



**UNIVERSIDAD NACIONAL DE CAJAMARCA**  
**FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD**  
**E.A.P. DE BIOLOGÍA Y BIOTECNOLOGÍA**



**TESIS**

**BIOSORCIÓN DE METALES PESADOS POR EXOPOLISACÁRIDOS**  
**PRODUCIDOS POR CIANOBACTERIAS TERMÓFILAS PROVENIENTES DE**  
**BAÑOS DEL INCA – CAJAMARCA**

**PARA OBTAR POR EL TÍTULO PROFESIONAL DE**  
**BIÓLOGO BIOTECNÓLOGO**

**PRESENTADO POR:**

**BACH. MARÍA TANIA ALIAGA SÁNCHEZ**

**ASESOR:**

**MBLGO. LUIS FELIPE VALDEZ NUÑEZ**

**CAJAMARCA – PERÚ**

**2024**

## CONSTANCIA DE INFORME DE ORIGINALIDAD

- Investigador: **María Tania Aliaga Sánchez**  
DNI: **71781318**  
  
Escuela Profesional/Unidad UNC: **ESCUELA ACADÉMICO DE BIOLOGÍA Y BIOTECNOLOGÍA**
- Asesor: **Mblgo. LUIS FELIPE VALDEZ NUÑEZ**  
Facultad/Unidad UNC: **FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD**
- Grado académico o título profesional  
 Bachiller     Título profesional     Segunda especialidad  
 Maestro     Doctor
- Tipo de Investigación:  
 Tesis     Trabajo de investigación     Trabajo de suficiencia profesional  
 Trabajo académico
- Título de Trabajo de Investigación: **BIOSORCIÓN DE METALES PESADOS POR EXOPOLISACÁRIDOS PRODUCIDOS POR CIANOBACTERIAS TERMÓFILAS PROVENIENTES DE BAÑOS DEL INCA - CAJAMARCA**
- Fecha de evaluación del Software antiplagio: **31/7/2024**
- Software antiplagio:  **TURNITIN**     **URKUND (OURIGINAL) (\*)**
- Porcentaje de Informe de Similitud: **10%**
- Código Documento: **oid:3117:370978946**
- Resultado de la Evaluación de Similitud:  
 **APROBADO**     **PARA LEVANTAMIENTO DE OBSERVACIONES O DESAPROBADO**

Cajamarca, 2 de agosto del 2024

		Firma y/o Sello Emisor Constancia
		
<b>Dra. Martha Vicenta Abanto Villar</b> DIRECTORA DE LA UNIDAD DE INVESTIGACIÓN POS		
<b>DNI: 26673990</b>		

\* En caso se realizó la evaluación hasta setiembre de 2023

COPYRIGHT©  
**MARÍA TANIA ALIAGA SÁNCHEZ**  
Todos los derechos reservados

## FICHA CATALOGRÁFICA

Aliaga Sánchez, M. 2024. **Biosorción de metales pesados por exopolisacáridos producidos por cianobacterias termófilas provenientes de Baños del Inca – Cajamarca** / María Tania Aliaga Sánchez.

Escuela Académico Profesional de Biología y Biotecnología

Asesor: Mblgo. Luis Felipe Valdez Nuñez

Disertación académica para obtener el título profesional de Biólogo Biotecnólogo – UNC  
2024.

**BIOSORCIÓN DE METALES PESADOS POR EXOPOLISACÁRIDOS  
PRODUCIDOS POR CIANOBACTERIAS TERMÓFILAS PROVENIENTES DE  
BAÑOS DEL INCA – CAJAMARCA**

**AUTORA:** María Tania Aliaga Sánchez

**ASESOR:** Mblgo. Luis Felipe Valdez Nuñez

Tesis evaluada y aprobada para la obtención del Título Profesional de Biólogo Biotecnólogo de la Universidad Nacional de Cajamarca, por los siguientes jurados.

**JURADO EVALUADOR**



.....  
Presidente  
M.Cs. Arturo Díaz Aliaga



.....  
Secretario  
M. Cs. Néstor Estuardo Carbajal Caballero



.....  
Vocal  
M.Cs. Rodolfo Raúl Orejuela Chirinos

Cajamarca, 2024 – Perú.



**MODALIDAD "A"**

**ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS PARA LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO PROFESIONAL DE BIÓLOGO BIOTECNÓLOGO**

En Cajamarca, siendo las 08:00 am del 15 de Julio del 2024, los integrantes del Jurado Evaluador para la revisión y sustentación de la tesis, designados en Consejo de Facultad a propuesta del Departamento Académico, reunidos en el ambiente 11-304 de la Facultad de Ciencias de la Salud de la Universidad Nacional de Cajamarca, dan inicio a la sustentación de tesis denominada: Biosorción de metales pesados por exopolisacáridos producidos por cianobacterias termófilas provenientes de Baños del Inca - Cajamarca.

del (a) Bachiller en Ciencias Biológicas:

María Temia Aliaga Sánchez

Siendo las 09:20 am del mismo día, se da por finalizado el proceso de evaluación, el Jurado Evaluador da su veredicto en los siguientes términos: Muy bueno, con el calificativo de: 18, con lo cual el (la) Bachiller en Ciencias Biológicas se encuentra APTA para la obtención del Título Profesional de: **BIÓLOGO BIOTECNÓLOGO**.

Miembros Jurado Evaluador		Firma
Nombres y Apellidos		
Presidente:	<u>Arturo Diego Aliaga</u>	
Secretario(a):	<u>Néstor Estuardo Carbajal Caballero</u>	
Vocal:	<u>Rodrigo Raúl Orejuela Chirinos</u>	
Accesitaria:	—	
Asesor (a):	<u>Luis Felipe Valdez Nuñez</u>	
Asesor (a):	—	

Términos de Calificación:  
 EXCELENTE (19-20)  
 REGULAR (12-13)

MUY BUENO (17-18)  
 REGULAR BAJO (11)

BUENO (14-16)  
 DESAPROBADO (10 a menos)

## AGRADECIMIENTO

En primer lugar, agradezco a mis padres, quienes siempre han sido mis guías, me han brindado su apoyo incondicional y han sido el pilar que ha sustentado cada uno de mis logros, gracias por enseñarme el valor de ser perseverante. A mi pequeño Otto, por siempre ser mi confort cuando más lo necesito, y a mis queridos amigos, que siempre estuvieron brindándome su ayuda.

A todos los docentes que me impartieron sus conocimientos y consejos durante los años de mi preparación profesional, en especial, quiero expresar mi gratitud al Mblgo. Luis Felipe Valdez Núñez, mi asesor, por brindarme su tiempo, sabiduría y constante apoyo en cada etapa del desarrollo de este proyecto. Su orientación y paciencia fueron esenciales para la culminación exitosa de esta tesis.

Agradezco a la Universidad Nacional de Cajamarca, especialmente al Laboratorio de Biología Molecular y al Laboratorio de Microbiología, pertenecientes al Departamento de Ciencias Biológicas, y al Laboratorio de Inmunología e Investigación de Ciencias Veterinarias, por recibirme siempre con las puertas abiertas y permitirme el uso de sus instalaciones y equipos. También extiendo mi gratitud al Departamento de Ciencias Químicas y Dinámicas por facilitarme el acceso a los reactivos empleados en esta tesis, así como a la gerencia del complejo turístico Baños del Inca, por facilitarme el acceso a sus instalaciones para la toma de muestras durante el periodo de realización de este trabajo de investigación.

## TABLA DE CONTENIDO

TÍTULO .....	v
RESUMEN .....	vi
ABSTRACT.....	vii
CAPÍTULO I.....	1
INTRODUCCIÓN.....	1
CAPÍTULO II .....	4
MARCO TEÓRICO .....	4
2.1 Antecedentes de la investigación .....	4
2.2 Bases teóricas .....	7
2.2.1 Fuentes termales .....	7
2.2.2 Cianobacterias .....	7
2.2.3 Exopolisacáridos .....	9
2.2.4 Biosíntesis de exopolisacáridos .....	10
2.2.5 Biosorción .....	12
2.2.6 Metales pesados .....	14
CAPÍTULO III .....	18
DISEÑO DE CONTRASTACIÓN DE LA HIPÓTESIS .....	18
3.1 Nivel y diseño de estudio .....	18
3.2 Material biológico .....	18
3.3 Descripción del lugar del muestreo .....	18
3.4 Toma de muestras y determinación de parámetros fisicoquímicos .....	19
3.5 Enriquecimiento de cianobacterias termófilas .....	19
3.6 Ensayo de biosorción de metales .....	20
3.7 Ensayos microbiológicos .....	21
3.7.1 Observación e identificación preliminar de cianobacterias .....	21
3.7.2 Curva de crecimiento celular .....	21
3.8 Métodos analíticos .....	21
3.8.1 Análisis de metales solubles .....	21
3.8.2 Caracterización química de EPS .....	22
3.8.2.1 Extracción de exopolisacáridos capsulares (C-EPS) .....	22
3.8.2.2 Extracción de exopolisacáridos débilmente unidos (LB-EPS) .....	23
3.8.2.3 Extracción de exopolisacáridos estrechamente unidos (TB-EPS) .....	23
3.8.2.4 Cuantificación de carbohidratos .....	24
3.8.2.5 Cuantificación de acetilos .....	24
3.8.2.6 Cuantificación de fosfatos .....	24
3.8.2.7 Cuantificación de sulfatos .....	25
3.9 Procesamiento y análisis de datos .....	25
CAPÍTULO IV .....	26
RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	26

4.1 Resultados .....	26
4.1.1 Parámetros fisicoquímicos del sitio del muestreo .....	26
4.1.2 Biosorción de metales pesados .....	26
4.1.3 Géneros de cianobacterias termófilas .....	33
4.1.4 Caracterización de EPS .....	37
4.1.4.1 Cuantificación de los carbohidratos .....	37
4.1.4.2 Cuantificación de acetilos .....	38
4.1.4.3 Cuantificación de fosfatos .....	38
4.1.4.4 Cuantificación de sulfatos .....	39
4.2 Discusión .....	40
4.2.1 Parámetros fisicoquímicos del sitio de muestreo .....	40
4.2.2 Cianobacterias termófilas .....	41
4.2.3 Biosorción de metales pesados por exopolisacáridos producidos por cianobacterias termófilas .....	43
4.2.4 Caracterización química de EPS producidos por cianobacterias .....	46
CAPÍTULO V .....	49
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES .....	49
5.1 Conclusiones .....	49
5.2 Recomendaciones .....	50
LISTA DE REFERENCIAS .....	51
APÉNDICES .....	57
ANEXOS.....	71

## **Lista de abreviaciones**

**EPS:** Exopolisacárido

**LB-EPS:** Exopolisacáridos débilmente unidos

**TB-EPS:** Exopolisacáridos estrechamente unidos

**C-EPS:** Exopolisacáridos capsulares

**BIOSORCIÓN DE METALES PESADOS POR EXOPOLISACÁRIDOS  
PRODUCIDOS POR CIANOBACTERIAS TERMÓFILAS PROVENIENTES DE  
BAÑOS DEL INCA – CAJAMARCA**

## RESUMEN

La presente investigación tuvo como objetivo evaluar la biosorción de metales pesados empleando exopolisacáridos (EPS) producidos por cianobacterias termófilas provenientes de las fuentes termales Baños del Inca de la región Cajamarca. Para la obtención de las cianobacterias, se realizó un enriquecimiento a partir de los tapetes extraídos de las fuentes termales (45°C). Posteriormente, se evaluó la capacidad de biosorción de metales por los EPS producidos por las cianobacterias empleando el medio de cultivo D suplementado con Mn, Ba, Ni, Cu, Zn, Pb y As durante los días 0, 4, 8, 20 y 30. Durante este ensayo, se identificaron microscópicamente a las cianobacterias que crecieron en el medio de cultivo y también se cuantificó el contenido de carbohidratos, acetilos, sulfatos y fosfatos de los EPS que produjeron. Los resultados indican que las cianobacterias termófilas pertenecen a los géneros *Synechococcus* sp. *Pseudoanabaena* sp. y *Planktohris* sp. En cuanto a la biosorción de metales, los EPS producidos por estas cianobacterias fueron capaces de disminuir hasta un 22.76% de níquel, 78.43% de cobre, 76.92% de zinc y 81.75% de plomo a 45°C, pH 7.12 en un periodo de 30 días. Sin embargo, no mostraron capacidad de biosorber As, Mn y Ba bajo estas mismas condiciones. En cuanto al análisis de EPS, al final del experimento, se estimó que estaban constituidos por 0.41 µg/mL de carbohidratos,  $18.53 \times 10^{-2}$  µg/L de acetilos,  $6.86 \times 10^{-4}$  de fosfatos y  $13.83 \times 10^{-2}$  µg/L de sulfatos. Esta investigación podría constituir uno de los primeros registros de procesos de biorremediación empleando cianobacterias termófilas en la ciudad de Cajamarca.

**Palabras clave:** Cianoabacterias termófilas, exopolisacáridos, metales pesados, biosorción.

## ABSTRACT

The aim of the present research was to evaluate the biosorption of heavy metals using exopolysaccharides (EPS) produced by thermophilic cyanobacteria recovered from the Baños del Inca hot springs in the Cajamarca city. To obtain the cyanobacteria, enrichment was performed from microbial mats extracted from the hot springs (45°C). Subsequently, the metal biosorption capacity of the EPS produced by the cyanobacteria was evaluated using D culture medium supplemented with Mn, Ba, Ni, Cu, Zn, Pb, and As during days 0, 4, 8, 20, and 30. During this assay, the cyanobacteria that grew in the culture medium were microscopically identified, and the carbohydrate, acetyl, sulfate, and phosphate content of the produced EPS was quantified. The results indicate that the thermophilic cyanobacteria belong to the genera *Synechococcus sp.*, *Pseudoanabaena sp.*, and *Planktothrix sp.* Regarding metal biosorption, the EPS produced by these cyanobacteria were able to reduce up to 22.76% of nickel, 78.43% of copper, 76.92% of zinc, and 81.75% of lead at 45°C, pH 7.12 over a period of 30 days. However, they did not show the ability to biosorb As, Mn, and Ba under these same conditions. As for the EPS analysis, at the end of the experiment, they were estimated to be composed of 0.41 µg/mL of carbohydrates,  $18.53 \times 10^{-2}$  µg/L of acetyls,  $6.86 \times 10^{-4}$  of phosphates, and  $13.83 \times 10^{-2}$  µg/L of sulfates. This research could constitute one of the first records of bioremediation processes using thermophilic cyanobacteria in the city of Cajamarca.

**Key words:** Thermophilic cyanobacteria, exopolysaccharides, heavy metals, biosorption.

# CAPÍTULO I

## INTRODUCCIÓN

Los metales pesados (metales o metaloides) se caracterizan por tener un número atómico mayor a 20 y una densidad superior a los 5g/cm<sup>3</sup>; además, estos suelen estar relacionados a la ecotoxicidad y efectos adversos a la salud cuando son liberados al ambiente (Faisal et al., 2020). En Cajamarca, las principales fuentes de estos contaminantes provienen de actividades antropogénicas relacionadas con la minería, fundiciones, combustibles fósiles, desechos municipales, plaguicidas y fertilizantes, así como con la contaminación por desechos electrónicos (Kim, Kim y Kumar, 2019), las cuales se realizan a la intemperie, exponiendo así los metales en los ecosistemas circundantes (p.e. ríos, lagunas, etc.). La falta de estrategias para mitigar la contaminación por metales en Cajamarca es preocupante, por lo cual es necesario abordar este tema ya que en la actualidad sigue sin una solución aparente (Rodríguez Díaz, 2020).

Existen métodos químicos y físicos para la remoción de metales de medios acuosos, tales como precipitación química, intercambio iónico, recuperación por evaporación, reacciones químicas de oxidación o reducción, ósmosis inversa, recuperación electrolítica, entre otros (Tripathi et al., 2023). Sin embargo, estos métodos suelen tener diversas desventajas, tales como: costos elevados, producción de grandes cantidades de lodos o subproductos potencialmente tóxicos (Vareda, Valente y Durães, 2019). No obstante, otros métodos alternativos basados en la biorremediación (empleo de organismos biológicos para la remoción de contaminantes orgánicos e inorgánicos)

pueden también remover metales. Hoy en día, estas alternativas vienen siendo exploradas debido a que son tratamientos económicos y eficaces (Tripathi et al., 2023).

Microorganismos tales como las cianobacterias podrían ser candidatos ideales en procesos de biorremediación debido a que estos microorganismos son ubicuos; ya que podemos encontrarlos en ambientes como agua dulce, océanos e incluso en suelos (Zahra et al., 2020). Además, las cianobacterias tienen una naturaleza mixótrofa, lo que les permite sobrevivir en ambientes diversos, y las vuelve más convenientes al momento de cultivarlas frente a otros microorganismos (Mona et al., 2020). Adicionalmente, las cianobacterias pueden producir exopolisacáridos (EPS), los cuales pueden biosorber metales (remoción de un metal mediante su unión a un material de origen biológico). Cabe resaltar que este proceso se caracteriza por no generar subproductos (e.g., lodos), ser rentable y sostenible a comparación de otras tecnologías empleadas para la remoción de metales (Yadav et al., 2021).

La presente investigación tuvo como objetivo evaluar la biosorción de metales pesados por exopolisacáridos producidos por cianobacterias termófilas provenientes de Baños del Inca - Cajamarca durante el año 2023. Para cumplir con este objetivo, se realizó un ensayo de biosorción empleando un medio suplementado con metales, así como con cianobacterias termófilas provenientes de muestras de tapetes microbianos de las fuentes termales del Complejo Turístico Baños del Inca (Cajamarca). Los cultivos fueron caracterizados microscópicamente, determinándose su afiliación taxonómica hasta género. Finalmente, se calculó el porcentaje de biosorción de metales por parte de estos microorganismos durante un periodo de 30 días, así como un análisis de los EPS

producidos, y su contenido de acetilos, sulfatos y fosfatos. Esta investigación podría constituir uno de los primeros registros de procesos de biorremediación empleando cianobacterias termófilas en la ciudad de Cajamarca. Los resultados obtenidos servirán para sentar una base con el fin de poder elaborar métodos alternativos más sostenibles para la remoción de metales pesados en aguas residuales.

## CAPÍTULO II

### MARCO TEÓRICO

#### 2.1 Antecedentes de la investigación

Al-Qahtani y colaboradores (2021), recolectaron tapetes microbianos de cianobacterias provenientes de ambientes extremos. Una de las muestras fue recolectada de una fuente termal localizada en el oasis de Siwa, Egipto. Posteriormente, los tapetes fueron expuestos a soluciones acuosas con los metales Pb, Cu y Ni, con la finalidad de removerlos. Se determinó que el tapete microbiano proveniente de la fuente termal alcanzó una capacidad máxima de biosorción de 100% de Pb, 93.2% de Cu y 73.6% de Ni, empleando como condiciones óptimas de remoción 2.5 g/L de biomasa a pH 6 en un periodo de 150 minutos. Se concluyó que los tapetes de cianobacterias poseen una excelente afinidad para biosorber y eliminar iones metálicos (Pb > Cu > Ni) de soluciones acuosas mezcladas.

En China, un grupo de investigadores emplearon cianobacterias pertenecientes al género *Synechococcus*, las cuales expusieron a diferentes concentraciones de Cs, con la finalidad de determinar las cantidades de biosorción de Cs ( $q_e$ ). Además, se realizó la extracción de EPS y se cuantificaron los polisacáridos con el método de fenol – ácido sulfúrico, y las proteínas con un Kit BCA. Los resultados mostraron que la mayor cantidad de biosorción de Cs ( $q_e$ ) fue de 20.59 mg/g a 40°C. Además, se produjeron 72 mg de polisacáridos por g de biomasa seca y 40 mg de proteínas por g de biomasa seca. Finalmente, se concluyó que la biosorción de los iones de Cs por esta cianobacteria fue

rápida, y los grupos funcionales de los EPS jugaron un papel vital para la unión de los iones de Cs (Yu et al., 2020).

En Pakistán, Iqbal, Javed y Baig (2022) recolectaron muestras procedentes de un estanque de tratamiento de aguas residuales en Islamabad. Realizaron una identificación microscópica con ayuda de la guía “Algal Identification Field Guide” y determinaron que los microorganismos presentes eran *Ankistrodesmus sp.*, *Nostoc sp.* y *Anabaena sp.*. Posteriormente, sometieron a los microorganismos a un ensayo de biosorción de los metales Fe, Cu, Pb, Cr y Zn, durante un periodo de 8 días. Al finalizar, se calcularon la cantidad de iones metálicos eliminados por unidad de masa de cianobacterias (Q), los cuáles fueron: Pb (7.03 mg. g<sup>-1</sup>), Cu (5.85 mg. g<sup>-1</sup>), Zn (5.73 mg. g<sup>-1</sup>), Fe (5.09 mg. g<sup>-1</sup>) y Cr (3.34 mg. g<sup>-1</sup>). Se concluyó que estas cianobacterias tienen un potencial significativo para eliminar iones de metales pesados en el orden: Pb (II) > Cu (II) > Zn (II) > Fe (II) > Cr (VI).

En Madrid, García (2021) caracterizó EPS producidos por diferentes cepas de bacterias provenientes de ambientes extremos (halófilas), empleando técnicas de espectrofotometría UV-VIS. Entre estas técnicas se incluyen el método del fenol-ácido sulfúrico para la determinación carbohidratos, método de McComb y McCready para la determinación de acetilos, el método de Berenblum y Chain para la detección de fosfatos, y el método de Severiche y González para detectar sulfatos. Se determinó que los EPS estaban constituidos por un contenido máximo de 60% de carbohidratos, 17% de acetilos, 4% de fosfatos y sulfatos 7%. Se concluyó que los componentes predominantes de los EPS de las cepas investigadas fueron los carbohidratos.

Carmen y Chávez (2020), recolectaron muestras de cianobacterias provenientes de las fuentes termales “Los Perolitos” del distrito Baños del Inca, de la región Cajamarca. El objetivo fue identificar la producción de algunos metabolitos secundarios. En este estudio se realizó identificación microscópica, llegando a reconocer las especies *Anacystis dimidiata*, *Cocchloris stagnina* y *Oscillatoria prínceps*. Posteriormente, secaron, pulverizaron y tamizaron las muestras y procedieron a realizar ensayos para detectar algunos metabolitos. Finalmente, se concluyó que estas poseen la capacidad de producir lactonas, esteroides, triterpenos, quinonas, deglucósidos cardiotónicos, alcaloides y saponinas.

En Arequipa, Guzmán (2022), cultivó cianobacterias halófilas con el fin de producir EPS para su posterior uso en humectantes dérmicos. Para ello, obtuvo muestras de la Laguna de San Camilo – La Joya. Después de aislar cepas, realizó observaciones microscópicas para la identificación de las cianobacterias y se logró determinar la presencia de los géneros *Euhalothece sp.* y *Synechococcus sp.*. Posteriormente, las cultivó en el medio líquido BG11 durante 15 días y después la biomasa fue expuesta a condiciones ambientales y radiación solar para la obtención de EPS. Finalmente, se realizó la extracción de los EPS y se determinó que la cantidad producida fue de 6.4 g/L para *Euhalothece sp.* y 5.2 g/L para *Synechococcus sp.* Se concluyó que, bajo condiciones de estrés por radiación solar, los microorganismos produjeron las cantidades mencionadas de EPS.

## **2.2 Bases teóricas**

### **2.2.1 Fuentes termales**

Las fuentes termales son de alto interés para los investigadores, debido a sus características fisicoquímicas que permiten el crecimiento de una amplia gama de organismos, entre ellos los termófilos, cuya temperatura óptima de crecimiento está entre los 45 hasta los 80°C. El microbioma de aguas termales ha producido hasta la actualidad una considerable cantidad de enzimas que tienen gran potencial industrial y biotecnológico (Debnath et al., 2019). En la región Cajamarca contamos con las fuentes termales Chancay Baños, Pinipata Baños, Bombón, El Cumbe, Quilcate, Llanguat, Baños Jerez, Yumagual, El Tragadero y Baños del Inca (Huamaní, 2000).

### **2.2.2 Cianobacterias**

Son bacterias fototróficas oxigénicas unicelulares que pueden encontrarse como filamentos y en colonias. Su tamaño varía desde los 0.5  $\mu\text{m}$  hasta 100  $\mu\text{m}$  de diámetro. Utilizan fotosistemas del tipo FeS y tipo Q. Fijan  $\text{CO}_2$  empleando el ciclo de Calvin; la mayoría puede fijar  $\text{N}_2$  y sintetizar sus vitaminas. También pueden generar energía por fermentación o respiración aeróbica de productos de almacenamiento de carbono como el glucógeno. Su pared celular está compuesta por péptido glucano. Poseen tilacoides, los cuáles sirven para incrementar la capacidad para acumular energía luminosa. El dióxido de carbono es la fuente predominante de carbono, pero también pueden asimilar algunos compuestos orgánicos (Madigan et al., 2018).

Durante el año 1971, Stanier y su equipo de trabajo acuñaron el término “cianobacteria”. Posteriormente, en el año 1977, Stanier y Cohen-Bazire ubicaron taxonómicamente a

estos microorganismos en el súper reino Prokaryotae. Asimismo, pertenecen al dominio Bacteria; división, clase y orden Cyanobacteria, que a su vez incluye alrededor de 5 órdenes, 150 géneros y alrededor de 2000 especies. Los cinco órdenes reconocidos en el esquema taxonómico botánico clásico son: Chroococcales, Pleurocapsales, Oscillatoriales, Nostocales y Stigonematales. Actualmente, su clasificación se basa en la composición de la base del ADN, hibridación ADN – ADN, isoenzimas, entre otros métodos (Mona et al., 2020).

Cabe destacar que las cianobacterias tienen características que las vuelve llamativas frente a otros organismos. Poseen la capacidad de adaptarse para sobrevivir ante cambios ambientales, una alta tasa de crecimiento, y la capacidad de crecer en diversos tipos de entornos. Además, tienen potencial para ser un recurso para la producción de biocombustibles, fuente de producción de metabolitos secundarios, suplementos alimenticios, biofertilizantes, productor de biomoléculas y ácidos grasos poliinsaturados. También se exploran sus aplicaciones potenciales en medicina y la biorremediación de contaminantes como metales pesados, petróleo crudo, pesticidas, fenantreno, naftaleno, fenoles y xenobióticos (Zahra et al., 2020).

Los microorganismos cuya temperatura óptima de crecimiento se encuentra entre los 45°C y los 80°C, son denominados termófilos. Estos a su vez, se pueden clasificar en termófilos moderados, que crecen a 45°C o más, y termófilos extremos, que crecen en un rango de 65 a 80°C (Debnath et al., 2019). Para poder sobrevivir a temperaturas elevadas, las cianobacterias poseen diversas características, como membranas celulares constituidas por ácidos hexadecanoicos y ácidos grasos saturados e insaturados. También

tienen alto contenido de C-G en su material genético y suelen agruparse para conformar tapetes en la superficie de las fuentes termales (Madigan et al., 2018). Existen diversos estudios sobre el potencial biotecnológico de algunas bacterias y hongos termófilos; sin embargo, aún falta este tipo de información sobre cianobacterias termófilas (Patel et al., 2019).

### **2.2.3 Exopolisacáridos (EPS)**

Son aquellos polímeros de alto peso molecular que se encuentran en el exterior de la célula. Estas biomoléculas tienen como función facilitar la adhesión del microorganismo que las produce. También sirve como un mecanismo para protegerse ante condiciones adversas y, en algunos casos, pueden ser empleadas como una reserva de energía. Estos polímeros están constituidos principalmente por monosacáridos y, en menor cantidad por acetato, fosfato, piruvato y succinato, etc. (Yildiz y Karatas, 2018). Sin embargo, estos componentes pueden variar debido a factores como la edad del cultivo, temperatura, intensidad lumínica, concentración de metales, etc. (Kumar, Kaštánek y Adhikary, 2018).

Según su composición, los EPS de cianobacterias pueden clasificarse en homopolisacáridos, cuando están conformados solo por un tipo de monosacárido, y heteropolisacáridos, cuando contienen dos o más tipos de monosacáridos en su composición (Yildiz y Karatas, 2018). También se pueden clasificar a estos polímeros según su consistencia, espesor y aspecto en vainas, cápsulas y limos. Las vainas se caracterizan por ser capas finas y densas que se encuentran envolviendo las células; las cápsulas, por otro lado, son capas gruesas y de consistencia viscosa; y, finalmente, el tipo

limo son compuestos mucilaginosos que se encuentran rodeando a los microorganismos (Kumar, Kaštánek y Adhikary, 2018).

Otra característica de los EPS es que poseen una estructura de dos capas distintivas: el EPS fuertemente unido (TB-EPS), localizado en la capa interna, y el EPS débilmente unido (LB-EPS), localizado en la capa externa. Aunque ambas capas presentan una composición similar, existen algunas diferencias tanto en su concentración como en sus características (Ma et al., 2023). Una de estas diferencias es que el LB-EPS tiene una estructura menos compacta y una mayor superficie expuesta que el TB-EPS, razón por la cual tiene más sitios de unión con cationes metálicos. Estas diferencias son fundamentales para los EPS, ya que afectan su capacidad para sorber contaminantes (Lu et al., 2021).

Por otro lado, las cianobacterias se caracterizan por ser productores de cantidades elevadas de exopolisacáridos, los cuales tienen importancia en los ámbitos ecológico, fisiológico e industrial. Los EPS cianobacterianos generalmente son del tipo heteropolisacáridos y suelen estar compuestos, además de monosacáridos, por otras biomoléculas como péptidos, ADN, ácidos grasos, ácidos urónicos, ácido pirúvico, O-metil, O-acetilo, y grupos sulfato. Estas sustancias son empleadas como biofloculantes, acondicionadores de suelo, biopolímeros, complementos alimentarios, para uso médico, formadores de biofilms y para la biorremediación (Parwani, Bhatt y Singh, 2021).

#### **2.2.4 Biosíntesis de exopolisacáridos**

Las vías de síntesis de los exopolisacáridos por cianobacterias están relativamente conservadas entre las especies bacterianas. Este proceso se realiza en diferentes partes de

la célula, según lo mencionan en el libro *Microbial and Natural Macromolecules: Synthesis and Applications* (Nishanth et al., 2020) sucede de la siguiente manera:

“en primer lugar se activan los monosacáridos y se da la conversión en azúcares de nucleótidos en el citoplasma, posteriormente se ensamblan los oligosacáridos con el transportador de lípidos por glicosiltransferasa en la membrana plasmática, después se polimerizan unidades repetidas en el espacio periplásmico y finalmente se instala el polímero al exterior de la célula”.

Existen 3 vías para la producción de EPS (Al-Amin et al., 2021), representadas en la figura 1.

**2.2.4.1** Vía dependiente de Wzx/Wzy: En la vía dependiente de Wzx/Wzy, los factores de transcripción generales (GTF), transfieren azúcar unido a lípidos específicos hasta formar una unidad repetida. Wzx lleva oligosacáridos ligados a lípidos del citoplasma hasta el periplasma, posteriormente, son polimerizados por Wzy.

**2.2.4.2** Vía dependiente del transportador del casete de unión a ATP (ABC): Para realizar la polimerización se requieren de los genes *wza* (codifican proteína de membrana externa), *wz* (codifica tirosina autoquinasa). Los polisacáridos ensamblados son trasladados por el transportador ABC a través de la membrana.

**2.2.4.3** Vía dependiente de sintasa: Se da por cuando se presenta o cuando se ausenta un aceptor de lípidos. La secreción se da a través de la membrana y la pared de la cianobacteria. La traslocación y polimerización están mediadas por una glicosiltransferasa de membrana.

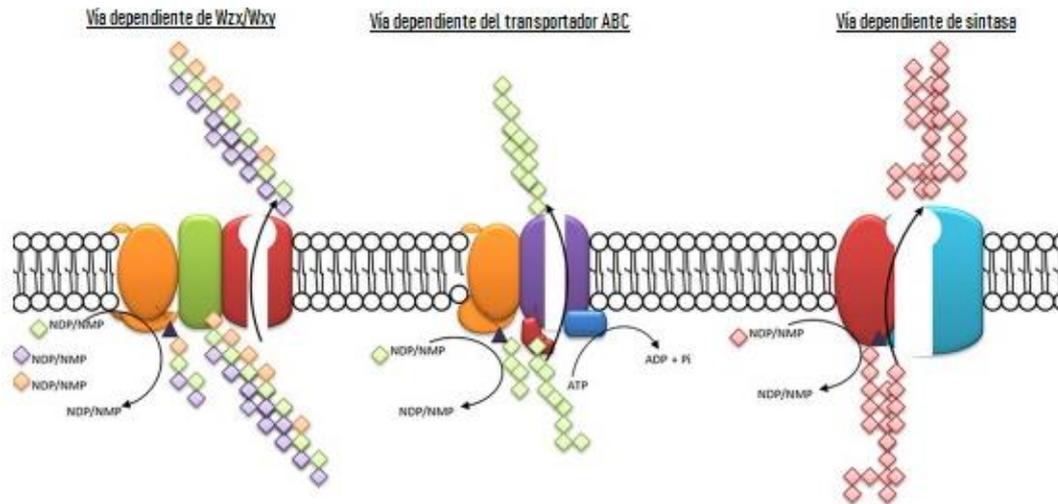


Figura 1. Vías de síntesis de EPS en cianobacterias (Singh et al., 2018).

### 2.2.5 Biosorción

La biosorción es un tipo de sorción que se caracteriza porque el sorbente es un material biológico. Este es un proceso mediante el cual una sustancia se une a sorbente. El elemento más importante de este proceso es la biomasa a emplear como sorbente, que puede estar viva o muerta en el caso de los microorganismos. Cabe aclarar que cuando se usan organismos vivos, se debe considerar los efectos de toxicidad sobre este al momento de ser usado. Además, pueden ser empleados como biosorbentes los materiales de desecho agroindustriales, sustancias derivadas de plantas, polisacáridos y biopolímeros. Este proceso es ampliamente usado para biorremediación o remoción de contaminantes debido a su simplicidad y que es ecoamigable (Torres, 2020).

Las cianobacterias sorben los metales pesados con el fin de incorporarlos en su metabolismo o para minimizar las concentraciones de estos elementos en el medio en el que se encuentra, esta acción puede ser realizada por los mecanismos de bioacumulación o biosorción. Este segundo proceso básicamente consiste en la unión en diversos sitios de

los EPS a los metales pesados, esto debido a que los EPS poseen diversos sitios de unión para la sorción de contaminantes orgánicos e inorgánicos. Además, la carga negativa que estos poseen gran potencial para la remoción de los metales cargados positivamente (Yadav et al., 2021).

Los mecanismos por los que los EPS pueden sorber metales pesados son los siguientes: complejación superficial, cuando se forman complejos metálicos por iones metálicos que utilizan grupos funcionales en la superficie de EPS; otro mecanismo es el intercambio iónico, el cual se da entre iones metálicos e iones en los EPS; el mecanismo redox, se realiza cuando un metal de valencia variable se sorbe en el EPS conformados por grupos funcionales reductores, también está el mecanismo de sorción electrostática, que se da por las cargas negativas de los EPS que interactúan electrostáticamente con iones de metales pesados; y por último, el mecanismo de microprecipitación inorgánica (Li et al., 2021). Todos estos mecanismos están representados en la Figura 2:

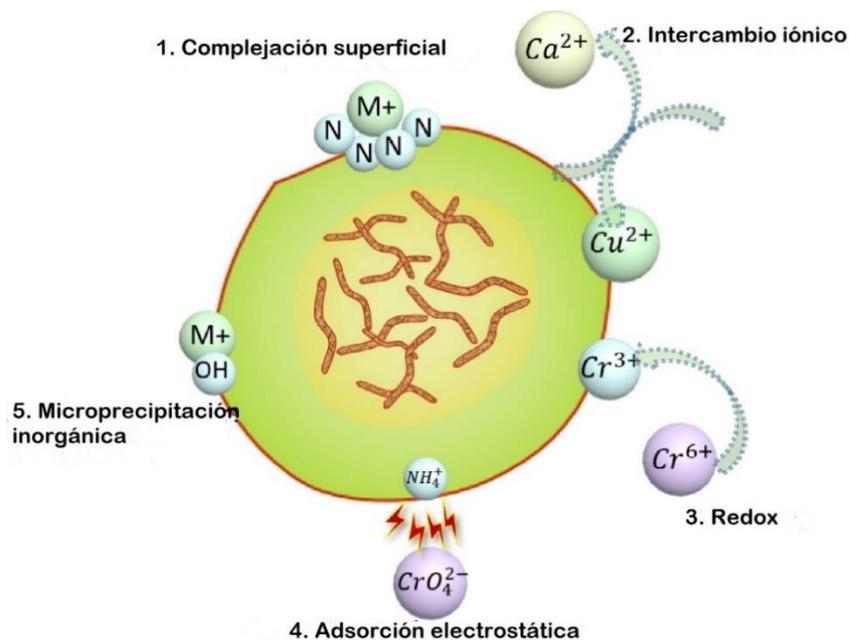


Figura 2. Mecanismos de biosorción de metales pesados mediado por EPS (Li et al., 2021).

El secuestro de iones metálicos mediado por las cianobacterias depende de diversos factores, como la tasa de crecimiento celular, biomasa, capacidad de carga, tiempo de contacto con los metales, pH, temperatura, concentración de glucosa e intensidad lumínica. Estos dos últimos factores, especialmente, influyen en la composición de los EPS y, por ende, en su capacidad de sorción (Al-Amin et al., 2021).

### **2.2.6 Metales pesados**

Son aquellos metales y metaloides que se caracterizan por tener una densidad atómica superior a 4000 kg/m<sup>3</sup>. Entre ellos encontramos al Pb, Zn, Cr, As, Cu, B, Ti, Sn, Cd, Ni, Hg, entre otros (Vardhan, Kumar y Panda, 2019). Estos elementos provienen tanto de fuentes naturales como antropogénicas, entre los que encontramos el uso de agroquímicos, actividades industriales, combustión de combustibles fósiles y la actividad minera (Vareda, Valente y Durães, 2019). Suelen tener impactos negativos en la salud de los seres humanos, incluso en concentraciones mínimas, y son igualmente perjudiciales para animales y plantas cuando su concentración excede los límites permisibles (Vardhan, Kumar y Panda, 2019).

#### **2.2.6.1 Manganeso (Mn)**

El manganeso es un metal con número atómico 25, perteneciente al grupo VII de la tabla periódica, y su masa atómica es de 54.938049 u. Este metal compone aproximadamente el 0.1% de la corteza terrestre. Otras fuentes de manganeso incluyen la deposición atmosférica directa, la filtración de tejidos vegetales, el rocío oceánico y los volcanes. Este elemento también se encuentra en todos los tejidos del cuerpo en pequeñas cantidades debido a que se usa para diversas reacciones enzimáticas; sin embargo, un

exceso de este metal puede afectar el desarrollo neurológico infantil (Harischandra et al., 2019). De igual manera, es importante para diversos procesos metabólicos en plantas, pero su exceso puede generar toxicidad y alterar varios procesos fisiológicos en las células vegetales (Li et al., 2019).

#### **2.2.6.2 Bario (Ba)**

Es un metal alcalinotérreo que pertenece al grupo IIA de la tabla periódica; su número atómico es 56 y su peso atómico es 137.34 u. Suele encontrarse en la naturaleza como un catión divalente ( $Ba^{2+}$ ). Su presencia en la naturaleza es poco común, y la contaminación por bario suele ocurrir por actividades antropogénicas. Las sales de bario altamente insolubles se consideran no tóxicas para el ser humano, pero las especies solubles se consideran dañinas. El consumo de sales de bario solubles induce procesos celulares peligrosos como la parálisis hipopotasémica; además, la ingestión de alimentos con bario es la causa más común de envenenamiento por este metal (Peana et al., 2021).

#### **2.2.6.3 Níquel (Ni)**

Es un metal de transición, su número atómico es 28, su peso atómico es de 58.6934 u. Pertenece al grupo X de la tabla periódica y su estado de oxidación más común es +2. En la naturaleza, se encuentra en la corteza terrestre, en el suelo, meteoritos y volcanes, así como en el mar. Por otro lado, también se origina a partir de diversas actividades antropogénicas como la combustión de combustibles como el carbón y el diésel, la incineración de desechos, las aguas residuales y el humo de los cigarrillos. Concentraciones elevadas de níquel alteran las actividades metabólicas de las plantas de manera perjudicial. En los humanos, puede provocar dermatitis, enfermedades

cardiovasculares, asma, fibrosis pulmonar y cáncer de las vías respiratorias (Genchi et al., 2020).

#### **2.2.6.4 Cobre (Cu)**

Es un metal que desempeña el rol de micronutriente. Su número atómico es 29 y su peso atómico es 63,5 u, además, pertenece al grupo IB de la tabla periódica. Sus estados de oxidación más frecuentes son +1 y +2. En la naturaleza, se encuentra debido a los volcanes, descomposición de la vegetación e incendios forestales, y también se genera por actividades antropogénicas como la combustión de combustibles fósiles, aguas residuales, uso de fertilizantes, minería, entre otras. Este elemento puede ser perjudicial en cantidades excesivas para animales y plantas, ya que puede generar cambios en el material genético, alteración de las membranas celulares e incluso en procesos de vital importancia como la fotosíntesis (Rehman et al., 2019).

#### **2.2.6.5 Zinc (Zn)**

El zinc es un metal de transición considerado un mineral esencial, necesario para la producción de algunas enzimas. Tiene número atómico 30, peso atómico de 65,38 u y pertenece al grupo XII de la tabla periódica. Generalmente se encuentra presente en la naturaleza en su estado divalente. Su origen antropogénico se da por aguas residuales, residuos industriales, actividades mineras. Las altas concentraciones de este metal pueden generar graves efectos en la salud humana como enfermedades gastrointestinales, accidentes cerebrovasculares, hipertensión, efecto cancerígeno, neurotoxicidad, entre otros (Sankhla, Kumar y Prasad, 2019).

#### **2.2.6.6 Plomo (Pb)**

Es un metal pesado altamente tóxico que no es biodegradable, con número atómico 82, peso atómico de 207,2 u y pertenece al grupo XIV de la tabla periódica. Sus estados de oxidación más frecuentes son +2 y +4. Las causas naturales de la contaminación por plomo incluyen la meteorización geoquímica, las emisiones de rocío marino y actividad volcánica, así como actividades antropogénicas como procesamiento de petróleo, agroquímicos, pintura, minería, agua de cañerías viejas, entre otros (Kumar et al., 2020). Las elevadas concentraciones de plomo causan una disminución de la productividad del suelo. También, afectan las actividades enzimáticas de diferentes organismos vivos, pudiendo también causar daños e incluso su muerte (Meena et al., 2020).

#### **2.2.6.7 Arsénico (As)**

El arsénico es un metal nocivo, su número atómico es 33, su masa atómica es 74,922 u, perteneciente al grupo XV de la tabla periódica. Se puede encontrar en sus formas inorgánicas, y orgánicas como arseniato As(V) y arsenito As(III). Naturalmente se encuentra en más de 200 formas minerales diferentes y se distribuye por toda la corteza terrestre, suelo, y sedimentos. Su origen antropogénico se debe a la combustión, uso de pesticidas, herbicidas, fungicidas e insecticidas, extracción y fundición de minerales, fabricación de metales, aleaciones entre otros. Las altas concentraciones de este elemento afectan el crecimiento de las plantas, y en los humanos puede causar lesiones dérmicas, pérdida de cabello, cáncer de piel y otros efectos (Hare et al., 2019).

## **CAPÍTULO III**

### **DISEÑO DE CONTRASTACIÓN DE LA HIPÓTESIS**

#### **3.1 Nivel y diseño de estudio**

El nivel de la presente investigación es descriptivo debido a que documenta la capacidad de biosorción de metales pesados por EPS producidos por cianobacterias. El diseño es longitudinal, porque se realizaron mediciones de las concentraciones de metales pesados a lo largo del ensayo de biosorción.

#### **3.2 Material biológico**

El material biológico estuvo constituido por las cianobacterias presentes en las muestras de tapetes microbianos recolectados de las pozas del Complejo Turístico Baños del Inca (Cajamarca). La unidad de análisis de esta investigación estuvo constituida por cada una de las cianobacterias termófilas que crecieron en el medio de cultivo líquido para cianobacterias termófilas empleado en el laboratorio.

#### **3.3 Descripción del lugar de muestreo**

El lugar de muestreo se ubicó en el complejo turístico Baños del Inca (Apéndice 1), ubicado a una distancia de 6 km de la ciudad de Cajamarca (2659 m.s.n.m), cuyas coordenadas son: 7°09'45" Sur y 78°27'49" Oeste (Anexo 1). En el interior del complejo se encuentran pozos con aguas hidrotermales, las cuales emanan del subsuelo a temperatura entre 35 y 71°C. En los pozos antes mencionados existen tapetes microbianos, los cuales son comunidades conformadas por microorganismos de distintas

especies, los cuales interactúan para su supervivencia (Prieto, Valencia y Santoyo, 2018). Estudios previos relacionados a la búsqueda de metabolitos secundarios tales como hidrolasas, biosurfactantes y sideróforos han sido desarrollados en este sitio de muestreo (Valdez-Nuñez y Rivera-Jacinto, 2022).

### **3.4 Colección de muestras y determinación de parámetros fisicoquímicos.**

Se colectaron muestras de tapetes microbianos (Apéndice 2) de cada poza aleatoriamente (15 x 15 cm aproximadamente), empleando una espátula de acero inoxidable estéril (Bürkle, Germany) (Apéndice 3). Las muestras se colectaron en frascos de vidrio (Boeco, Germany) estériles de capacidad de 250 mL, los cuales se llenaron con agua proveniente de los pozos para conservar las muestras. Parámetros como el pH y la temperatura fueron medidos *in situ*. Todas las muestras colectadas fueron etiquetadas y almacenadas en un contenedor térmico para mantener una temperatura aproximada a la de la zona (45°C) y fueron inmediatamente transportadas al laboratorio de Biotecnología de la Escuela Académico Profesional de Biología y Biotecnología de la Universidad Nacional de Cajamarca.

### **3.5 Enriquecimiento de cianobacterias termófilas**

El enriquecimiento se llevó a cabo en frascos de vidrio de 1 L (Boeco, Germany), a los cuales se adicionaron 900 mL de medio de cultivo D modificado (Apéndice 4), esterilizado (Castenholz, 1981), suplementado con 0.5% (p/v) glucosa y 1000 µg/L de ampicilina y tuvo un pH de 7.12, según lo descrito por Rippka (Rippka, 1988). Se colocaron en total 90 g de una muestra compuesta de tapetes microbianos, la cual consistió en porciones aleatorias de todos los tapetes microbianos colectados

anteriormente. Se realizó un triplicado del enriquecimiento (Apéndice 5). Posteriormente, los frascos fueron incubados a 45°C durante 48 horas, agitados manualmente una vez al día, y se mantuvieron en la oscuridad.

### 3.6 Ensayo de biosorción de metales

Concluido el proceso de enriquecimiento, las muestras de tapetes microbianos (conteniendo cianobacterias termófilas) fueron lavadas con agua destilada estéril y se colocaron los tapetes en frascos nuevos con 900 mL de medio D modificado, el cual estuvo suplementado con metales para simular las concentraciones de estos en las fuentes termales del Complejo Baños del Inca (Anexo 2). La adición de metales se realizó a partir de una solución stock de sales (Tabla 1). El experimento se realizó por triplicado.

Tabla 1. Stock de sales empleadas para el ensayo de biosorción.

<b>Fórmula de la sal</b>	<b>Concentración (mg L<sup>-1</sup>)</b>
<b>NiCl<sub>2</sub></b>	0.57
<b>CuSO<sub>4</sub></b>	0.791
<b>ZnSO<sub>4</sub></b>	6.071
<b>Pb<sub>3</sub>(AsO<sub>4</sub>)<sub>2</sub></b>	0.6438
<b>MnSO<sub>4</sub></b>	5.4975
<b>BaCl<sub>2</sub></b>	3.9478

El medio de cultivo estéril tuvo un pH de 7.12. Las botellas se incubaron a 45°C con fotoperiodo de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad, agitándolas manualmente una vez al día durante 30 días. Además, se implementó un control abiótico, que consistió en un medio de cultivo sin microorganismos, pero suplementado con las sales mencionadas anteriormente (Apéndice 6).

### **3.7 Ensayos microbiológicos**

#### **3.7.1 Observación e identificación preliminar de cianobacterias**

Las células que crecieron en el medio de cultivo D modificado durante el ensayo de biosorción fueron observadas en los días 0 y 30 utilizando un microscopio Leica DM750 a 400X. Se registraron sus características en una ficha de datos (Apéndice 7), junto con una fotografía del organismo descrito. Se empleó como referencia el libro “A Guide to Cyanobacteria: Identification and Impact” (Nienaber y Steinitz-Kannan, 2018), para realizar la identificación a nivel de género.

#### **3.7.2 Curva de crecimiento celular**

Durante los días 0, 5, 10, 15, 20, 25 y 30 del ensayo de biosorción, se extrajo 1 mL de muestra de cada uno de los replicados y se colocó en una cámara de Gridded Sedgewick (Wildlife Supply Company, U.S.A.), para luego ser observada en el microscopio. Se determinó el número de células por género de cianobacteria (por cuadrado) y se calculó el promedio (Knappe, Belk y Briley, 2004). Para determinar la cantidad de células en 1 mL se multiplicó el promedio de células contadas por 1000.

### **3.8 Métodos analíticos**

#### **3.8.1 Análisis de metales solubles**

Se extrajeron 80 mL de cada uno de los frascos del ensayo de biosorción (replicados y control) durante los días 0, 4, 8, 20 y 30. El volumen se centrifugó a 4000 rpm durante 3 minutos (Aksu, Ertuğrul y Dönmez, 2009), y los sobrenadantes se preservaron con 6 gotas de ácido nítrico ( $\text{HNO}_3$ ) 1 N. Posteriormente, se enviaron las muestras al laboratorio SGS – Perú, sede Cajamarca, para determinar la concentración de metales disueltos mediante

espectroscopía de absorción atómica. El porcentaje de remoción de metales se determinó de acuerdo a la ecuación 1 (Hussein et al., 2019):

$$R = \frac{(C_0 - C_t)}{C_0} \times 100 \quad (\text{Ecuación 1})$$

Donde, R es el porcentaje de biosorción (%),  $C_0$  es la concentración inicial de iones metálicos en el medio de cultivo expresado en  $\text{mg. L}^{-1}$  y  $C_t$  es la concentración de metal que permanece en la solución expresado en  $\text{mg. L}^{-1}$ . Los resultados de las concentraciones y el cálculo de los porcentajes de biosorción fueron registrados en tablas (Apéndice 8).

### **3.8.2 Extracción y caracterización química de EPS**

Para la obtención de los EPS, se extrajeron muestras de biomasa suspendida en medio de cultivo de cada replicado empleado para el ensayo de biosorción en el día 0 (3 muestras) y en el día 30 (12 muestras). Posteriormente, se determinó la composición química de los EPS extraídos empleando métodos de espectrofotometría UV-VIS, para ello se emplearon protocolos descritos en (García, 2021), en el cual se describen métodos modificados para el uso mínimo de reactivos y EPS. La evolución de la producción de EPS durante el ensayo de biosorción se evaluará principalmente mediante el análisis de carbohidratos totales.

#### **3.8.2.1 Extracción de EPS capsulares (C-EPS)**

Se colocaron 2mL de biomasa suspendida en medio de cultivo de cada replicado empleado para el ensayo de biosorción en tubos Eppendorf, se centrifugaron a 10.000 rpm durante 10 minutos, luego se eliminó el sobrenadante. Después, se disolvió el precipitado resultante en 1 mL de agua destilada, la solución se mantuvo durante 15 min

a 100°C empleando un termobloque. Luego se mantuvo a temperatura ambiente durante 10 min y se le agregaron 3 µL de ácido tricloroacético (TCA) al 85 %. La mezcla resultante se centrifugó a 10.000 rpm durante 30 min. Se reunió el sobrenadante que contenía EPS y se añadió un volumen igual de etanol al 96% (v/v). La mezcla se mantuvo a 4°C durante 12 h y se centrifugó a 10.000 rpm durante 30 minutos. Posteriormente, el precipitado resultante se lavó dos veces con etanol al 96 % y se centrifugó a 10.000 rpm durante 30 min. El precipitado resultante final se disolvió en 1 mL de agua destilada estéril y se almacenó a 4°C (Cérantola et al., 2000).

#### **3.8.2.2 Extracción de EPS débilmente unidos (LB-EPS)**

Para separar las células y el medio, se colocaron 2 mL de biomasa suspendida en medio de cultivo de cada replicado empleado para el ensayo de biosorción en tubos Eppendorf y se centrifugaron a 2500 g durante 15 minutos a 4°C. Posteriormente, las células de cianobacterias se resuspendieron en una solución de NaCl al 0.05 % (0.5 g de biomasa húmeda en 5 ml de solución de NaCl al 0.05 %) y se centrifugaron a 5000 g, durante 15 minutos a 4 °C. Se extrajo cuidadosamente el sobrenadante, el cual se mantuvo en refrigeración a 4°C para su posterior caracterización (Xu, Yu y Jiang, 2013).

#### **3.8.2.3 Extracción de EPS estrechamente unidos (TB-EPS)**

El pellet obtenido al final de la extracción de LB-EPS fue resuspendido con NaCl al 0.05 % y se calentó a 50°C durante 20 min. Posteriormente, se centrifugó a 15.000 g, durante 15 minutos a 4°C. Finalmente, se extrajo cuidadosamente el sobrenadante y se mantuvo en refrigeración a 4°C para su posterior caracterización (Cui et al., 2021).

#### **3.8.2.4 Cuantificación de carbohidratos**

En un tubo de ensayo se colocaron 200  $\mu$ L de muestra de los EPS obtenidos (C-EPS, LB-EPS y TB-EPS) o estándar, a los cuales se les añadió 200  $\mu$ L de fenol al 5%. A continuación, se agregó 1 mL de ácido sulfúrico al 96%, se dejó reposar durante 10 minutos. Se homogeneizó la solución empleando vórtex y posteriormente se incubó a 30 °C durante 20 minutos. Finalmente, se colocó la solución en una cubeta descartable de 2.5 mL y se midió la absorbancia a 490 nm en el espectrofotómetro (UNICO®). Se empleó glucosa como estándar (Dubois et al., 1956).

#### **3.8.2.5 Cuantificación de acetilos**

En un tubo de ensayo se agregaron 0.5 mL de la muestra de los EPS obtenidos (C-EPS, LB-EPS y TB-EPS) o estándar y 1 mL del reactivo de acetilos (Anexo 3). Se homogenizó la mezcla y se dejó reposar 25 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, se colocó la solución en una cubeta descartable de 2.5 mL y se midió la absorbancia a 540 nm en el espectrofotómetro (UNICO®). Se empleó pentaacetato de  $\beta$ -D-glucosa como estándar (McComb y McCready, 1957).

#### **3.8.2.6 Cuantificación de fosfatos**

En un tubo de ensayo se colocó 1 mL de la muestra de los EPS obtenidos (C-EPS, LB-EPS y TB-EPS) o estándar y 0.7 mL del reactivo de fosfatos (Anexo 3). Después se homogeneizó la solución, posteriormente se la transfirió a una cubeta descartable de 2.5 mL y se midió la absorbancia a 420 nm en el espectrofotómetro (UNICO®). Se empleó hidrógeno-fosfato de potasio como estándar (Berenblum y Chain, 1938).

### **3.8.2.7 Cuantificación de sulfatos**

En un tubo de ensayo se agregaron 1 mL de la muestra de los EPS obtenidos (C-EPS, LB-EPS y TB-EPS) o estándar y 1 mL del reactivo de sulfatos (Anexo 3). Se homogeneizó la solución empleando un vórtex. Se adicionaron 0.2 g de BaCl<sub>2</sub>, se transfirió la solución a una cubeta descartable de 2.5 mL y se midió la absorbancia a 420 nm en el espectrofotómetro (UNICO®). Se empleó sulfato de sodio como estándar (Severiche y González, 2012).

### **3.9 Procesamiento y análisis de datos**

Los resultados experimentales se realizaron en triplicado con un grupo control. Los datos de los triplicados se promediaron para su procesamiento. Se evaluó la normalidad de los datos mediante la prueba de Shapiro-Wilk y la homogeneidad de varianzas mediante la prueba de Levene. Se aplicó la prueba T de Student para muestras independientes a los datos que mostraron distribución normal y homogeneidad de varianzas. En casos de distribución normal, pero sin homogeneidad de varianzas, se utilizó la prueba T de Student con corrección de Welch. Para los datos que no siguieron una distribución normal, se aplicó la prueba U de Mann-Whitney. Todos los análisis se llevaron a cabo en el programa estadístico SPSS versión 25.0 con un nivel de confianza del 95% y se consideró significativo un valor de  $p < 0.05$ .

## CAPÍTULO IV

### RESULTADOS Y DISCUSIÓN

#### 4.1 Resultados

##### 4.1.1 Parámetros fisicoquímicos del sitio del muestreo

Los valores de los parámetros fisicoquímicos medidos en el área de estudio durante la colección de muestras se detallan en la Tabla 2.

Tabla 2. Parámetros fisicoquímicos (pH y temperatura) de las fuentes termales del complejo turístico Baños del Inca, medidos in situ durante la colección de muestras.

	N° de pozo								
Parámetro	1	2	3	4	5	6	7	8	9
pH	7.46	7.07	6.91	7.25	7.26	7.20	7.06	7.02	7.24
Temperatura									
(°C)	50.3	50.0	52.4	48.5	47.7	49.5	54.8	50.0	48.3

##### 4.1.2 Biosorción de metales pesados

Se realizó el ensayo de biosorción de 7 metales pesados (Ni, Cu, As, Mn, Ba, Zn, Pb), también se calculó el porcentaje de biosorción en los días 4, 8, 20 y 30 del ensayo. Por un lado, se observó la disminución en la concentración inicial de Ni, Cu, Zn y Pb, por ende, el porcentaje de biosorción aumentó con el paso de los días. Por otro lado, en el caso del As, Mn y Ba la concentración aumentó, consecuentemente, el porcentaje de biosorción fue negativo. Del mismo modo, los análisis estadísticos realizados en el programa SPSS

revelaron que existen diferencias significativas entre los replicados y el grupo control de todos los metales a excepción del As (Apéndice 13).

Con respecto al Cu, se observó una disminución en la concentración de este elemento, desde 0.17 mg. L<sup>-1</sup> hasta 0.03 mg. L<sup>-1</sup> (Figura 3).

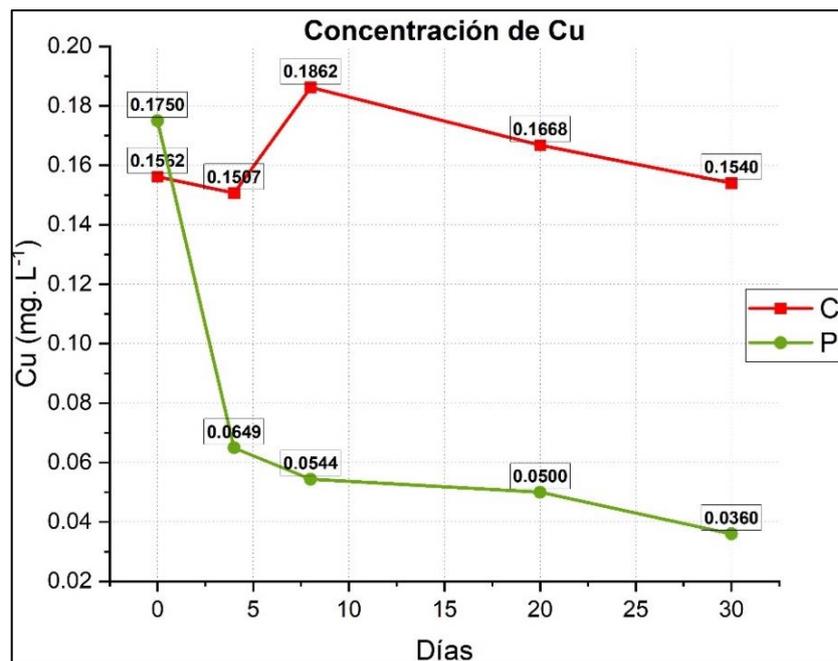


Figura 3. Concentración de Cu (mg. L<sup>-1</sup>) en el medio de cultivo D modificado durante el ensayo de biosorción. C: control; P: promedio de los replicados.

Para el Pb, se observó una disminución en la concentración de este elemento, desde 0.06 mg L<sup>-1</sup> hasta 0.01 mg. L<sup>-1</sup> (Figura 4).

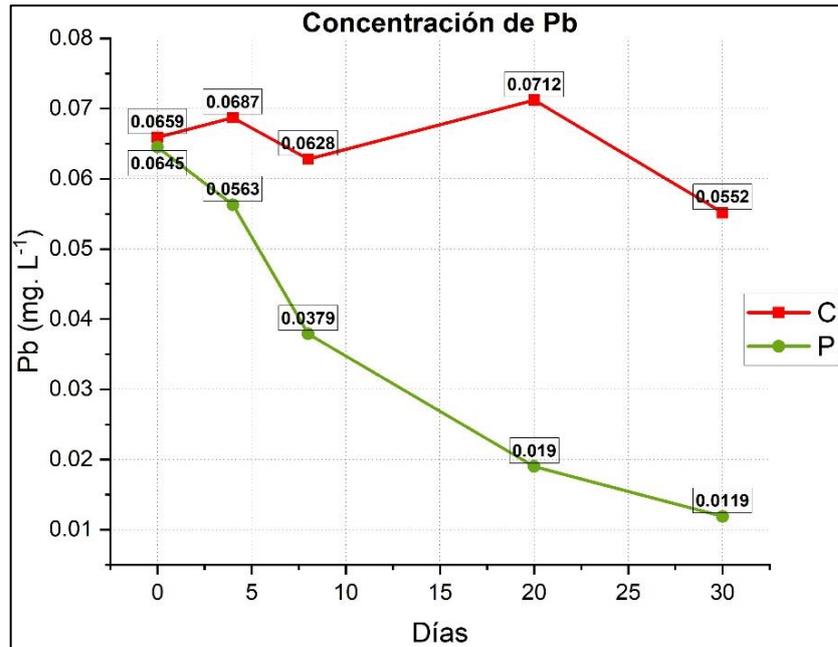


Figura 4. Concentración de Pb (mg. L<sup>-1</sup>) en el medio de cultivo D modificado durante el ensayo de biosorción. C: control; P: promedio de los replicados.

Para el Zn, también se observó una disminución en la concentración de este elemento, desde 1.38 mg. L<sup>-1</sup> hasta 0.31 mg. L<sup>-1</sup> (Figura 5).

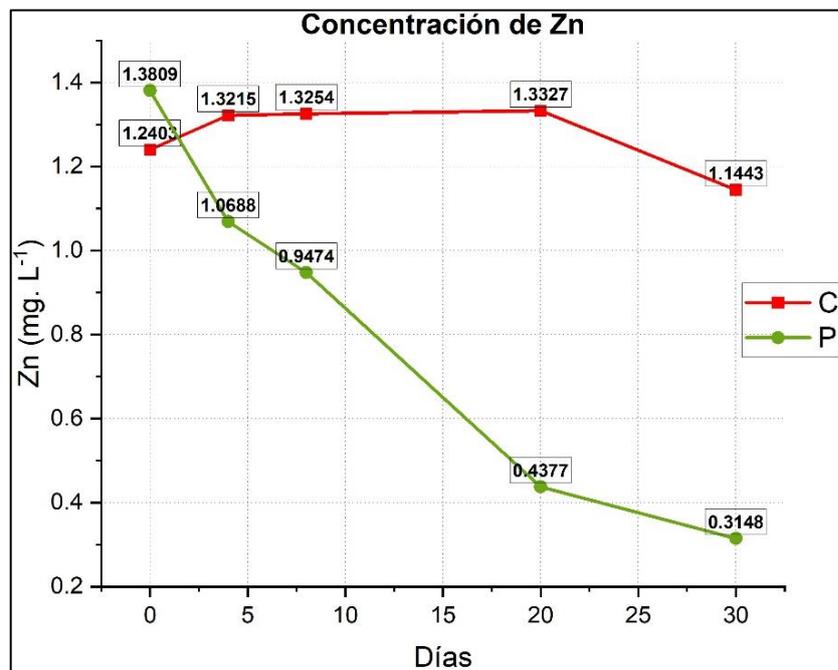


Figura 5. Concentración de Zn (mg. L<sup>-1</sup>) en el medio de cultivo D modificado durante el ensayo de biosorción. C: control; P: promedio de los replicados.

Asimismo, para el Ni hubo una disminución en su concentración, desde 0.20 mg. L<sup>-1</sup> hasta 0.15 mg. L<sup>-1</sup> (Figura 6).

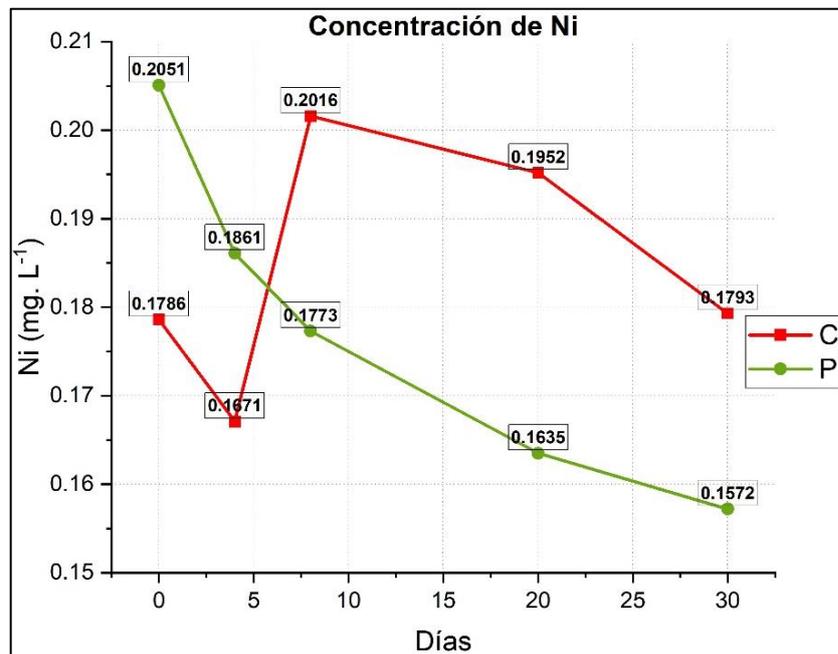


Figura 6. Concentración de Ni (mg. L<sup>-1</sup>) en el medio de cultivo D modificado durante el ensayo de biosorción. C: control; P: promedio de los replicados.

En el caso del As, no hubo biosorción, por el contrario, se vio un aumento de la concentración, de 0.008 a 0.02 mg. L<sup>-1</sup> (Figura 7).

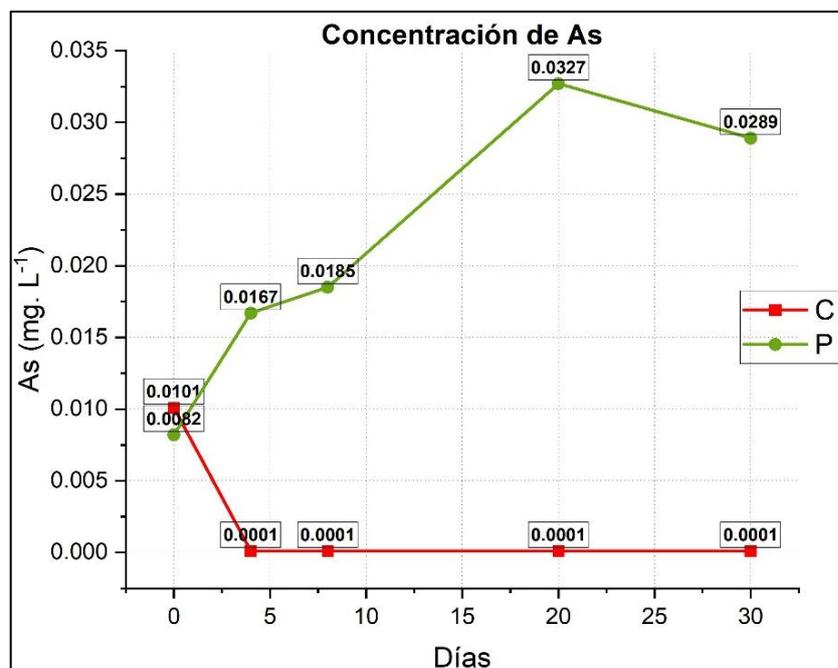


Figura 7. Concentración de As (mg. L<sup>-1</sup>) en el medio de cultivo D modificado durante el ensayo de biosorción. C: control; P: promedio de los replicados.

En el caso del Ba, no hubo biosorción, no obstante, se vio un aumento de concentración de 0.01 a 1.41 mg. L<sup>-1</sup> (Figura 8).

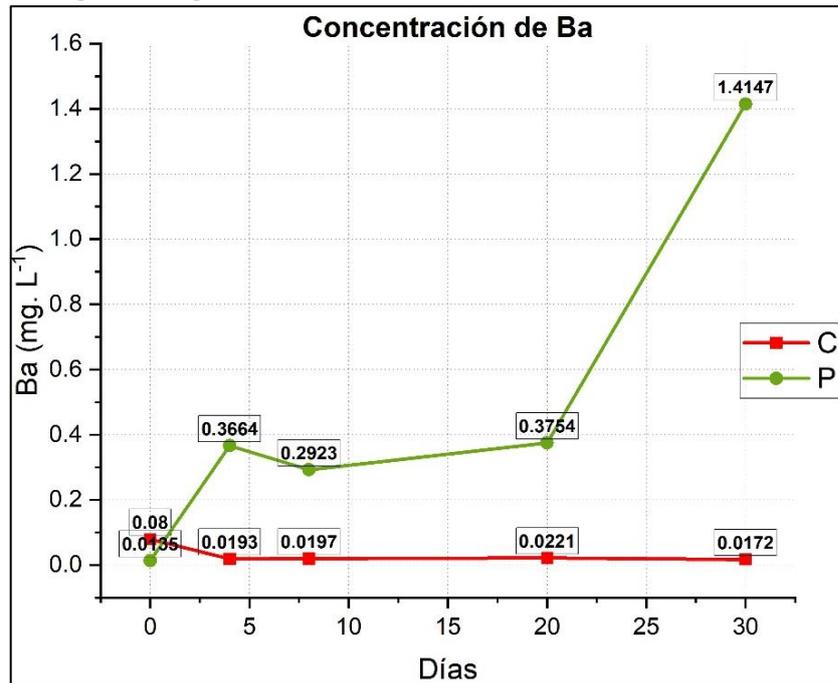


Figura 8. Concentración de Ba (mg. L<sup>-1</sup>) en el medio de cultivo D modificado durante el ensayo de biosorción. C: control; P: promedio de los replicados.

En el caso del Mn, no hubo biosorción, por el contrario, se vio un aumento de concentración de 0.66 a 14.28 mg. L<sup>-1</sup> (Figura 9).

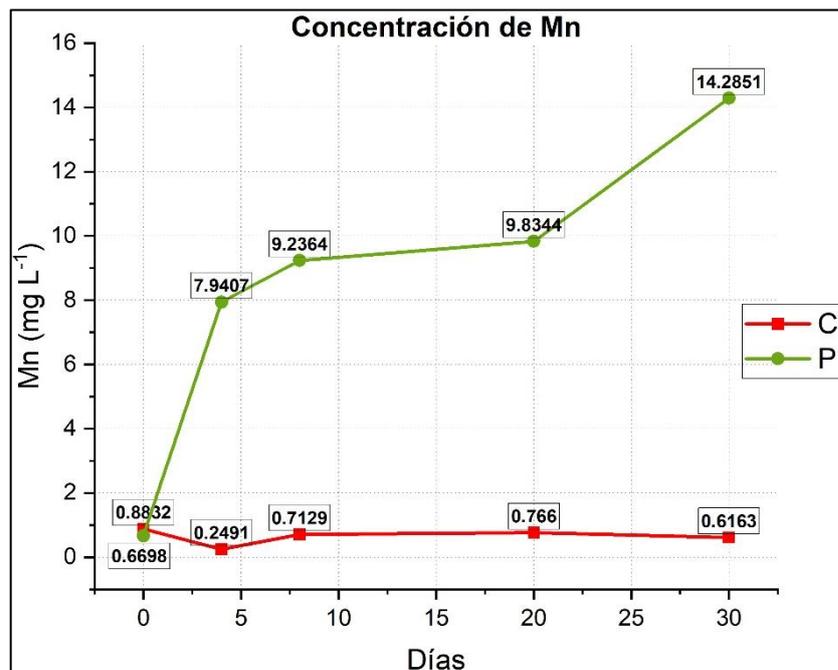


Figura 9. Concentración de Mn (mg. L<sup>-1</sup>) en el medio de cultivo D modificado durante el ensayo de biosorción. C: control; P: promedio de los replicados.

Al obtener las concentraciones de los metales en los días 0, 4, 8, 20 y 30 durante el ensayo de biosorción, se pudo calcular posteriormente el promedio del porcentaje de biosorción de los metales que presentaron una disminución en su concentración. En el caso del Cu se obtuvieron porcentajes de 63.74% al inicio del ensayo de biosorción, asimismo se observó que este valor aumentó con el transcurso de los días, obteniendo finalmente en un 78.43% en el día 30 (Figura 10).

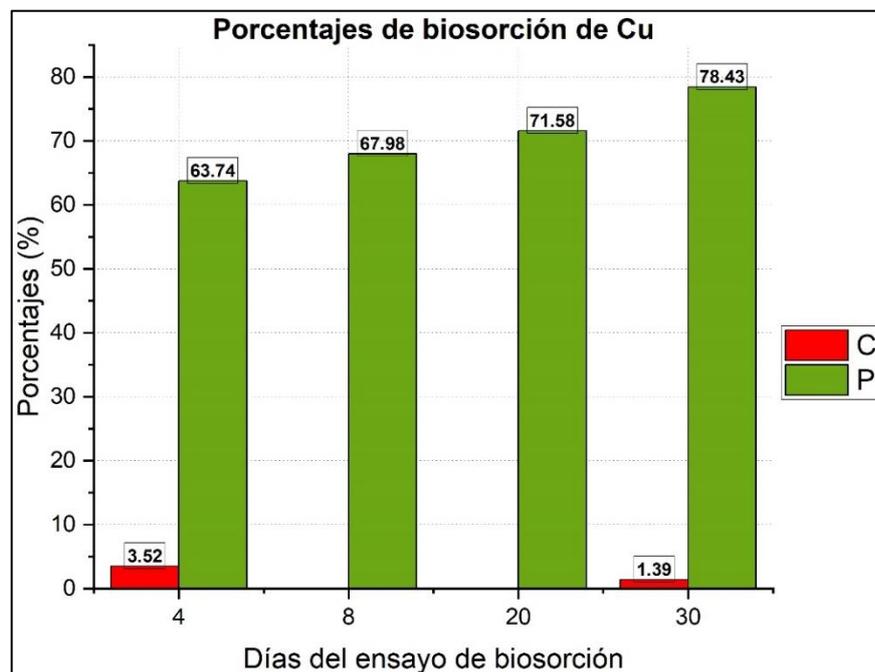


Figura 10. Porcentajes de biosorción de Cu obtenidos durante el ensayo de biosorción en los días 4, 8, 20 y 30. C: control; P: promedio de los replicados. La ausencia de barras es equivalente a que no hubo biosorción.

En cuanto al Pb, inicialmente se obtuvo un porcentaje de 10.91% en el día 4 del ensayo de biosorción, asimismo se observó que este valor incrementó con el transcurso de los días, obteniendo finalmente en el día 30 como porcentaje: un 81.75% en el día 30 (Figura 11).

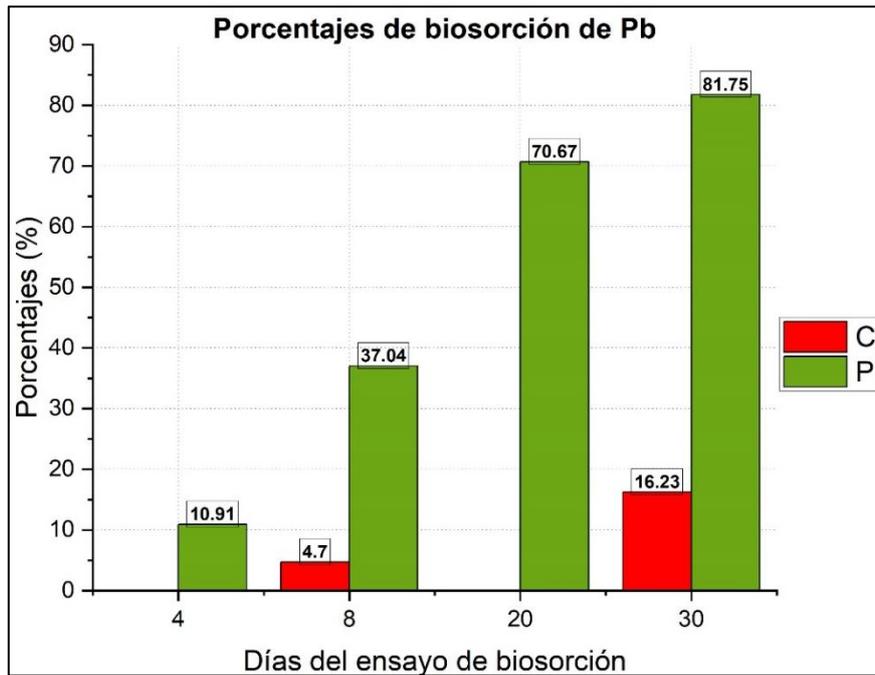


Figura 11. Porcentajes de biosorción de Pb obtenidos durante el ensayo de biosorción en los días 4, 8, 20 y 30. C: control; P: promedio de los replicados. La ausencia de barras es equivalente a que no hubo biosorción.

Para el Zn, se obtuvo un porcentaje de 19.82% en el día 4 del ensayo de biosorción, asimismo se observó que este valor incrementó con el transcurso de los días, obteniendo finalmente un 76.92% en el día 30 (Figura 12).

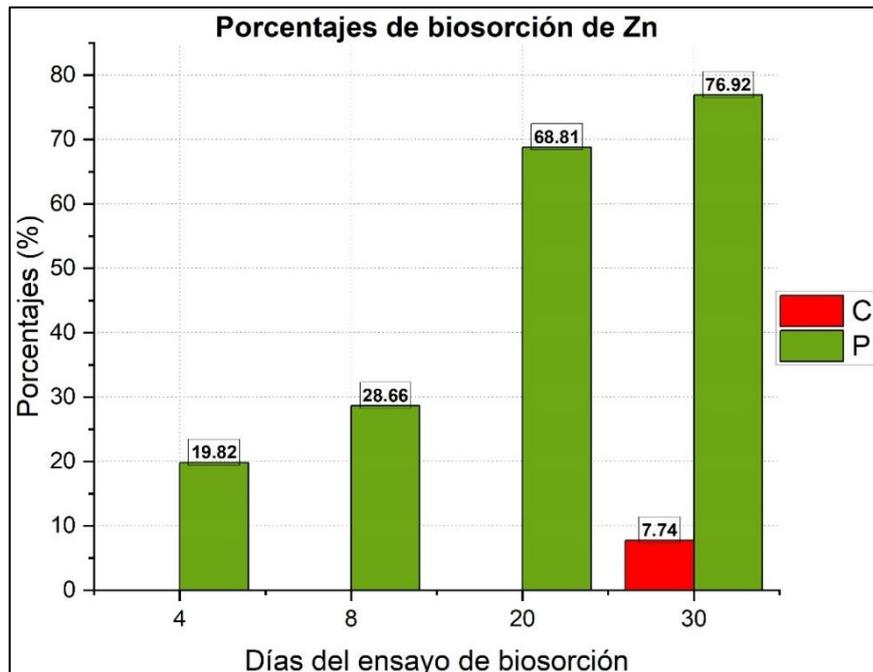


Figura 12. Porcentajes de biosorción de Zn obtenidos durante el ensayo de biosorción en los días 4, 8, 20 y 30. C: control; P: promedio de los replicados. La ausencia de barras es equivalente a que no hubo biosorción.

Finalmente, para el Ni inicialmente se obtuvo un porcentaje de 7.20% en el día 4 del ensayo de biosorción, pero se observó que este valor incrementó con el transcurso de los días, obteniendo finalmente un 22.76% en el día 30 (Figura 13).

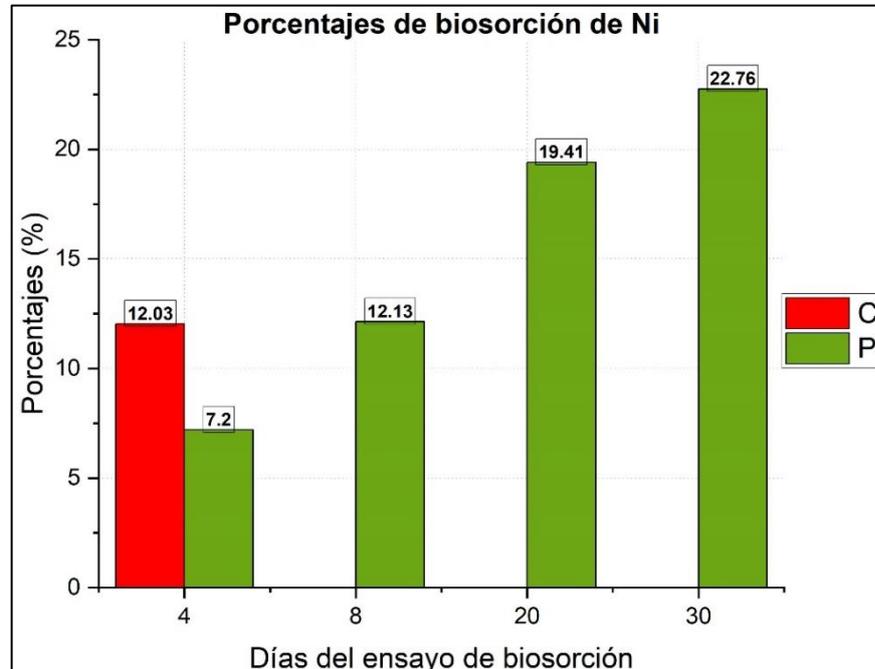


Figura 13. Porcentajes de biosorción de Ni obtenidos durante el ensayo de biosorción en los días 4, 8, 20 y 30. C: control; P: promedio de los replicados. La ausencia de barras es equivalente a que no hubo biosorción.

#### 4.1.3 Géneros de cianobacterias termófilas

Durante el ensayo de biosorción, fueron identificados microscópicamente las cianobacterias que crecieron en el medio de cultivo D modificado (Figura 14), las cuales han sido reportadas en ambientes similares. Se identificó a *Synechococcus sp.*, género de cianobacterias que fue el predominante en los cultivos. También se observó a *Pseudanabaena sp.*, las cuales se encontraron en menores cantidades. Finalmente se identificó a *Planktothrix sp.*, que también se encontró en menores concentraciones, adicionalmente, se las encontró siempre agrupadas con más filamentos del mismo género o también agrupadas con *Synechococcus sp.*

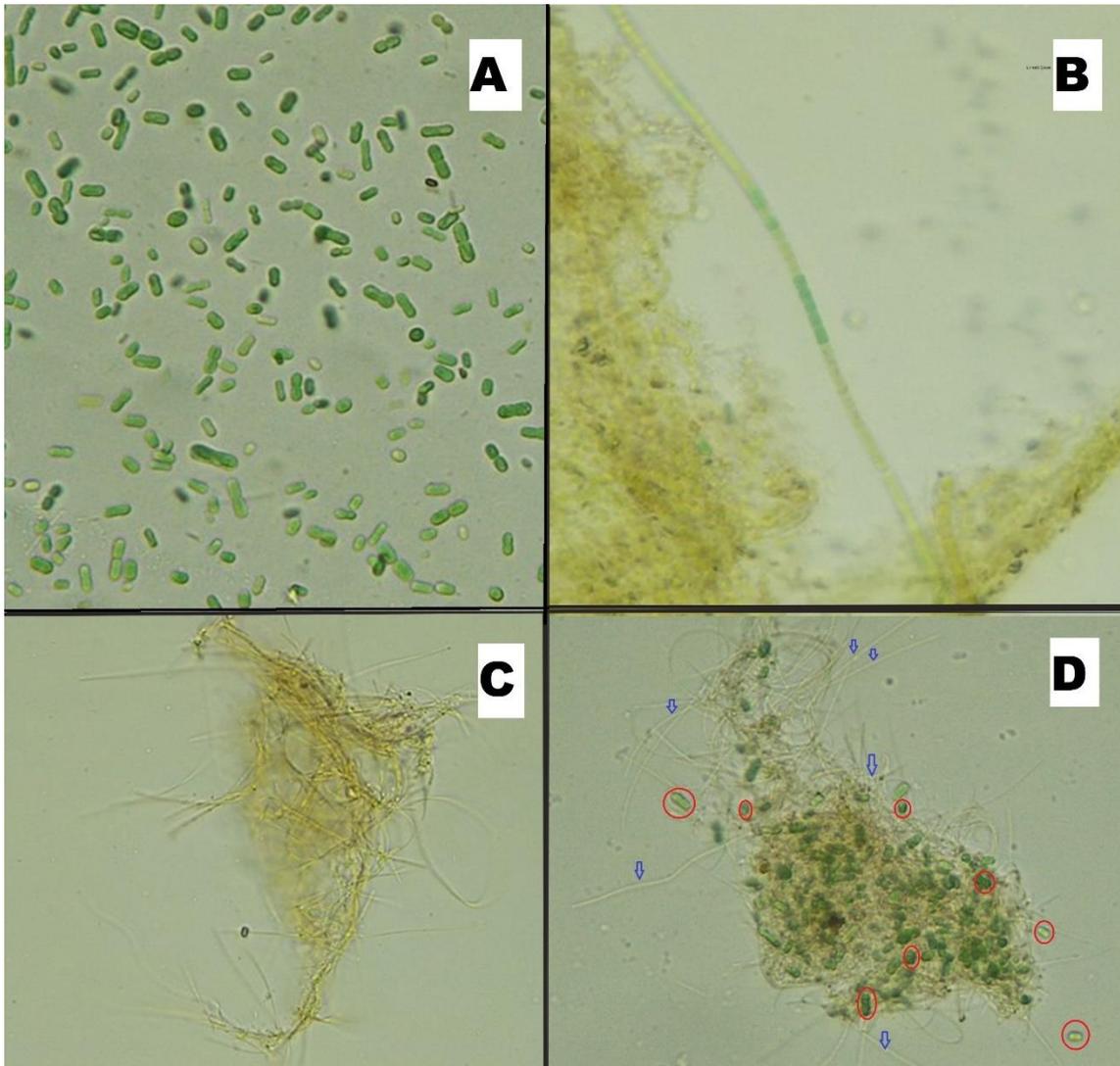


Figura 14. Cianobacterias identificadas durante el ensayo de biosorción de metales. Observación microscópica 400 X. A) *Synechococcus* sp. B) *Pseudanabaena* sp. C) *Planktothrix* sp. D) *Synechococcus* sp. (círculos rojos) y *Planktothrix* sp. (flechas azules).

Paralelamente a la caracterización y ensayo de biosorción, se determinó también la curva de crecimiento de las tres especies de cianobacterias que crecieron en el medio de cultivo D modificado. El género *Synechococcus*, mostró un crecimiento exponencial hasta el día 30 del ensayo de biosorción, además fueron las cianobacterias que dominaron el cultivo, ya que se encontraron en una mayor cantidad (Figura 15). Las cianobacterias del género *Planktothrix* fueron las segundas más abundantes en el medio de cultivo D modificado; es importante mencionar que se empezó a observar la disminución de esta población desde el día 20 de los cultivos (Figura 16). Por otro lado, las cianobacterias del género *Pseudoanabaena* fueron las menos abundantes en los medios de cultivo tanto al inicio como al final del ensayo de biosorción, se observó su fase de muerte celular a partir del día 20 de edad del cultivo (Figura 17).

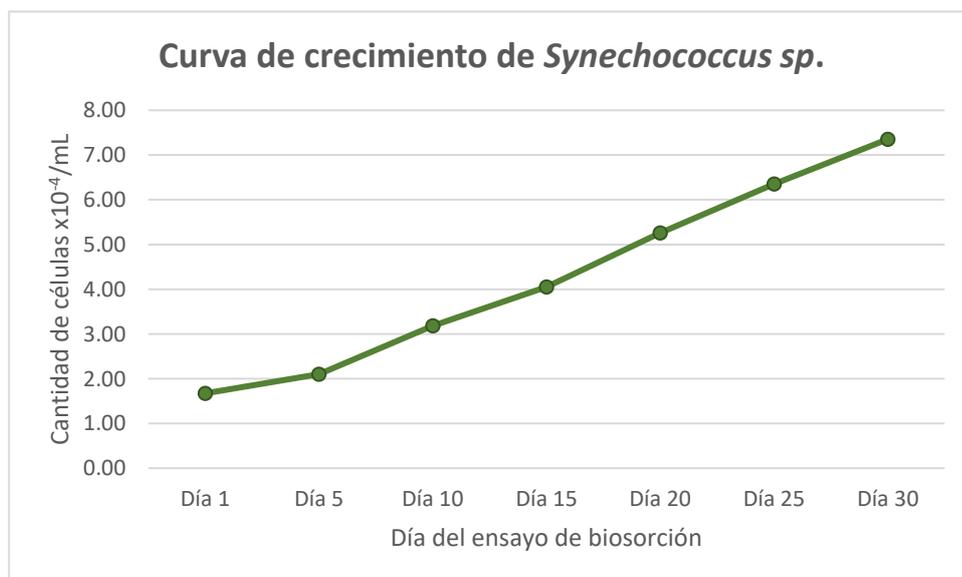


Figura 15. Curva de crecimiento de *Synechococcus sp.* durante el ensayo de biosorción.

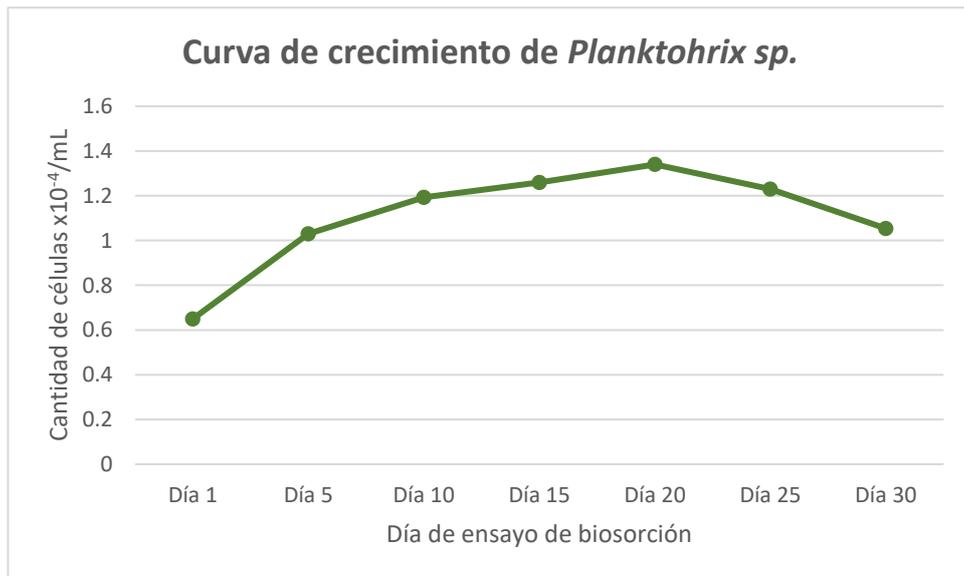


Figura 16. Curva de crecimiento de *Planktohrix sp.* durante el ensayo de biosorción.

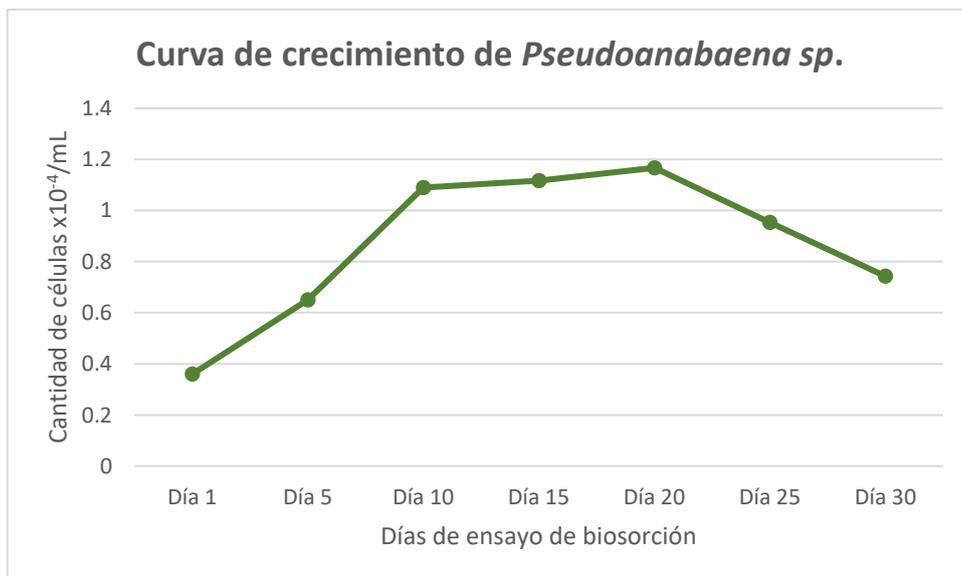


Figura 17. Curva de crecimiento de *Pseudoanabaena sp.* durante el ensayo de biosorción.

#### 4.1.4 Caracterización de EPS

##### 4.1.4.1 Cuantificación de los carbohidratos

Se extrajeron los EPS (LB-EPS, TB-EPS y C-EPS) en el día 0 y en el día 30 del ensayo de biosorción con el fin de analizar este mecanismo de biosorción de las cianobacterias. Se determinó su presencia empleando el método de cuantificación de carbohidratos, en el cual se observó un incremento en su concentración, evidenciando que durante el ensayo de biosorción hubo producción de EPS. Las concentraciones de los carbohidratos de los tres tipos de EPS analizados fueron de 0.07  $\mu\text{g/mL}$  durante el día 0 del ensayo de biosorción e incrementaron hasta 0.41  $\mu\text{g/mL}$  hasta el día 30 del ensayo de biosorción (Figura 18). Los carbohidratos fueron los constituyentes más abundantes en los 3 tipos de EPS, a comparación de los otros componentes cuantificados en el presente estudio.

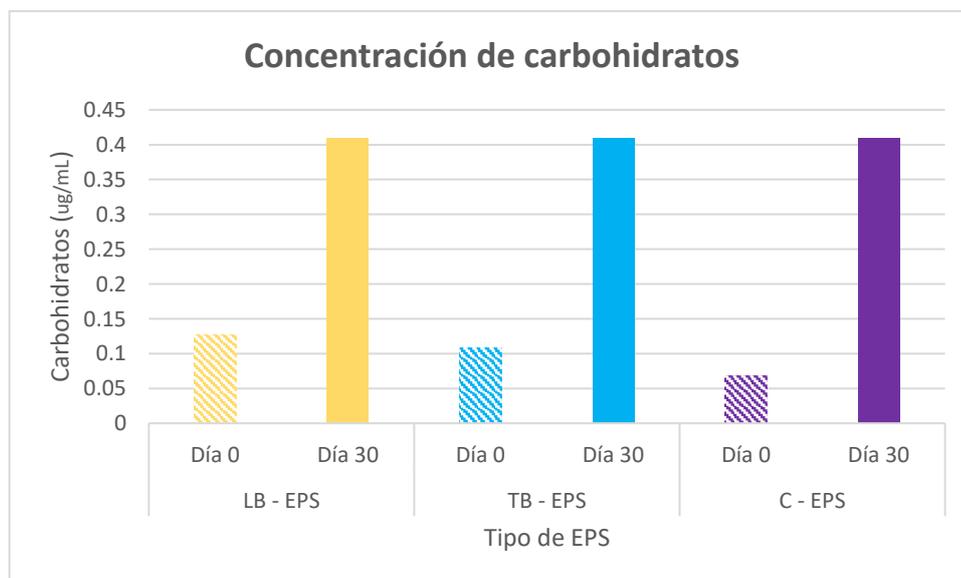


Figura 18. Concentración de carbohidratos en LB – EPS (amarillo), TB-EPS (celeste) y C-EPS (morado) en el día 0 (barras degradadas) y día 30 (barras de color sólido) del ensayo de biosorción.

#### 4.1.2.4 Cuantificación de acetilos

Se determinó la concentración de acetilos en LB-EPS, TB-EPS y C-EPS, teniendo una concentración de hasta  $18.53 \times 10^{-2} \mu\text{g/L}$  (Figura 19). Se mostró una mayor cantidad de acetilos en los TB-EPS, seguidos de los LB-EPS y en menor concentración en los C-EPS (TB-EPS > LB-EPS > C-EPS).

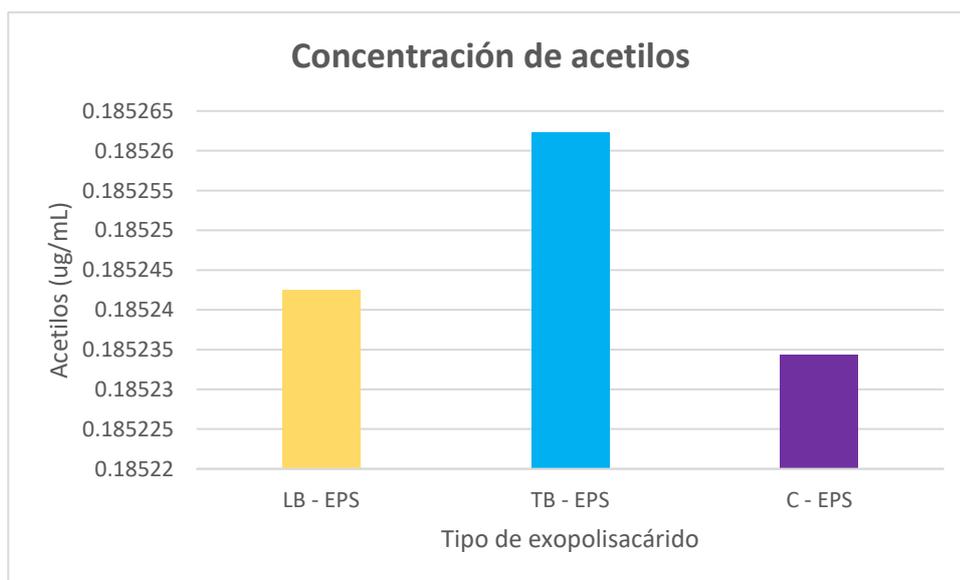


Figura 19. Concentración de acetilos en LB – EPS (amarillo), TB-EPS (celeste) y C-EPS (morado) durante el último día del ensayo de biosorción.

#### 4.1.2.5 Cuantificación de fosfatos

Se determinó la concentración de fosfatos en cada replicado de las muestras de LB-EPS, TB-EPS y C-EPS y se promediaron los resultados, siendo la concentración mínima de  $4.14 \times 10^{-4} \mu\text{g/L}$  y una máxima de  $6.86 \times 10^{-4} \mu\text{g/L}$  (Figura 20). Se mostró una mayor cantidad de fosfatos en LB-EPS y en menor concentración en los C- EPS (LB-EPS, TB-EPS > C- EPS).

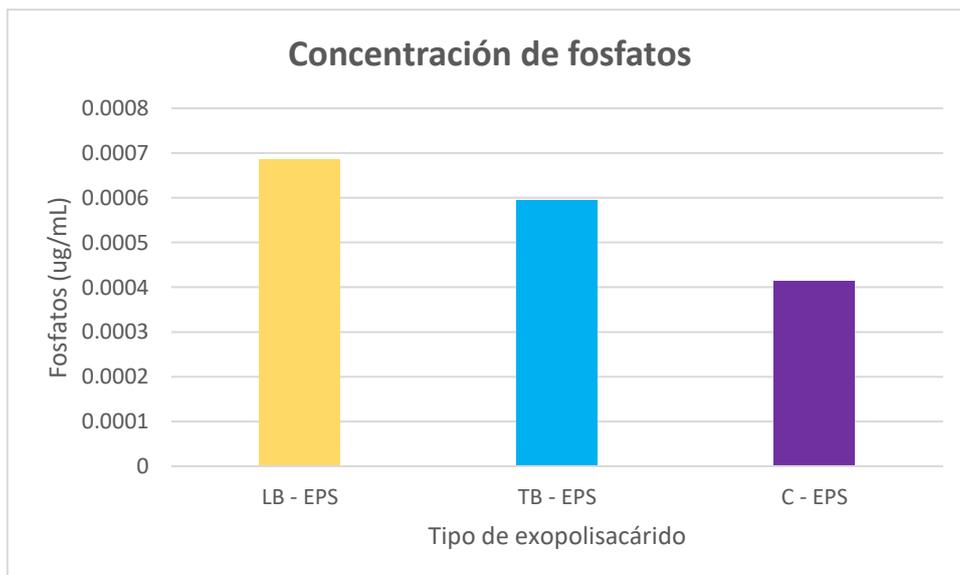


Figura 20. Concentración de fosfatos en LB – EPS (amarillo), TB-EPS (celeste) y C-EPS (morado) durante el último día del ensayo de biosorción.

#### 4.1.3 Cuantificación de sulfatos

Se determinó la concentración de sulfatos en cada replicado de las muestras de LB-EPS, TB-EPS y C-EPS y se promediaron los resultados, se obtuvo una concentración mínima de  $13.8336 \times 10^{-2} \mu\text{g/L}$  y una máxima de  $13.83 \times 10^{-2} \mu\text{g/L}$  (Figura 21). Se mostró una mayor cantidad de sulfatos tanto en C-EPS y en menor concentración en los LB- EPS (C-EPS >TB-EPS > LB- EPS).

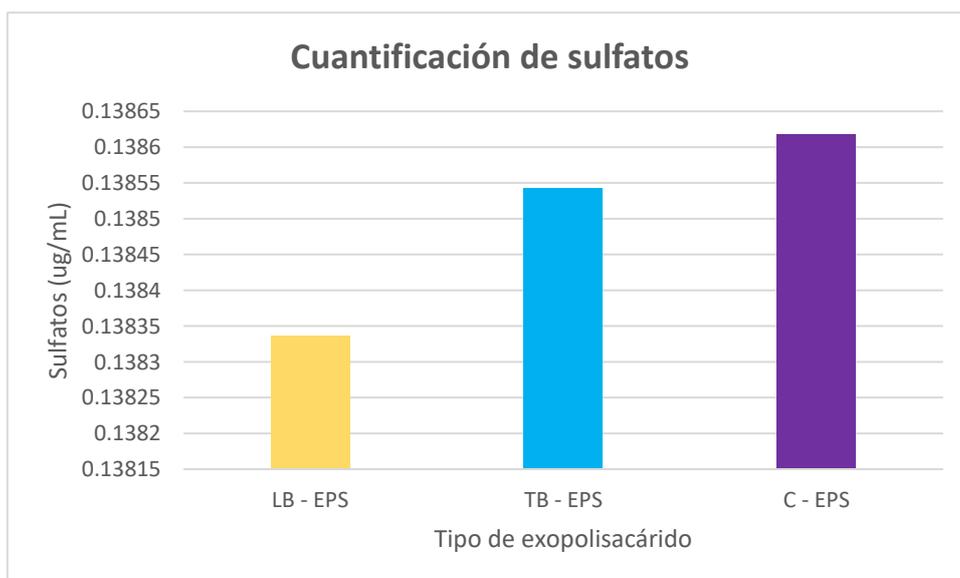


Figura 21. Concentración de sulfatos en LB – EPS (amarillo), TB-EPS (celeste) y C-EPS (morado) durante el último día del ensayo de biosorción.

## **4.2 Discusión**

### **4.2.1 Parámetros fisicoquímicos del sitio del muestreo**

Se determinaron los valores de los parámetros fisicoquímicos del área de la cual se extrajeron las muestras de tapetes microbianos. Los valores de pH estuvieron en un rango de 6.91 a 7.46, y los valores de temperatura, en un rango de 47.7 a 54.8°C. Estos resultados concuerdan con lo reportado en un informe de INGEMMET, en el que mencionan que el pH del agua de las pozas varía entre 5.5 a 8.0 y la temperatura fluctúa entre 35 y 71°C (INGEMMET, 2003). Debido a estas características, se puede concluir que todos los microorganismos que habitan en estos ambientes son neutrófilos (pH óptimo de crecimiento entre 6 - 8) y termófilos moderados (temperatura óptima de crecimiento entre 45 – 70°C) (Madigan et al., 2018).

Los valores de algunos de los metales/no metales presentes en las pozas, tales como Fe (595.18 mg/L), Al (489.57 mg/L), As (0.40 mg/L), Hg (0.06 mg/L), entre otros, sobrepasan los valores óptimos establecidos en los Estándares Nacionales de Calidad Ambiental (ECA) para agua (MINAM, 2017). Estos podrían tener un efecto tóxico en los microorganismos debido a que pueden inhibir su crecimiento (Diaconu et al., 2020). Sin embargo, las adaptaciones fisiológicas de la microbiota nativa, por ejemplo, sistemas de bombas de eflujo de metales, síntesis de metalotioneínas, producción de sideróforos (Valdez-Nuñez y Rivera-Jacinto, 2022), así como el desarrollo de interacciones microbianas, tales como comensalismo y sintrofismo que podrían propiciar en la formación de biofilms y tapetes microbianos, podrían influir en su supervivencia en este ambiente extremo (Ashok, Sajna y Swati, 2021).

#### 4.2.2 Cianobacterias termófilas

Con el objetivo de conocer los géneros de cianobacterias que estuvieron involucradas en el ensayo de biosorción, se realizó una identificación microscópica usando como referencia “A Guide to Cyanobacteria: Identification and Impact” (Nienaber y Steinitz-Kannan, 2018). Dentro de los géneros se encontraron a *Synechococcus sp.*, *Pseudanabaena sp.* y *Planktohrrix sp.* Las cianobacterias del género *Synechococcus* tienen forma cilíndrica, un tamaño aproximado de 35  $\mu\text{m}$  de largo x 6  $\mu\text{m}$  de ancho, y se presentan como células individuales o formando grupos. Además, son inmóviles, de color verde azul pálido o verde oliva y se las puede encontrar formando tapetes o colonias. Las cianobacterias del género *Pseudoanabaena* son filamentos cilíndricos, de 1.0 a 3.5  $\mu\text{m}$  de ancho, y se pueden encontrar solitarios o conformando tapetes. Los filamentos más antiguos tienen constricciones en las paredes transversales, son de color verde opaco o verde azulado, y pueden habitar lagos, suelos, ambientes extremos (aguas termales o hábitats hipersalinos). Finalmente, *Planktohrrix*, el último género de cianobacterias encontrado en nuestro estudio, se muestra como filamentos rectos u ondulados, de un largo de hasta 4 mm y ancho de 3.5 a 10.0  $\mu\text{m}$ , y de color verde azul (Nienaber y Steinitz-Kannan, 2018).

El hallazgo de estos géneros de cianobacterias ha sido reportado en ambientes similares. Por ejemplo, *Synechococcus* y *Pseudanabaena* han sido identificadas morfológicamente en las fuentes termales de Maha Oya – Sri Lanka, cuyas temperaturas oscilan entre los 42- 59.8°C y el pH entre 6.89-7.63 (Medhavi et al., 2018), también se ha encontrado a *Planktohrrix* y *Synechococcus* (identificación molecular), formando parte de la comunidad microbiana de las fuentes termales de Yunnan – China, cuyas temperaturas oscilan entre los 38 a 90°C y el pH de 4 a 9.4 (Keshari et al., 2022).

Las condiciones de cultivo (p.e. medios y/o antibióticos) pueden cambiar drásticamente las comunidades de cianobacterias incluso en el mismo lugar de muestreo. Carmen y Chávez, 2020 han reportado a *Anacystis dimidiata*, *Cocchloris stagnina*, *Oscillatoria prínceps* en un estudio realizado con tapetes microbianos de las fuentes termales de Baños del Inca. La identificación morfológica de estas bacterias se realizó al observar las muestras de tapetes directamente en el microscopio. Cabe recalcar que, en nuestro estudio, aunque también se empleó tapetes microbianos de la misma zona de estudio, se administraron antibióticos (1000 µg/L de ampicilina) con el fin de evitar la contaminación por otros géneros microbianos, lo cual pudo influir en la selección de diferentes géneros de cianobacterias termófilas. Estos hallazgos muestran que las condiciones de cultivo son determinantes para la obtención de consorcios microbianos.

Los géneros de cianobacterias encontrados en la presente investigación han sido reportados previamente con la capacidad de biosorción de metales. Por un lado, se ha demostrado la disminución de la concentración de metales por estos mismos géneros de cianobacterias, como es el caso de *Synechococcus elongatus* Arkk1, que tiene la capacidad de biosorción de 85.84 % de Pb (Raj *et al.*, 2020), y *Synechococcus elongatus* BDU130911, que logró un 75% de biosorción de U (Rashmi *et al.*, 2021). Por otro lado, *Pseudoanabaena mucicola* tiene una capacidad del 100% de biosorción de Fe, Mn, Cu y Zn (Belal *et al.*, 2024), y *Planktohrrix rubescene* en consorcio con *Anabaena cylindrical* tienen la capacidad de biosorción del 100% de Ni y 90.1% de Cu (Bello, 2015).

Al realizar la curva de crecimiento, se observó que *Synechococcus* mostró un crecimiento exponencial hasta el día 30 del ensayo de biosorción. En otra investigación en la cual se

empleó cianobacterias de este género a diferentes tratamientos de salinidad para evaluar su crecimiento y producción de EPS, se determinó que pueden iniciar la fase exponencial hasta 31 días después de iniciar el cultivo (Bemal y Anil, 2018). Por otro lado, el número de células de *Pseudoanabaena* empezó a disminuir a partir del día 20 de edad del cultivo (hubo una reducción de  $1.17 \times 10^4$  durante el día 20 a  $0.95 \times 10^4$  células/mL durante el día 25). Se describen resultados similares en un estudio en el que se investigó el impacto de Cs y K en cianobacterias del género *Pseudoanabaena*, estas crecieron de manera constante durante el periodo de incubación que fue de dos semanas (Zhang et al., 2023). Finalmente, la cantidad de *Planktothrix* empezó a disminuir desde el día 20 del ensayo de biosorción, similar a un estudio en el que se expuso a la cianobacteria *Planktothrix agardhii* a diferentes salinidades de 7.5 a 12.5 g. L<sup>-1</sup> las cuales crecieron progresivamente durante 18 días (Vergalli et al., 2020).

#### **4.2.3 Biosorción de metales pesados por EPS producidos por cianobacterias termófilas**

Se realizó un ensayo de biosorción durante 30 días para poder determinar la capacidad de remoción de metales pesados (Mn, Ba, Ni, Cu, Zn, Pb y As) por EPS producidos por cianobacterias obtenidas de las fuentes termales de Baños del Inca (*Synechococcus sp.*, *Pseudoanabaena sp.* y *Planktothrix sp.*). Durante el ensayo, se monitoreó la concentración de los metales en 5 fechas diferentes. Los resultados obtenidos indican que los EPS producidos por dichas cianobacterias tienen la capacidad de disminuir la concentración principalmente de Pb (81.75%), Cu (78.43%), Zn (76.92%) y Ni (22.76%).

Se determinó que la biosorción de metales fue directamente proporcional respecto al tiempo. En otras investigaciones se obtuvieron resultados similares respecto a la remoción de Cd, en el cual, en los primeros 30 minutos hubo un 40% de remoción de este metal, y un 86% de remoción en el día 9 (Shen et al., 2018). Esto se debe a que el tiempo de retención y contacto influyen positivamente en la remoción de metales, es decir, a mayor duración del ensayo, mayor capacidad de biosorción (Ali Redha, 2020).

Factores abióticos tales como la temperatura afectan drásticamente la capacidad de biosorción por parte de los consorcios microbianos. Por un lado, las altas temperaturas provocan el aumento de la energía cinética del sistema sorbente-sorbato, lo cual favorece la unión de los metales a los EPS (Warjri y Syiem, 2018). Por ejemplo, en el caso del Cu, un estudio demostró que con el aumento de temperatura también incrementaba el porcentaje de biosorción de este metal, de 84.0% a 25°C a un 90.1% a 45°C (Fawzy et al., 2022). De igual manera, un estudio reportó que la temperatura óptima para la biosorción de Pb fue de 45°C (Sarkar et al., 2021). Además, un estudio demostró que a 25°C el porcentaje de remoción de Zn fue de 95.6% el cual aumentó hasta 97.02% a 45°C (Alharbi et al., 2022). También se ha reportado hasta un 83% de porcentaje de remoción de Ni, a una temperatura óptima de 45°C (Şen, Kılıç y Dönmez, 2022). En esta investigación, la temperatura empleada fue de 45°C durante todo el ensayo, lo que podría sugerir que los procesos de biosorción de los metales Cu, Pb, Zn y Ni podrían haberse incrementado a esta temperatura.

El pH también es un factor determinante para la biosorción de metales. Este factor influye en la protonación de los grupos funcionales de la superficie de los EPS, así como en la

química de los metales. A un pH bajo, no se da efectivamente la unión entre metales y grupos funcionales debido a que los iones  $H^+$  compiten con los iones metálicos cargados positivamente. En cambio, a pH mayor, existe mayor unión entre los metales y los EPS, ya que una mayor cantidad de ligandos cargados negativamente quedan expuestos en la superficie del sorbente (Warjri y Syiem, 2018). Sin embargo, para algunos elementos tales como el As, el pH óptimo para su biosorción se encuentra en un rango de 2 a 4 (Torres, 2020). El pH inicial en el ensayo de biosorción de esta investigación, fue de 7.12 y terminó en 8.90. Este rango podría ser adecuado para la biosorción de Cu, Pb, Zn y Ni. En el caso del As, Mn y Ba, podríamos asumir que uno de los factores por las que no fueron removidos del medio de cultivo es que no se empleó el pH adecuado para su biosorción. Además, estos elementos pudieron haberse encontrado en otras especies químicas como hidróxidos, haciendo inviable su remoción del medio.

Adicionalmente, el aumento en las concentraciones de As, Mn y Ba podría estar relacionado a la naturaleza de las muestras, así como a la cinética celular de las cianobacterias termófilas. Por un lado, un posible aumento de estos elementos podría deberse a su liberación en el medio acuoso. Se ha reportado que diferentes metales pueden encontrarse en los tapetes debido a su interacción con los microorganismos (acumulación y biosorción natural de los metales por los tapetes) (Huerta-Díaz et al., 2011). Concentraciones de As, Mn y Ba han sido encontradas en las pozas de Baños del Inca (Anexo 3), sugiriendo la ocurrencia de una sorción natural inicial por los tapetes microbianos en el ambiente termal y una posterior liberación en el medio de cultivo empleado en el experimento. Por otro lado, el aumento de elementos tales como el Mn podría estar relacionado directamente con las cianobacterias, ya que este elemento es un componente abundante en la clorofila (Madigan et al., 2018). Su liberación al medio

acuoso podría producirse después de una lisis celular de las cianobacterias empleadas en este ensayo, algo que se evidenció aproximadamente en el día 20 del ensayo de biosorción (p.e., *Planktohrrix* y *Pseudoanabaena*).

El ensayo de biosorción realizado mostró resultados positivos respecto a la remoción de Ni, Cu, Zn y Pb, demostrando así el potencial biotecnológico de los microorganismos y sus metabolitos (EPS) que se encuentran habitando los ambientes extremos de la ciudad de Cajamarca. Con este ensayo, se busca proponer potenciales soluciones al problema de la contaminación por metales pesados en Cajamarca, además de recalcar la importancia de explorar, estudiar y preservar la biodiversidad microbiana de los ambientes extremos con los que contamos en nuestra región ya que son recursos valiosos para la biotecnología ambiental.

#### **4.2.5 Caracterización química de EPS producidos por cianobacterias**

La producción de EPS por microorganismos está estrechamente relacionada a su supervivencia (Rana y Upadhyay, 2020), pero también a la remoción de metales pesados debido a su capacidad de biosorción (Ciani y Adessi, 2023). Ya que las cianobacterias pueden producir EPS en su ambiente natural o bajo condiciones de cultivo, en esta investigación se evaluó la producción y composición de EPS producidos por cianobacterias termófilas de la región Cajamarca.

Se determinó que a mayor cantidad de EPS producidos por las cianobacterias termófilas podría haber un aumento en la biosorción de metales (Li et al., 2021). En este experimento, la determinación de la concentración de EPS se realizó mediante el análisis

de carbohidratos totales mediante el método del ácido fenol-sulfúrico (Bemal y Anil, 2018). Se encontró que los carbohidratos fueron los componentes más abundantes en los tres tipos de EPS extraídos a comparación de los otros componentes cuantificados en este estudio (Figura 18). En este estudio, la concentración de los 3 tipos de EPS detectados por la presencia de carbohidratos fue inversamente proporcional a la concentración de metales, razón por la que se puede atribuir a los EPS como agentes responsables de la biosorción, tal como lo demuestran diversos estudios relacionados a la biosorción de Cd (Shen et al., 2021), Pb, Cr (Cui et al., 2021), Cs (Yu et al., 2020), As (Naveed et al., 2020), Cu, y Ni (Ghorbani et al., 2022).

La clasificación de los EPS como capsulares (C-EPS), ligeramente unidos (LB-EPS) o fuertemente unidos (TB-EPS) depende de cómo se asocian con las células o el método empleado para su extracción (More et al., 2014). En esta investigación, se extrajeron los 3 tipos de EPS empleando diferentes metodologías, y los resultados mostraron que al finalizar el ensayo de biosorción, las concentraciones de C-EPS, LB-EPS y TB-EPS fueron similares. Cada tipo de EPS tiene diferentes funciones respecto al mecanismo de biosorción de metales (Ma et al., 2023). Sin embargo, en una investigación se determinó que los LB-EPS son los que tienen una mayor capacidad de sorción de  $Pb^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$  en comparación con los otros tipos de EPS, debido a que tienen una estructura menos compacta y una mayor superficie expuesta, lo que proporciona más sitios de unión para cationes metálicos (Lu et al., 2021). En la presente investigación, también se evidenció la biosorción de los metales Pb, Cu y Zn, así como la producción de LB-EPS, lo que sugiere que este tipo de EPS desempeñó un papel importante en los resultados obtenidos.

Adicionalmente, se analizó la presencia de otros grupos orgánicos presentes en los EPS, los cuáles estuvieron de mayor a menor concentración: acetilos>sulfatos>fosfatos. La importancia de los acetilos (Figura 19) en los EPS radica en que posibilitan que los iones metálicos se unan fuertemente (Banerjee et al., 2021). En cuanto a sulfatos y fosfatos, son grupos cargados negativamente y pueden funcionar como agentes quelantes para cationes metálicos (Ciani y Adessi, 2023; Banerjee et al., 2021).

Los resultados sugieren que las cianobacterias termófilas obtenidas de tapetes provenientes de las fuentes termales de Baños del Inca – Cajamarca, son capaces de remover concentraciones de metales pesados bajo las condiciones de cultivo administradas en este experimento, y que los EPS producidos están directamente relacionados con estos procesos a elevadas temperaturas. De esta manera, estos microorganismos y sus metabolitos podrían ser empleados en procesos de biorremediación integrados con temperaturas fluctuantes para así remover metales pesados de ambientes acuosos.

## CAPÍTULO V

### CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

#### 5.1 Conclusiones

Los EPS producidos por las cianobacterias termófilas estuvieron relacionados a la biosorción de metales pesados durante el ensayo de biosorción. Las cianobacterias termófilas demostraron la capacidad de biosorber hasta un 81.75% de Pb; 78.43% de Cu; 76.92% de Zn y 22.76% de Ni a una temperatura de 45°C y a un pH de 7.12. Sin embargo, no mostraron capacidad de biosorber As, Mn y Ba bajo estas mismas condiciones.

Se logró identificar a las cianobacterias termófilas (45°C): *Synechococcus sp.*, *Pseudoanabaena sp.* y *Planktothrix sp.*, provenientes de las fuentes termales de Baños del Inca (Cajamarca), que crecieron en el medio de cultivo D.

Los EPS del tipo LB-EPS, TB-EPS y C-EPS, presentaron concentraciones similares. Estos EPS estuvieron principalmente compuestos por (de mayor a menor concentración): carbohidratos > acetilos > sulfatos > fosfatos.

## **5.2 Recomendaciones**

La presente investigación establece un precedente en trabajos con cianobacterias termófilas, así como su potencial biotecnológico como consorcio, para que en futuras investigaciones estos puedan ser empleados en procesos de biorremediación de ambientes contaminados con metales pesados.

Para futuros trabajos de investigación se sugiere realizar un análisis más profundo de las comunidades de cianobacterias de las fuentes termales de Baños del Inca, en los cuales se puedan conocer la identidad de la microbiota termófila.

Asimismo, se sugiere el uso de otros metales que no hayan sido empleados durante el desarrollo de esta investigación. Así también, emplear concentraciones más elevadas de los metales pesados ya empleados en esta investigación para determinar la cantidad máxima que pueden tolerar estas cianobacterias.

Finalmente, también se recomienda que en futuras investigaciones se determine la capacidad de biosorción de metales realizando variaciones en los parámetros: temperatura, pH y cantidad de biomasa con el fin de optimizar las condiciones de este proceso.

## LISTA DE REFERENCIAS

- Aksu, Z., Ertuğrul, S. y Dönmez, G. (2009) 'Single and binary chromium(VI) and Remazol Black B biosorption properties of *Phormidium sp.*', *Journal of Hazardous Materials*, 168(1), pp. 310–318. doi: 10.1016/j.jhazmat.2009.02.027.
- Al-Amin, A. et al. (2021) 'Cyanobacteria mediated heavy metal removal: a review on mechanism, biosynthesis, and removal capability', *Environmental Technology Reviews*, 10(1), pp. 44–57. doi: 10.1080/21622515.2020.1869323.
- Al-Qahtani, K. M. et al. (2021) 'Efficiency of extremophilic microbial mats for removing Pb(II), Cu(II), and Ni(II) ions from aqueous solutions', *Environmental Science and Pollution Research*, 28(38), pp. 53365–53378. doi: 10.1007/s11356-021-14571-5.
- Alharbi, N. K. et al. (2022) 'Kinetic, isotherm and thermodynamic aspects of Zn<sup>2+</sup> biosorption by *Spirulina platensis*: Optimization of process variables by response surface methodology', *Life*, 12(4). doi: 10.3390/life12040585.
- Ali Redha, A. (2020) 'Removal of heavy metals from aqueous media by biosorption', *Arab Journal of Basic and Applied Sciences*, 27(1), pp. 183–193. doi: 10.1080/25765299.2020.1756177.
- Ashok, K., Sajna, K. y Swati, S. (2021) *Microbial exopolysaccharides as novel and significant biomaterials*. Springer. Disponible en: <https://link.springer.com/10.1007/978-3-030-75289-7>.
- Banerjee, A. et al. (2021) 'Extremophilic exopolysaccharides: Biotechnologies and wastewater remediation', *Frontiers in Microbiology*, 12(Agosto). doi: 10.3389/fmicb.2021.721365.
- Belal, E. et al. (2024) 'Biosorption of some heavy metals from wastewater by *Pseudoanabaena mucicola*', *Egyptian Journal of Soil Science*, 64(1), pp. 313–323. doi: 10.21608/ejss.2024.249891.1689.
- Bello, A. (2015) 'Efficiency of algae combinations in heavy metal removal from wastewaters using photo-bio-reactor', (May), pp. 1–38. Disponible en: <http://www.theseus.fi/handle/10024/94671>.
- Bemal, S. y Anil, A. C. (2018) 'Effects of salinity on cellular growth and exopolysaccharide production of freshwater *Synechococcus* strain CCAP1405', *Journal of Plankton Research*, 40(1), pp. 46–58. doi: 10.1093/plankt/fbx064.
- Berenblum, I. y Chain, E. (1938) 'An improved method for the colorimetric determination of phosphate', *The Biochemical journal*, 32(2), pp. 295–298. doi: 10.1042/bj0320295.
- Carmen, M. y Chávez, N. (2020) 'Identificación de metabolitos secundarios en cianobacterias presentes en las aguas termales Los Perolitos del distrito de Baños del Inca, Cajamarca'. Tesis para titulación: Universidad Antonio Guillermo Urrelo.
- Castenholz, R. W. (1981) 'Isolation and cultivation of thermophilic cyanobacteria', *The Prokaryotes*, (Table 1), pp. 236–246. doi: 10.1007/978-3-662-13187-9\_11.
- Cérantola, S. et al. (2000) 'Exopolysaccharide production by mucoid and non-mucoid strains of *Burkholderia cepacia*', *FEMS Microbiology Letters*, 185(2), pp. 243–246. doi: 10.1016/S0378-1097(00)00099-9.

- Ciani, M. y Adessi, A. (2023) 'Cyanoremediation and phyconanotechnology: cyanobacteria for metal biosorption toward a circular economy', *Frontiers in Microbiology*, 14(May), pp. 1–9. doi: 10.3389/fmicb.2023.1166612.
- Cui, L. et al. (2021) 'Characterization of extracellular polymeric substances from *Synechocystis sp.* PCC6803 under Cd (II), Pb (II) and Cr (VI) stress', *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 9(4), p. 105347. doi: 10.1016/j.jece.2021.105347.
- Debnath, T. et al. (2019) 'Diversity of microbes in hot springs and their sustainable use', *Microbial Diversity in Ecosystem Sustainability and Biotechnological Applications*, pp. 159–186. doi: 10.1007/978-981-13-8315-1\_6.
- Diaconu, M. et al. (2020) 'Characterization of heavy metal toxicity in some plants and microorganisms—A preliminary approach for environmental bioremediation', *New Biotechnology*, 56(Enero), pp. 130–139. doi: 10.1016/j.nbt.2020.01.003.
- Dubois, M. et al. (1956) 'Colorimetric method for determination of sugars and related substances', *University of Minnesota*, pp. 350–356.
- Faisal, M. et al. (2020) *Cellular and molecular phytotoxicity of heavy metals*. Springer International Publishing (Nanotechnology in the Life Sciences). Disponible en: <https://books.google.com.pe/books?id=AywEEAAAQBAJ>.
- Fawzy, M. A. et al. (2022) 'Statistical optimization, kinetic, equilibrium isotherm and thermodynamic studies of copper biosorption onto *Rosa damascena* leaves as a low-cost biosorbent', *Scientific Reports*, 12(1), pp. 1–19. doi: 10.1038/s41598-022-12233-1.
- García, Á. (2021) 'Estudio de microorganismos halófilos moderados productores de exopolisacáridos pertenecientes a salinas de interior en Castilla - La Mancha'. Tesis doctoral: Universidad Autónoma de Madrid.
- Genchi, G. et al. (2020) 'Nickel: Human health and environmental toxicology', *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 17(3). doi: 10.3390/ijerph17030679.
- Ghorbani, E. et al. (2022) 'Metal removal capability of two cyanobacterial species in autotrophic and mixotrophic mode of nutrition', *BMC Microbiology*, 22(1), p. 58. doi: 10.1186/s12866-022-02471-8.
- Guzmán Ortiz, G. M. (2022) 'Caracterización y potencial biotecnológico de exopolisacáridos (EPS) de cianobacterias extremófilas, para su uso como humectantes dérmicos', *Universidad Católica de Santa María*. Arequipa: Universidad Católica de Santa María, pp. 2003–2005.
- Hare, V. et al. (2019) 'Arsenic toxicity and its remediation strategies for fighting the environmental threat', en Bharagava, R. N. y Chowdhary, P. (eds) *Emerging and Eco-Friendly Approaches for Waste Management*. Springer Nature Singapore, pp. 143–170.
- Harischandra, D. S. et al. (2019) 'Manganese-induced neurotoxicity: New insights into the triad of protein misfolding, mitochondrial impairment, and neuroinflammation', *Frontiers in Neuroscience*, 13(JUN), pp. 1–19. doi: 10.3389/fnins.2019.00654.
- Huamani, A. (2000) 'Riesgos volcánicos e hidrotermalismo en el Perú', en *Aguas termales y minerales en el norte del Perú*. 22nd edn. Lima: INGEMMET.
- Huerta-Díaz, M. A. et al. (2011) 'Iron and trace metals in microbial mats and underlying

- sediments: Results from Guerrero Negro Saltern, Baja California Sur, Mexico', *Aquatic Geochemistry*, 17(4), pp. 603–628. doi: 10.1007/s10498-011-9126-3.
- Hussein, M. H. et al. (2019) 'Characterization and chromium biosorption potential of extruded polymeric substances from *Synechococcus mundulus* induced by acute dose of gamma irradiation', *Environmental Science and Pollution Research*, 26(31), pp. 31998–32012. doi: 10.1007/s11356-019-06202-x.
- INGEMMET (2003) 'Estudio hidrogeológico Complejo Turístico Baños del Inca', pp. 1–23.
- Iqbal, J., Javed, A. y Baig, M. A. (2022) 'Heavy metals removal from dumpsite leachate by algae and cyanobacteria', *Bioremediation Journal*, 26(1), pp. 31–40. doi: 10.1080/10889868.2021.1884530.
- Keshari, N. et al. (2022) 'Cyanobacterial community structure and isolates from representative hot springs of Yunnan province, China using an integrative approach', *Frontiers in Microbiology*, 13(April). doi: 10.3389/fmicb.2022.872598.
- Kim, J., Kim, Y. y Kumar, V. (2019) 'Heavy metal toxicity: An update of chelating therapeutic strategies', *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, 54(Noviembre 2018), pp. 226–231. doi: 10.1016/j.jtemb.2019.05.003.
- Knappe, D., Belk, R. y Briley, D. (2004) *Algae detection and removal strategies for drinking water treatment plants*. AWWA Research Foundation. Disponible en: <https://books.google.com.pe/books?id=UtuTFyk6pQ4C>.
- Kumar, A. et al. (2020) 'Lead toxicity : Health hazards , influence on food Chain , and sustainable remediation approaches', *Environmental Research and Public Health*, 17, pp. 1–36. doi: 10.3390/ijerph17072179.
- Kumar, D., Kaštánek, P. y Adhikary, S. P. (2018) 'Exopolysaccharides from cyanobacteria and microalgae and their commercial application', *Current Science*, 115(2), pp. 234–241. doi: 10.18520/cs/v115/i2/234-241.
- Li, C. et al. (2021) 'Insight into biosorption of heavy metals by extracellular polymer substances and the improvement of the efficacy: a review', *Letters in Applied Microbiology*. doi: 10.1111/lam.13563.
- Li, J. et al. (2019) 'Advances in the mechanisms of plant tolerance to manganese toxicity', *International Journal of Molecular Sciences*, 20(20). doi: 10.3390/ijms20205096.
- Lu, S. et al. (2021) 'Insight the roles of loosely-bound and tightly-bound extracellular polymeric substances on Cu<sup>2+</sup>, Zn<sup>2+</sup> and Pb<sup>2+</sup> biosorption process with *Desulfovibrio vulgaris*', *Journal of Colloid and Interface Science*, 596, pp. 408–419. doi: 10.1016/j.jcis.2021.03.152.
- Ma, Y. et al. (2023) 'The contradictory roles of tightly bound and loosely bound extracellular polymeric substances of activated sludge in trimethoprim adsorption process', *Journal of Environmental Management*, 336, p. 117661. doi: <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2023.117661>.
- Madigan, M. et al. (2018) 'Diversity of phototrophic bacteria', in Pearson (ed.) *Brock Biology of Microorganisms*. 15th edn, pp. 1–33.
- McComb, E. y McCready, R. (1957) 'Determination of acetyl in pectin and in acetylated

- carbohydrate polymers', *Analytical Chemistry*, 29(5), pp. 819–821. doi: 10.1021/ac60125a025.
- Medhavi, P. et al. (2018) 'Isolation and identification of thermophilic bacteria and cyanobacteria from Maha Oya hot springs in Sri Lanka', (April 2019), p. 2018.
- Meena, V. et al. (2020) 'Impact of lead contamination on agroecosystem and human health BT - lead in plants and the environment', in. Cham: Springer International Publishing, pp. 67–82. doi: 10.1007/978-3-030-21638-2\_4.
- MINAM (2017) 'Estandares de Calidad Ambiental (ECA) para Agua', *El Peruano*, pp. 6–9. Disponible en: <http://www.minam.gob.pe/wp-content/uploads/2017/06/DS-004-2017-MINAM.pdf>.
- Mona, S. et al. (2020) *Cyanobacteria: The eco-friendly tool for the treatment of industrial wastewaters, Bioremediation of Industrial Waste for Environmental Safety*. Pali. doi: 10.1007/978-981-13-3426-9\_16.
- More, T. T. et al. (2014) 'Extracellular polymeric substances of bacteria and their potential environmental applications', *Journal of Environmental Management*, 144, pp. 1–25. doi: 10.1016/j.jenvman.2014.05.010.
- Naveed, S. et al. (2020) 'Sorption and transformation of arsenic by extracellular polymeric substances extracted from *Synechocystis sp.* PCC6803', *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 206. doi: 10.1016/j.ecoenv.2020.111200.
- Nienaber, M. A. y Steinitz-Kannan, M. (2018) *A Guide to Cyanobacteria: Identification and Impact*. University Press of Kentucky. Disponible en: <https://books.google.com.pe/books?id=PKxuDwAAQBAJ>.
- Nishanth, S. et al. (2020) 'Cyanobacterial extracellular polymeric substances (EPS): Biosynthesis and their potential applications', en Das, S. y Dash, H. (eds) *Microbial and natural macromolecules: synthesis and applications*. Elsevier Science, p. 354. Disponible en: <https://books.google.com.pe/books?id=E9PVDwAAQBAJ>.
- Parwani, L., Bhatt, M. y Singh, J. (2021) 'Potential biotechnological applications of cyanobacterial exopolysaccharides', *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 64, pp. 1–13. doi: 10.1590/1678-4324-2021200401.
- Patel, A. et al. (2019) 'A perspective on biotechnological applications of thermophilic microalgae and cyanobacteria', *Bioresource Technology*, 278, pp. 424–434. doi: 10.1016/j.biortech.2019.01.063.
- Peana, M. et al. (2021) 'Environmental barium: potential exposure and health-hazards', *Archives of Toxicology*, 95(8), pp. 2605–2612. doi: 10.1007/s00204-021-03049-5.
- Prieto, C., Valencia, E. y Santoyo, G. (2018) 'Microbial mat ecosystems: Structure types, functional diversity, and biotechnological application', *Electronic Journal of Biotechnology*, 31, pp. 48–56. doi: <https://doi.org/10.1016/j.ejbt.2017.11.001>.
- Raj, A. et al. (2020) 'Bioremoval of lead by mangrove-derived cyanobacteria (*Synechococcus elongatus* Arkk1)', *Global Environment Governance, Policies and Ethics*, (June 2021), pp. 13–31.
- Rana, S. y Upadhyay, L. (2020) 'Microbial exopolysaccharides: Synthesis pathways, types and their commercial applications', *International Journal of Biological*

*Macromolecules*, 157, pp. 577–583. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2020.04.084.

Rashmi, V. et al. (2021) ‘Uranium adsorption and oil emulsification by extracellular polysaccharide (EPS) of a halophilic unicellular marine cyanobacterium *Synechococcus elongatus* BDU130911’, *Current Research in Green and Sustainable Chemistry*, 4(Septiembre 2020), p. 100051. doi: 10.1016/j.crgsc.2020.100051.

Rehman, M. et al. (2019) ‘Copper environmental toxicology, recent advances, and future outlook: a review’, *Environmental Science and Pollution Research*, 26(18), pp. 18003–18016. doi: 10.1007/s11356-019-05073-6.

Rippka, R. (1988) ‘Isolation and purification of Cyanobacteria’, *Methods in enzymology*, 167, pp. 3–27.

Rodríguez Díaz, W. C. (2020) ‘Minería informal como generadora de la contaminación ambiental en el distrito de Contumazá, Región de Cajamarca: 2019 – 2020’, *Universidad César Vallejo*, p. 144. Disponible en: <https://hdl.handle.net/20.500.12692/76522>.

Sankhla, M. S., Kumar, R. y Prasad, L. (2019) ‘Zinc impurity in drinking water and its toxic effect on human health’, *Indian Internet Journal of Forensic Medicine & Toxicology*, 17, p. 84. doi: 10.5958/0974-4487.2019.00015.4.

Sarkar, B. et al. (2021) ‘Application of artificial neural network and particle swarm optimization for modelling and optimization of biosorption of lead(II) and nickel(II) from wastewater using dead cyanobacterial biomass’, *Journal of the Indian Chemical Society*, 98(3). doi: 10.1016/j.jics.2021.100039.

Şen, S., Kılıç, N. y Dönmez, G. (2022) ‘The usage of thermophile cyanobacterium aponinum in Ni(II) Bioremediation’, *Journal of Water Chemistry and Technology*, 44(5), pp. 374–380. doi: 10.3103/S1063455X22050113.

Severiche, C. y González, H. (2012) ‘Evaluación analítica para la determinación de sulfatos en aguas por método turbidimétrico modificado’, *Ingenierías USBMed*, 3(2), pp. 6–11. doi: 10.21500/20275846.269.

Shen, L. et al. (2018) ‘Characterization of extracellular polysaccharide/protein contents during the adsorption of Cd(II) by *Synechocystis* sp. PCC6803’, *Environmental Science and Pollution Research*, 25(21), pp. 20713–20722. doi: 10.1007/s11356-018-2163-3.

Shen, L. et al. (2021) ‘Biosorption behavior and mechanism of cadmium from aqueous solutions by: *Synechocystis* sp. PCC6803’, *RSC Advances*, 11(30), pp. 18637–18650. doi: 10.1039/d1ra02366g.

Singh, S. et al. (2018) ‘Cyanobacterial exopolysaccharides: Composition, biosynthesis, and biotechnological applications’, en *Cyanobacteria*. Elsevier Inc., pp. 347–358. doi: 10.1016/B978-0-12-814667-5.00017-9.

Torres, E. (2020) ‘Biosorption : A review of the latest advances’, *Processes*, 8, pp. 1–23. doi: 10.3390/pr8121584.

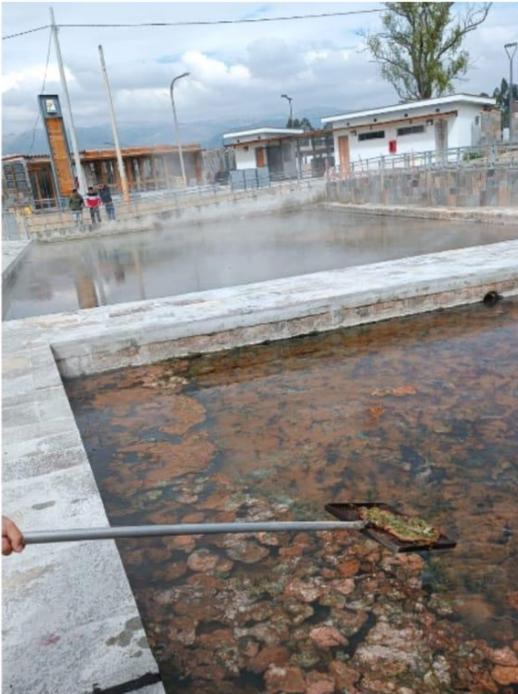
Tripathi, M. et al. (2023) ‘Microbial biosorbent for remediation of dyes and heavy metals pollution: A green strategy for sustainable environment’, *Frontiers in Microbiology*, 14(April), pp. 1–9. doi: 10.3389/fmicb.2023.1168954.

Valdez-Nuñez, L. F. y Rivera-Jacinto, M. A. (2022) ‘Thermophilic bacteria from Peruvian hot springs with high potential application in environmental biotechnology’,

- Environmental Technology*, pp. 1–16. doi: 10.1080/09593330.2022.2143293.
- Vardhan, K. H., Kumar, P. S. y Panda, R. C. (2019) ‘A review on heavy metal pollution, toxicity and remedial measures: Current trends and future perspectives’, *Journal of Molecular Liquids*, 290, pp. 1–22. doi: 10.1016/j.molliq.2019.111197.
- Vareda, J. P., Valente, A. J. M. y Durães, L. (2019) ‘Assessment of heavy metal pollution from anthropogenic activities and remediation strategies: A review’, *Journal of Environmental Management*, 246, pp. 101–118. doi: 10.1016/j.jenvman.2019.05.126.
- Vergalli, J. et al. (2020) ‘Persistence of microcystin production by *Planktothrix agardhii* (Cyanobacteria) exposed to different salinities’, *Phycologia*, 59(1), pp. 24–34. doi: 10.1080/00318884.2019.1664875.
- Warjri, S. M. y Syiem, M. B. (2018) ‘Analysis of biosorption parameters, equilibrium isotherms and thermodynamic studies of chromium (VI) uptake by a *Nostoc sp.* isolated from a Coal Mining Site in Meghalaya, India’, *Mine Water and the Environment*, 37(4), pp. 713–723. doi: 10.1007/s10230-018-0523-3.
- Xu, H., Yu, G. y Jiang, H. (2013) ‘Investigation on extracellular polymeric substances from mucilaginous cyanobacterial blooms in eutrophic freshwater lakes’, *Chemosphere*, 93(1), pp. 75–81. doi: 10.1016/j.chemosphere.2013.04.077.
- Yadav, A. et al. (2021) ‘Cyanobacterial extracellular polymeric substances for heavy metal removal: A mini review’, *Journal of Composites Science*, 5(1), pp. 1–18. doi: 10.3390/jcs5010001.
- Yildiz, H. y Karatas, N. (2018) ‘Microbial exopolysaccharides: Resources and bioactive properties’, *Process Biochemistry*, 72(Noviembre 2017), pp. 41–46. doi: 10.1016/j.procbio.2018.06.009.
- Yu, R. et al. (2020) ‘Behavior and mechanism of cesium biosorption from aqueous solution by living *Synechococcus* PCC7002’, *Microorganisms*, 8(4). doi: 10.3390/microorganisms8040491.
- Zahra, Z. et al. (2020) ‘Cyanobacteria: Review of current potentials and applications’, *Environments - MDPI*, 7(2). doi: 10.3390/environments7020013.
- Zhang, K. et al. (2023) ‘The interplay between Cs and K in *Pseudanabaena catenata*; from microbial bloom control strategies to bioremediation options for radioactive waters’, *Journal of Hazardous Materials*, 445, p. 130556. doi: <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2022.130556>.

## APÉNDICES

### Apéndice 1. Sitio del muestreo: fuentes termales de Baños del Inca.



**Apéndice 2. Muestras de tapetes microbianos en la superficie de las pozas termales.**



**Apéndice 3. Colección de muestras de tapetes microbianos de las fuentes termales de Baños del Inca.**



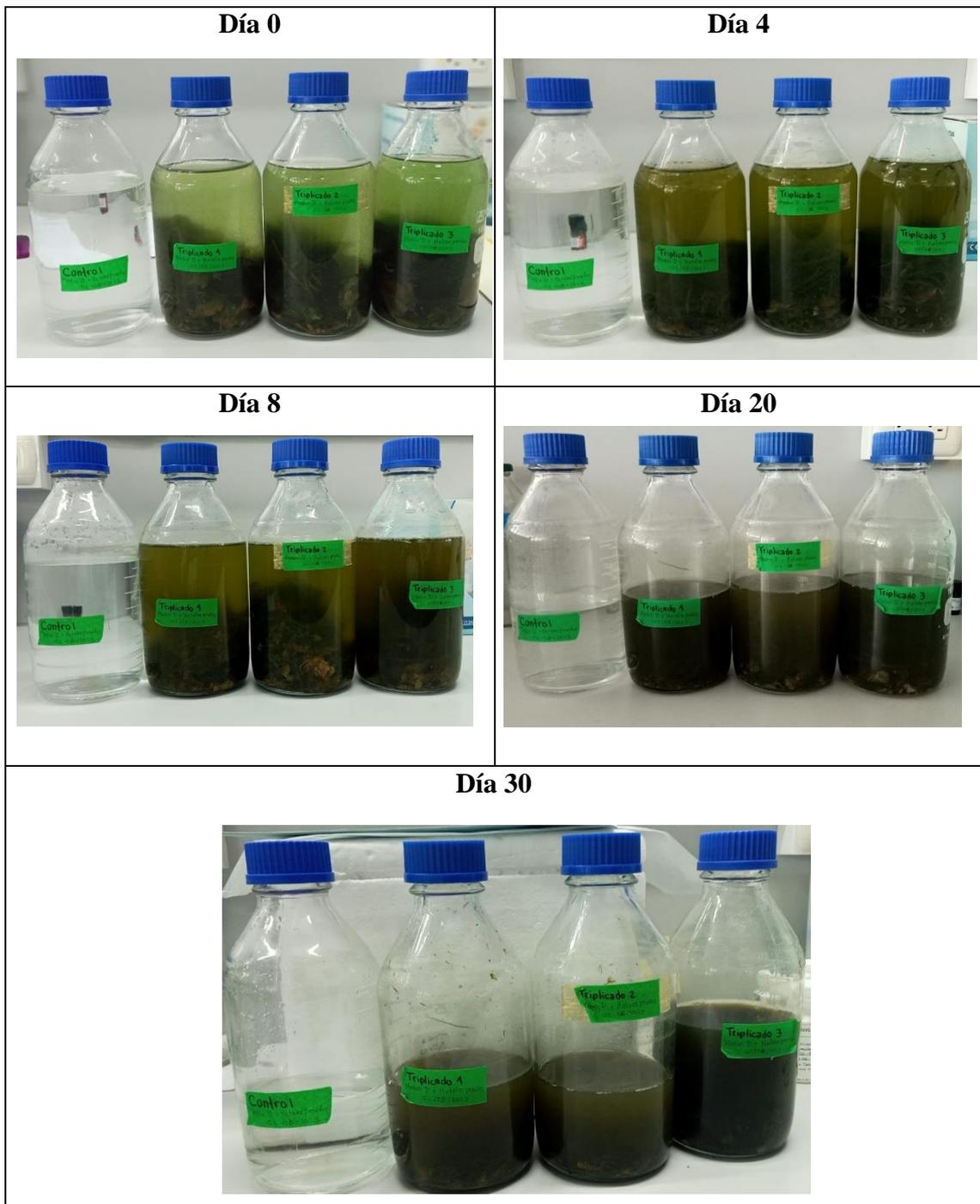
**Apéndice 4. Composición de medio de cultivo líquido D modificado.**

	COMPONENTE	CONCENTRACIÓN FINAL
	Agua destilada estéril	1L
<b>MACRONUTRIENTES</b>	EDTA	0.1 g
<b>MICRONUTRIENTES</b>	Solución de FeCl <sub>3</sub> (0.29 g/L)	1 mL
	CaCl	0.06 g
	MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0.10 g
	NaCl	0.008 g
	KNO <sub>3</sub>	0.10 g
	NaNO <sub>3</sub>	0.70 g
	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.11 g
<b>SOLUCIÓN DE MICRONUTRIENTES</b>	MnSO <sub>4</sub> . H <sub>2</sub> O (2.28 g/L), ZnSO <sub>4</sub> . 7H <sub>2</sub> O (0.50 g/L), H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> (0.50 g/L), CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O (0.025 g/L), Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> .2 H <sub>2</sub> O (0.025 g/L), CoCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O (0.045 g/L)	2.5 mL
*(Solvente: agua destilada)		

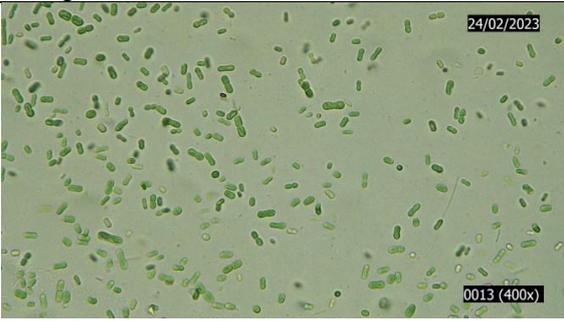
**Apéndice 5. Enriquecimiento de cianobacterias en medio de cultivo D modificado, suplementado con 0.5% (p/v) glucosa y 1000 µg/L de ampicilina a 45°C.**



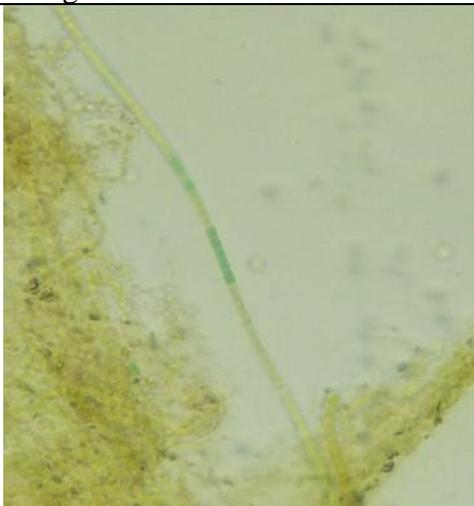
**Apéndice 6. Control, replicado 1, replicado 2 y replicado 3 durante los días 0, 4, 8, 20 y 30 del ensayo de biosorción.**



**Apéndice 7. Fichas de identificación de cianobacterias.**

Código	0013	Fotografía
<b>Características</b>		
Forma	Cococoides	
Célula	Cilíndrica	
Color	Verde oliva	
Tamaño	7.029 – 11.376 $\mu\text{m}$	
Observaciones	Se las encontró inicialmente formando colonias con células filamentosas.	
Posible género	<i>Synechococcus sp</i>	

Código	0014	Fotografía
<b>Características</b>		
Forma	Filamentosa	
Célula	Cilíndrica	
Color	Verde	
Tamaño	876.90 – 1004.21 $\mu\text{m}$ aprox	
Observaciones	Se las encontró inicialmente formando colonias con células cococoides	
Posible género	<i>Planktothrix sp</i>	

Código	0018	Fotografía
<b>Características</b>		
Forma	Filamentosa	
Célula	Cilíndrica	
Color	Verde oliva	
Tamaño	1010.20 – 1530.34 $\mu\text{m}$	
Observaciones	Presenta constricciones	
Posible género	<i>Pseudanabaena sp</i>	

## Apéndice 8. Fichas de concentración de metales y porcentaje de biosorción

Ficha del control

<b>CONTROL</b>			
<b>Metal</b>	<b>Día</b>	<b>Concentración (mg/L) ±Incertidumbre</b>	<b>Porcentaje de biosorción</b>
<b>NÍQUEL</b>	0	0.1786 ± 0.041	<b>Concentración inicial</b>
	4	0.1571±0.013	12.03%
	8	0.2016±0.046	-12.88%
	20	0.1952 ± 0.045	-9.29%
	30	0.1793±0.041	-0.39%
<b>COBRE</b>	0	0.15617 ± 0.039	<b>Concentración inicial</b>
	4	0.15066±0.013	3.52%
	8	0.18623±0.047	-19.25%
	20	0.16679 ± 0.042	-6.80%
	30	0.15400±0.039	1.39%
<b>ZINC</b>	0	1.2403 ± 0.12	<b>Concentración inicial</b>
	4	1.3215±0.042	-6.54%
	8	1.3254±0.13	-7.45%
	20	1.3327 ± 0.13	-7.45%
	30	1.1443±0.11	7.74%
<b>ARSÉNICO</b>	0	0.01009 ± 0.0011	<b>Concentración inicial</b>
	4	< 0.00010	99.00% aprox
	8	< 0.00010	99.00% aprox
	20	< 0.00010	99.00% aprox
	30	< 0.00010	99.00% aprox
<b>PLOMO</b>	0	0.0659 ± 0.0059	<b>Concentración inicial</b>
	4	0.0687±0.0017	-4.25%
	8	0.0628±0.0057	4.7%
	20	0.0712 ± 0.0064	-8.04%
	30	0.0552±0.0050	16.23%
<b>MANGANESO</b>	0	0.88318 ± 0.062	<b>Concentración inicial</b>
	4	0.24908±0.017	71.79%
	8	0.71289±0.050	19.28%
	20	0.76596 ± 0.054	13.27%
	30	0.61631±0.043	30.22%
<b>BARIO</b>	0	0.0800 ± 0.0072	<b>Concentración inicial</b>
	4	0.0193±0.0017	75.88%
	8	0.0197±0.0018	75.38%
	20	0.0221 ± 0.0020	72.38%
	30	0.0172±0.0015	78.5%

Ficha del replicado 1

<b>REPLICADO 1</b>			
<b>Metal</b>	<b>Día</b>	<b>Concentración (mg/L) ±Incertidumbre</b>	<b>Porcentaje de biosorción</b>
	0	0.1957 ±0.045	Concentración inicial

<b>NÍQUEL</b>	4	0.1993±0.046	-1.84%
	8	0.1815±0.042	7.26%
	20	0.1744±0.040	10.88%
	30	0.1708±0.039	12.72%
<b>COBRE</b>	0	0.16628±0.042	Concentración inicial
	4	0.05716±0.014	65.62%
	8	0.05752±0.014	65.41%
	20	0.06033±0.015	63.72%
	30	0.05733±0.014	65.52%
<b>ZINC</b>	0	1.3070±0.13	Concentración inicial
	4	1.1175±0.11	14.50%
	8	1.1068±0.11	15.32%
	20	0.3910±0.039	70.08%
	30	0.2848±0.029	78.21%
<b>ARSÉNICO</b>	0	< 0.00010	Concentración inicial
	4	0.01680±0.0019	-16.70%
	8	0.01619±0.0018	-16.09%
	20	0.03461±0.0038	-34.510%
	30	0.02782±0.0031	-27.72%
<b>PLOMO</b>	0	0.0629±0.0057	Concentración inicial
	4	0.0543±0.0049	13.67%
	8	0.0473±0.0043	24.80%
	20	0.0268±0.0024	57.39%
	30	0.0136±0.0012	78.38 %
<b>MANGANESO</b>	0	0.68120±0.048	Concentración inicial
	4	5.60535±0.39	-722.86%
	8	7.64401±0.53	-1022.14%
	20	8.78494±0.61	-1189.63%
	30	12.14627±0.85	-1683.07%
<b>BARIO</b>	0	0.0180±0.0016	Concentración inicial
	4	0.3255±0.029	-1708.33%
	8	0.2779±0.025	-1443.89%
	20	0.3576±0.032	-1886.67%
	30	1.3208±0.12	-7237.78%

Ficha del replicado 2

<b>REPLICADO 2</b>			
<b>Metal</b>	<b>Día</b>	<b>Concentración (mg/L) ±Incertidumbre</b>	<b>Porcentaje de biosorción</b>
<b>NÍQUEL</b>	0	0.2429 ± 0.056	<b>Concentración inicial</b>
	4	0.1725±0.040	28.98%
	8	0.1779 ± 0.041	26.76%
	20	0.1705±0.039	29.81%
	30	0.1669±0.038	31.29%
	0	0.20857 ± 0.052	<b>Concentración inicial</b>
	4	0.09276 ± 0.023	55.52%

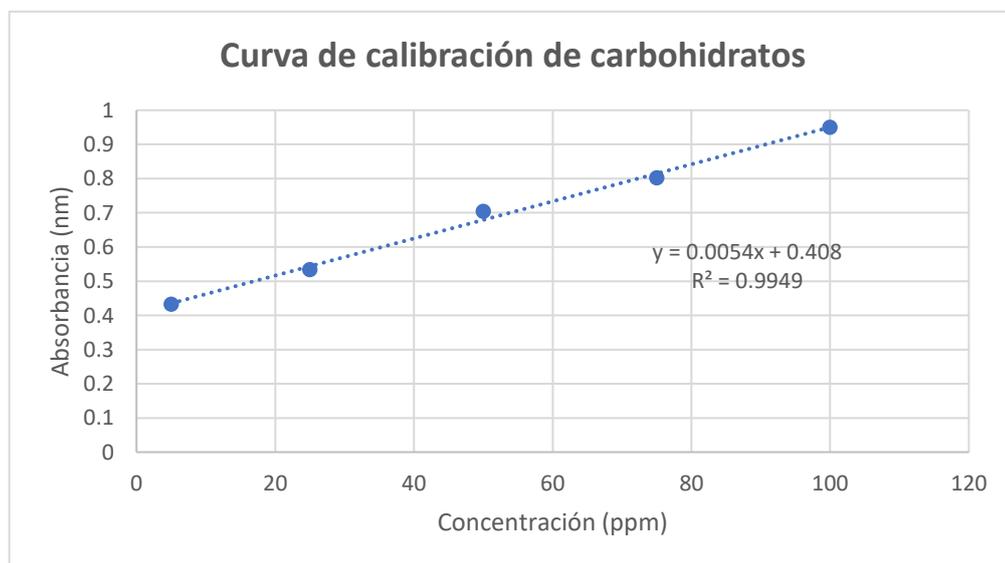
<b>COBRE</b>	8	0.04764±0.012	77.16%
	20	0.05732±0.014	72.5%
	30	0.01930±0.0048	90.75%
<b>ZINC</b>	0	1.7242±0.17	<b>Concentración inicial</b>
	4	1.0191±0.10	40.89%
	8	0.8380±0.084	51.40%
	20	0.6043±0.060	64.95%
	30	0.3720±0.037	78.42%
<b>ARSÉNICO</b>	0	< 0.00010	<b>Concentración inicial</b>
	4	0.01587±0.0018	-15.77%
	8	0.01895±0.0021	-18.85%
	20	0.03415±0.0038	-34.05%
	30	0.03513±0.0039	-35.03%
<b>PLOMO</b>	0	0.0860±0.0077	<b>Concentración inicial</b>
	4	0.0696±0.0063	19.07%
	8	0.0324±0.0029	62.33%
	20	0.0207±0.0019	75.93%
	30	0.0150±0.0014	82.56%
<b>MANGANESO</b>	0	0.69536±0.049	<b>Concentración inicial</b>
	4	9.06616±0.63	-1203.80%
	8	10.15910±0.71	-1369.98%
	20	11.74989±0.82	-1589.76%
	30	20.15205±1.41	-2798.07%
<b>BARIO</b>	0	0.0162±0.0015	<b>Concentración inicial</b>
	4	0.3133±0.028	-1833.95%
	8	0.2294±0.21	-1316.05%
	20	0.4318±0.039	-2565.43%
	30	1.8763±0.17	-11482.10%

Ficha del replicado 3

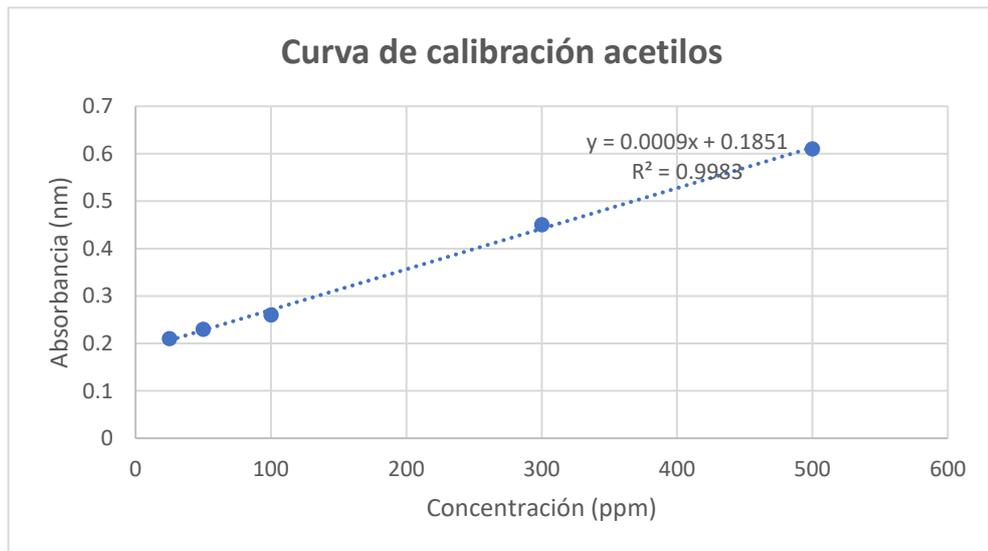
<b>REPLICADO 3</b>			
<b>Metal</b>	<b>Día</b>	<b>Concentración (mg/L) ±Incertidumbre</b>	<b>Porcentaje de biosorción</b>
<b>NÍQUEL</b>	0	0.1767±0.041	<b>Concentración inicial</b>
	4	0.1865±0.043	-5.55%
	8	0.1725±0.040	2.38%
	20	0.1457±0.034	17.54%
	30	0.1338±0.031	24.28%
<b>COBRE</b>	0	0.15013±0.038	<b>Concentración inicial</b>
	4	0.04491±0.011	70.09%
	8	0.05800±0.015	61.37%
	20	0.03224±0.0081	78.52%
	30	0.03150±0.0079	79.02%
<b>ZINC</b>	0	1.1115±0.11	<b>Concentración inicial</b>
	4	1.0697±0.11	4.06%
	8	0.8975±0.090	19.25%

	20	0.3179±0.032	71.40%
	30	0.2876±0.029	74.12%
<b>ARSÉNICO</b>	0	0.02446±0.0027	<b>Concentración inicial</b>
	4	0.01757±0.0019	28.17%
	8	0.02028±0.0022	17.09%
	20	0.02948±0.0032	-20.52%
	30	0.02377±0.0026	2.03%
		0	0.0446±0.0040
<b>PLOMO</b>	4	0.0449±0.0040	0.00%
	8	0.0339±0.0031	23.99%
	20	0.0095±0.00090	78.70%
	30	0.0070±0.00060	84.30%
		0	0.63274±0.044
<b>MANGANESO</b>	4	9.15070±0.64	-1346.20%
	8	9.90616±0.69	-1465.60%
	20	8.96859±0.63	-1317.42%
	30	10.55718±0.74	-1568.49%
		0	0.0064±0.00060
<b>BARIO</b>	4	0.4605±0.041	-7095.31%
	8	0.3695±0.033	-5673.44%
	20	0.3368±0.030	-5162.5%
	30	1.0470±0.094	-16259.38%

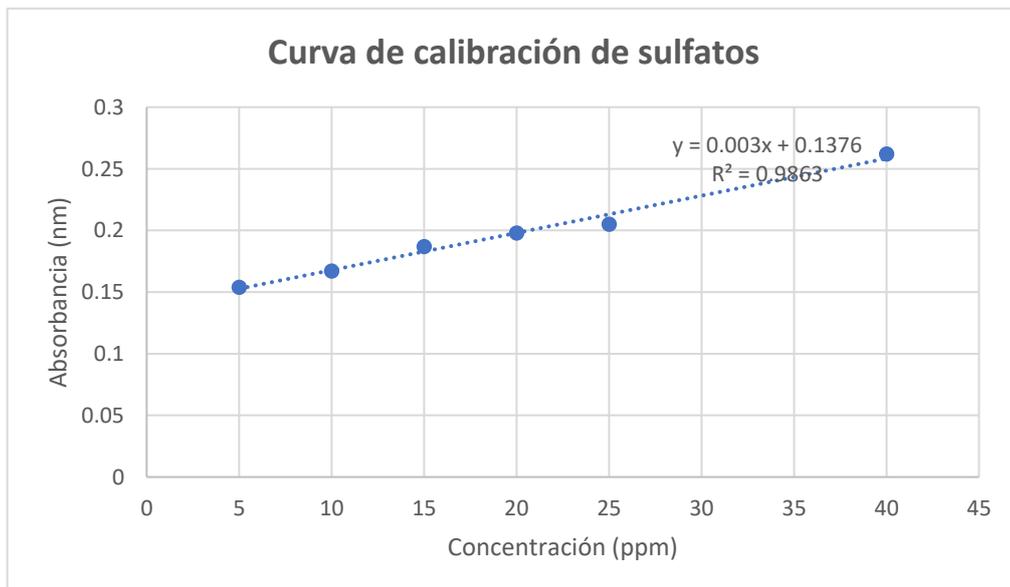
#### Apéndice 9. Curva de calibración y ecuación de la recta de polisacáridos



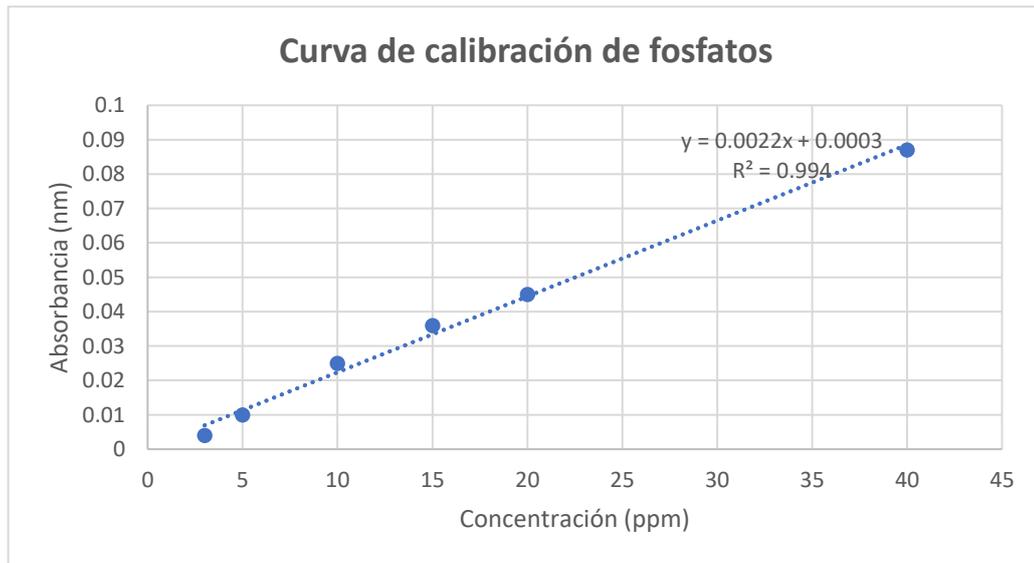
### Apéndice 10. Curva de calibración y ecuación de la recta de acetilos



### Apéndice 11. Curva de calibración y ecuación de la recta de sulfatos



## Apéndice 12. Curva de calibración y ecuación de la recta de fosfatos



## Apéndice 13. Análisis estadísticos

### Pruebas de normalidad y prueba T para muestras independientes entre el promedio de los replicados y control de níquel.

**Pruebas de normalidad**

	Grupo	Kolmogorov-Smirnov <sup>a</sup>			Shapiro-Wilk		
		Estadístico	gl	Sig.	Estadístico	gl	Sig.
Porcentaje	Control	,226	4	.	,937	4	,634
	Promedio	,217	4	.	,956	4	,756

a. Corrección de significación de Lilliefors

### Prueba T

**Estadísticas de grupo**

	Grupo	N	Media	Desv.	Desv. Error
				Desviación	promedio
Porcentaje	Control	4	-2,6325	11,09581	5,54791
	Promedio	4	15,3750	7,02804	3,51402

**Prueba de muestras independientes**

Porcentaje	Se asumen varianzas iguales	Prueba de Levene de igualdad de varianzas		prueba t para la igualdad de medias						
		F	Sig.	t	gl	Sig. (bilateral)	Diferencia de medias	Diferencia de error estándar	95% de intervalo de confianza de la diferencia	
									Inferior	Superior
	No se asumen varianzas iguales			-2,742	6	,034	-18,00750	6,56716	-34,07677	-1,93823
				-2,742	5,073	,040	-18,00750	6,56716	-34,81571	-1,19929

**Pruebas de normalidad y prueba T para muestras independientes entre el promedio de los replicados y control de cobre.**

Pruebas de normalidad							
Grupo	Kolmogorov-Smirnov <sup>a</sup>			Shapiro-Wilk			
	Estadístico	gl	Sig.	Estadístico	gl	Sig.	
Porcentaje	Control	,241	4	.	,906	4	,462
	Promedio	,177	4	.	,985	4	,932

a. Corrección de significación de Lilliefors

**Prueba T**

Estadísticas de grupo					
Grupo	N	Media	Desv. Desviación	Desv. Error	Desv. Error promedio
Porcentaje	Control	4	-5,2850	10,31827	5,15914
	Promedio	4	70,4325	6,22043	3,11021

Prueba de muestras independientes											
		Prueba de Levene de igualdad de varianzas				prueba t para la igualdad de medias				95% de intervalo de confianza de la diferencia	
		F	Sig.	t	gl	Sig. (bilateral)	Diferencia de medias	Diferencia de error estándar	Inferior	Superior	
Porcentaje	Se asumen varianzas iguales	1,073	,340	-12,569	6	,000	-75,71750	6,02413	-90,45801	-60,97699	
	No se asumen varianzas iguales			-12,569	4,926	,000	-75,71750	6,02413	-91,27306	-60,16194	

**Pruebas de normalidad y pruebaU de Mann - Whitney para muestras independientes entre el promedio de los replicados y control de zinc.**

Pruebas de normalidad							
Grupo	Kolmogorov-Smirnov <sup>a</sup>			Shapiro-Wilk			
	Estadístico	gl	Sig.	Estadístico	gl	Sig.	
Porcentaje	Control	,412	4	.	,673	4	,005
	Promedio	,261	4	.	,866	4	,281

a. Corrección de significación de Lilliefors

**Resumen de prueba de hipótesis**

	Hipótesis nula	Prueba	Sig.	Decisión
1	La distribución de Porcentaje es la misma entre las categorías de Grupo.	Prueba U de Mann-Whitney para muestras independientes	,029 <sup>1</sup>	Rechazar la hipótesis nula.

Se muestran significaciones asintóticas. El nivel de significación es de ,05

<sup>1</sup>Se muestra la significación exacta para esta prueba.

**Pruebas de normalidad y prueba T para muestras independientes entre el promedio de los replicados y control de arsénico.**

		Pruebas de normalidad			Shapiro-Wilk		
		Kolmogorov-Smirnov <sup>a</sup>					
	Grupo	Estadístico	gl	Sig.	Estadístico	gl	Sig.
Porcentaje	Control	.	4	.	.	4	.
	Promedio	,240	4	.	,936	4	,632

a. Corrección de significación de Lilliefors

		Estadísticas de grupo			
	Grupo	N	Media	Desv. Desviación	Desv. Error promedio
Porcentaje	Control	4	2,1600	10,79421	5,39710
	Promedio	4	50,0925	32,30721	16,15360

		Prueba de Levene de igualdad de varianzas		prueba t para la igualdad de medias				95% de intervalo de confianza de la diferencia		
		F	Sig.	t	gl	Sig. (bilateral)	Diferencia de medias	Diferencia de error estándar	Inferior	Superior
Porcentaje	Se asumen varianzas iguales	7,992	,030	-2,814	6	,031	-47,93250	17,03137	-89,60677	-6,25823
	No se asumen varianzas iguales			-2,814	3,662	,053	-47,93250	17,03137	-96,99392	1,12892

**Pruebas de normalidad y prueba T para muestras independientes entre el promedio de los replicados y control de plomo.**

		Pruebas de normalidad			Shapiro-Wilk		
		Kolmogorov-Smirnov <sup>a</sup>					
	Grupo	Estadístico	gl	Sig.	Estadístico	gl	Sig.
Porcentaje	Control	,267	4	.	,891	4	,390
	Promedio	,238	4	.	,941	4	,660

a. Corrección de significación de Lilliefors

**Prueba T**

		Estadísticas de grupo			
	Grupo	N	Media	Desv. Desviación	Desv. Error promedio

		Prueba de Levene de igualdad de varianzas		prueba t para la igualdad de medias				95% de intervalo de confianza de la diferencia		
		F	Sig.	t	gl	Sig. (bilateral)	Diferencia de medias	Diferencia de error estándar	Inferior	Superior
Porcentaje	Se asumen varianzas iguales	12,043	,013	-3,053	6	,022	-50,43250	16,51871	-90,85232	-10,01268
	No se asumen varianzas iguales			-3,053	3,274	,049	-50,43250	16,51871	-100,60123	-,26377

Porcentaje	Control	4	-,3400	6,90759	3,45380
	Promedio	4	50,0925	32,30721	16,15360

**Pruebas de normalidad y prueba T para muestras independientes entre el promedio de los replicados y control de manganeso.**

**Pruebas de normalidad**

	Grupo	Kolmogorov-Smirnov <sup>a</sup>			Shapiro-Wilk		
		Estadístico	gl	Sig.	Estadístico	gl	Sig.
Porcentaje	Control	,302	4	.	,846	4	,214
	Promedio	,323	4	.	,872	4	,306

a. Corrección de significación de Lilliefors

**Estadísticas de grupo**

	Grupo	N	Media	Desv.	Desv. Error
				Desviación	promedio
Porcentaje	Control	4	33,6400	26,38349	13,19174
	Promedio	4	-1439,7750	401,50902	200,75451

**Prueba de muestras independientes**

Porcentaje		Prueba de Levene de igualdad de varianzas		prueba t para la igualdad de medias						
		F	Sig.	t	gl	Sig. (bilateral)	Diferencia de medias	Diferencia de error estándar	95% de intervalo de confianza de la diferencia	
									Inferior	Superior
	Se asumen varianzas iguales	5,747	,053	7,324	6	,000	1473,41500	201,18746	981,12701	1965,70299
	No se asumen varianzas iguales			7,324	3,026	,005	1473,41500	201,18746	836,23673	2110,59327

**Pruebas de normalidad y prueba U de Mann - Whitney para muestras independientes entre el promedio de los replicados y control de bario.**

**Pruebas de normalidad**

	Grupo	Kolmogorov-Smirnov <sup>a</sup>			Shapiro-Wilk		
		Estadístico	gl	Sig.	Estadístico	gl	Sig.
Porcentaje	Control	,225	4	.	,974	4	,866
	Promedio	,411	4	.	,696	4	,011

a. Corrección de significación de Lilliefors

**Resumen de prueba de hipótesis**

	Hipótesis nula	Prueba	Sig.	Decisión
1	La distribución de Porcentaje es la misma entre las categorías de Grupo.	Prueba U de Mann-Whitney para muestras independientes	,029 <sup>1</sup>	Rechazar la hipótesis nula.

Se muestran significaciones asintóticas. El nivel de significación es de ,05

<sup>1</sup>Se muestra la significación exacta para esta prueba.

## ANEXOS

### Anexo 1. Lugar de muestreo



Fuente: Google Earth

### Anexo 2. Composición química de aguas de las fuentes termales del Complejo Turístico Baños del Inca – Cajamarca.

Elemento	Resultado	Incertidumbre	Unidad
Plata Total	0.004110	± 0.000617	mg/L
Aluminio Total	489.573	± 44.062	mg/L
Arsénico Total	0.40425	± 0.04447	mg/L
Boro Total	0.489	± 0.059	mg/L
Bario Total	2.6040	± 0.2344	mg/L
Berilio Total	0.02791	± 0.00586	mg/L
Bismuto Total	0.00499	± 0.00105	mg/L
Calcio Total	186.657	± 18.666	mg/L
Cadmio Total	0.00427	± 0.00098	mg/L
Cerio Total	0.73706	± 0.05978	mg/L
Cobalto Total	0.21840	± 0.01966	mg/L
Cromo Total	0.3569	± 0.0892	mg/L
Cesio Total	0.8155	± 0.2039	mg/L
Cobre Total	3.14875	± 0.78719	mg/L
Hierro Total	595.1781	± 47.6142	mg/L
Galio Total	0.13669	± 0.01107	mg/L

<b>Germanio Total</b>	<0.0006		mg/L
<b>Mercurio Total</b>	0.06481	± 0.01815	mg/L
<b>Potasio Total</b>	26.87	± 2.15	mg/L
<b>Lutecio Total</b>	0.00336	± 0.00094	mg/L
<b>Magnesio Total</b>	63.994	± 7.679	mg/L
<b>Manganeso Total</b>	11.62643	± 0.81385	mg/L
<b>Molibdeno Total</b>	0.00559	± 0.00129	mg/L
<b>Sodio Total</b>	73.395	± 8.073	mg/L
<b>Niobio Total</b>	<0.0015		mg/L
<b>Níquel Total</b>	0.2599	± 0.0598	mg/L
<b>Fósforo Total</b>	9.959	± 2.789	mg/L
<b>Plomo Total</b>	0.3843	± 0.0346	mg/L
<b>Rubidio Total</b>	0.7715	± 0.0772	mg/L
<b>Antimonio Total</b>	0.47260	± 0.13233	mg/L
<b>Selenio Total</b>	0.0060	± 0.0014	mg/L
<b>Silicio Total</b>	33.09	± 3.97	mg/L
<b>Silice Total</b>	70.80	± 8.50	mg/L
<b>Titanio Total</b>	0.3219	± 0.0418	mg/L
<b>Talio Total</b>	0.04828	± 0.01110	mg/L
<b>Uranio Total</b>	0.016001	± 0.003360	mg/L
<b>Zinc Total</b>	2.4590	± 0.2459	mg/L
<b>Zirconio Total</b>	0.07580	± 0.01743	mg/L

### Anexo 3. Composición de reactivos para la caracterización de EPS.

<b>Reactivo</b>	<b>Composición</b>
<b>Reactivo de acetilos</b> (McComb y McCready, 1957)	Solución 1:1 de clorhidrato de hidroxilamina 2 M con NaOH 3.5M, posteriormente se agregaron 0.25 mL de HCl al 24.6% y 0.25 mL de FeCl <sub>3</sub> hexahidrato 0.185 M en HCl 0.1 M
<b>Reactivo de fosfatos</b> (Berenblum y Chain, 1938)	25 mL de heptamolibdato amónico 0.04 M, 6.25 mL de ácido ascórbico 0.1 M y 6.25 mL de HNO <sub>3</sub> al 56%
<b>Reactivo de</b> (Severiche y González, 2012)	6 mL de HCl al 37%, 20 mL de isopropanol puro, 15 g de NaCl, 10 mL de glicerol y agua destilada 100 mL