

TRABAJO FINAL DE CURSO R

Autor: Anny Vannesa Guillén Watson

1. Objetivo del análisis

Determinar el grado de tolerancia a ciertos metales pesados por parte de diez microhongos aisladas de un pasivo minero en Guanacaste, Costa Rica, para que puedan ser utilizados en procesos de biorremediación en zonas contaminadas con pasivos mineros o expuestos a metales.

2. Método

Los datos corresponden a los resultados de dos ensayos realizados a diez cepas de microhongo, los cuales fueron obtenidos a través de una colecta de muestra de pasivo minero en Líbano de Tilarán, Guanacaste, Costa Rica, para su posterior aislamiento en laboratorio y preservación. De alrededor de 95 cepas, se seleccionaron 10 cepas de acuerdo con su morfología, de tal manera que fueran diferentes entre ellos y que excretaran metabolitos secundarios al medio. Una vez seleccionados se les aplicó dos ensayos para determinar su potencial biorremediador.

El primer ensayo, consistió en determinar el porcentaje de viraje de pH del medio, es decir, que tuvieran la capacidad para aumentar el pH del medio. Para ello, se inoculó el medio de cultivo Agar Papa Dextrosa (PDA) por triplicado para cada cepa, y al medio se le adicionó una solución indicadora de pH de azul de bromotimol, partiendo con un pH de 4.5, de tal manera que si el microhongo libera metabolitos que aumenten el pH, este se tornará en una coloración azul. Cada placa del triplicado representa un 33.33% de la prueba. El segundo ensayo se relacionó con estimar el nivel de tolerancia de los microhongos al exponerlos a diferentes concentraciones de cuatro metales pesados: Arsénico (As), Cadmio (Cd), Plomo (Pb) y Hierro (Fe). Su tolerancia se determinó, de acuerdo con el diámetro de crecimiento del microhongo en 12 días.

Con respecto a los análisis con RStudio consistieron en pruebas estadísticas (prueba de normalidad con Shapiro test, homogeneidad de varianzas con Levene test, comparación de medianas con Kruskal test e identificación de factores diferentes o pruebas post hoc con Dunn test); identificación de valores extremos; generación de gráficas (histograma, boxplot y barras) y análisis de correlación de variables. Todo ello, considerando un nivel de confianza del 95%.

3. Resultados

Los resultados de las pruebas estadísticas demostraron que los datos tanto del viraje de pH como de crecimiento no siguen una distribución normal (valor $p < 0.05$). Por lo que se continuó el análisis con pruebas no paramétricas. De acuerdo con el análisis estadístico de comparación de medianas Kruskal Wallis, se reporta que efectivamente existen diferencias significativas en el crecimiento de las cepas micológicas (p-value: $0.0000101 < 0,05$) expuestas a los metales, como se ve reflejado en el gráfico de cajas y en el de barras (Figura 1 y Figura 2). Esto mismo ocurre con la capacidad de viraje de pH de las cepas (p-value: $0.000000587 < 0.05$), que se detallan en la Figura 3 y Figura 4.

La prueba de post hoc de Dunn, demostró que efectivamente existen diferencias significativas entre las cepas, especialmente entre: LIBH1-LIBH2, LIBH1-LIBH7, LIBH2-LIBH25, LIBH2-LIBH81 y LIBH7-LIBH25; como se muestra en el gráfico de cajas de la figura 1. Así como las cepas que presentaron un viraje de pH, principalmente la LIBH5 y la LIBH2 con las demás cepas (figura 3 y 4).

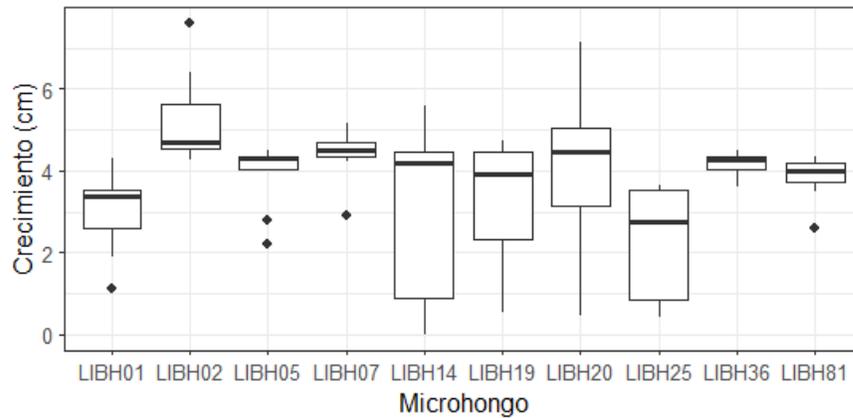


Figura 1. Distribución media del crecimiento de las cepas de microhongos expuestos a todos los metales.

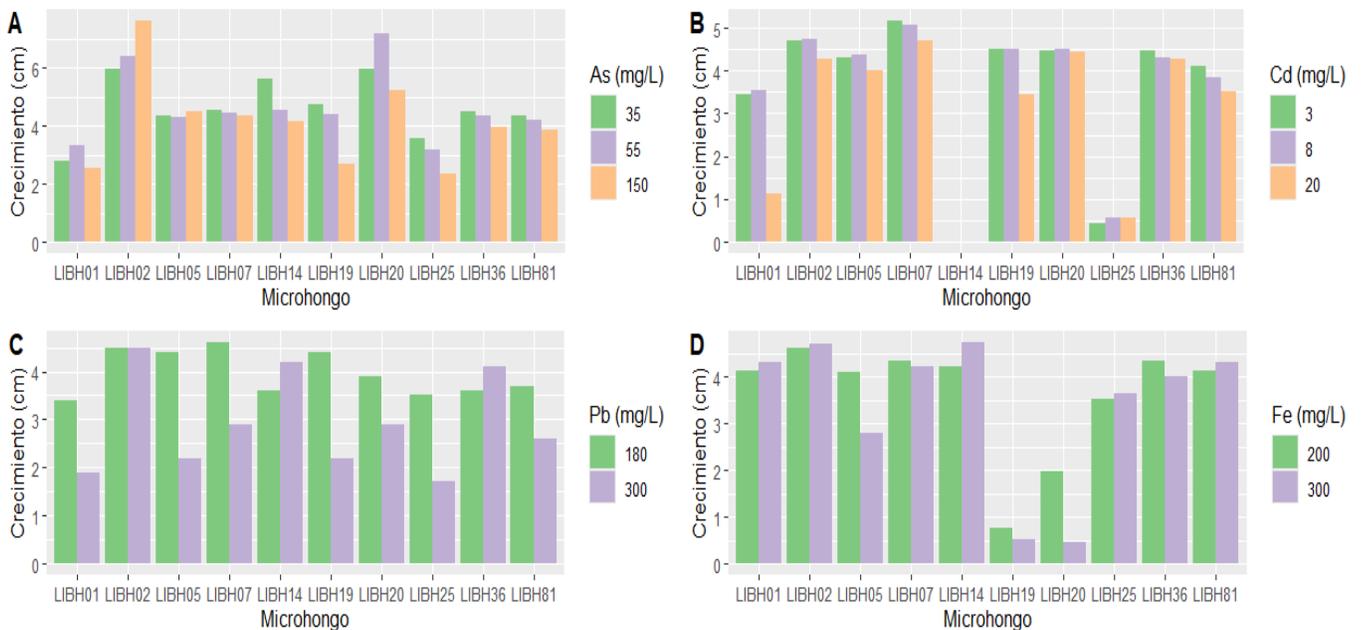


Figura 2. Crecimiento de las cepas de microhongos de acuerdo con las diferentes concentraciones de los metales. **A.** Arsénico, **B.** Cadmio, **C.** Plomo y **D.** Hierro.

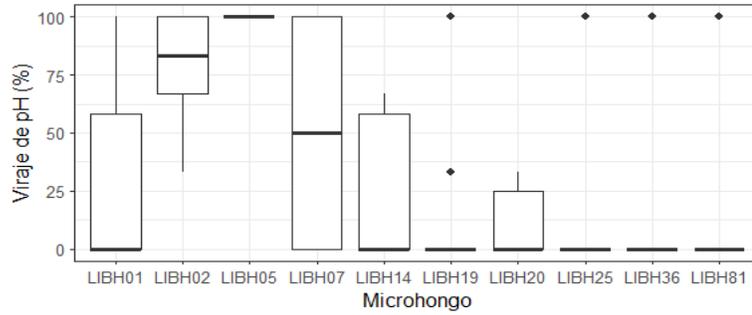


Figura 3. Distribución media del viraje de pH en las placas de medio por los microhongos.

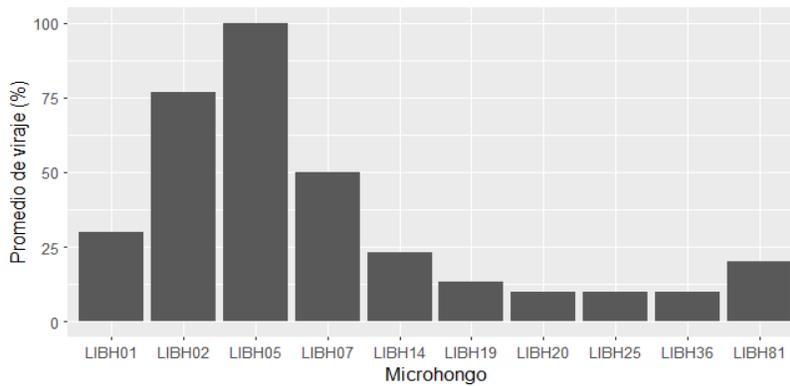


Figura 4. Promedio del porcentaje de viraje de pH por cada microhongo analizado.

También, se puede inferir que, por lo general, conforme aumenta la concentración, disminuye el crecimiento como lo confirma la prueba de correlación de Spearman, la cual muestra una correlación negativa o inversamente proporcional (Figura 5). No obstante, en algunos casos ocurre lo contrario, ciertos hongos se muestran más resistentes conforme aumentan las concentraciones de estos metales, como pasa con LIBH5 y LIBH7 en los medios de arsénico y cadmio respectivamente, por lo que ambos ejemplares muestran un alto potencial para ser utilizados en pruebas de remediación.

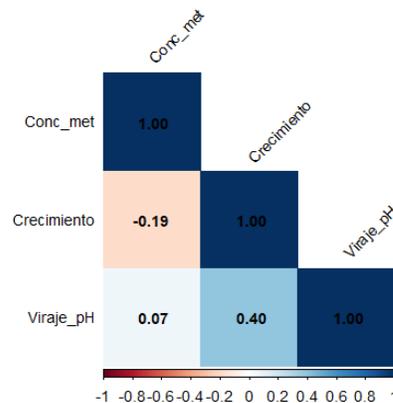


Figura 5. Matriz de correlación de variables de la prueba Spearman.

4. Discusión

Los hongos filamentosos son organismos que poseen resistencia a ambientes de estrés gracias a la composición de su pared celular, por lo cual pueden resistir ambientes con acidez muy baja y elevadas concentraciones de metales (Arrieta-Aquise, 2019). Mediante estas pruebas, se pudo identificar los hongos con mayor tolerancia, lo que facilita una evaluación más selectiva al reducir la cantidad de hongos analizados. Así, se seleccionan únicamente aquellos que presentan mayor resistencia a altas concentraciones del metal evaluado (Muñoz-Silva et al., 2019). Los hongos que presentaron mayor tolerancia a las concentraciones de metal en general fueron LIBH2, LIBH5, LIBH7, LIBH36 y LIBH81; siendo la mejor entre ellas la cepa LIBH2, dado que siempre presentó los mejores resultados de crecimiento sin importar el metal (Figura 1 y 2).

No obstante, al considerar también el viraje del pH del medio a básico, sólo destacan las cepas LIBH2, LIBH5, LIBH7 (Figura 4 y 5), principalmente las dos primeras. Esto es especialmente importante, dado que, en procesos de biorremediación de pasivos mineros, es vital mantener condiciones básicas del pasivo, puesto que cuanto más ácido es el pH del medio en donde se encuentran los metales, estos se liberan más fácilmente al ambiente, volviéndose más disponibles y llegando a las fuentes de agua mediante la escorrentía cuando se da la temporada de lluvias (Rojas-Conejo et al., 2021).

En general, las cepas LIBH2, LIBH5, LIBH7 muestran un buen potencial de biorremediación al demostrar resistencia a las diferentes concentraciones de metales usadas en el estudio con un buen desarrollo y mostrando aumentos en el pH, lo que contribuye a reducir la liberación de metales tóxicos al entorno. De igual forma, si se desea considerar un metal en particular para otros tipos de biorremediación, como por ejemplo para plomo, uno de los metales más tóxicos del planeta, por lo que la existencia de organismos que posean tolerancia a este, son de importancia para el desarrollo de estudios con fines de biorremediación (Muñoz-Silva et al. 2019), se podría considerar algunas otras cepas como la LIBH14, que pese a que no crece en medios con Cd, es muy eficiente con Pb; por lo que no se podría descartar del todo las demás cepas, y se recomienda continuar con ensayos en pequeña escala para estimar su potencial real así como la identificación molecular de las tres mejores cepas.

5. Referencias

Arrieta Aquise. (2019). Biosorción de metales pesados por hongos filamentosos, aislados de cuerpos de agua altoandinos contaminados con relaves mineros de la sierra central del Perú [Tesis de grado]. Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Perú. <https://core.ac.uk/download/pdf/323345574.pdf>

Muñoz-Silva, L., Olivera-Gonzales, P., Santillán-Torres, M., & Tamariz-Angeles, C. (2019). Microorganismos tolerantes a metales pesados del pasivo minero Santa Rosa, Jangas (Perú). *Revista peruana de biología*, 26(1). http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1727-99332019000100013

Rojas-Conejo, J., Picado Pavón, F., Suárez Serrano, A., van Gestel, C. A. M., Golcher Benavides, C., & Durán Sanabria, G. (2021). Mining environmental liabilities: a potential source of metal

contamination for freshwater ecosystems in Costa Rica. Geographical Journal of Central America, 1(68), 333-356. <https://doi.org/10.15359/rgac.68-1.12>

6. **Anexo.** Código en R utilizado para: la importación de datos, el análisis, las figuras, etc.

#ANALISIS DE DATOS HONGOS

#1. Cargar programas para uso de datos estadísticos

```
library(tidyverse)
library(readxl)
library(rstatix)
library(ggplot2)
library(dplyr)
library(forcats) # para reordenar los ejes x
install.packages("corrplot")
library(corrplot)
install.packages("ggcorrplot")
library(ggcorrplot)
install.packages("cowplot")
library(cowplot)
```

#2. Cargar base de datos/importar datasets

```
hong <- read_excel("C:/Users/Anny/Desktop/R/Libano/HONGOS.xlsx")
```

#3. Mostrar la parte superior de los datos

```
head(hong)
```

#4. Mostrar su estructura y tipo de variables

```
str(hong)
```

#4.1 Combinar las variables en una sola columna de factor

```
hong |>
  filter(Microhongo %in% c("LIBH1", "LIBH2", "LIBH5", "LIBH7", "LIBH14", "LIBH19", "LIBH20",
"LIBH25", "LIBH36", "LIBH81")) |>
  mutate(across(Microhongo, ~as.factor(.x))) |>
  group_by(Microhongo, Metal, Crecimiento)
```

```
hong$Microhongo <- as.factor(hong$Microhongo) #convertir Microhongo a factor
```

#5. Histograma

```
hist(hong$`Crecimiento`,
      main = "Distribución del crecimiento de los microhongos", # Título del histograma
      xlab = "Crecimiento", # Etiquetar el eje X
      ylab = "Frecuencia") # Etiquetar el eje Y
```

```
hist(hong$`Viraje_pH`,
      main = "Distribución del viraje de pH de los microhongos", # Título del histograma
      xlab = "Viraje de pH", # Etiquetar el eje X
      ylab = "Frecuencia") # Etiquetar el eje Y
```

#7. Estadística descriptiva

```
hong |>
  get_summary_stats(type = "mean_sd")
```

#8. Identificar valores extremos

```
hong |>
  identify_outliers(Crecimiento)
```

#9. Prueba de normalidad de datos, para saber si son o no normales

hong |>

shapiro_test(Crecimiento) #p (0.000000491)<0.05 por lo que los datos no vienen de una distribución normal

hong |>

shapiro_test(Viraje_pH) #p (4.09e-13)<0.05 por lo que los datos no vienen de una distribución normal

#10. Prueba de homogeneidad de varianzas.

hong |>

levene_test(Crecimiento ~ Microhongo, center = "median") #p (0.0138)<0.05 por lo que las varianzas entre los hongos es diferente

hong |>

levene_test(Viraje_pH ~ Microhongo, center = "median")

#11. Comparación de medianas (con kruskal por ser datos no normales)

hong |>

kruskal_test(Crecimiento ~ Microhongo) # p(0.000000101)<0.05 por lo menos hay 2 hongos signif. diferentes en crecimiento entre ellos.

hong |>

kruskal_test(Viraje_pH ~ Metal) # p(0.0508)> 0.05 no hay dif. sigif entre el metal y el viraje de pH

hong |>

kruskal_test(Crecimiento ~ Metal) # p(0.0324) < 0.05 por lo menos hay 2 metales signif. diferentes en crecimiento entre ellos.

hong |>

kruskal_test(Viraje_pH ~ Microhongo) # p(0.000000587) < 0.05 por menos hay 2 hongos signif. diferentes en cuanto a viraje de pH.

#12. Determinar cuál de los factores es diferente

#12.1 Viraje_pH ~ Microhongo

```
dunn_matrix <- hong |>
  dunn_test(Viraje_pH ~ Microhongo)
View(dunn_matrix) # Imprime todas las filas
```

#12.2 Crecimiento ~ Microhongo

```
dunn_matrix2 <- hong |>
  dunn_test(Crecimiento ~ Microhongo)
View(dunn_matrix2)
```

#12.3 Viraje_pH ~ Metal

```
dunn_matrix3 <- hong |>
  dunn_test(Viraje_pH ~ Metal)
View(dunn_matrix3)
```

#12.4 Crecimiento ~ Metal

```
dunn_metal <- hong |>
  dunn_test(Crecimiento ~ Metal)
View(dunn_metal)
```

#13. Ver diferencias a través de gráficos

#13.1 Convertir columnas de categoría a factor para poder hacer los gráficos

```
hong$Metal <- factor(hong$Metal) #convierto a factor tipo de metal
```

#13.2 Grafico de boxplot de Crecimiento por Microhongo

```
ggplot(data=hong, mapping = aes(x=Microhongo, y=Crecimiento))+
  geom_boxplot()+
```

```
theme_bw()+  
theme(legend.position="right")+  
labs(y = "Crecimiento (cm)")
```

#13.3 Grafico de boxplot de Viraje de pH por Microhongo

```
ggplot(data=hong, mapping = aes(x=Microhongo, y=Viraje_pH))+  
geom_boxplot()+  
theme_bw()+  
theme(legend.position="right")+  
labs(y = "Viraje de pH (%)")
```

#13.4 Grafico de barras Crecimiento x Tipo de hongo x Metal x Concentración

#13.4.1 Hacer diferentes tablas filtrando por metal

```
As <- hong |>  
select(Microhongo, Conc_met, Crecimiento, Metal) |>  
filter(Metal == "As")
```

```
Pb <- hong |>  
select(Microhongo, Conc_met, Crecimiento, Metal) |>  
filter(Metal == "Pb")
```

```
Cd <- hong |>  
select(Microhongo, Conc_met, Crecimiento, Metal) |>  
filter(Metal == "Cd")
```

```
Fe <- hong |>  
select(Microhongo, Conc_met, Crecimiento, Metal) |>  
filter(Metal == "Fe")
```

#13.4.2 Hacer cada gráfica de columnas por metal para posteriormente juntar todos

```
AsG <- As |>
  filter(Microhongo %in% c("LIBH01", "LIBH02", "LIBH05", "LIBH07", "LIBH14", "LIBH19",
    "LIBH20", "LIBH25", "LIBH36", "LIBH81")) |>
  group_by(Microhongo, Conc_met, Crecimiento) |>
  summarise(mean = mean(Crecimiento),
    .groups = "drop") |>
  group_by(Microhongo, Conc_met) |>
  summarise(mean = mean(Crecimiento),
    .groups = "drop") |>
  ggplot(aes(x = Microhongo,
    y = mean,
    fill = as.factor(Conc_met))) +
  labs(y = "Crecimiento (cm)",
    fill = "As (mg/L)") +
  geom_col(position = "dodge") +
  scale_fill_manual(values = RColorBrewer::brewer.pal(5, "Accent"))
```

```
PbG <- Pb |>
  filter(Microhongo %in% c("LIBH01", "LIBH02", "LIBH05", "LIBH07", "LIBH14", "LIBH19",
    "LIBH20", "LIBH25", "LIBH36", "LIBH81")) |>
  group_by(Microhongo, Conc_met, Crecimiento) |>
  summarise(mean = mean(Crecimiento),
    .groups = "drop") |>
  group_by(Microhongo, Conc_met) |>
  summarise(mean = mean(Crecimiento),
    .groups = "drop") |>
  ggplot(aes(x = Microhongo,
    y = mean,
```

```
fill = as.factor(Conc_met))) +  
labs(y = "Crecimiento (cm)",  
fill = "Pb (mg/L)") +  
geom_col(position = "dodge") +  
scale_fill_manual(values = RColorBrewer::brewer.pal(5, "Accent"))
```

```
CdG <- Cd |>
```

```
filter(Microhongo %in% c("LIBH01", "LIBH02", "LIBH05", "LIBH07", "LIBH14", "LIBH19",  
"LIBH20", "LIBH25", "LIBH36", "LIBH81")) |>
```

```
group_by(Microhongo, Conc_met, Crecimiento) |>
```

```
summarise(mean = mean(Crecimiento),
```

```
.groups = "drop") |>
```

```
group_by(Microhongo, Conc_met) |>
```

```
summarise(mean = mean(Crecimiento),
```

```
.groups = "drop") |>
```

```
ggplot(aes(x = Microhongo,
```

```
y = mean,
```

```
fill = as.factor(Conc_met))) +
```

```
labs(y = "Crecimiento (cm)",
```

```
fill = "Cd (mg/L)") +
```

```
geom_col(position = "dodge") +
```

```
scale_fill_manual(values = RColorBrewer::brewer.pal(5, "Accent"))
```

```
FeG <- Fe |>
```

```
filter(Microhongo %in% c("LIBH01", "LIBH02", "LIBH05", "LIBH07", "LIBH14", "LIBH19",  
"LIBH20", "LIBH25", "LIBH36", "LIBH81")) |>
```

```
group_by(Microhongo, Conc_met, Crecimiento) |>
```

```
summarise(mean = mean(Crecimiento),
```

```
.groups = "drop") |>
```

```
group_by(Microhongo, Conc_met) |>
```

```

summarise(mean = mean(Crecimiento),
  .groups = "drop") |>
ggplot(aes(x = Microhongo,
  y = mean,
  fill = as.factor(Conc_met))) +
labs(y = "Crecimiento (cm)",
  fill = "Fe (mg/L)") +
geom_col(position = "dodge") +
scale_fill_manual(values = RColorBrewer::brewer.pal(5, "Accent"))

```

#13.4.3 Unir gráficos

```

Metales <- plot_grid(AsG, CdG, PbG, FeG,
  labels = c("A", "B", "C", "D"),
  label_size = 14)

```

Metales # Visualizar todos juntos

#13.5 Gráfico de barras para viraje de pH

```

hong |>
group_by(Microhongo) |>
summarise(mean = mean(Viraje_pH),
  .groups = "drop") |>
ggplot(aes(x = Microhongo,
  y = mean)) +
labs(y = "Promedio de viraje (%)") +
geom_col()

```

#14. Correlación de variables

```

cor_matrix <- hong |>
select(Crecimiento, Viraje_pH, Conc_met) |>

```

```
cor_test(vars = c(Crecimiento, Viraje_pH, Conc_met),
  vars2 = c(Crecimiento, Viraje_pH, Conc_met),
  method = "spearman")
```

#14.1. Gráfico de correlación

#14.1.1 Seleccionar solo columnas numéricas

```
hongo_numeric <- hong[sapply(hong, is.numeric)]
```

#14.1.2 Calcular la matriz de correlación usando Spearman

```
cor_matrix2 <- cor(hongo_numeric, method = "spearman", use = "complete.obs")
```

#14.1.3. Graficar usando corrplot

```
corrplot(cor_matrix2,
  method = "color",    # Usar colores para representar la correlación
  type = "lower",      # Mostrar solo la mitad inferior
  tl.cex = 0.8,        # Tamaño del texto en las etiquetas
  addCoef.col = "black", # Color de los coeficientes
  tl.col = 'black',
  number.cex = 0.8,    # Tamaño de los coeficientes
  tl.srt = 45,         # Rota la etiqueta en angulo de 45 grados
  title = "Matriz de Correlación (Spearman)",
  mar = c(0, 0, 1, 0)) # Ajuste de los márgenes
```