un planteamiento teórico breve, aportándose la base de datos de ejemplo de un modo intuitivo para que el alumno pueda utilizarla y seguir el guion paso a paso hasta llegar a la respuesta solicitada. Se espera que el alumnado pueda repetir los ejercicios con bases de datos simuladas o reales facilitadas por el profesorado, para de este modo poner a prueba lo aprendido, observar diferencias entre bases de datos y comprender en mayor medida el significado de cada una de las líneas de comando requeridas.

En este sentido, se ha recurrido a una sintaxis sencilla para los comandos en R, empleando buena parte de las funciones con sus parámetros por defecto, a fin de facilitar su comprensión por parte de los usuarios sin experiencia previa. Así, cabe mencionar que los ejercicios tienen una finalidad didáctica y no pretenden ser base de análisis complejos para investigación, existiendo para ello numerosos repositorios y bases de datos de entrenamiento que exceden la finalidad de este material.

Finalmente, se facilitan recursos bibliográficos de apoyo que podrán ayudar a los estudiantes a ampliar su conocimiento teórico y explorar otras formas de resolver los ejercicios propuestos en el entorno de R.

El autor, marzo de 2022

Ejercicio 1. Medidas repetidas, medias y desviaciones

Planteamiento

En el laboratorio de Fitopatología se está estudiando la biología del hongo patógeno *Cryphonectria parasitica* (Murrill) Barr. Tras varias semanas de incubación de colonias del hongo en medio de cultivo rico en nutrientes, los investigadores seleccionaron tres cultivos (muestras A, B y C) de una cepa del hongo de interés, denominada UDL2022, para conocer su tasa de esporulación *in vitro*.

En cada placa de cultivo vertieron 1 mL de agua destilada estéril con la ayuda de una micropipeta, haciendo que las gotas de agua resbalasen sobre el micelio maduro para así extraer más fácilmente las esporas. Tras ello, recogieron el agua cargada de esporas (suspensiones originales) y lo transfirieron a tubos de 2 mL. De cada una de las suspensiones de esporas originales (A, B y C) los investigadores tomaron una submuestra (10-12 μL) con una micropipeta y llenaron con ella la cámara central de un hemocitómetro (Mérida y Moreno, 2014). El hemocitómetro recibe otros nombres, tales como cámara Thoma o de Neubauer en función de sus dimensiones y número de campos de conteo (Figura 1). Una vez depositada la muestra, fue observada al microscopio para proceder a contar las esporas presentes. El conteo se realizó en los sectores diagonales de la cámara central, marcados con círculos rojos en la Figura 1, repitiendo el conteo de cada muestra en tres ocasiones. Los resultados obtenidos se recogen en la Tabla 1.

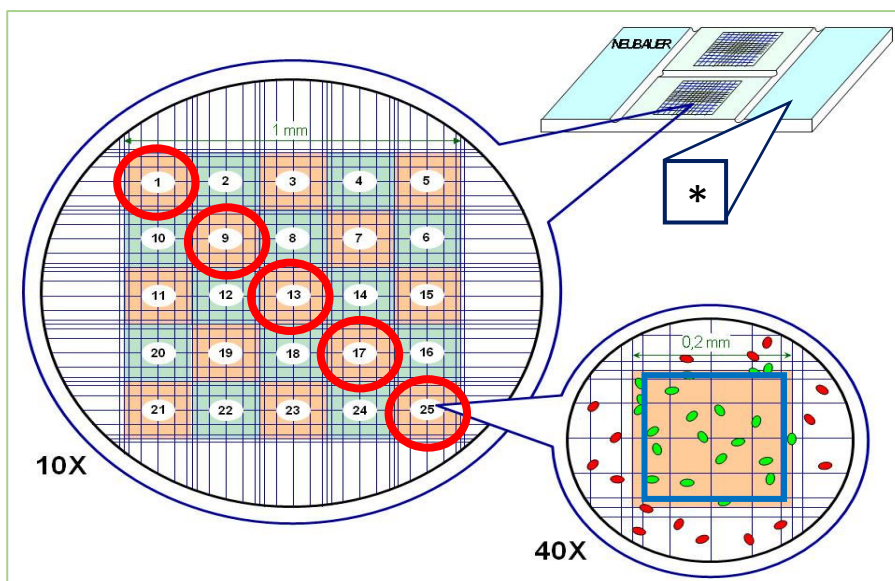


Figura 1. Cámara de Neubauer. Modificada de Bikandi y San Millán (s.f.). *: Se suele indicar el área mínima (mm^2) y la profundidad de la cámara (mm).

Es necesario prestar atención a las características del hemocitómetro empleado, en el caso práctico que ocupa estos ejercicios supondremos que se utilizó una cámara de Neubauer, la cual presenta una cámara cuadrada central de 1 mm^2 de superficie (Figura 1). Esta cámara está dividida a su vez en 25 sectores de conteo (algunos modelos de hemocitómetro, como la cámara Thoma, presentan 16 sectores, aunque la superficie de la cámara central suele ser constante), cada uno de ellos dividido a su vez en 16 cuadrados (rectángulo azul señalado en la Figura 1). Si la cámara se llenó correctamente (con muestra en exceso), el espesor de lámina acuosa esperado es de $0,1 \text{ mm}$, tal y como indica el fabricante del hemocitómetro. Por lo tanto, el volumen total de muestra en la cámara central asciende a $1 \text{ mm} \times 1 \text{ mm} \times 0,1 \text{ mm} = 0,1 \text{ mm}^3$, lo que equivale a $1 \times 10^{-4} \text{ mL}$.

Los sectores de conteo (25 en la cámara de Neubauer) tienen $0,2 \text{ mm}$ de lado tal y como refleja la Figura 1 (en la Cámara Thoma, estos tienen $0,25 \text{ mm}$ de lado), por lo que el volumen de cada sector de conteo puede calcularse fácilmente: $0,2 \text{ mm} \times 0,2 \text{ mm} \times 0,1 \text{ mm} = 0,004 \text{ mm}^3 = 0,000004 \text{ mL}$.

Tabla 1. Número de esporas totales observadas en cada una de las muestras (suma de las esporas presentes en los cinco sectores diagonales del hemocitómetro).

Muestra	Conteo1	Conteo2	Conteo3
A	12	24	15
B	22	25	23
C	56	43	32

Con estos datos y teniendo en cuenta las características del hemocitómetro utilizado, se pide:

- 1) Calcular la media de esporas totales por muestra y la desviación típica.
- 2) Calcular el error estándar para cada muestra.

Solución

Podemos calcular los valores estadísticos pedidos de diversos modos en el entorno de programación R (R Core Team, 2020). En este caso, incluiremos las fórmulas manualmente para de este modo incidir en el método de cálculo de dichos indicadores.

a. Establecer el directorio de trabajo y cargar la base de datos

Todo usuario debe tener previamente instalado en su ordenador el *software* R (<https://www.r-project.org/>) y se recomienda contar también con RStudio

(<https://www.rstudio.com/>) de modo que se pueda seguir fácilmente la línea de comandos dispuesta y anotada a continuación.

En primer lugar, se carga el directorio de trabajo, en este caso una carpeta ubicada en la unidad C del PC denominada "CursoBio". En esta carpeta habremos depositado el fichero de datos previamente.

```
setwd("C:/CursoBio")
```

A continuación, se cargan los datos, los cuales estarán disponibles como archivo en extensión ".csv" en el repositorio de recursos docentes de la Universitat de Lleida donde se depositará asimismo el presente manual. Llamaremos a nuestros datos esporas, como elemento de R.

```
esporas<-read.csv2(file.choose(), header=T) # se abrirá una ventana en el navegador para seleccionar el archivo que contiene los datos. Indicamos que los datos tienen encabezados por lo que la primera línea del archivo ".csv" se incorporará de este modo en R
```

```
view(esporas) # visualizamos la base de datos
```

```
str(esporas) # comprobamos que todas las variables son numéricas salvo el nombre de las muestras que debe ser un factor (Factor), en caso de no aparecer como factor, indicamos a R que lo modifique. En este ejercicio, esta cuestión será irrelevante, pero debemos asegurarnos siempre de que R interprete los datos por su tipología correcta
```

```
esporas$Muestra<-as.factor(esporas$Muestra)
```

```
str(esporas)
```

```
#
```

```
'data.frame': 3 obs. of 4 variables:
 $ Muestra: Factor w/ 3 levels "A","B","C": 1 2 3
 $ Conteo1: int 12 22 56
 $ Conteo2: int 24 25 43
 $ Conteo3: int 15 23 32
```

```
#
```

b. Cálculo de medias y desviación típica

Los investigadores contaron esporas en un total de 5 sectores (círculos rojos en la Figura 1) por cada evento de conteo y anotaron después en la tabla el total de esporas contadas. Por tanto, los valores mostrados en las celdas de la Tabla 1 corresponden al número total de esporas por conteo y no al valor observado en cada sector. En consecuencia, calcularemos el valor medio de esporas por sector como primer paso.

```
esporas$Cmed1<-esporas$Conteo1/5 # generamos una columna nueva (Cmed1)
con el valor medio de esporas/sector, ya que sabemos que se contaron 5 sectores
```

```
esporas$Cmed2<-esporas$Conteo2/5 # lo mismo para el conteo 2 y 3
```

```
esporas$Cmed3<-esporas$Conteo3/5
```

```
str(esporas)
```

```
#
```

```
'data.frame': 3 obs. of 7 variables:
 $ Muestra: Factor w/ 3 levels "A","B","C": 1 2 3
 $ Conteo1: int 12 22 56
 $ Conteo2: int 24 25 43
 $ Conteo3: int 15 23 32
 $ Cmed1 : num 2.4 4.4 11.2
 $ Cmed2 : num 4.8 5 8.6
 $ Cmed3 : num 3 4.6 6.4
```

```
#
```

Conocemos ya el valor medio de esporas/sector para cada uno de los conteos. Pasamos ahora a calcular la media global de esporas/sector por muestra, utilizando para ello las nuevas columnas.

```
esporas$Cmedi<-(esporas$Cmed1+esporas$Cmed2+esporas$Cmed3)/3
```

```
str(esporas)
```

```
#
```

```
'data.frame': 3 obs. of 8 variables:
 $ Muestra: Factor w/ 3 levels "A","B","C": 1 2 3
 $ Conteo1: int 12 22 56
 $ Conteo2: int 24 25 43
 $ Conteo3: int 15 23 32
 $ Cmed1 : num 2.4 4.4 11.2
 $ Cmed2 : num 4.8 5 8.6
 $ Cmed3 : num 3 4.6 6.4
 $ Cmedi : num 3.4 4.67 8.73
```

```
#
```

```
esporas$Cmedi
```

```
#
```

```
[1] 3.400000 4.666667 8.733333
```

```
#
```

Vemos que la media de esporas/sector entre las tres muestras difiere sensiblemente. Pasamos ahora a calcular la desviación estándar para cada muestra (Zuur, *et al.*, 2007). Dado que contamos únicamente con tres valores por muestra y debido a la finalidad didáctica de este ejercicio, se incluirá la fórmula de la desviación típica de forma manual.


```

esporas$Csd<-((((esporas$Cmed1-
esporas$Cmedi)^2)+((esporas$Cmed2-
esporas$Cmedi)^2)+((esporas$Cmed3-esporas$Cmedi)^2))/((3-1))^0.5

```

Exploramos el objeto (columna) creado:

```

esporas$Csd

```

```

#

```

```

[1] 1.249000 0.305505 2.402776

```

```

#

```

Se aprecia que la muestra B tiene menos variabilidad en sus valores que la A y la C.

c. Cálculo del error estándar

Un indicador estadístico de dispersión muy utilizado en ciencias biológicas es el error estándar. Se basa en la desviación típica ya mencionada, pero toma en mayor consideración el tamaño muestral (en este ejemplo igual a tres). Lo calcularemos incluyendo manualmente la fórmula en R y generando una nueva columna.

```

esporas$Cse<-esporas$Csd/(3)^0.5
esporas$Cse

```

```

#

```

```

[1] 0.7211103 0.1763834 1.3872435

```

```

#

```

Disponemos del error estándar tal y como solicitaba el apartado 2 del ejercicio.

Ejercicio 2: Cálculo de la densidad de esporas

Planteamiento

Tras realizar el conteo de esporas para las tres muestras (A, B, y C), los investigadores quieren conocer la densidad de esporas (D) que está produciendo el hongo en las condiciones de cultivo establecidas.

Una vez conocida la media muestral de esporas por sector de conteo ($C_{med\ i}$), es posible calcular la densidad. Esta variable se expresa como el número de células (esporas en este caso) por unidad de superficie o volumen. Dado que el ejemplo trabaja con suspensiones acuosas, lo adecuado es estimar la densidad de esporas en función de unidades de volumen, tomando el mililitro como unidad de referencia por comodidad práctica en laboratorio ($D = n \text{ esporas/mL}$).

Los valores de la columna $C_{med\ i}$ están referidos a una unidad de referencia concreta: el sector de conteo de la cámara de Neubauer. Por tanto, a la hora de calcular la densidad se debe trabajar con el volumen correspondiente a dicha unidad de referencia. En el ejercicio 1 calculamos el volumen contenido en un sector de conteo de la cámara de Neubauer, siendo este de 0,000004 mL. La densidad, por tanto, puede calcularse como $D = f \times (C_{med\ i} / 0,000004)$, siendo f el factor de dilución aplicado, en su caso.

Con estas premisas, se pide:

- 1) Calcular la densidad de esporas estimada para cada muestra.
- 2) Calcular la densidad de esporas para cada muestra si los valores de la Tabla 1 correspondieran a suspensiones de esporas (recogidas directamente del micelio) que fueron diluidas 1:10 (A y B) y 1:5 (C) con agua destilada estéril antes de realizar el conteo en el hemocitómetro.

Solución

a. Cálculo de densidad de esporas sin dilución

Seguimos trabajando con la base de datos ya cargada, la cual incluye las nuevas columnas procedentes del ejercicio 1. Añadiremos a continuación una columna que incluya el factor de dilución que aplicamos a las muestras antes de trasladarlas al hemocitómetro.

`esporas$f<-c(1,1,1)` # "c" es un comando básico de R que permite crear vectores, en este caso, la columna tendrá tres filas, todas ellas con un factor de dilución igual a 1

Procedemos a calcular la densidad, creando una nueva columna denominada D_i .

```
esporas$Di<-esporas$f * esporas$Cmedi / 0.000004
esporas$Di
```

```
#
```

```
[1] 850000 1166667 2183333
```

```
#
```

De acuerdo con las indicaciones del ejercicio, la muestra A presenta una densidad de esporas de 850×10^3 esporas/mL, la B de $1166,667 \times 10^3$ esporas/mL y la C de $2183,333 \times 10^3$ esporas/mL.

b. Cálculo de densidad de esporas en suspensiones diluidas

Con frecuencia sucede que la densidad de esporas a contar (cuando se trabaja directamente con suspensiones extraídas de micelio o cultivo líquido) es demasiado elevada e impide la visión correcta en el hemocitómetro. En estos casos se debe diluir la muestra original 5, 10, 100 o hasta 1000 veces, de modo que el campo de observación al microscopio esté más despejado y se pueda realizar el conteo con comodidad y precisión. En estos casos hablamos de diluciones (1:5, 1:10, 1:100, 1:1000) y el factor de dilución correspondiente es proporcional (5, 10, 100 y 1000, respectivamente).

En el apartado 2 se piden factores de dilución distintos a uno (hay dilución), por lo que se creará un nuevo vector f que satisfaga las premisas del ejercicio y se procederá a recalcular la densidad de las muestras en una nueva columna (D_{id}).

```
esporas$f<-c(10,10,5) # de acuerdo con lo exigido por el apartado 2
```

```
esporas$Did<-esporas$f * esporas$Cmedi / 0.000004
esporas$Did
```

```
#
```

```
[1] 8500000 11666667 10916667
```

```
#
```

Las suspensiones propuestas en el apartado 2 muestran, como cabría esperar, densidades de esporas estimadas superiores a las del apartado 1. Así pues, la nueva muestra A presenta una densidad de 8500×10^3 esporas/mL, la B de $11666,667 \times 10^3$ esporas/mL y la C de $10916,667 \times 10^3$ esporas/mL.

Ejercicio 3. Cálculo de diluciones

Planteamiento

El equipo de investigación desea inocular plántulas de castaño (*Castanea sativa* Mill.) con suspensiones de esporas procedentes de las muestras A, B y C. Para realizar el ensayo requieren de 20 mL de suspensión esporal de cada una de las muestras, con una concentración prefijada de 1×10^6 esporas/mL.

Se pide:

1) Calcular el volumen necesario de las suspensiones de esporas de las muestras A, B y C (ejercicio 2, apartado 2), para preparar las suspensiones de esporas de trabajo mencionadas en el planteamiento.

Solución

a. Calcular diluciones

Este ejercicio se resuelve empleando la ecuación estequiométrica $V_i \times C_i = V_f \times C_f$, donde V_i corresponde al volumen de la muestra inicial que debemos tomar (incógnita), mientras que C_i es la concentración inicial de la muestra original (en este caso D_{id} , calculada en el apartado 2 del ejercicio 2). Los valores de volumen y concentración finales (V_f y C_f , respectivamente) vienen dados por el enunciado (20 mL y 1×10^6 esporas/mL).

Generamos una nueva columna en nuestra base de datos (v_i), donde calcularemos el volumen en mL que debemos tomar de cada una de las muestras para elaborar las diluciones pedidas.

```
esporas$vi<-20 * 1000000 /esporas$Did
esporas$vi
```

```
#
```

```
[1] 2.352941 1.714286 1.832061
```

```
#
```

Por tanto, de la muestra A debemos tomar 2,35 mL, de la B 1,71 mL y de la C 1,83 mL para preparar las diluciones de trabajo. Si llegados a este punto el valor obtenido de v_i para alguna de las muestras excediera el valor fijado de V_f (20 mL en este caso), estaríamos ante una muestra cuya densidad de esporas es insuficiente para obtener la suspensión de trabajo deseada. En estos casos, deberíamos buscar alternativas para

aumentar la densidad de esporas en la muestra (centrifugación, incubar el hongo en un medio que estimule la esporulación, etc.).

Calculamos por diferencia el volumen de agua destilada estéril (en mL) que deberíamos añadir para preparar las diluciones pedidas.

```
esporas$H2O<-20 - esporas$Vi
esporas$H2O
```

```
#
```

```
[1] 17.64706 18.28571 18.16794
```

```
#
```

De esta forma, bastará con disponer en el laboratorio tres matraces Erlenmeyer estériles y adicionar separadamente los volúmenes de agua destilada estéril y de las suspensiones esporales que se han calculado. De esta forma se obtendrán las tres suspensiones esporales de trabajo de 20 mL cuya concentración es 1×10^6 esporas/mL.

Si deseáramos exportar nuestra tabla de resultados en formato “.txt” compatible con otros *software* de cálculo o Microsoft Excel, seguiríamos la siguiente línea de comandos:

```
write.table(esporas, "C:/CursoBio/esporas_final.txt", sep="\t") #
```

indicamos separación por tabulador

Automáticamente disponemos de los datos en el directorio indicado (carpeta “CursoBio” ubicada en la unidad C del PC).

Bibliografía

- Bikandi J., San Millán R. *s.f.* Recursos de Microbiología. Dpto. Inmunología, Microbiología y Parasitología, Universidad del País Vasco. <http://www.testak.org/microbiologia/>

- Mérida F.J., Moreno E.E. (eds.). 2014. Manual para técnico superior de laboratorio clínico y biomédico. Editorial Médica Panamericana, Madrid

- R Core Team. 2020. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna. <https://www.R-project.org/>

- Zuur A.F., Ieno E.N., Smith G.M. 2007. *Analysing Ecological Data (Statistics for Biology and Health)*. Springer-Verlag, New York