

FACULTAD DE INGENIERÍA

Escuela Académico Profesional de Ingeniería Ambiental

Tesis

**Biotecnología ambiental para la biodegradación de
colorantes hospitalarios y de laboratorios biomédicos
(Tinción Gram) aplicando Levaduras Residuales Industriales**

Flora Yvonne Chavez Salas
Sofia Esther Manrique Llanos

Para optar el Título Profesional de
Ingeniero Ambiental

Huancayo, 2025

Repositorio Institucional Continental
Tesis digital



Esta obra está bajo una Licencia "Creative Commons Atribución 4.0 Internacional" .

INFORME DE CONFORMIDAD DE ORIGINALIDAD DE TRABAJO DE INVESTIGACIÓN

A : Decano de la Facultad de Ingeniería
DE : Jose Vladimir Cornejo Tueros
Asesor de trabajo de investigación
ASUNTO : Remito resultado de evaluación de originalidad de trabajo de investigación
FECHA : 06 de julio de 2025

Con sumo agrado me dirijo a vuestro despacho para informar que, en mi condición de asesor del trabajo de investigación:

Título:

Biotechnología ambiental para la Biodegradación de Colorantes Hospitalarios y de Laboratorios Biomédicos (Tinción Gram) Aplicando Levaduras Residuales Industriales

Autores:

1. Flora Yvonne Chavez Salas – EAP. Ingeniería Ambiental
2. Sofia Esther Manrique Llanos – EAP. Ingeniería Ambiental

Se procedió con la carga del documento a la plataforma "Turnitin" y se realizó la verificación completa de las coincidencias resaltadas por el software dando por resultado 19 % de similitud sin encontrarse hallazgos relacionados a plagio. Se utilizaron los siguientes filtros:

- Filtro de exclusión de bibliografía SI ☐ NO ☒
- Filtro de exclusión de grupos de palabras menores alabaras excluidas (en caso de elegir "SI"): SI ☐ NO ☒
- Exclusión de fuente por trabajo anterior del mismo estudiante SI ☐ NO ☒

En consecuencia, se determina que el trabajo de investigación constituye un documento original al presentar similitud de otros autores (citas) por debajo del porcentaje establecido por la Universidad Continental.

Recae toda responsabilidad del contenido del trabajo de investigación sobre el autor y asesor, en concordancia a los principios expresados en el Reglamento del Registro Nacional de Trabajos conducentes a Grados y Títulos – RENATI y en la normativa de la Universidad Continental.

Atentamente,

La firma del asesor obra en el archivo original
(No se muestra en este documento por estar expuesto a publicación)

ASESOR

PhD. José Vladimir Cornejo Tueros

AGRADECIMIENTOS

Al docente PhD., José Vladimir Cornejo Tueros, por su apoyo incondicional y a todos los que apoyaron en la realización de esta investigación, en especial al Dr. Mario Esparza Mantilla, docente investigador Renacyt N.º P0002287 y a los docentes de la Escuela de Ingeniería Ambiental.

DEDICATORIA

A mis amados padres, Flora Salas Portilla y
Angel Chávez Machado.

Flora

A mis padres: Zenobio Manrique y
Magdalena Llanos

Sofia

ÍNDICE DE CONTENIDOS

Asesor	i
Agradecimientos	ii
Dedicatoria.....	iii
Índice de contenidos	iv
Lista de tablas.....	vi
Lista de figuras	vii
Resumen.....	viii
Abstract.....	ix
Introducción	x
Capítulo I.....	12
Planteamiento del problema	12
1.1. Problema de Investigación	12
1.1.1. Justificación Ambiental	14
1.1.2. Justificación social	14
1.1.3. Justificación tecnológica.....	14
1.2. Marco Teórico.....	15
1.2.1. Antecedentes de la investigación.....	15
1.2.2. Antecedentes Internacionales	15
1.2.3. Antecedentes nacionales.....	16
1.3. Definiciones	17
1.4. Objetivo general	17
1.5. Objetivos específicos	17
1.6. Hipótesis.....	17
1.6.1. Hipótesis general.....	17
1.6.2. Hipótesis específicas	18
Capítulo II	19
Material y métodos	19
2.1. Métodos y alcance de la investigación.....	19
2.2. Diseño de investigación	19
2.3. Población y muestra	19
2.4. Metodología	19
2.4.1. Muestreo	19
2.4.2. Aislamiento e identificación de levaduras desde efluentes residuales industriales	20

2.4.3. Mantenimiento de levaduras residuales industriales (LRI).....	20
2.4.4. Identificación de los aislados fúngicos (LRI)	20
2.4.5. Ensayos de identificación molecular de LRI	20
2.4.6. Preparación del inóculo de LRI	20
2.4.7. Experimentos de decoloración de cristal violeta (CV)	21
2.4.8. Ensayo de decoloración	21
2.4.9. Biodegradación del efluente de aguas residuales hospitalarias por LRI.....	21
Capítulo III.....	22
Resultados.....	22
Capítulo IV	27
Discusión	27
Conclusiones.....	30
Referencias	31
Anexos	36

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Características microscópicas de Levadura Residual Industrial (LRI) compatibles con <i>Saccharomyces</i>	22
Tabla 2. Análisis de biología molecular de levadura residual industrial (LRI) aplicada a la biodegradación de cristal violeta.....	23

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Biodegradación de cristal violeta (mg/L) por levadura residual industrial (LRI) <i>Saccharomyces cerevisiae</i> (10^6 cel/mL) en medios de caldo de papa (CP: barra azul) y caldo de papa sacarosa (CPS: barra naranja) durante 14 días de incubación a temperatura ambiente (22 °C).	24
Figura 2. Biodegradación de cristal violeta (mg/L) por levadura residual industrial <i>Saccharomyces cerevisiae</i> en caldo de papa (CP: barra azul) durante 14 días de incubación a temperatura ambiente (22 °C).	25
Figura 3. Viabilidad celular de la levadura residual industrial (LRI) <i>Saccharomyces cerevisiae</i> en presencia de cristal violeta (CV) 500 mg/L durante 14 días.	26
Figura 4. Desarrollo de experimento de biodegradación de colorante azo cristal violeta por levadura residual industrial (LRI) en medio de caldo de papa (CP).	37
Figura 5. Observación microscópica a 10X de biodegradación de colorante azo cristal violeta por levadura residual industrial (LRI) en medio de caldo de papa conteniendo 25 mg/L de CV después de 7 días de incubación a 22 °C.	37
Figura 6. Observación microscópica a 40X de biodegradación de colorante azo cristal violeta por levadura residual industrial (LRI) en medio de caldo de papa conteniendo 50 (A), 100(B) y 300 (C) mg/L de CV después de 7 días de incubación a 22 °C.	38
Figura 7. Observación microscópica a 40X de biodegradación de colorante azo cristal violeta por levadura residual industrial (LRI) en medio de caldo de papa conteniendo 500 mg/L de CV después de 14 días de incubación a 22 °C.	38
Figura 8. Observación microscópica a 40X de biodegradación de colorante azo cristal violeta por levadura residual industrial (LRI) en medio de caldo de papa conteniendo 500 mg/L de CV después de 14 días de incubación a 22 °C.	39
Figura 9. Observación microscópica a 100X de biodegradación de colorante azo cristal violeta por levadura residual industrial (LRI) en medio de caldo de papa conteniendo 500 mg/L de CV después de 14 días de incubación a 22 °C.	39
Figura 10. Observación macroscópica de levadura residual industrial (LRI) en medio agar papa sacarosa después de 2 días de incubación a 22 °C.	40

RESUMEN

El impacto ambiental por colorantes azo como el cristal violeta (CV) constituye un grave problema de contaminación de aguas residuales de hospitales y laboratorios en Perú, sin existir soluciones eficientes para su tratamiento biológico; por ello se sometió el CV a degradación microbiana por una cepa de levadura residual industrial (LRI). La LRI se analizó por pruebas microbiológicas, tintoriales y moleculares aplicando cultivos en Caldo Papa Sacarosa (CPS), Chromoagar; x^o; así como análisis moleculares por PCR e identificación bioinformática por BlastN. La LRI se identificó como *Saccharomyces cerevisiae*. Esta cepa fúngica de LRI se incubó por 7 a 14 días en medios CPS y caldo de papa (CP) en presencia de CV: 25, 50, 100, 300 y 500 mg/L a pH 4,5 a temperatura ambiente (22 °C) en experimentos por triplicado. *S. cerevisiae* LRI mostró ser capaz de biodegradar CV de 25 a 100 mg/L en CP: 99 % a 80 % y CPS: 80 a 60 % respectivamente, sin embargo, con CV de 300 a 500 mg/L la biodegradación decayó de 30 a 10 %. La cepa de LRI presenta mayor capacidad de biodegradación de tintes en ausencia de sacarosa donde logra biodegradar casi el 100 % de CV. Los resultados de esta investigación sugieren el uso exitoso LRI como residuo de la agroindustria azucarera para aplicarlo en la biodegradación de los tintes azo (CV). Estos hallazgos son importantes para diseñar tecnología de biorremediación para tratar el CV de aguas residuales hospitalarias o de laboratorios que aplican el CV en las técnicas de diagnóstico biomédico.

Palabras claves: biodegradación, biotecnología, cristal violeta, levaduras, tinción gram

ABSTRACT

The environmental impact by azo dyes such as the Crystal violet (CV) constitutes a serious problem of wastewater pollution of hospitals and laboratories in Peru, without efficient solutions for biological treatment; Therefore, the CV to microbial degradation was submitted by an industrial residual yeast strain (LRI). The LRI was analyzed by microbiological, tinctorial, and molecular tests applying crops in sucrose potato broth (CPS), Chromoagar; as well as molecular analysis by PCR and bioinformatics identification by blastN. The LRI was identified as *Saccharomyces cerevisiae*. This fungal strain of LRI was incubated for 7 to 14 days in CPS media and potato broth (CP) in the presence of CV: 25, 50, 100, 300 and 500 mg/l at a pH 4.5 at room temperature (22 °C) in triplicate experiments. *S. Cerevisiae* LRI showed being able to biodegrade CV from 25 to 100 mg/l in CP: 99 % to 80 % and CPS: 80 to 60 % respectively, however with CV from 300 to 500 mg/l the biodegradation declined 30 to 10 %. The strain of LRI has a greater capacity for biodegradation dyes in the absence of sucrose where it manages to biodegrade almost 100 % of CV. The results of this research suggest the successful use of LRI as a residue of sugar agribusiness to apply it in the biodegradation of azo dyes (CV). These findings are important to design bioremediation technology to treat hospital or laboratory wastewater CV that apply the CV in biomedical diagnostic techniques.

Keywords: biodegradation, biotechnology, gram staining, violet glass, yeasts

INTRODUCCIÓN

Los efluentes hospitalarios y de laboratorios biomédicos contienen colorantes que se consideran un importante problema medioambiental y son preocupación en el mundo actual. La tinción Gram usada en todos los laboratorios y hospitales del mundo contiene el colorante cristal violeta, es uno de los tintes del grupo trifenilmetano que es ampliamente utilizado en la industria textil y hospitalaria, pero es mutagénico y mitótico. Además, contiene otros componentes como iodo, alcohol, y safranina, estas mezclas de colorantes hospitalarios tienen alto impacto en las salas internas de laboratorios hospitalarios y biomédicos, que se impregnan en lavadores de porcelana, plástico y metal, después se vierten al desagüe doméstico, impactando como efluente hospitalario altamente tóxico. A la fecha, no existe norma interna en los hospitales o sistema de biotratamiento eficiente del efluente hospitalario que tiene tinciones que contengan cristal violeta, además no existen investigaciones que solucionen el problema de degradar tintes hospitalarios o residuos de la tinción de Gram usando mohos o levaduras.

Por otra parte, la industria de destilación, en el norte de Perú (Trujillo), usa levaduras (*Sacharomyces* spp), al finalizar la destilación esta levadura es desechada en sus efluentes como levadura residual industrial (LRI), sin ser aprovechada para otras aplicaciones biotecnológicas o ambientales. En el mundo, el biotratamiento de aguas contaminadas usa bacterias como biofiltros en la recuperación de aguas, hasta obtener efluentes que cumplan las normas ambientales sin considerar aplicar LRI como tratamiento ecoamigable. La LRI constituye un recurso biológico de bajo costo para tratar efluentes porque es un desecho industrial de la destilación que cuenta con las capacidades de ser un modelo biológico para tratar efluentes contaminados con colorantes. En consecuencia, la biomasa de LRI puede ser reusada como filtro biológico para tratar efluentes contaminados con colorantes o tintes provenientes de ambientes hospitalarios.

La biorremediación de colorantes, especialmente a través de bacterias, se está convirtiendo en un sector emergente e importante en el tratamiento de efluentes; sin embargo, escasos estudios se han publicado aplicando levadura comercial *Sacharomyces* spp lo que representa mayores costos del tratamiento, pero surge como alternativa el uso del desecho industrial que contiene cepas de dicha levadura, este desecho contiene levaduras residuales industriales (LRI) de la destilería peruana que puede reusarse o reciclarse para tratamiento de efluentes de colorantes, y puede

evaluarse como potencial biodegradador de cristal violeta y otros colorantes biomédicos presentes en ambientes y laboratorios hospitalarios que genera una biotecnología ambiental como alternativa natural y ecológica para la biodegradación de colorante cristal violeta presente en la tinción de Gram.

CAPÍTULO I

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

1.1. Problema de Investigación

La entrada de tintes sintéticos en ambientes acuáticos está asociada con desafíos ambientales. La estructura de estos contaminantes suele ser duradera y estable. Por lo tanto, estos contaminantes no se descomponen fácilmente en los sistemas biológicos comunes [1-3]. La contaminación de los cuerpos de agua por tintes tóxicos resultantes de la industria textil es una grave amenaza para la vida acuática y los seres humanos. La mayoría de los contaminantes industriales no son descompuestos por microorganismos y permanecen en el ambiente acuático durante mucho tiempo [4, 5]. Asimismo, la penetración de los tintes sintéticos en los ecosistemas acuáticos conduce a una disminución en la concentración de oxígeno disuelto, la actividad fotosintética y la calidad del agua [6]. Por lo tanto, estos contaminantes deben ser tratados antes de su liberación al medio acuático [2].

La producción anual de tinte en el mundo pesa más de 7×10^8 kg [7]. Los tintes sintéticos se utilizan a menudo en industrias como la del cuero, papel, plástico, farmacéutica, textil, etc. Por lo tanto, los efluentes industriales contienen grandes cantidades de colorantes sintéticos. Incluso en baja concentración, los tintes sintéticos pueden tener efectos adversos sobre el medio ambiente [8, 9]. Es difícil reducir estos contaminantes de los ambientes acuáticos debido a su estabilidad frente a calor, agentes oxidantes y luz [10]. En general, los tintes sintéticos incluyen tres categorías principales: trifenilmetano, antraquinona y azo [11, 12]. El cristal violeta (CV), perteneciente al grupo de los trifenilmetanos, es de naturaleza catiónica. En comparación con los colorantes aniónicos, este contaminante tiene efectos más destructivos sobre la membrana celular [13].

El CV tiene efectos tóxicos en animales y humanos, incluso en concentraciones de 1 ppb. Este tipo de tinte aumenta la frecuencia cardíaca y provoca sensibilidad, asfixia, vómitos, cáncer e irritación ocular [14]. Sin embargo, el CV es ampliamente utilizado en la industria textil debido a su fácil acceso, alta eficiencia y bajo costo [15]. En un estudio, la cáscara de nuez de argán (ANS) y la cáscara de almendra (AS) regenerado por ácido nítrico eliminó el 98,21 % y el 98,6 % del CV, respectivamente [16]. En otro estudio, el CV fue eliminado con éxito por residuos de materiales agrícolas tratados con álcalis [17]. Irshad et al. [18] eliminaron el CV mediante nanopartículas sintetizadas de actividad fotocatalítica. Recientemente, la eliminación de colorantes por microorganismos ha recibido más atención debido a su rentabilidad y seguridad biológica. De hecho, en comparación con las técnicas químicas o físicas, los métodos de biodegradación pueden reducir la toxicidad de los lodos [19].

La industria alimentaria produce un subproducto llamado *S. cerevisiae*, que puede producir alcohol mediante procesos de fermentación [20]. Las ventajas de utilizar este método incluyen bajo costo, fácil cultivo en grandes cantidades y uso conveniente [21]. Muchos investigadores han explorado el uso de materiales de desecho agrícola como adsorbentes de bajo costo para eliminar tintes. Por ejemplo, El Khomri et al. [22] investigaron la eliminación del rojo Congo de una solución acuosa en sistemas de mezcla simple y binaria utilizando madera de cáscara de nuez de argán. Messaoudi et al. [23] sintetizaron nanopartículas de Ag₂O utilizando extracto de hoja de *Punica granatum* para la adsorción del antibiótico sulfametoxazol. Su estudio demostró que las nanopartículas fabricadas exhibían una excelente capacidad de adsorción hacia el antibiótico, lo que sugiere su uso potencial como adsorbente para eliminar el antibiótico sulfametoxazol. En otro estudio, se encontró que el carbón activado derivados de hojas de *Citrus sinensis* eliminaron eficazmente el 98,64 % del CV de 100 mg/L [24]. Además, algunos estudios muestran que los adsorbentes naturales, como los materiales de desecho agrícola, se pueden utilizar como adsorbentes alternativos para la eliminación de colorantes azoicos [25-29].

En un artículo, se estudió la biodegradación del tinte CV por la levadura *S. cerevisiae* en medio acuoso [30]. Los hongos juegan un papel importante en la descomposición y decoloración de tintes orgánicos por enzimas y procesos como la absorción y acumulación de tintes para aguas residuales [30]. La biodegradación de tintes sintéticos por hongos está surgiendo como un enfoque eficaz y prometedor [31]. Se estudió la biotransformación del verde de malaquita por *S. cerevisiae* y se encontró que el verde de malaquita se decoloraba por biosorción [32]. En algunos estudios, la

S. cerevisiae se ha utilizado para la eliminación de contaminantes, como arsénico [19], Hg^{2+} [33], cadmio (Cd), plomo (Pb) [34], verde de malaquita [35] y rojo de metilo [36-37] a partir de soluciones acuosas.

1.1.1. Justificación Ambiental

La justificación ambiental del presente estudio describe que la contaminación de ecosistemas por colorantes hospitalarios y de laboratorios biomédicos en Perú, es un problema ambiental y de salud pública que no ha sido resuelto, en consecuencia esta investigación es necesaria su ejecución porque aportará en la recuperación ecoamigable de desechos líquidos hospitalarios contaminados con colorantes hasta producir efluentes tratados para minimizar el impacto tóxico de los colorantes a ecosistemas locales.

1.1.2. Justificación social

El impacto social de la contaminación de colorantes en efluentes afecta a toda la población donde estos efluentes contaminados no pueden ser degradados eficazmente y las aguas con estos colorantes tienen impacto en la salud por ser cancerígenos, el evitar la eliminación de los colorantes al medio ambiente, minimizará el potencial carcinogénico de estos colorantes, ya que esta investigación aplicó biomasa de LRI para transformar los tintes cancerígenos en moléculas menos tóxicas o que sean biodegradadas hasta su eliminación total

1.1.3. Justificación tecnológica

La justificación tecnológica se basa en que en el Perú no existe tecnologías ambientales para tratar efluentes contaminados con colorantes hospitalarios provenientes de la tinción Gram, por ello, el desarrollo de esta investigación permitirá que los hospitales y centros biomédicos cuenten con una tecnología ecoamigable para tratar sus efluentes contaminados con tintes cancerígenos, para ello se planteó aplicar biomasa de LRI para que sea aplicado como biotratamiento y se biodegrade eficientemente los tintes y se transfiera una nueva biotecnología ambiental a los hospitales o centros biomédicos e impacte positivamente a la salud pública y al medio ambiente.

Por lo tanto, esta investigación tiene por objetivo investigar el uso de levadura residual industrial (LRI) como una alternativa natural y ecológica para la biodegradación de colorante violeta cristal, que puede complementar los métodos existentes para la eliminación de tintes desde los efluentes hospitalarios y de laboratorios biomédicos.

1.2. Marco Teórico

1.2.1. Antecedentes de la investigación

En la presente investigación se ejecutó una búsqueda de diversos artículos científicos y tesis en distintos repositorios nacionales, así como el empleo de bases de datos de Scielo y Scopus, en estas búsquedas se incluyeron las palabras claves: levaduras, cristal violeta, biodegradación, biotecnología, tinción Gram. En la búsqueda se priorizó los artículos científicos Scopus, con evidencia más actualizada y validada por pares. También se tuvo en cuenta el criterio temporal, donde se consideró investigaciones entre 2019 al 2024, con la finalidad de identificar las publicaciones y estudios de investigación con información de calidad y fiabilidad.

1.2.2. Antecedentes Internacionales

A nivel internacional los colorantes azoicos se encuentran entre las principales clases de colorantes sintéticos, incluidos más de 3000 colorantes diferentes que se utilizan en industrias como la del papel, la química, la alimentación, los productos cosméticos, los tejidos y la industria farmacéutica. En la industria del teñido, los colorantes azoicos se utilizan ampliamente y constituyen más de la mitad de todos los colorantes utilizados a nivel mundial [38]. Además, a medida que la industria textil global se ha expandido en las últimas décadas, también lo ha hecho el uso de estos colorantes, lo que ha aumentado los contaminantes generados por las aguas residuales contaminadas con colorantes. La eliminación incontrolada de aguas residuales textiles que comprenden colorantes azoicos y sus productos intermedios en la vida acuática tiene un aspecto desagradable y reduce la penetración de la luz solar, lo que reduce la fotosíntesis, la cantidad de oxígeno disuelto (OD) presente en el agua y la calidad del agua. También tiene consecuencias nocivas para la flora y los animales acuáticos, generando graves problemas ambientales en todo el mundo. Como resultado, existe un requisito de limpiar los efluentes textiles antes de su eliminación en el entorno natural [38].

Además, los colorantes azoicos dañan la demanda química de oxígeno (DQO), la demanda biológica de oxígeno (DBO) y el carbono orgánico total (COT). Numerosos colorantes sintéticos con sus metabolitos son cancerígenos, mutagénicos y tóxicos. Además, numerosos estudios han demostrado que los efluentes que contienen colorantes dañan la eficiencia de germinación, así como la biomasa de varias especies de plantas que cumplen funciones ecológicas necesarias, como prevenir la erosión del suelo, contribuir al hábitat para la vida silvestre y proporcionar materia orgánica que es esencial para la fertilidad del suelo [39]. Como resultado, los efluentes que contienen colorantes y sus metabolitos podrían erradicarse antes de ser liberados en los recursos hídricos y el medio ambiente.

Se han empleado muchos enfoques, como procedimientos químicos, físicos y biológicos, en el tratamiento de aguas residuales que contienen colorantes. Las técnicas físicas y químicas tienen las desventajas intrínsecas de ser incómodas económicamente (debido al mayor uso de energía y productos químicos), ser ineficientes en la eliminación de colorantes recalcitrantes o sus metabolitos, lo que resulta en una gran cantidad de biosólidos que eventualmente pueden terminar causando contaminación secundaria, y requieren técnicas avanzadas [39]. En comparación con los métodos fisicoquímicos, la eliminación y degradación de colorantes microbiológicos o enzimáticos es un sustituto más amigable con el medio ambiente y rentable.

1.2.3. Antecedentes nacionales

Cada año se producen en todo el mundo una gran variedad de colorantes textiles (aproximadamente 10 000 colorantes sintéticos; 7×10^7 toneladas métricas), lo que supone una amenaza para la seguridad medioambiental [40]. Los colorantes azoicos representan la clase de colorantes sintéticos más grande y más utilizada en la industria textil. Sin embargo, los efluentes de estas industrias han demostrado tener actividades tóxicas, mutagénicas y carcinógenas debido a la presencia de uno o más enlaces azoicos. Recientemente, el vertido de efluentes de colorantes en corrientes naturales ha ganado gran atención pública debido a los graves riesgos ecológicos. Por lo tanto, es urgente encontrar métodos más eficaces y ecológicos para tratar los efluentes de aguas residuales industriales antes de su vertido en el medio ambiente natural.

A pesar de la eliminación de colorantes azoicos de los efluentes mediante tratamientos convencionales, como la floculación, la filtración por membranas, la fotocátalisis y la adsorción; la decoloración microbiana es una técnica aceptada más barata y ecológica para la eliminación de colorantes en comparación con los métodos físicos y químicos convencionales. Por lo tanto, la mayoría de los estudios actuales en Perú es limitada sobre la degradación de colorantes azoicos, ya que se centran principalmente en la degradación microbiana mediante bacterias de tintes textiles, sin estudios sobre biodegradación de colorantes biomédicos y hospitalarios como el cristal violeta. Sin embargo, aportes de la biodegradación de colorantes textiles (azo) mencionan que, por la actividad bacteriana, producen aminas aromáticas que tienen un impacto adverso en el ambiente. En comparación, se ha descubierto que los hongos decoloran los colorantes sin producir aminas aromáticas en función de su actividad extracelular de forma más eficiente, como en el caso de *Sterigmatomyces halophilus* SSA157 [40].

1.3. Definiciones

Levaduras. Es un microorganismo perteneciente al dominio Eucario, que se caracteriza por ser un hongo microscópico unicelular ($8\mu\text{ m}$), de forma esférica o elipsoide, que crece en medios orgánicos a pH ácido (< 4.5).

Levadura residual industrial. Es un subproducto de desecho de la industria de producción de azúcar de caña o etanol que contiene más del 90 % de presencia de hongos unicelulares (levaduras).

Medios de cultivo microbiano: Es aquel que contiene nutrientes necesarios como fuente de carbono o energía para el desarrollo y crecimiento de células microbianas (bacterias, arqueas, hongos, etc.) y permite su aislamiento en soportes sólidos (agar) o en medios líquidos.

Tinción de Gram: Comprende un método por el cual se clasifican microorganismos en Gram positivos (captura el colorante cristal violeta) y Gram negativos (capturan el tinte safranina). Este procedimiento es altamente usado en los laboratorios biomédicos y de docencia universitaria del mundo, donde los colorantes cristal violeta (cancerígeno) es usado y eliminado al drenaje sin considerar métodos de biotratamiento eficiente.

1.4. Objetivo general

Biodegradar cristal violeta (tinción Gram) desde efluentes hospitalarios y biomédicos en medios líquidos y sólidos aplicando levadura residual industrial (LRI).

1.5. Objetivos específicos

1. Aislar y caracterizar levadura residual industrial (LRI).
2. Identificar por métodos moleculares levadura residual industrial (LRI).
3. Evaluar el efecto de la concentración de biomasa de levadura residual industrial (LRI) en la biodegradación de cristal violeta (tinción Gram) presente en efluentes hospitalarios y biomédicos.

1.6. Hipótesis

1.6.1. Hipótesis general

La levadura residual industrial (LRI) tiene capacidad catalizadora para biodegradar el cristal violeta (tinción Gram) presente en efluentes hospitalarios y biomédicos para ser aplicado en biotecnología ambiental.

1.6.2. Hipótesis específicas

1. El aislamiento y las características microscópicas de Levadura Residual Industrial (LRI) con potencial de biodegradación de colorantes son compatibles con hongos unicelulares de *Saccharomyces* spp.
2. El análisis de biología molecular de Levadura Residual Industrial (LRI) aplicada a la biodegradación de cristal violeta corresponde a la cepa *Saccharomyces cerevisiae*.
3. El efecto de la concentración de biomasa (1×10^6 cel/ml) de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* (LRI) en la biodegradación de cristal violeta (CV) presente en efluentes hospitalarios y biomédicos permite biodegradar entre el 80-100 % de CV (25 a 100 mg/L).

CAPÍTULO II

MATERIAL Y MÉTODOS

2.1. Métodos y alcance de la investigación

La prueba de hipótesis se desarrolló demostrando que la LRI tiene capacidad biológica para la biodegradación de colorantes hospitalarios (cristal violeta).

2.2. Diseño de investigación

El tipo de investigación ejecutada fue aplicada, con diseño experimental con variable independiente: La biomasa de LRI incluyendo la variable dependiente: porcentaje (%) de biodegradación de colorantes de efluente hospitalario.

2.3. Población y muestra

La población fueron los microorganismos fúngicos (levaduras) presente en 20 mL de efluente de procesos de fermentación de caña de azúcar provenientes de aguas residuales de la Empresa Azucarera Casa Grande y la muestra fue aislados de la Levadura Residual Industrial que desarrollen en medios Agar Papa Sacarosa (APS) y Chromoagar (CAG).

2.4. Metodología

2.4.1. Muestreo

El efluente (20 ml) con microorganismos fúngicos (1×10^8 cel/mL) de procesos de fermentación de caña de azúcar de las aguas residuales de la Empresa Azucarera Casa Grande se recolectó en tubos falcón estériles de 50 ml, se conservaron en cadena de frío a 4-8 °C y se usaron sin ningún tratamiento preliminar. En el laboratorio se procedió a procesar la muestra bajo cabina de bioseguridad (biobase) para ejecutar el aislamiento de microorganismos.

Las muestras de tintes hospitalarios con residuos de colorantes azoicos de tinción Gram (cristal violeta) se formularon desde Laboratorios de Microbiología de la Universidad Nacional de Trujillo. Las muestras de tinte comerciales de tinción Gram, se usaron como control.

2.4.2. Aislamiento e identificación de levaduras desde efluentes residuales industriales

Para el aislamiento se usó la técnica de vertida en placa con medio Agar Papa (APS) Sacarosa y Chromoagar (CAG). Para ello 0.1 mL de efluente de las aguas residuales de la empresa azucarera Casa Grande, se sembró por estría y se incubó a temperatura ambiente (22 °C) por 48 a 72 horas.

2.4.3. Mantenimiento de levaduras residuales industriales (LRI)

Las colonias de levaduras bien desarrolladas fueron replicadas en APS y se almacenaron a 4 °C en refrigerador LG 426L.

2.4.4. Identificación de los aislados fúngicos (LRI)

La identificación de los aislados de LRI se llevó a cabo por los métodos micológicos de rutina por análisis de la morfología de la colonia, pruebas preliminares como tinción de Gram y tinción de levaduras con azul de metileno.

2.4.5. Ensayos de identificación molecular de LRI

Las cepas aisladas de LRI fueron sometidas a purificación y extracción de ADN total mediante el kit Promega siguiendo las indicaciones del proveedor. El ADN aislado de la LRI se usó como molde para realizar amplificación del gen ARN 18S por PCR (Taq ADN polimerasa Promega) aplicando oligonucleótidos universales [37] en termociclador Eppendorf (Mastercycler X50p). El amplicón resultante se purificó mediante electroforesis en geles de agarosa TAE usando *safered* (ABP bioscience), en cámara de electroforesis híbrida UV (*Umbrella Genomics*). Luego el amplicón se secuenció usando secuenciador de ADN (*Oxford Nanopore Technologies*) y el resultado se analizó por BlastN hasta obtener la identificación bioinformática respectiva.

2.4.6. Preparación del inóculo de LRI

Para investigar la capacidad de decolorar cristal violeta, se realizó la suspensión de cultivos de levaduras LRI en Solución Salina Fisiológica Estéril (cloruro de sodio al 0,85 %). Una alícuota de 0,5 ml de cultivos de levaduras se inocularon en 50 ml de solución salina y se incubaron a 22 °C durante 3 horas (incubado FAITHFUL modelo WP-25AB).

2.4.7. Experimentos de decoloración de cristal violeta (CV)

Los experimentos se ejecutaron por triplicado y se evaluó la decoloración de CV en viales de 25 ml con 15 ml de cristal violeta (0, 25, 50, 100, 300 y 500 mg/l), en caldo de papa con y sin sacarosa a pH 4.5. Luego, los viales se esterilizaron en autoclave a 121 °C durante 15 minutos (Autoclave Portable Biobase Bkm-p 18 L). Luego cada vial fue inoculado con 1.5 ml de suspensión celular de LRI aplicando agitación manual por aireación externa y se incubó (incubado FAITHFUL modelo WP-25AB) a 22 °C durante 7-14 días. Se tomaron muestras a intervalos de 24-48 horas para observación microscópica (microscopio Greatlab - XSZ 157H) y evaluación visual de decoloración. La decoloración del sobrenadante se evaluó por la absorbancia en espectrofotómetro (Jenway 6850, IQ/OQ; 230 V) y el sedimento se analizó al microscopio óptico (Greatlab). Algunas muestras de LRI en presencia de CV de 100 y 300 mg/L fueron evaluadas en su viabilidad celular por siembra en placas Petri conteniendo en APS y Chromoagar.

2.4.8. Ensayo de decoloración

El ensayo de decoloración se ejecutó por medición del porcentaje de decoloración (biodegradación) utilizando espectrofotómetro (Jenway 6850) midiendo la Densidad Óptica (DO) a 600 nm de cada ensayo al inicio y al final. El porcentaje de la decoloración se calculó a partir de la siguiente ecuación:

$$\text{Porcentaje de biodegradación} = \frac{\text{DO inicial} - \text{DO final}}{\text{DO inicial}} \times 100$$

2.4.9. Biodegradación del efluente de aguas residuales hospitalarias por LRI

Biodegradación efluente hospitalaria o efluente de laboratorio biomédico, se llevó a cabo en un matraz de 250 ml con 150 ml del efluente. El efluente con residuos de colorantes de tinción de Gram se enriqueció con caldo de papa y luego se esterilizó en autoclave (Biobase Bkm-p 18 L) a 121°C durante 15 minutos a pH 4.5 (*Hanna Instruments*). El matraz fue inoculado con 15 ml de inóculo de LRI (10^6 cel/mL). El matraz se agitó por aireación mecánica, a 22 °C en incubadora (FAITHFUL modelo WP-25AB) durante 7-14 días. La biodegradación se analizó por presencia y ausencia de decoloración al finalizar los tiempos de incubación respectivos.

CAPÍTULO III

RESULTADOS

Tabla 1. Características microscópicas de Levadura Residual Industrial (LRI) compatibles con *Saccharamyces*.

Parámetros biológicos	Descripción
Análisis microscópico	Células eucariontes ovaladas (8 µm) en estado de gemación algunas con pseudohifas
Análisis macroscópicos	Colonias de 3 a 6 mm de diámetro, bordes redondeados, aspecto cremoso y colonias convexas
Tinción azul de metileno (AM)	Células con movilidad que captan colorante AM
Tinción de Gram	Células tiñen Gram positivas

El aislamiento y caracterización microbiológica del efluente de levadura residual industrial (tabla 1) fue posible aplicando técnicas clásicas de microbiología para determinar la anatomía celular de la muestra mediante observación al microscopio óptico, donde se encontró presencia de células eucariontes ovaladas (8 µm) en estado de gemación con algunas pseudohifas, en las observaciones a inmersión se encontró células independientes en estado de gemación con morfología elipsoide con núcleo central bien característico de las cepas del género *Sacharamyces*. Cuando la LRI se sembró en medios de cultivo sólido cromogénicos se encontró el desarrollo de colonias de 3 a 6 mm de diámetro con bordes redondeados, aspecto cremoso y formas convexas, las tonalidades del agente cromogénico (*Chromoagar*) dieron resultado de colonias púrpuras características de *Saccharomyces cerevisiae* las cuales fueron expuestas a tinción de Gram que resultó en células Gram positivas y al exponerlas al colorante vital azul de metileno se evidenció bajo microscopio óptico (40X) células motiles (100 células x campo), con un 90 % de viabilidad. Este resultado (tabla 1) permite evidenciar la presencia de biomasa activa de LRI que corresponde a levaduras de la cepa *Saccharomyces cerevisiae*.

Tabla 2. Análisis de biología molecular de levadura residual industrial (LRI) aplicada a la biodegradación de cristal violeta

Biología molecular	Descripción
Extracción de ADN genómico	100 ng/μL
Amplificación por PCR	PCR (positivo)
Identificación de Molecular	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>

El análisis de biología molecular (tabla 2) del aislado microbiológico del efluente de levadura residual industrial (tabla 1) se desarrolló mediante la extracción de ADN genómico de células de LRI. Para ello, una colonia de levadura fue sometida de lisis celular para proceder con el kit de extracción de ácidos nucleicos Promega, hasta obtener ADN purificado (100 ng/ul). Este ADN genómico se aplicó como molde para amplificar por PCR el gen ARNr, y detectar un amplicón correspondiente al tamaño esperado dando un PCR positivo (tabla 2). Para el PCR se usaron oligonucleótidos (SB1/SB2 y SC1/SC2) de la región del ITS del ARNr de levaduras según lo descrito previamente [37]. Los parámetros de PCR fueron con desnaturalización inicial a 94 °C durante 5 min y 30 s para los ciclos posteriores, hibridización de oligonucleótidos a 50 °C durante 1 min y extensión a 72 °C durante 1 min. Se programaron 30 ciclos seguidos de una extensión final a 72 °C durante 7 min en termociclador Biorad. Los productos amplificados se sometieron a electroforesis en gel de agarosa al 1,4 % (Boehringer) y se tiñeron con Safered. Se utilizó un marcador de ADN de 100 pb (Gibco BRL) como estándar de tamaño. El amplicón resultante se usó como molde para análisis de secuenciamiento de ADN, resultando en la identificación de la LRI (tabla 2) mediante BlastN ser *Saccharomyces cerevisiae*. El análisis de biología molecular de Levadura Residual Industrial (LRI) aplicada a la biodegradación de cristal violeta corresponde a la cepa *Saccharomyces cerevisiae*.

La identificación molecular (tabla 2) por PCR permite validar las características microscópicas y macroscópicas (tabla 1) de la LRI como *Saccharomyces cerevisiae*.

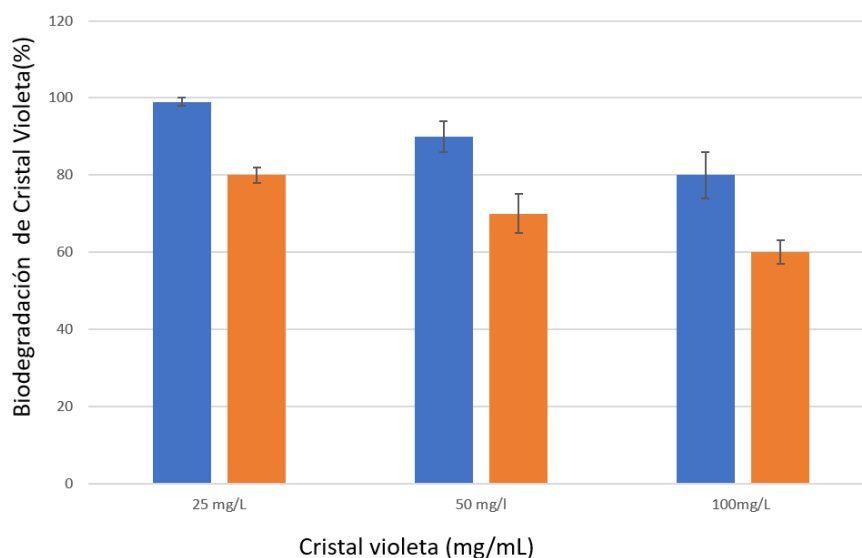


Figura 1. Biodegradación de cristal violeta (mg/L) por levadura residual industrial (LRI) *Saccharomyces cerevisiae* (10^6 cel/mL) en medios de caldo de papa (CP: barra azul) y caldo de papa sacarosa (CPS: barra naranja) durante 14 días de incubación a temperatura ambiente (22 °C). Se incluyen la desviación estándar en barras de error de experimentos por triplicado

La evaluación del efecto de la concentración de biomasa (1×10^6 cel/ml) de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* (LRI) en la biodegradación de cristal violeta (CV) presente en efluentes hospitalarios y biomédicos resultó (figura 1) en la capacidad de biodegradar entre el 80-99 % de CV (25 a 100 mg/L) cuando se usa caldo de papa y de 80- 60 % de CV (25 a 100 mg/L) cuando se usa caldo papa sacarosa. Al parecer la concentración celular de LRI es idónea para lograr 100 % de biodegradación de CV en CP, versus CPS (80 %) en 25 mg/mL de CV. La sacarosa en el medio CPS interfiere en la eficiencia de biodegradación del CV por la LRI, ya que en este medio la LRI usa de forma preferente la sacarosa como fuente de carbono, en vez de biodegradar de forma prioritaria el CV, como se evidencia en la figura 1, cuando la incubación se desarrolló a 22 °C por 14 días. El análisis celular de LRI bajo las diferentes concentraciones de CV, permitió detectar las levaduras activas y viables, pero con 100 % de captación intracelular del colorante CV, estas elevadas dosis de CV, hacen que este colorante tiña toda la anatomía celular, conforme pasa el proceso de incubación las células van decolorando el CV intracelular hasta recuperar su coloración natural original.

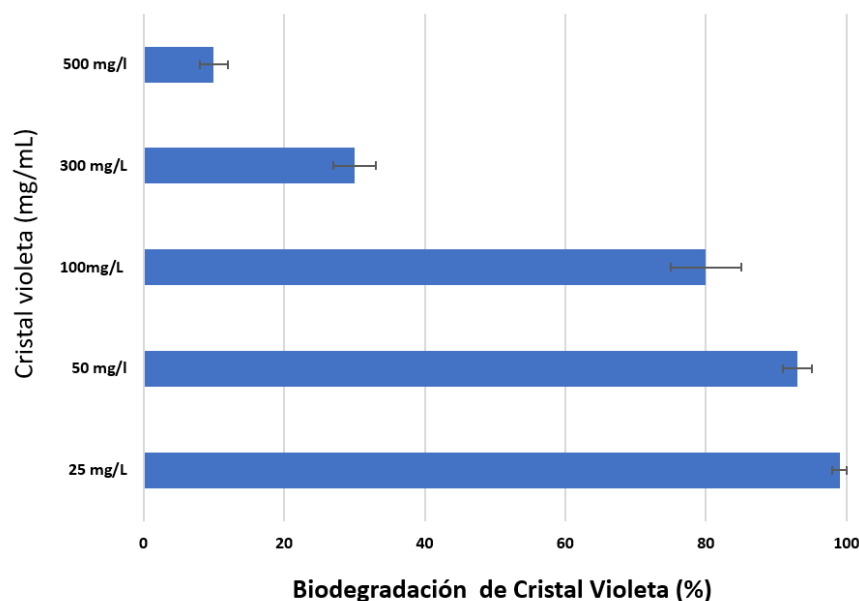


Figura 2. Biodegradación de cristal violeta (mg/L) por levadura residual industrial *Saccharomyces cerevisiae* en caldo de papa (CP: barra azul) durante 14 días de incubación a temperatura ambiente (22 °C). Se incluye la desviación estándar en barras de error de experimentos por triplicado

El efecto de la concentración de biomasa (1×10^6 cel/ml) de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* (LRI) en la biodegradación de elevadas concentraciones de cristal violeta (CV) de 300 a 500 mg/L no ha sido reportado, por ello se evaluó la capacidad de la LRI de desarrollarse bajo esta condición de extrema toxicidad (figura 2), que según, la información obtenida, son condiciones letales donde la muerte celular es inminente por estrés oxidativo, radicales libres y desnaturalización de proteínas de membrana [25-30]. Al usar un inóculo celular de LRI de 1×10^6 cel/ml se puede obtener que el CV (figura 2) alcanza a biodegradarse al 30 % cuando la concentración inicial de CV es 300 mg/L y del 10 % cuando fue de 500 mg/L. A pesar de lograr capacidad degradativa del 10 al 30 % del CV, se observó que las células de levadura independientes están mayormente destruidas con las membranas celulares dañadas y bajo porcentaje de viabilidad (< 20 %) o células sobreteñidas con CV; sin embargo, se logró observar células resistentes a colorearse con CV, quizás las poblaciones descendientes logran adaptarse, observando cepas de levaduras de mayor tamaño (40 a 80 μ m) que las parentales 8 μ m. Este reporte demuestra mecanismos de respuesta de aumento de tamaño celular para evadir la toxicidad del CV, lo que causa letalidad en la población progenitora, pero los descendientes resultaron ser capaces de adaptarse a dosis letales de CV (300-500 mg/L).

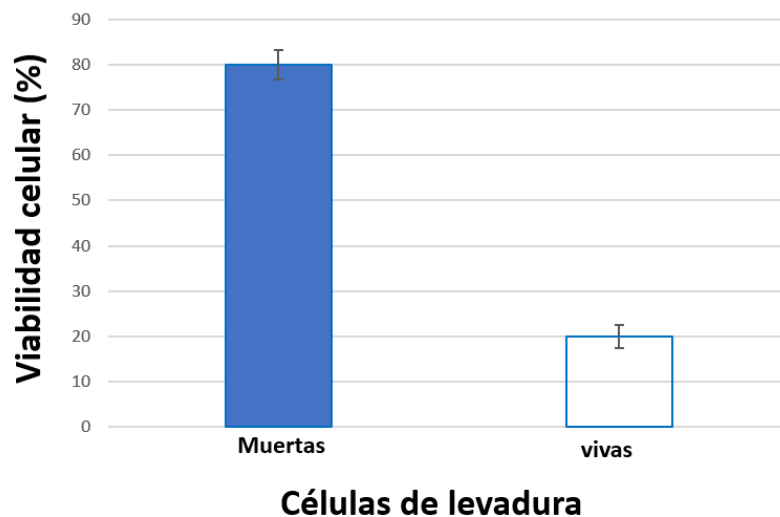


Figura 3. Viabilidad celular de la levadura residual industrial (LRI) *Saccharomyces cerevisiae* en presencia de cristal violeta (CV) 500 mg/L durante 14 días. La barra azul representa a células de levadura que permanecen teñidas con CV durante 14 que están sin actividad biológica (células muertas), la barra blanca, representa células vivas que resisten la toxicidad de la elevada concentración de CV (500 mg/L) que logran tener resistencia a absorber el CV dentro de su matriz celular

La elevada concentración de cristal violeta (CV) al 500 mg/L representa una acción de alta mortalidad celular (figura 3) alcanzando 80 % de células de LRI muertas, cuando se aplica agente de tinción vital (azul de metileno). Al pasar 14 días de incubación a 22 °C en presencia de CV al 500 mg/L, existe un 20 % de viabilidad, pero las células logran tener mayor tamaño, así como experimentaron resistencia a captar el CV en su anatomía celular.

En la práctica biomédica, el CV al ser aplicado en procesos de coloración de muestras biológicas y ser desechado al drenaje, inicialmente, alcanza concentraciones letales que luego de mezclarse con el agua servida va diluyéndose. Los resultados (figuras 2 y 3 de esta investigación) se pueden aplicar para usar la LRI como producto biológico bioabsorbente con capacidad de biodegradar el CV. De esta forma, se puede minimizar el impacto ambiental del CV y prevenir su efecto cancerígeno y letal a otras especies.

CAPÍTULO IV

DISCUSIÓN

Las investigaciones sobre la degradación de colorantes por hongos aún son escasas a nivel comercial para el tratamiento eficaz de compuestos cancerígenos como el cristal violeta. Por ello, los estudios deben centrarse en minimizar los factores limitantes que afectan el metabolismo celular fúngico. Un proceso de biodegradación eficiente debe considerar las vías de degradación, los factores ambientales, la tasa de biodegradación y los mecanismos que inciden en la eliminación de estos colorantes contaminantes. Es imperativo garantizar que los productos resultantes de la degradación no sean tóxicos para la vida acuática o las plantas.

La integración de diferentes tecnologías para el tratamiento de colorantes contaminantes es altamente deseable a fin de implementar soluciones tecnológicas efectivas en industrias sanitarias, hospitales y laboratorios que actualmente desechan colorantes al ambiente sin un tratamiento adecuado. El estudio de los mecanismos de biodegradación fúngica de colorantes azoicos, como el cristal violeta presente en aguas residuales de tintorerías, contribuiría a explorar la cinética de degradación de hongos levaduriformes.

La contaminación del agua por parte de industrias textiles y centros hospitalarios representa un problema crítico, ya que se vierten grandes cantidades de tintes a los efluentes y cuerpos de agua. La eficacia de los procesos microbianos para la eliminación o degradación de estos compuestos se basa en el uso de microorganismos capaces de decolorar y degradar tintes sintéticos con estructuras químicas diversas. La degradación o decoloración fúngica de los tintes ha sido investigada principalmente a nivel de

laboratorio [19, 21, 27, 33]. Estudios previos se han centrado en bacterias para la decoloración de tintes, y los hallazgos han dependido en gran medida de un medio de cultivo adecuado y de la optimización de diversos parámetros (como la adición de cosustratos, nutrientes, moléculas mediadoras y condiciones físicas), así como del manejo de cepas comerciales o biomasa [19].

La integración de tecnologías es otro aspecto clave que podría aportar beneficios significativos. Es necesario desarrollar tecnologías y materiales avanzados para la degradación efectiva de colorantes en aguas residuales industriales. Actualmente, solo existen estudios básicos en laboratorio sin aplicaciones a escala comercial para resolver el problema de los colorantes en los efluentes. En ese contexto, esta tesis desarrolló un modelo eficiente de biodegradación del colorante azoico cristal violeta utilizando la Levadura Residual Industrial (LRI) *Saccharomyces cerevisiae*. Este modelo emplea dos residuos ambientales para su valorización tecnológica:

Efluentes hospitalarios o de laboratorio que contienen cristal violeta, y residuos industriales de la industria azucarera provenientes de la producción de etanol, específicamente la Levadura Residual Industrial (LRI).

Ambos contaminantes son actualmente vertidos a los efluentes, afectando el medio ambiente. En esta tesis, se les otorga una nueva utilidad tecnológica, empleando la LRI como insumo para la biodegradación del cristal violeta (CV), logrando una eficiencia del 99 % en un periodo de 7 a 14 días de tratamiento, bajo condiciones ambientales y a bajo costo.

Se desarrolló también la validación tecnológica de la biodegradación del CV, evidenciada mediante la caracterización e identificación microbiológica y molecular de la LRI (tablas 1 y 2), determinando que la cepa evaluada corresponde a *Saccharomyces cerevisiae*. Este hongo, al ser expuesto a diferentes concentraciones de cristal violeta (25 a 500 mg/L) (figuras 1, 2 y 3), demostró la capacidad de utilizar el CV como fuente de carbono, logrando una mayor eficiencia de biodegradación en medio de caldo de papa (CP) en comparación con caldo de papa sacarosa (CPS) (figura 1).

La LRI logró biodegradar el 99 % del CV (25 mg/L) en CP en un periodo de 7 a 14 días, y el 80 % en CPS. No obstante, concentraciones más altas (300 a 500 mg/L) reducen la eficiencia de biodegradación (de 30 % a 10 %), debido a la citotoxicidad y al efecto antimicrobiano [1] del CV. Esto se evidencia en la muerte celular de más del 80 % de las levaduras expuestas a 500 mg/L de CV (figura 3).

En general, concentraciones superiores a 100 mg/L de CV son difícilmente biodegradadas por modelos microbianos. Solo unas pocas especies de bacterias o levaduras han mostrado capacidad de biodegradación en estos rangos [2-19], ya que el CV > 100 mg/L posee efectos antibacterianos y antifúngicos [1-2]. Sin embargo, en esta tesis (figuras 2 y 3) se demuestra que la LRI es capaz de resistir y sobrevivir a concentraciones letales de CV: más del 20 % de la población celular sigue siendo viable. Futuros estudios podrán analizar los mecanismos de resistencia y extender los tiempos de tratamiento a 4 u 8 semanas, con el fin de determinar si la población viable puede biodegradar eficientemente CV a concentraciones de 500 mg/L.

CONCLUSIONES

1. La levadura residual industrial (LRI) *Saccharomyces cerevisiae* tiene capacidad catalizadora para biodegradar el cristal violeta (CV) presente en efluentes hospitalarios y biomédicos para ser aplicado en biotecnología ambiental. *S. cerevisiae* biodegrada del 80 a 99 % del CV en caldo de papa, pH 4,5, por 14 días a 22 °C cuando el CV esta entre 25 a 100 mg/L, pero disminuye 10 a 30 % para concentraciones de CV: 300 a 500 mg/L, en elevadas concentraciones de CV (500 mg/L) la LRI muestra resistencia al CV por 14 días al observarse 20 % de células fúngicas viables.
2. Las estrategias de crecimiento en medios agar de papa sacarosa y medio chromoagar permite aislar y caracterizar la presencia de biomasa activa de LRI que corresponde a levaduras de la cepa *Saccharomyces cerevisiae*.
3. El análisis molecular por PCR usando ADN genómico identificó como *Saccharomyces cerevisiae* al aislado de LRI consistente con sus características microscópicas y macroscópicas de fisiología de cultivos en medios agar de papa sacarosa y chromoagar.
4. La biomasa (1×10^6 cel/ml) de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* (LRI) tiene efecto de biodegradación de cristal violeta (CV) presente en efluentes hospitalarios y biomédicos

REFERENCIAS

1. **AL-KHIKANI, Falah; AYIT, Alae.** The Antibacterial Action of Safranin and Gentian Violet. *Rambam Maimonides Medical Journal* [en línea]. 2022, 13(3), e0018 [consultado el 4 de junio de 2024]. ISSN 2076-9172. doi:10.5041/rmmj.10475
2. **ANBARANI, Mohaddeseh Zahmatkesh et al.** Biodegradation of crystal violet dye by *Saccharomyces cerevisiae* in aqueous medium. *Heliyon* [en línea]. 2023, e19460 [consultado el 4 de junio de 2024]. ISSN 2405-8440. doi:10.1016/j.heliyon.2023.e19460
3. **BONYADI, Ziaeddin et al.** Biosorption of malachite green dye over *Spirulina platensis* mass: process modeling, factors optimization, kinetic, and isotherm studies. *Applied Water Science* [en línea]. 2022, 12(7) [consultado el 15 de marzo de 2024]. ISSN 2190-5495. doi:10.1007/s13201-022-01690-8
4. **BONYADI, Ziaeddin et al.** Reactive red-141 removal from synthetic solutions by γ - Al_2O_3 nanoparticles: process modeling, kinetic, and isotherm studies. *Applied Water Science* [en línea]. 2022, 13(2) [consultado el 15 de marzo de 2024]. ISSN 2190-5495. doi:10.1007/s13201-022-01854-6
5. **BONYADI, Ziaeddin; KHATIBI, Fatemeh Sadat; ALIPOUR, Fatemeh.** Ultrasonic-assisted synthesis of Fe_3O_4 nanoparticles-loaded sawdust carbon for malachite green removal from aquatic solutions. *Applied Water Science* [en línea]. 2022, 12(9) [consultado el 15 de marzo de 2024]. ISSN 2190-5495. doi:10.1007/s13201-022-01745-w
6. **DE ROSSI, Andreia et al.** Synthesis, characterization, and application of *Saccharomyces cerevisiae*/alginate composites beads for adsorption of heavy metals. *Journal of Environmental Chemical Engineering* [en línea]. 2020, 8(4), 104009 [consultado el 15 de marzo de 2024]. ISSN 2213-3437. doi:10.1016/j.jece.2020.104009
7. **EL KHOMRI, Mohammed et al.** Optimization Based on Response Surface Methodology of Anionic Dye Desorption From Two Agricultural Solid Wastes. *Chemistry Africa* [en línea]. 2022 [consultado el 16 de marzo de 2024]. ISSN 2522-5766. doi:10.1007/s42250-022-00395-4
8. _____. Regeneration of argan nutshell and almond shell using HNO_3 for their reusability to remove cationic dye from aqueous solution. *Chemical Engineering Communications* [en línea]. 2021, 1–12 [consultado el 15 de marzo de 2024]. ISSN 1563-5201. doi:10.1080/00986445.2021.1963960

9. _____. Removal of Congo red from aqueous solution in single and binary mixture systems using Argan nutshell wood. *Pigment & Resin Technology* [en línea]. 2021 [consultado el 15 de marzo de 2024]. ISSN 0369-9420. doi:10.1108/prt-04-2021-0045
10. **EL MESSAOUDI, Noureddine et al.** Desorption of crystal violet from alkali-treated agricultural material waste: an experimental study, kinetic, equilibrium and thermodynamic modeling. *Pigment & Resin Technology* [en línea]. 2021, ahead-of-print. [consultado el 15 de marzo de 2024]. ISSN 0369-9420. doi:10.1108/prt-02-2021-0019
11. _____. Green synthesis of Ag₂O nanoparticles using Punica granatum leaf extract for sulfamethoxazole antibiotic adsorption: characterization, experimental study, modeling, and DFT calculation. *Environmental Science and Pollution Research* [en línea]. 2022 [consultado el 15 de marzo de 2024]. ISSN 1614-7499. doi:10.1007/s11356-022-21554-7
12. _____. Regeneration and reusability of non-conventional low-cost adsorbents to remove dyes from wastewaters in multiple consecutive adsorption–desorption cycles: a review. *Biomass Conversion and Biorefinery* [en línea]. 2022 [consultado el 16 de marzo de 2024]. ISSN 2190-6823. doi:10.1007/s13399-022-03604-9
13. **HADIANI, Mohammad Rasoul et al.** Assessment of Mercury biosorption by *Saccharomyces cerevisiae*: Response surface methodology for optimization of low Hg (II) concentrations. *Journal of Environmental Chemical Engineering* [en línea]. 2018, 6(4), 4980–4987 [consultado el 16 de marzo de 2024]. ISSN 2213-3437. doi:10.1016/j.jece.2018.07.034
14. _____. Biosorption of low concentration levels of Lead (II) and Cadmium (II) from aqueous solution by *Saccharomyces cerevisiae*: Response surface methodology. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology* [en línea]. 2018, 15, 25–34 [consultado el 16 de marzo de 2024]. ISSN 1878-8181. doi:10.1016/j.bcab.2018.05.001
15. **HASSAN, Mohamed R. et al.** Ultrasound facilitates and improves removal of triphenylmethane (crystal violet) dye from aqueous solution by activated charcoal: A kinetic study. *Journal of Saudi Chemical Society* [en línea]. 2021, 25(6), 101231 [consultado el 15 de marzo de 2024]. ISSN 1319-6103. doi:10.1016/j.jscs.2021.101231
16. **IRSHAD, Zunaira et al.** Ni doped SrFe₁₂O₁₉ nanoparticles synthesized via micro-emulsion route and photocatalytic activity evaluation for the degradation of crystal violet under visible light irradiation. *Results in Physics* [en línea]. 2022, 106006 [consultado el 15 de marzo de 2024]. ISSN 2211-3797.

- doi:10.1016/j.rinp.2022.106006
17. **JABAR, Jamiu Mosebolatan et al.** Synthesis of High Surface Area Mesoporous ZnCl₂–Activated Cocoa (Theobroma Cacao L) Leaves Biochar Derived Via Pyrolysis for Crystal Violet Dye Removal. *SSRN Electronic Journal* [en línea]. 2022 [consultado el 15 de marzo de 2024]. ISSN 1556-5068. doi:10.2139/ssrn.4134237
 18. **JADHAV, J. P. et al.** Decolourization of azo dye methyl red by *Saccharomyces cerevisiae* MTCC 463. *Chemosphere* [en línea]. 2007, 68(2), 394–400 [consultado el 16 de marzo de 2024]. ISSN 0045-6535. doi:10.1016/j.chemosphere.2006.12.087
 19. **JADHAV, J. P.; GOVINDWAR, S. P.** Biotransformation of malachite green by *Saccharomyces cerevisiae* MTCC 463. *Yeast* [en línea]. 2006, 23(4), 315–323 [consultado el 16 de marzo de 2024]. ISSN 1097-0061. doi:10.1002/yea.1356
 20. **KAUSAR, Abida et al.** Cellulose-based materials and their adsorptive removal efficiency for dyes: A review. *International Journal of Biological Macromolecules* [en línea]. 2022 [consultado el 16 de marzo de 2024]. ISSN 0141-8130. doi:10.1016/j.ijbiomac.2022.10.220
 21. **KHAN, Razia, BHAWANA, P.; FULEKAR, M. H.** Microbial decolorization and degradation of synthetic dyes: a review. *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology* [en línea]. 2012, 12(1), 75–97 [consultado el 15 de marzo de 2024]. ISSN 1572-9826. doi:10.1007/s11157-012-9287-6
 22. **KHOMRI, Mohammed El et al.** Modification of low-cost adsorbent prepared from agricultural solid waste for the adsorption and desorption of cationic dye. *Emergent Materials* [en línea]. 2022 [consultado el 16 de marzo de 2024]. ISSN 2522-574X. doi:10.1007/s42247-022-00390-y
 23. **MAZLOOMI, Sajad et al.** The removal of methylene blue by *Saccharomyces cerevisiae*: process modelling and optimization. *Desalination and Water Treatment* [en línea]. 2021, 236, 318–325 [consultado el 15 de marzo de 2024]. doi:10.5004/dwt.2021.27679
 24. **MBACKÉ, Maryam Khadim et al.** Electrocoagulation process applied on pollutants treatment- experimental optimization and fundamental investigation of the crystal violet dye removal. *Journal of Environmental Chemical Engineering* [en línea]. 2016, 4(4), 4001–4011 [consultado el 15 de marzo de 2024]. ISSN 2213-3437. doi:10.1016/j.jece.2016.09.002
 25. **MEHMANDOST, Nasrin et al.** Application of random forest for modeling batch and continuous fixed-bed removal of crystal violet from aqueous solutions using *Gypsophila aretioides* stem-based biosorbent. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy* [en línea]. 2022, 265, 120292 [consultado el 15 de marzo de 2024]. ISSN 1386-1425. doi:10.1016/j.saa.2021.120292

26. **MESSAOUDI, Noureddine El et al.** Experimental study and theoretical statistical modeling of acid blue 25 remediation using activated carbon from Citrus sinensis leaf. *Fluid Phase Equilibria* [en línea]. 2022, 563, 113585 [consultado el 16 de marzo de 2024]. ISSN 0378-3812. doi:10.1016/j.fluid.2022.113585
27. **MOHEBBRAD, Batool et al.** Arsenic removal from aqueous solutions using *Saccharomyces cerevisiae* : Kinetic and equilibrium study. *Environmental Progress & Sustainable Energy* [en línea]. 2018, 38(s1), S398—S402 [consultado el 15 de marzo de 2024]. ISSN 1944-7442. doi:10.1002/ep.13074
28. **NASOUDARI, Elaheh et al.** The biosorption of Alizarin Red S by *Spirulina platensis*; process modelling, optimisation, kinetic and isotherm studies. *International Journal of Environmental Analytical Chemistry* [en línea]. 2021, 1–15 [consultado el 15 de marzo de 2024]. ISSN 1029-0397. doi:10.1080/03067319.2020.1862814
29. **PARSHETTI, G. K. et al.** Biodegradation of Crystal Violet by *Agrobacterium radiobacter*. *Journal of Environmental Sciences* [en línea]. 2011, 23(8), 1384–1393 [consultado el 4 de junio de 2024]. ISSN 1001-0742. doi:10.1016/s1001-0742(10)60547-5
30. **RAJHANS, Geetanjali et al.** Degradation of dyes by fungi: an insight into mycoremediation. *BioTechnologia* [en línea]. 2021, 102(4), 445–455 [consultado el 16 de marzo de 2024]. ISSN 0860-7796. doi:10.5114/bta.2021.111109
31. **RAMAVANDI, Bahman et al.** Alizarin Red S removal from aqueous solutions using *Saccharomyces cerevisiae*: kinetic and equilibrium study. *Desalination and Water Treatment* [en línea]. 2019, 144, 286–291 [consultado el 15 de marzo de 2024]. doi:10.5004/dwt.2019.23556
32. **SADEGHI, Abbas et al.** The effect of diazinon on the removal of carmoisine by *Saccharomyces cerevisiae*. *Desalination and Water Treatment* [en línea]. 2019, 137, 273–278 [consultado el 15 de marzo de 2024]. doi:10.5004/dwt.2019.23189
33. **ŞENOL, Zeynep Mine et al.** Bioremoval of rhodamine B dye from aqueous solution by using agricultural solid waste (almond shell): experimental and DFT modeling studies. *Biomass Conversion and Biorefinery* [en línea]. 2023 [consultado el 16 de marzo de 2024]. ISSN 2190-6823. doi:10.1007/s13399-023-03781-1
34. **SHUKLA, Sushil Kumar et al.** Removal of crystal violet by Cu-chitosan nano-biocomposite particles using Box–Behnken design. *Journal of Environmental Chemical Engineering* [en línea]. 2021, 9(5), 105847 [consultado el 15 de marzo de 2024]. ISSN 2213-3437. doi:10.1016/j.jece.2021.105847
35. **VITHALKAR, Sarika H.; JUGADE, Ravin M.** Adsorptive removal of crystal violet from aqueous solution by cross-linked chitosan coated bentonite. *Materials*

- Today: Proceedings* [en línea]. 2020, 29, 1025–1032 [consultado el 15 de marzo de 2024]. ISSN 2214-7853. doi:10.1016/j.matpr.2020.04.705
36. **YANG, Panpan et al.** Screening of freshwater fungi for decolorizing multiple synthetic dyes. *Brazilian Journal of Microbiology* [en línea]. 2016, 47(4), 828–834 [consultado el 16 de marzo de 2024]. ISSN 1517-8382. doi:10.1016/j.bjm.2016.06.010
37. **SABATÉ, Jose et al.** PCR differentiation of *Saccharomyces cerevisiae* from *Saccharomyces bayanus*/*Saccharomyces pastorianus* using specific primers. *FEMS Microbiology Letters* [en línea]. 2000, 193 (2), 255–259 [consultado el 15 de julio del 2024]. ISSN 1574-6968. doi.org/10.1111/j.1574-6968.2000.tb09433.x
38. **KUMARAVEL, Ramaprabha; SHANMUGAM, Venkat Kumar.** Biomimetic and ecological perspective towards decolorization of industrial important Azo Dyes using bacterial cultures – A Review. *Sustainable Chemistry for the Environment* [en línea]. 2024, 100130 [consultado el 17 de agosto de 2024]. ISSN 2949-8392. doi:10.1016/j.scenv.2024.100130
39. **SATHISHKUMAR, Kuppusamy et al.** Sequential electrochemical oxidation and bio-treatment of the azo dye congo red and textile effluent. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* [en línea]. 2019, 200, 111655 [consultado el 17 de agosto de 2024]. ISSN 1011-1344. doi:10.1016/j.jphotobiol.2019.111655
40. **AL-TOHAMY, Rania et al.** Ecofriendly biodegradation of Reactive Black 5 by newly isolated *Sterigmatomyces halophilus* SSA1575, valued for textile azo dye wastewater processing and detoxification. *Scientific Reports* [en línea]. 2020, 10(1) [consultado el 17 de agosto de 2024]. ISSN 2045-2322. doi:10.1038/s41598-020-69304-4

ANEXOS

Anexo 1



Figura 4. Desarrollo de experimento de biodegradación de colorante azo cristal violeta por levadura residual industrial (LRI) en medio de caldo de papa (CP). El primer vial (control) contiene solo LRI en vinaza de caña de azúcar, del 2.º al 7.º vial se observa la LRI en medio CP con 0, 25, 50, 100, 300 y 500 mg/L de CV

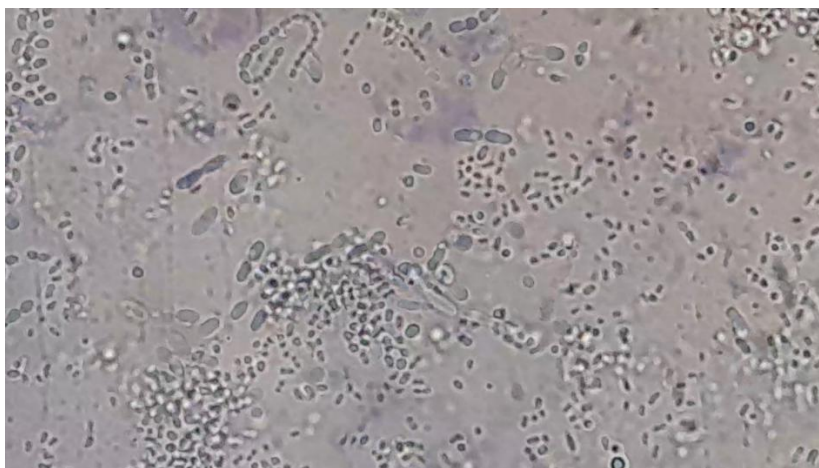


Figura 5. Observación microscópica a 10X de biodegradación de colorante azo cristal violeta por levadura residual industrial (LRI) en medio de caldo de papa conteniendo 25 mg/L de CV después de 7 días de incubación a 22 °C. Se muestra la presencia de células de LRI (incoloras) en su totalidad demostrando la biodegradación de casi 100 % del CV

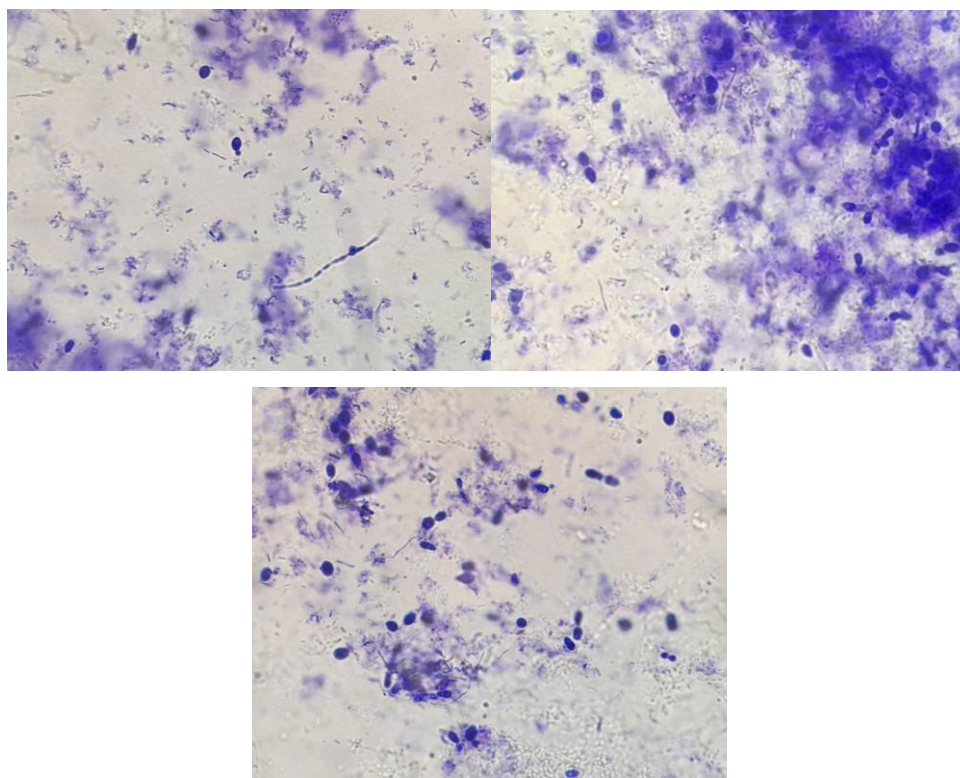


Figura 6. Observación microscópica a 40X de biodegradación de colorante azo cristal violeta por levadura residual industrial (LRI) en medio de caldo de papa conteniendo 50 (A), 100(B) y 300 (C) mg/L de CV después de 7 días de incubación a 22 °C. Se muestra que la totalidad de la LRI corresponde a células azules elipsoides de LRI que están en proceso de biodegradación de CV

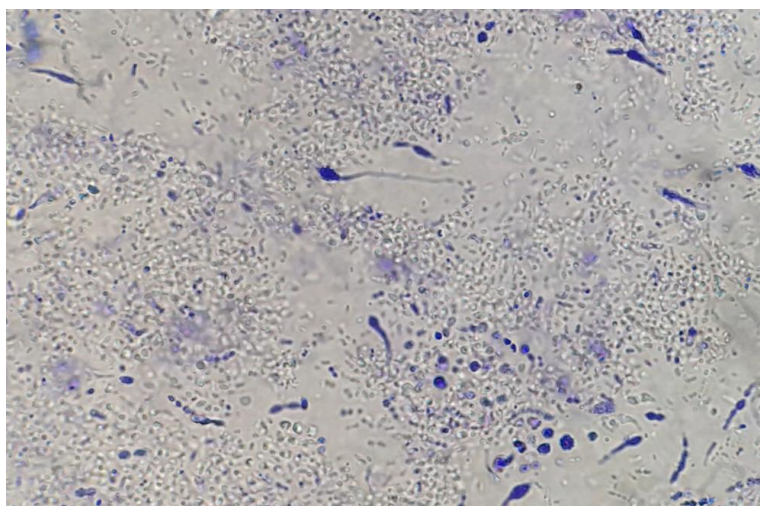


Figura 7. Observación microscópica a 40X de biodegradación de colorante azo cristal violeta por levadura residual industrial (LRI) en medio de caldo de papa conteniendo 500 mg/L de CV después de 14 días de incubación a 22 °C. Se muestra la presencia de células azules de LRI (espermatozoide like) de forma ahusada con prolongación de pseudohifas tipo filamentosa con morfología diferente a las levaduras silvestres originales (células azules elipsoides)



Figura 8. Observación microscópica a 40X de biodegradación de colorante azo cristal violeta por levadura residual industrial (LRI) en medio de caldo de papa conteniendo 500 mg/L de CV después de 14 días de incubación a 22 °C. Se muestra la presencia de células de LRI (incoloras) de 4 a 5 veces más grandes que las levaduras silvestres originales (células azules elipsoides)



Figura 9. Observación microscópica a 100X de biodegradación de colorante azo cristal violeta por levadura residual industrial (LRI) en medio de caldo de papa conteniendo 500 mg/L de CV después de 14 días de incubación a 22 °C. Se muestra la presencia de células de LRI (incoloras) de 4 a 5 veces más grandes que las levaduras silvestres originales (células azules)

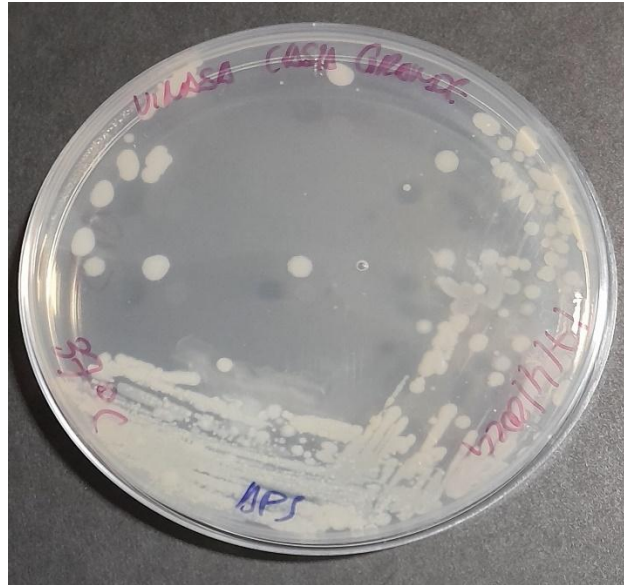


Figura 10. Observación macroscópica de levadura residual industrial (LRI) en medio agar papa sacarosa después de 2 días de incubación a 22 °C. Se muestra la presencia colonias cremosas de 3 mm de diámetro de LRI.

Anexo 2

CONSTANCIA DE CO-ASESORÍA

El que suscribe Dr. Mario Esparza Mantilla, con DNI 18199986, docente Investigador RENACYT N° P0002287, del Laboratorio de Biotecnología-Centro de Investigación Muchik, Trujillo-Perú. Hace constar que ha brindado el co-asesoramiento correspondiente para el desarrollo de la siguiente investigación en formato de proyecto de tesis titulada **"Biotecnología ambiental para la biodegradación de colorantes hospitalarios y de laboratorios biomédicos (tinción Gram) aplicando levaduras residuales industriales"**, con autoría de las estudiantes de la Escuela de Ingeniería Ambiental de la Universidad Continental: Bach. Flora Yvonne Chávez Salas y Bach. Sofia Esther Manrique Llanos

El proyecto de tesis fue ejecutado en parte, con mi asesoría presencial en el Laboratorio antes mencionado, y se aplicó el control de calidad en los procesos experimentales, apoyando en los procesos co - Asesoría en Investigación de Tesis de Ingeniería Ambiental.

Trujillo, 5 de Junio del 2024



Dr. Mario Esparza Mantilla
CBP 5073
Celular: +51-913931217



Biotecnología Ambiental para la Biodegradación de Colorantes Hospitalarios y de Laboratorios Biomédicos (Tinción Gram) Aplicando Levaduras Residuales Industriales

por Flora Yvonne Chavez Salas Sofia Esther Manrique Llanos

Fecha de entrega: 06-jul-2025 11:29a.m. (UTC-0500)

Identificador de la entrega: 2710811129

Nombre del archivo: CH_VEZ_-_MANRIQUE.pdf (1.09M)

Total de palabras: 9563

Total de caracteres: 56494

²
FACULTAD DE INGENIERÍA

Escuela Académico Profesional de Ingeniería Ambiental

TESIS

**Biotecnología Ambiental para la
Biodegradación de Colorantes Hospitalarios y
de Laboratorios Biomédicos (Tinción Gram)
Aplicando Levaduras Residuales Industriales**

Autoras

Flora Yvonne Chavez Salas
Sofia Esther Manrique Llanos

¹
Para optar el Título Profesional de
Ingeniero Ambiental

Huancayo – Perú
2025

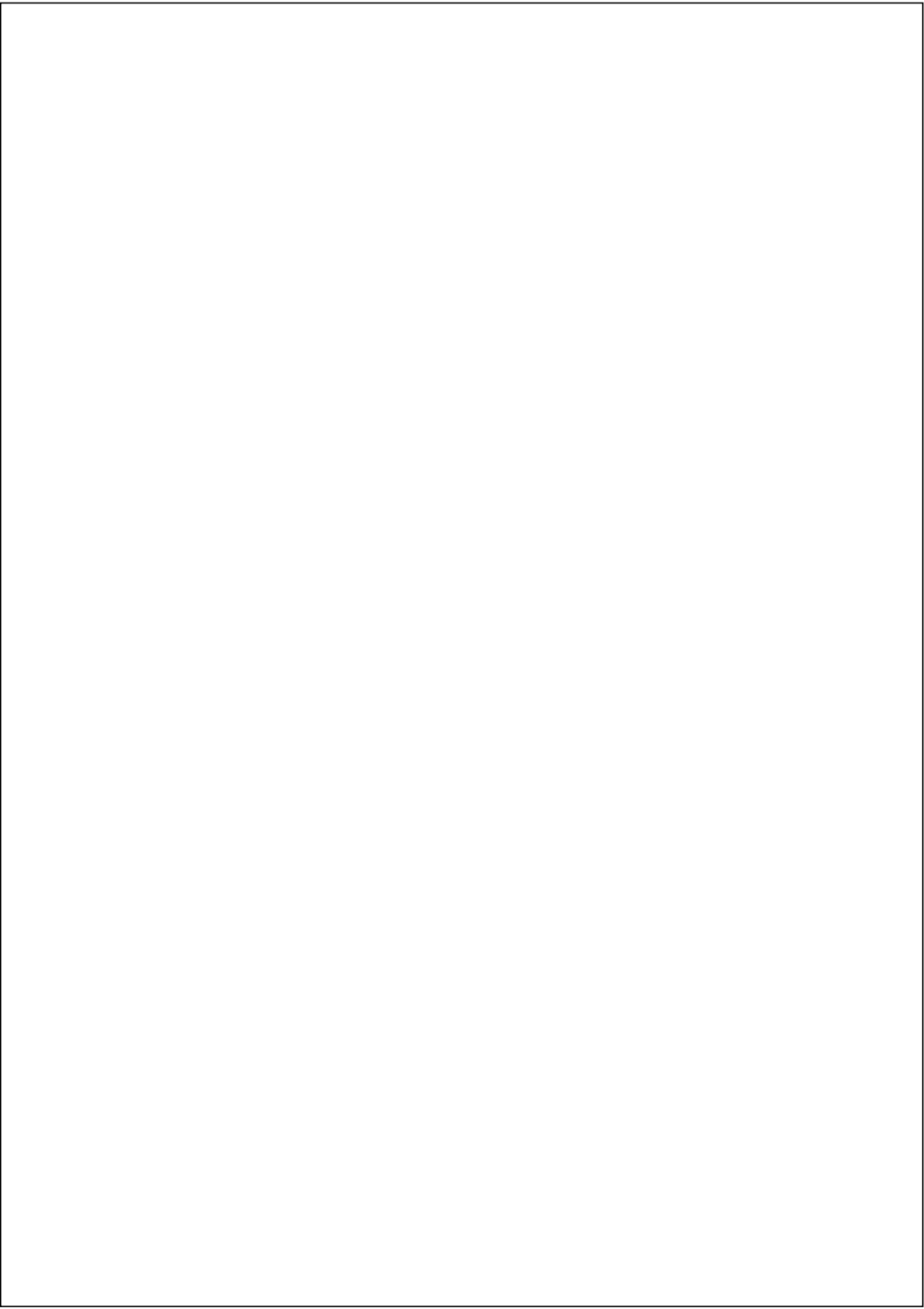


Repositorio Institucional Continental

Tesis digital



Esta obra está bajo una licencia "Creative Commons Atribución 4.0 Internacional"



ASESOR

PhD. ⁴ José Vladimir Cornejo Tueros

AGRADECIMIENTOS

Al docente ⁴PhD., José Vladimir Cornejo Tueros, por su apoyo incondicional y a todos los que apoyaron en la realización de esta investigación, en especial al Dr. Mario Esparza Mantilla, docente investigador ⁴Renacyt N.º P0002287 y a los docentes de la Escuela de Ingeniería Ambiental.

DEDICATORIA

A mis amados padres, Flora Salas Portilla y
Angel Chávez Machado.

Flora

A mis padres: Zenobio Manrique y
Magdalena Llanos

Sofia

1 **INDICE DE CONTENIDOS**

Asesor	iv
Agradecimientos	v
Dedicatoria	vi
Índice de contenidos	vii
Lista de tablas	ix
Lista de figuras	x
Resumen	xi
Abstract	xii
Introducción	xiii
Capítulo I	15
Planteamiento del problema	15
1.1. Problema de Investigación	15
1.1.1. Justificación Ambiental	17
1.1.2. Justificación social	17
1.1.3. Justificación tecnológica	17
1.2. Marco Teórico	18
1.2.1. Antecedentes de la investigación	18
1.2.2. Antecedentes Internacionales	18
1.2.3. Antecedentes nacionales	19
1.3. Definiciones	20
1.4. Objetivo general	20
1.5. Objetivos específicos	20
1.6. Hipótesis	20
1.6.1. Hipótesis general	20
1.6.2. Hipótesis específicas	21
Capítulo II	22
Material y métodos	22
2.1. Métodos y alcance de la investigación	22
2.2. Diseño de investigación	22
2.3. Población y muestra	22
2.4. Metodología	22
2.4.1. Muestreo	22
2.4.2. Aislamiento e identificación de levaduras desde efluentes residuales industriales	23

2.4.3. Mantenimiento de levaduras residuales industriales (LRI).....	23
2.4.4. Identificación de los aislados fúngicos (LRI)	23
2.4.5. Ensayos de identificación molecular de LRI	23
2.4.6. Preparación del inóculo de LRI	23
2.4.7. Experimentos de decoloración de cristal violeta (CV)	24
2.4.8. Ensayo de decoloración	24
2.4.9. Biodegradación del efluente de aguas residuales hospitalarias por LRI.....	24
Capítulo III	25
Resultados.....	25
Capítulo IV	30
Discusión	30
Conclusiones	33
Referencias	34
Anexos	39

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Características microscópicas de Levadura Residual Industrial (LRI) compatibles con Saccharomyces.....	25
Tabla 2. Análisis de biología molecular de levadura residual industrial (LRI) aplicada a la biodegradación de cristal violeta.....	26

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Biodegradación de cristal violeta (mg/L) por levadura residual industrial (LRI) <i>Saccharomyces cerevisiae</i> (10^6 cel/mL) en medios de caldo de papa (CP: barra azul) y caldo de papa sacarosa (CPS: barra naranja) durante 14 días de incubación a temperatura ambiente (22 °C).	27
Figura 2. Biodegradación de cristal violeta (mg/L) por levadura residual industrial <i>Saccharomyces cerevisiae</i> en caldo de papa (CP: barra azul) durante 14 días de incubación a temperatura ambiente (22 °C).	28
Figura 3. Viabilidad celular de la levadura residual industrial (LRI) <i>Saccharomyces cerevisiae</i> en presencia de cristal violeta (CV) 500 mg/L durante 14 días.	29
Figura 4. Desarrollo de experimento de biodegradación de colorante azo cristal violeta por levadura residual industrial (LRI) en medio de caldo de papa (CP).	40
Figura 5. Observación microscópica a 10X de biodegradación de colorante azo cristal violeta por levadura residual industrial (LRI) en medio de caldo de papa conteniendo 25 mg/L de CV después de 7 días de incubación a 22 °C.	40
Figura 6. Observación microscópica a 40X de biodegradación de colorante azo cristal violeta por levadura residual industrial (LRI) en medio de caldo de papa conteniendo 50 (A), 100(B) y 300 (C) mg/L de CV después de 7 días de incubación a 22 °C.	41
Figura 7. Observación microscópica a 40X de biodegradación de colorante azo cristal violeta por levadura residual industrial (LRI) en medio de caldo de papa conteniendo 500 mg/L de CV después de 14 días de incubación a 22 °C.	41
Figura 8. Observación microscópica a 40X de biodegradación de colorante azo cristal violeta por levadura residual industrial (LRI) en medio de caldo de papa conteniendo 500 mg/L de CV después de 14 días de incubación a 22 °C.	42
Figura 9. Observación microscópica a 100X de biodegradación de colorante azo cristal violeta por levadura residual industrial (LRI) en medio de caldo de papa conteniendo 500 mg/L de CV después de 14 días de incubación a 22 °C.	42
Figura 10. Observación macroscópica de levadura residual industrial (LRI) en medio agar papa sacarosa después de 2 días de incubación a 22 °C.	43

RESUMEN

El impacto ambiental por colorantes azo como el cristal violeta (CV) constituye un grave problema de contaminación de aguas residuales de hospitales y laboratorios en Perú, sin existir soluciones eficientes para su tratamiento biológico; por ello se sometió el CV a degradación microbiana por una cepa de levadura residual industrial (LRI). La LRI se analizó por pruebas microbiológicas, tintoriales y moleculares aplicando cultivos en Caldo Papa Sacarosa (CPS), Chromoagar; x^o; así como análisis moleculares por PCR e identificación bioinformática por BlastN. La LRI se identificó como *Saccharomyces cerevisiae*. Esta cepa fúngica de LRI se incubó por 7 a 14 días en medios CPS y caldo de papa (CP) en presencia de CV: 25, 50, 100, 300 y 500 mg/L a pH 4,5 a temperatura ambiente (22 °C) en experimentos por triplicado. *S. cerevisiae* LRI mostró ser capaz de biodegradar CV de 25 a 100 mg/L en CP: 99 % a 80 % y CPS: 80 a 60 % respectivamente, sin embargo, con CV de 300 a 500 mg/L la biodegradación decayó de 30 a 10 %. La cepa de LRI presenta mayor capacidad de biodegradación de tintes en ausencia de sacarosa donde logra biodegradar casi el 100 % de CV. Los resultados de esta investigación sugieren el uso exitoso LRI como residuo de la agroindustria azucarera para aplicarlo en la biodegradación de los tintes azo (CV). Estos hallazgos son importantes para diseñar tecnología de biorremediación para tratar el CV de aguas residuales hospitalarias o de laboratorios que aplican el CV en las técnicas de diagnóstico biomédico.

Palabras claves: biodegradación, biotecnología, cristal violeta, levaduras, tinción gram

ABSTRACT

The environmental impact by azo dyes such as the Crystal violet (CV) constitutes a serious problem of wastewater pollution of hospitals and laboratories in Peru, without efficient solutions for biological treatment; Therefore, the CV to microbial degradation was submitted by an industrial residual yeast strain (LRI). The LRI was analyzed by microbiological, tinctorial, and molecular tests applying crops in sucrose potato broth (CPS), Chromoagar; as well as molecular analysis by PCR and bioinformatics identification by blastN. The LRI was identified as *Saccharomyces cerevisiae*. This fungal strain of LRI was incubated for 7 to 14 days in CPS media and potato broth (CP) in the presence of CV: 25, 50, 100, 300 and 500 mg/l at a pH 4.5 at room temperature (22 °C) in triplicate experiments. *S. Cerevisiae* LRI showed being able to biodegrade CV from 25 to 100 mg/l in CP: 99 % to 80 % and CPS: 80 to 60 % respectively, however with CV from 300 to 500 mg/l the biodegradation declined 30 to 10 %. The strain of LRI has a greater capacity for biodegradation dyes in the absence of sucrose where it manages to biodegrade almost 100 % of CV. ⁶⁷ The results of this research suggest the successful use of LRI as a residue of sugar agribusiness to apply it in the biodegradation of azo dyes (CV). These findings are important to design bioremediation technology to treat hospital or laboratory wastewater CV that apply the CV in biomedical diagnostic techniques.

Keywords: biodegradation, biotechnology, gram staining, violet glass, yeasts

INTRODUCCIÓN

Los efluentes hospitalarios y de laboratorios biomédicos contienen colorantes que se consideran un importante problema medioambiental y son preocupación en el mundo actual. La tinción Gram usada en todos los laboratorios y hospitales del mundo contiene el colorante cristal violeta, es uno de los tintes del grupo trifenilmetano que es ⁷⁵ ampliamente utilizado en la industria textil y hospitalaria, pero es mutagénico y mitótico. Además, contiene otros componentes como iodo, alcohol, y safranina, estas mezclas de colorantes hospitalarios tienen alto impacto en las salas internas de laboratorios hospitalarios y biomédicos, que se impregnan en lavadores de porcelana, plástico y metal, después se vierten al desagüe doméstico, impactando como efluente hospitalario altamente tóxico. A la fecha, no existe norma interna en los hospitales o sistema de biotratamiento eficiente del efluente hospitalario que tiene tinciones que contengan cristal violeta, además no existen investigaciones que solucionen el problema de degradar tintes hospitalarios o residuos de la tinción de Gram usando mohos o levaduras.

Por otra parte, la industria de destilación, en el norte de Perú (Trujillo), usa levaduras (*Sacharomyces* spp), al finalizar la destilación esta levadura es desechada en sus efluentes como levadura residual industrial (LRI), sin ser aprovechada para otras aplicaciones biotecnológicas o ambientales. En el mundo, el biotratamiento de aguas contaminadas usa bacterias como biofiltros en la recuperación de aguas, hasta obtener efluentes que cumplan las normas ambientales sin considerar aplicar LRI como tratamiento ecoamigable. La LRI constituye un recurso biológico de bajo costo para tratar efluentes porque es un desecho industrial de la destilación que cuenta con las capacidades de ser un modelo biológico para tratar efluentes contaminados con colorantes. En consecuencia, la biomasa de LRI puede ser reusada como filtro biológico para tratar efluentes contaminados con colorantes o tintes provenientes de ambientes hospitalarios.

La biorremediación de colorantes, especialmente a través de bacterias, se está convirtiendo en un sector emergente e importante en el tratamiento de efluentes; sin embargo, escasos estudios se han publicado aplicando levadura comercial *Sacharomyces* spp lo que representa mayores costos del tratamiento, pero surge como alternativa el uso del desecho industrial que contiene cepas de dicha levadura, este desecho contiene levaduras residuales industriales (LRI) de la destilería peruana que puede reusarse o reciclarse para tratamiento de efluentes de colorantes, y puede

evaluarse como potencial biodegradador de cristal violeta y otros colorantes biomédicos presentes en ambientes y laboratorios hospitalarios que genera una biotecnología ambiental como alternativa natural y ecológica para la biodegradación de colorante cristal violeta presente en la tinción de Gram.

CAPÍTULO I

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

1.1. Problema de Investigación

La entrada de tintes sintéticos en ambientes acuáticos está asociada con desafíos ambientales. La estructura de estos contaminantes suele ser duradera y estable. Por lo tanto, estos contaminantes no se descomponen fácilmente en los sistemas biológicos comunes [1-3]. La contaminación de los cuerpos de agua por tintes tóxicos resultantes de la industria textil es una grave amenaza para la vida acuática y los seres humanos. La mayoría de los contaminantes industriales no son descompuestos por microorganismos y permanecen en el ambiente acuático durante mucho tiempo [4, 5]. Asimismo, la penetración de los tintes sintéticos en los ecosistemas acuáticos conduce a una disminución en la concentración de oxígeno disuelto, la actividad fotosintética y la calidad del agua [6]. Por lo tanto, estos contaminantes deben ser tratados antes de su liberación al medio acuático [2].

La producción anual de tinte en el mundo pesa más de 7×10^8 kg [7]. Los tintes sintéticos se utilizan a menudo en industrias como la del cuero, papel, plástico, farmacéutica, textil, etc. Por lo tanto, los efluentes industriales contienen grandes cantidades de colorantes sintéticos. Incluso en baja concentración, los tintes sintéticos pueden tener efectos adversos sobre el medio ambiente [8, 9]. Es difícil reducir estos contaminantes de los ambientes acuáticos debido a su estabilidad frente a calor, agentes oxidantes y luz [10]. En general, los tintes sintéticos incluyen tres categorías principales: trifenilmetano, antraquinona y azo [11, 12]. El cristal violeta (CV), perteneciente al grupo de los trifenilmetanos, es de naturaleza catiónica. En comparación con los colorantes aniónicos, este contaminante tiene efectos más destructivos sobre la membrana celular [13].

¹⁷ El CV tiene efectos tóxicos en animales y humanos, incluso en concentraciones de 1 ppb. Este tipo de tinte aumenta la frecuencia cardíaca y provoca sensibilidad, asfixia, vómitos, cáncer e irritación ocular [14]. Sin embargo, el CV es ampliamente ¹⁷ utilizado en la industria textil debido a su fácil acceso, alta eficiencia y bajo costo [15]. En un estudio, la cáscara de nuez de argán (ANS) y la cáscara de almendra (AS) regenerado por ácido nítrico eliminó el 98,21 % y el 98,6 % del CV, respectivamente [16]. En otro estudio, el CV fue eliminado con éxito por residuos de materiales agrícolas tratados con álcalis [17]. Irshad et al. [18] eliminaron el CV mediante nanopartículas sintetizadas de actividad fotocatalítica. Recientemente, la eliminación de colorantes por microorganismos ha recibido más atención debido a su rentabilidad y seguridad biológica. De hecho, en comparación con las técnicas químicas o físicas, los métodos de biodegradación pueden reducir la toxicidad de los lodos [19].

La industria alimentaria produce un subproducto llamado *S. cerevisiae*, que puede producir alcohol mediante procesos de fermentación [20]. Las ventajas de utilizar este método incluyen bajo costo, fácil cultivo en grandes cantidades y uso conveniente [21]. Muchos investigadores han explorado el uso de materiales de desecho agrícola como adsorbentes de bajo costo para eliminar tintes. Por ejemplo, El Khomri et al. [22] investigaron la eliminación del rojo Congo de una solución acuosa en sistemas de mezcla simple y binaria utilizando madera de cáscara de nuez de argán. Messaoudi et al. [23] sintetizaron nanopartículas de Ag₂O utilizando extracto de hoja de *Punica granatum* para la adsorción del antibiótico sulfametoxazol. Su estudio demostró que las nanopartículas fabricadas exhibían una excelente capacidad de adsorción hacia el antibiótico, lo que sugiere su uso potencial como adsorbente para eliminar el antibiótico sulfametoxazol. En otro estudio, se encontró que el carbón activado derivados de hojas de *Citrus sinensis* eliminaron eficazmente el 98,64 % del CV de 100 mg/L [24]. Además, algunos estudios muestran que los adsorbentes naturales, como los materiales de desecho agrícola, se pueden utilizar como adsorbentes alternativos para la eliminación de colorantes azoicos [25-29].

En un artículo, se estudió la biodegradación del tinte CV por la levadura *S. cerevisiae* en medio acuoso ⁵⁶ [30]. Los hongos juegan un papel importante en la descomposición y decoloración de tintes orgánicos por enzimas y procesos como la absorción y acumulación de tintes para aguas residuales [30]. La biodegradación de tintes sintéticos por hongos está surgiendo como un enfoque eficaz y prometedor [31]. Se estudió la biotransformación del verde de malaquita por *S. cerevisiae* y se encontró que el verde de malaquita se decoloraba por biosorción [32]. En algunos estudios, la

S. cerevisiae se ha utilizado para la eliminación de contaminantes, como arsénico [19], Hg^{2+} [33], cadmio (Cd), plomo (Pb) [34], verde de malaquita [35] y rojo de metilo [36-37] a partir de soluciones acuosas.

1.1.1. Justificación Ambiental

La justificación ambiental del presente estudio describe que la contaminación de ecosistemas por colorantes hospitalarios y de laboratorios biomédicos en Perú, es un problema ambiental y de salud pública que no ha sido resuelto, en consecuencia esta investigación es necesaria su ejecución porque aportará en la recuperación ecoamigable de desechos líquidos hospitalarios contaminados con colorantes hasta producir efluentes tratados para minimizar el impacto tóxico de los colorantes a ecosistemas locales.

1.1.2. Justificación social

El impacto social de la contaminación de colorantes en efluentes afecta a toda la población donde estos efluentes contaminados no pueden ser degradados eficazmente y las aguas con estos colorantes tienen impacto en la salud por ser cancerígenos, el evitar la eliminación de los colorantes al medio ambiente, minimizará el potencial carcinogénico de estos colorantes, ya que esta investigación aplicó biomasa de LRI para transformar los tintes cancerígenos en moléculas menos tóxicas o que sean biodegradadas hasta su eliminación total.

1.1.3. Justificación tecnológica

La justificación tecnológica se basa en que en el Perú no existe tecnologías ambientales para tratar efluentes contaminados con colorantes hospitalarios provenientes de la tinción Gram, por ello, el desarrollo de esta investigación permitirá que los hospitales y centros biomédicos cuenten con una tecnología ecoamigable para tratar sus efluentes contaminados con tintes cancerígenos, para ello se planteó aplicar biomasa de LRI para que sea aplicado como biotratamiento y se biodegrade eficientemente los tintes y se transfiera una nueva biotecnología ambiental a los hospitales o centros biomédicos e impacte positivamente a la salud pública y al medio ambiente.

Por lo tanto, esta investigación tiene por objetivo investigar el uso de levadura residual industrial (LRI) como una alternativa natural y ecológica para la biodegradación de colorante violeta cristal, que puede complementar los métodos existentes para la eliminación de tintes desde los efluentes hospitalarios y de laboratorios biomédicos.

1.2. Marco Teórico

1.2.1. Antecedentes de la investigación

En la presente investigación se ejecutó una búsqueda de diversos artículos científicos y tesis en distintos repositorios nacionales, así como el empleo de bases de datos de Scielo y Scopus, en estas búsquedas se incluyeron las palabras claves: levaduras, cristal violeta, biodegradación, biotecnología, tinción Gram. En la búsqueda se priorizó los artículos científicos Scopus, con evidencia más actualizada y validada por pares. También se tuvo en cuenta el criterio temporal, donde se consideró investigaciones entre 2019 al 2024, con la finalidad de identificar las publicaciones y estudios de investigación con información de calidad y fiabilidad.

1.2.2. Antecedentes Internacionales

A nivel internacional los colorantes azoicos se encuentran entre las principales clases de colorantes sintéticos, incluidos más de 3000 colorantes diferentes que se utilizan en industrias como la del papel, la química, la alimentación, los productos cosméticos, los tejidos y la industria farmacéutica. En la industria del teñido, los colorantes azoicos se utilizan ampliamente y constituyen más de la mitad de todos los colorantes utilizados a nivel mundial [38]. Además, a medida que la industria textil global se ha expandido en las últimas décadas, también lo ha hecho el uso de estos colorantes, lo que ha aumentado los contaminantes generados por las aguas residuales contaminadas con colorantes. La eliminación incontrolada de aguas residuales textiles que comprenden colorantes azoicos y sus productos intermedios en la vida acuática tiene un aspecto desagradable y reduce la penetración de la luz solar, lo que reduce la fotosíntesis, la cantidad de oxígeno disuelto (OD) presente en el agua y la calidad del agua. También tiene consecuencias nocivas para la flora y los animales acuáticos, generando graves problemas ambientales en todo el mundo. Como resultado, existe un requisito de limpiar los efluentes textiles antes de su eliminación en el entorno natural [38].

Además, los colorantes azoicos dañan la demanda química de oxígeno (DQO), la demanda biológica de oxígeno (DBO) y el carbono orgánico total (COT). Numerosos colorantes sintéticos con sus metabolitos son cancerígenos, mutagénicos y tóxicos. Además, numerosos estudios han demostrado que los efluentes que contienen colorantes dañan la eficiencia de germinación, así como la biomasa de varias especies de plantas que cumplen funciones ecológicas necesarias, como prevenir la erosión del suelo, contribuir al hábitat para la vida silvestre y proporcionar materia orgánica que es esencial para la fertilidad del suelo [39]. Como resultado, los efluentes que contienen colorantes y sus metabolitos podrían erradicarse antes de ser liberados en los recursos hídricos y el medio ambiente.

Se han empleado muchos enfoques, como procedimientos químicos, físicos y biológicos, en el tratamiento de aguas residuales que contienen colorantes. Las técnicas físicas y químicas tienen las desventajas intrínsecas de ser incómodas económicamente (debido al mayor uso de energía y productos químicos), ser ineficientes en la eliminación de colorantes recalcitrantes o sus metabolitos, lo que resulta en una gran cantidad de biosólidos que eventualmente pueden terminar causando contaminación secundaria, y requieren técnicas avanzadas [39]. En comparación con los métodos fisicoquímicos, la eliminación y degradación de colorantes microbiológicos o enzimáticos es un sustituto más amigable con el medio ambiente y rentable.

1.2.3. Antecedentes nacionales

Cada año se producen en todo el mundo una gran variedad de colorantes textiles (aproximadamente 10 000 colorantes sintéticos; 7×10^7 toneladas métricas), lo que supone una amenaza para la seguridad medioambiental [40]. Los colorantes azoicos representan la clase de colorantes sintéticos más grande y más utilizada en la industria textil. Sin embargo, los efluentes de estas industrias han demostrado tener actividades tóxicas, mutagénicas y carcinógenas debido a la presencia de uno o más enlaces azoicos. Recientemente, el vertido de efluentes de colorantes en corrientes naturales ha ganado gran atención pública debido a los graves riesgos ecológicos. Por lo tanto, es urgente encontrar métodos más eficaces y ecológicos para tratar los efluentes de aguas residuales industriales antes de su vertido en el medio ambiente natural.

A pesar de la eliminación de colorantes azoicos de los efluentes mediante tratamientos convencionales, como la floculación, la filtración por membranas, la fotocatalisis y la adsorción; la decoloración microbiana es una técnica aceptada más barata y ecológica para la eliminación de colorantes en comparación con los métodos físicos y químicos convencionales. Por lo tanto, la mayoría de los estudios actuales en Perú es limitada sobre la degradación de colorantes azoicos, ya que se centran principalmente en la degradación microbiana mediante bacterias de tintes textiles, sin estudios sobre biodegradación de colorantes biomédicos y hospitalarios como el cristal violeta. Sin embargo, aportes de la biodegradación de colorantes textiles (azo) mencionan que, por la actividad bacteriana, producen aminas aromáticas que tienen un impacto adverso en el ambiente. En comparación, se ha descubierto que los hongos decoloran los colorantes sin producir aminas aromáticas en función de su actividad extracelular de forma más eficiente, como en el caso de *Sterigmatomyces halophilus* SSA157 [40].

1.3. Definiciones

Levaduras. Es un microorganismo perteneciente al dominio Eucario, que se caracteriza por ser un hongo microscópico unicelular ($8\mu\text{ m}$), de forma esférica o elipsoide, que crece en medios orgánicos a pH ácido (< 4.5).

Levadura residual industrial. Es un subproducto de desecho de la industria de producción de azúcar de caña o etanol que contiene más del 90 % de presencia de hongos unicelulares (levaduras).

Medios de cultivo microbiano: Es aquel que contiene nutrientes necesarios como fuente de carbono o energía para el desarrollo y crecimiento de células microbianas (bacterias, arqueas, hongos, etc.) y permite su aislamiento en soportes sólidos (agar) o en medios líquidos.

Tinción de Gram: Comprende un método por el cual se clasifican microorganismos en Gram positivos (captura el colorante cristal violeta) y Gram negativos (capturan el tinte safranina). Este procedimiento es altamente usado en los laboratorios biomédicos y de docencia universitaria del mundo, donde los colorantes cristal violeta (cancerígeno) es usado y eliminado al drenaje sin considerar métodos de biotratamiento eficiente.

1.4. Objetivo general

Biodegradar cristal violeta (tinción Gram) desde efluentes hospitalarios y biomédicos en medios líquidos y sólidos aplicando levadura residual industrial (LRI).

1.5. Objetivos específicos

1. Aislar y caracterizar levadura residual industrial (LRI).

2. Identificar por métodos moleculares levadura residual industrial (LRI).

3. Evaluar el efecto de la concentración de biomasa de levadura residual industrial (LRI) en la biodegradación de cristal violeta (tinción Gram) presente en efluentes hospitalarios y biomédicos.

1.6. Hipótesis

1.6.1. Hipótesis general

La levadura residual industrial (LRI) tiene capacidad catalizadora para biodegradar el cristal violeta (tinción Gram) presente en efluentes hospitalarios y biomédicos para ser aplicado en biotecnología ambiental.

1.6.2. Hipótesis específicas

1. El aislamiento y las características microscópicas de Levadura Residual Industrial (LRI) con potencial de biodegradación de colorantes son compatibles con hongos unicelulares de *Saccharomyces* spp.
2. El análisis de biología molecular de Levadura Residual Industrial (LRI) aplicada a la biodegradación de cristal violeta corresponde a la cepa *Saccharomyces cerevisiae*.
3. El efecto de la concentración de biomasa (1×10^6 cel/ml) de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* (LRI) en la biodegradación de cristal violeta (CV) presente en efluentes hospitalarios y biomédicos permite biodegradar entre el 80-100 % de CV (25 a 100 mg/L).

MATERIAL Y MÉTODOS

2.1. Métodos y alcance de la investigación

La prueba de hipótesis se desarrolló demostrando que la LRI tiene capacidad biológica para la biodegradación de colorantes hospitalarios (cristal violeta).

2.2. Diseño de investigación

54

El tipo de investigación ejecutada fue aplicada, con diseño experimental con variable independiente: La biomasa de LRI incluyendo la variable dependiente: porcentaje (%) de biodegradación de colorantes de efluente hospitalario.

4

2.3. Población y muestra

La población fueron los microorganismos fúngicos (levaduras) presente en 20 mL de efluente de procesos de fermentación de caña de azúcar provenientes de aguas residuales de la Empresa Azucarera Casa Grande y la muestra fue aislados de la Levadura Residual Industrial que desarrollen en medios Agar Papa Sacarosa (APS) y Chromoagar (CAG).

2.4. Metodología**2.4.1. Muestreo**

El efluente (20 ml) con microorganismos fúngicos (1×10^8 cel/mL) de procesos de fermentación de caña de azúcar de las aguas residuales de la Empresa Azucarera Casa Grande se recolectó en tubos falcón estériles de 50 ml, se conservaron en cadena de frío a $4-8^\circ\text{C}$ y se usaron sin ningún tratamiento preliminar. En laboratorio se procedió a procesar la muestra bajo cabina de bioseguridad (biobase) para ejecutar el aislamiento de microorganismos.

Las muestras de tintes hospitalarios con residuos de colorantes azoicos de tinción Gram (cristal violeta) se formularon desde ⁶¹ Laboratorios de Microbiología de la Universidad Nacional de Trujillo. Las muestras de tinte comerciales de tinción Gram, se usaron como control.

2.4.2. Aislamiento e identificación de levaduras desde efluentes residuales industriales

Para el aislamiento se usó la técnica de vertida en placa con medio Agar Papa (APS) Sacarosa y Chromoagar (CAG). Para ello 0.1 mL de efluente de la aguas residuales de la empresa azucarera Casa Grande, se sembró por estría y se incubó a temperatura ambiente (22 °C) por 48 a 72 horas.

2.4.3. Mantenimiento de levaduras residuales industriales (LRI)

Las colonias de levaduras bien desarrolladas fueron replicadas en APS y se almacenaron a 4 °C en refrigerador LG 426L.

2.4.4. Identificación de los aislados fúngicos (LRI)

La identificación de los aislados de LRI se llevó a cabo por los métodos micológicos de rutina por análisis de la morfología de la colonia, pruebas preliminares como tinción de Gram y tinción de levaduras con azul de metileno.

2.4.5. Ensayos de identificación molecular de LRI

Las cepas aisladas de LRI fueron sometidas a purificación y extracción de ADN total mediante el kit Promega siguiendo las indicaciones del proveedor. El ADN aislado de la LRI se usó como molde para realizar amplificación del gen ARN 18S por PCR (Taq ADN polimerasa Promega) aplicando oligonucleótidos universales [37] en termociclador Eppendorf (Mastercycler X50p). El amplicón resultante se purificó mediante electroforesis en geles de agarosa TAE usando *safered* (ABP bioscience), en cámara de electroforesis híbrida UV (*Umbrella Genomics*). Luego el amplicón se secuenció usando secuenciador de ADN (*Oxford Nanopore Technologies*) y el resultado se analizó por BlastN hasta obtener la identificación bioinformática respectiva.

2.4.6. Preparación del inóculo de LRI

Para investigar la capacidad de decolorar cristal violeta, se realizó la suspensión de cultivos de levaduras LRI en Solución Salina Fisiológica Estéril (cloruro de sodio al 0,85 %). Una alícuota de 0,5 ml de cultivos de levaduras se inocularon en 50 ml de solución salina y se incubaron a 22 °C durante 3 horas (incubado FAITHFUL modelo WP-25AB).

2.4.7. Experimentos de decoloración de cristal violeta (CV)

Los experimentos se ejecutaron por triplicado y se evaluó la decoloración de CV en viales de 25 ml con 15 ml de cristal violeta (0, 25, 50 100, 300 y 500 mg/l), en caldo de papa con y sin sacarosa a pH 4.5. Luego, los viales ⁵ se esterilizaron en autoclave a 121 °C durante 15 minutos (Autoclave Portable Biobase Bkm-p 18 L). Luego cada vial fue inoculado con 1.5 ml de suspensión celular de LRI aplicando agitación manual por aireación externa y se incubó (incubado FAITHFUL modelo WP-25AB) a 22 °C durante 7-14 días. Se tomaron muestras a intervalos de 24-48 horas para observación microscópica (microscopio Greatlab - XSZ 157H) y evaluación visual de decoloración. La decoloración del sobrenadante se evaluó por la absorbancia en espectrofotómetro (Jenway 6850, IQ/OQ; 230 V) y el sedimento se analizó al microscopio óptico (Greatlab). Algunas muestras de LRI en presencia de CV de 100 y 300 mg/L fueron evaluadas en su viabilidad celular por siembra en placas Petri conteniendo en APS y Chromoagar.

2.4.8. Ensayo de decoloración

El ensayo de decoloración se ejecutó por medición del porcentaje de decoloración (biodegradación) utilizando espectrofotómetro (Jenway 6850) midiendo la Densidad Óptica (DO) a 600 nm de cada ensayo al inicio y al final. El porcentaje de la decoloración se calculó a partir de la siguiente ecuación:

$$\text{Porcentaje de biodegradación} = \frac{\text{DO inicial} - \text{DO final}}{\text{OD inicial}} \times 100$$

2.4.9. Biodegradación del efluente de aguas residuales hospitalarias por LRI

Biodegradación efluente hospitalaria o efluente de laboratorio biomédico, ⁵ se llevó a cabo en un matraz de 250 ml con 150 ml del efluente. El efluente con residuos de colorantes de tinción de Gram se enriqueció con caldo de papa y luego se esterilizó en autoclave (Biobase Bkm-p 18 L) a 121°C durante 15 minutos a pH 4.5 (*Hanna Instruments*). El matraz fue inoculado con 15 ml de inóculo de LRI (10^6 cel/mL). El matraz se agitó por aireación mecánica, a 22 °C en incubadora (FAITHFUL modelo WP-25AB) durante 7-14 días. La biodegradación se analizó por presencia y ausencia de decoloración al finalizar los tiempos de incubación respectivos.

CAPÍTULO III

RESULTADOS

Tabla 1. Características microscópicas de Levadura Residual Industrial (LRI) compatibles con *Saccharomyces*.

Parámetros biológicos	Descripción
Análisis microscópico	Células eucariontes ovaladas (8 μm) en estado de gemación algunas con pseudohifas
Análisis macroscópicos	Colonias de 3 a 6 mm de diámetro, bordes redondeados, aspecto cremoso y colonias convexas
Tinción azul de metileno (AM)	Células con movilidad que captan colorante AM
Tinción de Gram	Células tiñen Gram positivas

El aislamiento y caracterización microbiológica del efluente de levadura residual industrial (tabla 1) fue posible aplicando técnicas clásicas de microbiología para determinar la anatomía celular de la muestra mediante observación al microscopio óptico, donde se encontró presencia de células eucariontes ovaladas (8 μm) en estado de gemación con algunas pseudohifas, en las observaciones a inmersión se encontró células independientes en estado de gemación con morfología elipsoide con núcleo central bien característico de las cepas del género *Sacharomyces*. Cuando la LRI se sembró en medios de cultivo sólido cromogénicos se encontró el desarrollo de colonias de 3 a 6 mm de diámetro con bordes redondeados, aspecto cremoso y formas convexas, las tonalidades del agente cromogénico (*Chromoagar*) dieron resultado de colonias púrpuras características de *Saccharomyces cerevisiae* las cuales fueron expuestas a tinción de Gram que resultó en células Gram positivas y al exponerlas al colorante vital azul de metileno se evidenció bajo microscopio óptico (40X) células motiles (100 células x campo), con un 90 % de viabilidad. Este resultado (tabla 1) permite evidenciar la presencia de biomasa activa de LRI que corresponde a levaduras de la cepa *Saccharomyces cerevisiae*.

Tabla 2. Análisis de biología molecular de levadura residual industrial (LRI) aplicada a la biodegradación de cristal violeta

Biología molecular	Descripción
Extracción de ADN genómico	100 ng/ μ L
Amplificación por PCR	PCR (positivo)
Identificación de Molecular	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>

El análisis de biología molecular (tabla 2) del aislado microbiológico del efluente de levadura residual industrial (tabla 1) se desarrolló mediante la extracción de ADN genómico de células de LRI. Para ello, una colonia de levadura fue sometida de lisis celular para proceder con el kit de extracción de ácidos nucleicos Promega, hasta obtener ADN purificado (100 ng/ μ L). Este ADN genómico se aplicó como molde para amplificar por PCR el gen ARNr, y detectar un amplicón correspondiente al tamaño esperado dando un PCR positivo (tabla 2). Para el PCR se usaron oligonucleótidos (SB1/SB2 y SC1/SC2) de la región del ITS del ARNr de levaduras según lo descrito previamente [37]. Los parámetros de PCR fueron con desnaturalización inicial a 94 °C durante 5 min y 30 s para los ciclos posteriores, hibridización de oligonucleótidos a 50 °C durante 1 min y extensión a 72 °C durante 1 min. Se programaron 30 ciclos seguidos de una extensión final a 72 °C durante 7 min en termociclador Biorad. Los productos amplificados se sometieron a electroforesis en gel de agarosa al 1,4 % (Boehringer) y se tiñeron con Safered. Se utilizó un marcador de ADN de 100 pb (Gibco BRL) como estándar de tamaño. El amplicón resultante se usó como molde para análisis de secuenciamiento de ADN, resultando en la identificación de la LRI (tabla 2) mediante BlastN ser *Saccharomyces cerevisiae*. El análisis de biología molecular de Levadura Residual Industrial (LRI) aplicada a la biodegradación de cristal violeta corresponde a la cepa *Saccharomyces cerevisiae*.

La identificación molecular (tabla 2) por PCR permite validar las características microscópicas y macroscópicas (tabla 1) de la LRI como *Saccharomyces cerevisiae*.

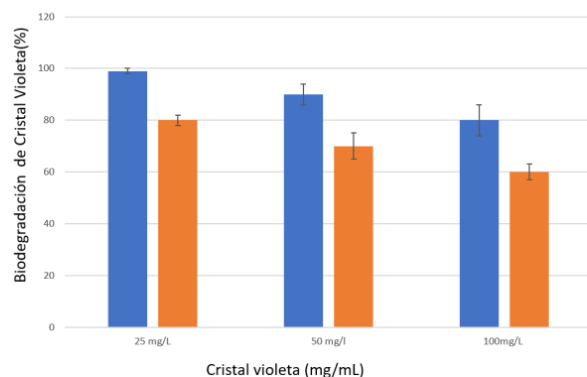


Figura 1. Biodegradación de cristal violeta (mg/L) por levadura residual industrial (LRI) *Saccharomyces cerevisiae* (10^6 cel/mL) en medios de caldo de papa (CP: barra azul) y caldo de papa sacarosa (CPS: barra naranja) durante 14 días de incubación a temperatura ambiente (22 °C). Se incluyen la desviación estándar en barras de error de experimentos por triplicado

La evaluación del efecto de la concentración de biomasa (1×10^6 cel/ml) de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* (LRI) en la biodegradación de cristal violeta (CV) presente en efluentes hospitalarios y biomédicos resultó (figura 1) en la capacidad de biodegradar entre el 80-99 % de CV (25 a 100 mg/L) cuando se usa caldo de papa y de 80- 60 % de CV (25 a 100 mg/L) cuando se usa caldo papa sacarosa. Al parecer la concentración celular de LRI es idónea para lograr 100 % de biodegradación de CV en CP, versus CPS (80 %) en 25 mg/mL de CV. La sacarosa en el medio CPS interfiere en la eficiencia de biodegradación del CV por la LRI, ya que en este medio la LRI usa de forma preferente la sacarosa como fuente de carbono, en vez de biodegradar de forma prioritaria el CV, como se evidencia en la figura 1, cuando la incubación se desarrolló a 22 °C por 14 días. El análisis celular de LRI bajo las diferentes concentraciones de CV, permitió detectar las levaduras activas y viables, pero con 100 % de captación intracelular del colorante CV, estas elevadas dosis de CV, hacen que este colorante tiña toda la anatomía celular, conforme pasa el proceso de incubación las células van decolorando el CV intracelular hasta recuperar su coloración natural original.

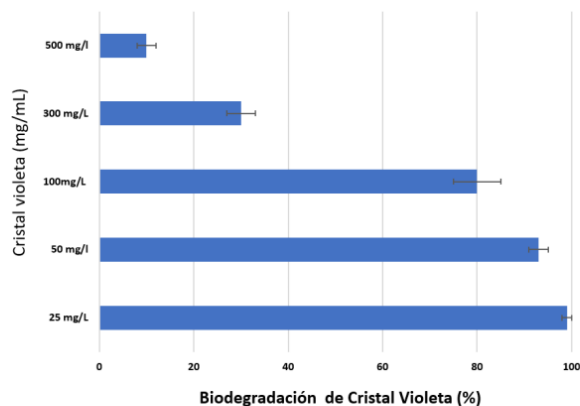


Figura 2. Biodegradación de cristal violeta (mg/L) por levadura residual industrial *Saccharomyces cerevisiae* en caldo de papa (CP: barra azul) durante 14 días de incubación a temperatura ambiente (22 °C). Se incluye la desviación estándar en barras de error de experimentos por triplicado

El efecto de la concentración de biomasa (1×10^6 cel/ml) de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* (LRI) en la biodegradación de elevadas concentraciones de cristal violeta (CV) de 300 a 500 mg/L no ha sido reportado, por ello se evaluó la capacidad de la LRI de desarrollarse bajo esta condición de extrema toxicidad (figura 2), que según, la información obtenida, son condiciones letales donde la muerte celular es inminente por estrés oxidativo, radicales libres y desnaturalización de proteínas de membrana [25-30]. Al usar un inóculo celular de LRI de 1×10^6 cel/ml se puede obtener que el CV (figura 2) alcanza a biodegradarse al 30 % cuando la concentración inicial de CV es 300 mg/L y del 10 % cuando fue de 500 mg/L. A pesar de lograr capacidad degradativa del 10 al 30 % del CV, se observó que las células de levadura independientes están mayormente destruidas con las membranas celulares dañadas y bajo porcentaje de viabilidad (< 20 %) o células sobreteñidas con CV; sin embargo, se logró observar células resistentes a colorearse con CV, quizás las poblaciones descendientes logran adaptarse, observando cepas de levaduras de mayor tamaño (40 a 80 μ m) que las parentales 8 μ m. Este reporte demuestra mecanismos de respuesta de aumento de tamaño celular para evadir la toxicidad del CV, lo que causa letalidad en la población progenitora, pero los descendientes resultaron ser capaces de adaptarse a dosis letales de CV (300-500 mg/L).

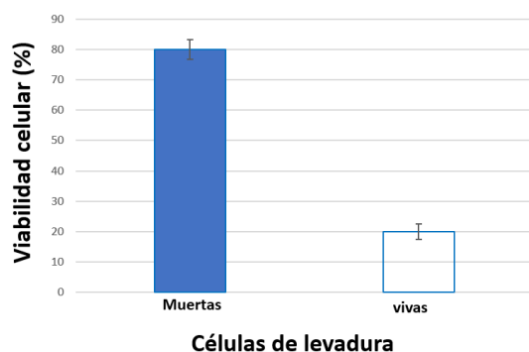


Figura 3. Viabilidad celular de la levadura residual industrial (LRI) *Saccharomyces cerevisiae* en presencia de cristal violeta (CV) 500 mg/L durante 14 días. La barra azul representa a células de levadura que permanecen teñidas con CV durante 14 que están sin actividad biológica (células muertas), la barra blanca, representa células vivas que resisten la toxicidad de la elevada concentración de CV (500 mg/L) que logran tener resistencia a absorber el CV dentro de su matriz celular

La elevada concentración de cristal violeta (CV) al 500 mg/L representa una acción de alta mortalidad celular (figura 3) alcanzando 80 % de células de LRI muertas, cuando se aplica agente de tinción vital (azul de metileno). Al pasar 14 días de incubación a 22 °C en presencia de CV al 500 mg/L, existe un 20 % de viabilidad, pero las células logran tener mayor tamaño, así como experimentaron resistencia a captar el CV en su anatomía celular.

En la práctica biomédica, el CV al ser aplicado en procesos de coloración de muestras biológicas y ser desechado al drenaje, inicialmente, alcanza concentraciones letales que luego de mezclarse con el agua servida va diluyéndose. Los resultados (figuras 2 y 3 de esta investigación) se pueden aplicar para usar la LRI como producto biológico bioabsorbente con capacidad de biodegradar el CV. De esta forma, se puede minimizar el impacto ambiental del CV y prevenir su efecto cancerígeno y letal a otras especies.

CAPÍTULO IV

DISCUSIÓN

Las investigaciones sobre la degradación de colorantes por hongos aún son escasas a nivel comercial para el tratamiento eficaz de compuestos cancerígenos como el cristal violeta. Por ello, los estudios deben centrarse en minimizar los factores limitantes que afectan el metabolismo celular fúngico. Un proceso de biodegradación eficiente debe considerar las vías de degradación, los factores ambientales, la tasa de biodegradación y los mecanismos que inciden en la eliminación de estos colorantes contaminantes. Es imperativo garantizar que los productos resultantes de la degradación no sean tóxicos para la vida acuática o las plantas.

La integración de diferentes tecnologías para el tratamiento de colorantes contaminantes es altamente deseable a fin de implementar soluciones tecnológicas efectivas en industrias sanitarias, hospitales y laboratorios que actualmente desechan colorantes al ambiente sin un tratamiento adecuado. El estudio de los mecanismos de biodegradación fúngica de colorantes azoicos, como el cristal violeta presente en aguas residuales de tintorerías, contribuiría a explorar la cinética de degradación de hongos levaduriformes.

La contaminación del agua por parte de industrias textiles y centros hospitalarios representa un problema crítico, ya que se vierten ⁶²grandes cantidades de tintes a los efluentes y cuerpos de agua. La eficacia de los procesos microbianos para la eliminación o degradación de estos compuestos se basa en el uso de microorganismos capaces de decolorar y degradar tintes sintéticos con estructuras químicas diversas. La degradación o decoloración fúngica de los tintes ha sido investigada principalmente a nivel de

laboratorio [19, 21, 27, 33]. Estudios previos se han centrado en bacterias para la decoloración de tintes, y los hallazgos han dependido en gran medida de un medio de cultivo adecuado y de la optimización de diversos parámetros (como la adición de cosustratos, nutrientes, moléculas mediadoras y condiciones físicas), así como del manejo de cepas comerciales o biomasa [19].

La integración de tecnologías es otro aspecto clave que podría aportar beneficios significativos. Es necesario desarrollar tecnologías y materiales avanzados para la degradación efectiva de colorantes en aguas residuales industriales. Actualmente, solo existen estudios básicos en laboratorio sin aplicaciones a escala comercial para resolver el problema de los colorantes en los efluentes. En ese contexto, esta tesis desarrolló un modelo eficiente de biodegradación del colorante azoico cristal violeta utilizando la Levadura Residual Industrial (LRI) *Saccharomyces cerevisiae*. Este modelo emplea dos residuos ambientales para su valorización tecnológica:

Efluentes hospitalarios o de laboratorio que contienen cristal violeta, y residuos industriales de la industria azucarera provenientes de la producción de etanol, específicamente la Levadura Residual Industrial (LRI).

Ambos contaminantes son actualmente vertidos a los efluentes, afectando el medio ambiente. En esta tesis, se les otorga una nueva utilidad tecnológica, empleando la LRI como insumo para la biodegradación del cristal violeta (CV), logrando una eficiencia del 99 % en un periodo de 7 a 14 días de tratamiento, bajo condiciones ambientales y a bajo costo.

Se desarrolló también la validación tecnológica de la biodegradación del CV, evidenciada mediante la caracterización e identificación microbiológica y molecular de la LRI (tablas 1 y 2), determinando que la cepa evaluada corresponde a *Saccharomyces cerevisiae*. Este hongo, al ser expuesto a diferentes concentraciones de cristal violeta (25 a 500 mg/L) (figuras 1, 2 y 3), demostró la capacidad de utilizar el CV como fuente de carbono, logrando una mayor eficiencia de biodegradación en medio de caldo de papa (CP) en comparación con caldo de papa sacarosa (CPS) (figura 1).

La LRI logró biodegradar el 99 % del CV (25 mg/L) en CP en un periodo de 7 a 14 días, y el 80 % en CPS. No obstante, concentraciones más altas (300 a 500 mg/L) reducen la eficiencia de biodegradación (de 30 % a 10 %), debido a la citotoxicidad y al efecto antimicrobiano [1] del CV. Esto se evidencia en la muerte celular de más del 80 % de las levaduras expuestas a 500 mg/L de CV (figura 3).

En general, concentraciones superiores a 100 mg/L de CV son difícilmente biodegradadas por modelos microbianos. Solo unas pocas especies de bacterias o levaduras han mostrado capacidad de biodegradación en estos rangos [2-19], ya que el CV > 100 mg/L posee efectos antibacterianos y antifúngicos [1-2]. Sin embargo, en esta tesis (figuras 2 y 3) se demuestra que la LRI es capaz de resistir y sobrevivir a concentraciones letales de CV: más del 20 % de la población celular sigue siendo viable. Futuros estudios podrán analizar los mecanismos de resistencia y extender los tiempos de tratamiento a 4 u 8 semanas, con el fin de determinar si la población viable puede biodegradar eficientemente CV a concentraciones de 500 mg/L.

CONCLUSIONES

1. La levadura residual industrial (LRI) *Saccharomyces cerevisiae* tiene capacidad catalizadora para biodegradar el cristal violeta (CV) presente en efluentes hospitalarios y biomédicos para ser aplicado en biotecnología ambiental. *S. cerevisiae* biodegrada del 80 a 99 % del CV en caldo de papa, pH 4,5, por 14 días a 22 °C cuando el CV esta entre 25 a 100 mg/L, pero disminuye 10 a 30 % para concentraciones de CV: 300 a 500 mg/L, en elevadas concentraciones de CV (500 mg/L) la LRI muestra resistencia al CV por 14 días al observarse 20 % de células fúngicas viables.
2. Las estrategias de crecimiento en medios agar de papa sacarosa y medio chromoagar permite aislar y caracterizar la presencia de biomasa activa de LRI que corresponde a levaduras de la cepa *Saccharomyces cerevisiae*.
3. El análisis molecular por PCR usando ADN genómico identificó como *Saccharomyces cerevisiae* al aislado de LRI consistente con sus características microscópicas y macroscópicas de fisiología de cultivos en medios agar de papa sacarosa y chromoagar.
4. La biomasa (1×10^6 cel/ml) de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* (LRI) tiene efecto de biodegradación de cristal violeta (CV) presente en efluentes hospitalarios y biomédicos

REFERENCIAS

1. **AL-KHIKANI, Falah; AYIT, Alae.** The Antibacterial Action of Safranin and Gentian Violet. *Rambam Maimonides Medical Journal* [en línea]. 2022, 13(3), e0018 [consultado el 4 de junio de 2024]. ISSN 2076-9172. doi:10.5041/rmmj.10475
2. **ANBARANI, Mohaddeseh Zahmatkesh et al.** Biodegradation of crystal violet dye by *Saccharomyces cerevisiae* in aqueous medium. *Heliyon* [en línea]. 2023, e19460 [consultado el 4 de junio de 2024]. ISSN 2405-8440. doi:10.1016/j.heliyon.2023.e19460
3. **BONYADI, Ziaeddin et al.** Biosorption of malachite green dye over *Spirulina platensis* mass: process modeling, factors optimization, kinetic, and isotherm studies. *Applied Water Science* [en línea]. 2022, 12(7) [consultado el 15 de marzo de 2024]. ISSN 2190-5495. doi:10.1007/s13201-022-01690-8
4. **BONYADI, Ziaeddin et al.** Reactive red-141 removal from synthetic solutions by γ -Al₂O₃ nanoparticles: process modeling, kinetic, and isotherm studies. *Applied Water Science* [en línea]. 2022, 13(2) [consultado el 15 de marzo de 2024]. ISSN 2190-5495. doi:10.1007/s13201-022-01854-6
5. **BONYADI, Ziaeddin; KHATIBI, Fatemeh Sadat; ALIPOUR, Fatemeh.** Ultrasonic-assisted synthesis of Fe₃O₄ nanoparticles-loaded sawdust carbon for malachite green removal from aquatic solutions. *Applied Water Science* [en línea]. 2022, 12(9) [consultado el 15 de marzo de 2024]. ISSN 2190-5495. doi:10.1007/s13201-022-01745-w
6. **DE ROSSI, Andreia et al.** Synthesis, characterization, and application of *Saccharomyces cerevisiae*/alginate composites beads for adsorption of heavy metals. *Journal of Environmental Chemical Engineering* [en línea]. 2020, 8(4), 104009 [consultado el 15 de marzo de 2024]. ISSN 2213-3437. doi:10.1016/j.jece.2020.104009
7. **EL KHOMRI, Mohammed et al.** Optimization Based on Response Surface Methodology of Anionic Dye Desorption From Two Agricultural Solid Wastes. *Chemistry Africa* [en línea]. 2022 [consultado el 16 de marzo de 2024]. ISSN 2522-5766. doi:10.1007/s42250-022-00395-4
8. _____. Regeneration of argan nutshell and almond shell using HNO₃ for their reusability to remove cationic dye from aqueous solution. *Chemical Engineering Communications* [en línea]. 2021, 1–12 [consultado el 15 de marzo de 2024]. ISSN 1563-5201. doi:10.1080/00986445.2021.1963960

9. ____³. Removal of Congo red from aqueous solution in single and binary mixture systems using Argan nutshell wood. *Pigment & Resin Technology* [en línea]. 2021 [consultado el 15 de marzo de 2024]. ISSN 0369-9420. doi:10.1108/prt-04-2021-0045
10. **EL MESSAOUDI, Noureddine et al.** Desorption of crystal violet from alkali-treated agricultural material waste: an experimental study, kinetic, equilibrium and thermodynamic modeling. *Pigment & Resin Technology* [en línea]. 2021, ahead-of-print. [consultado el 15 de marzo de 2024]. ISSN 0369-9420. doi:10.1108/prt-02-2021-0019
11. ____⁶. Green synthesis of Ag₂O nanoparticles using Punica granatum leaf extract for sulfamethoxazole antibiotic adsorption: characterization, experimental study, modeling, and DFT calculation. *Environmental Science and Pollution Research* [en línea]. 2022 [consultado el 15 de marzo de 2024]. ISSN 1614-7499. doi:10.1007/s11356-022-21554-7
12. ____². Regeneration and reusability of non-conventional low-cost adsorbents to remove dyes from wastewaters in multiple consecutive adsorption-desorption cycles: a review. *Biomass Conversion and Biorefinery* [en línea]. 2022 [consultado el 16 de marzo de 2024]. ISSN 2190-6823. doi:10.1007/s13399-022-03604-9
13. **HADIANI, Mohammad Rasoul et al.** Assessment of Mercury biosorption by *Saccharomyces cerevisiae*: Response surface methodology for optimization of low Hg (II) concentrations. *Journal of Environmental Chemical Engineering* [en línea]. 2018, 6(4), 4980–4987 [consultado el 16 de marzo de 2024]. ISSN 2213-3437. doi:10.1016/j.jece.2018.07.034
14. ____¹⁴. Biosorption of low concentration levels of Lead (II) and Cadmium (II) from aqueous solution by *Saccharomyces cerevisiae*: Response surface methodology. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology* [en línea]. 2018, 15, 25–34 [consultado el 16 de marzo de 2024]. ISSN 1878-8181. doi:10.1016/j.bcab.2018.05.001
15. **HASSAN, Mohamed R. et al.** Ultrasound facilitates and improves removal of triphenylmethane (crystal violet) dye from aqueous solution by activated charcoal: A kinetic study. *Journal of Saudi Chemical Society* [en línea]. 2021, 25(6), 101231 [consultado el 15 de marzo de 2024]. ISSN 1319-6103. doi:10.1016/j.jscs.2021.101231
16. **IRSHAD, Zunaira et al.** Ni doped SrFe₁₂O₁₉ nanoparticles synthesized via micro-emulsion route and photocatalytic activity evaluation for the degradation of crystal violet under visible light irradiation. *Results in Physics* [en línea]. 2022, 106006 [consultado el 15 de marzo de 2024]. ISSN 2211-3797.

- doi:10.1016/j.rinp.2022.106006²²
17. **JABAR, Jamiu Mosebolatan et al.** Synthesis of High Surface Area Mesoporous ZnCl₂-Activated Cocoa (Theobroma Cacao L) Leaves Biochar Derived Via Pyrolysis for Crystal Violet Dye Removal. *SSRN Electronic Journal* [en línea]. 2022 [consultado el 15 de marzo de 2024]. ISSN 1556-5068. doi:10.2139/ssrn.4134237⁸¹
 18. **JADHAV, J. P. et al.** Decolourization of azo dye methyl red by *Saccharomyces cerevisiae* MTCC 463. *Chemosphere* [en línea]. 2007, 68(2), 394–400 [consultado el 16 de marzo de 2024]. ISSN 0045-6535. doi:10.1016/j.chemosphere.2006.12.087⁵⁰
 19. **JADHAV, J. P.; GOVINDWAR, S. P.** Biotransformation of malachite green by *Saccharomyces cerevisiae* MTCC 463. *Yeast* [en línea]. 2006, 23(4), 315–323 [consultado el 16 de marzo de 2024]. ISSN 1097-0061. doi:10.1002/yea.1356³
 20. **KAUSAR, Abida et al.** Cellulose-based materials and their adsorptive removal efficiency for dyes: A review. *International Journal of Biological Macromolecules* [en línea]. 2022 [consultado el 16 de marzo de 2024]. ISSN 0141-8130. doi:10.1016/j.ijbiomac.2022.10.220⁵³
 21. **KHAN, Razia, BHAWANA, P.; FULEKAR, M. H.** Microbial decolorization and degradation of synthetic dyes: a review. *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology* [en línea]. 2012, 12(1), 75–97 [consultado el 15 de marzo de 2024]. ISSN 1572-9826. doi:10.1007/s11157-012-9287-6⁷³
 22. **KHOMRI, Mohammed El et al.** Modification of low-cost adsorbent prepared from agricultural solid waste for the adsorption and desorption of cationic dye. *Emergent Materials* [en línea]. 2022 [consultado el 16 de marzo de 2024]. ISSN 2522-574X. doi:10.1007/s42247-022-00390-y²⁸
 23. **MAZLOOMI, Sajad et al.** The removal of methylene blue by *Saccharomyces cerevisiae*: process modelling and optimization. *Desalination and Water Treatment* [en línea]. 2021, 236, 318–325 [consultado el 15 de marzo de 2024]. doi:10.5004/dwt.2021.27679³
 24. **MBACKÉ, Maryam Khadim et al.** Electrocoagulation process applied on pollutants treatment- experimental optimization and fundamental investigation of the crystal violet dye removal. *Journal of Environmental Chemical Engineering* [en línea]. 2016, 4(4), 4001–4011 [consultado el 15 de marzo de 2024]. ISSN 2213-3437. doi:10.1016/j.jece.2016.09.002¹⁶
 25. **MEHMANDOST, Nasrin et al.** Application of random forest for modeling batch and continuous fixed-bed removal of crystal violet from aqueous solutions using *Gypsophila aretioides* stem-based biosorbent. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy* [en línea]. 2022, 265, 120292 [consultado el 15 de marzo de 2024]. ISSN 1386-1425. doi:10.1016/j.saa.2021.120292⁴⁹

26. **MESSAOUDI, Nouredine El et al.** Experimental study and theoretical statistical modeling of acid blue 25 remediation using activated carbon from Citrus sinensis leaf. *Fluid Phase Equilibria* [en línea]. 2022, 563, 113585 [consultado el 16 de marzo de 2024]. ISSN 0378-3812. doi:10.1016/j.fluid.2022.113585
27. **MOHEBBRAD, Batool et al.** Arsenic removal from aqueous solutions using *Saccharomyces cerevisiae*: Kinetic and equilibrium study. *Environmental Progress & Sustainable Energy* [en línea]. 2018, 38(s1), S398–S402 [consultado el 15 de marzo de 2024]. ISSN 1944-7442. doi:10.1002/ep.13074
28. **NASOUDARI, Elaheh et al.** The biosorption of Alizarin Red S by *Spirulina platensis*; process modelling, optimisation, kinetic and isotherm studies. *International Journal of Environmental Analytical Chemistry* [en línea]. 2021, 1–15 [consultado el 15 de marzo de 2024]. ISSN 1029-0397. doi:10.1080/03067319.2020.1862814
29. **PARSHETTI, G. K. et al.** Biodegradation of Crystal Violet by *Agrobacterium radiobacter*. *Journal of Environmental Sciences* [en línea]. 2011, 23(8), 1384–1393 [consultado el 4 de junio de 2024]. ISSN 1001-0742. doi:10.1016/s1001-0742(10)60547-5
30. **RAJHANS, Geetanjali et al.** Degradation of dyes by fungi: an insight into mycoremediation. *BioTechnologia* [en línea]. 2021, 102(4), 445–455 [consultado el 16 de marzo de 2024]. ISSN 0860-7796. doi:10.5114/bta.2021.111109
31. **RAMAVANDI, Bahman et al.** Alizarin Red S removal from aqueous solutions using *Saccharomyces cerevisiae*: kinetic and equilibrium study. *Desalination and Water Treatment* [en línea]. 2019, 144, 286–291 [consultado el 15 de marzo de 2024]. doi:10.5004/dwt.2019.23556
32. **SADEGHI, Abbas et al.** The effect of diazinon on the removal of carmoisine by *Saccharomyces cerevisiae*. *Desalination and Water Treatment* [en línea]. 2019, 137, 273–278 [consultado el 15 de marzo de 2024]. doi:10.5004/dwt.2019.23189
33. **ŞENOL, Zeynep Mine et al.** Bioremoval of rhodamine B dye from aqueous solution by using agricultural solid waste (almond shell): experimental and DFT modeling studies. *Biomass Conversion and Biorefinery* [en línea]. 2023 [consultado el 16 de marzo de 2024]. ISSN 2190-6823. doi:10.1007/s13399-023-03781-1
34. **SHUKLA, Sushil Kumar et al.** Removal of crystal violet by Cu-chitosan nanobiocomposite particles using Box–Behnken design. *Journal of Environmental Chemical Engineering* [en línea]. 2021, 9(5), 105847 [consultado el 15 de marzo de 2024]. ISSN 2213-3437. doi:10.1016/j.jece.2021.105847
35. **VITHALKAR, Sarika H.; JUGADE, Ravin M.** Adsorptive removal of crystal violet from aqueous solution by cross-linked chitosan coated bentonite. *Materials*

- Today: Proceedings* [en línea]. 2020, 29, 1025–1032 [consultado el 15 de marzo de 2024]. ISSN 2214-7853. doi:10.1016/j.matpr.2020.04.705
36. YANG, Panpan et al. Screening of freshwater fungi for decolorizing multiple synthetic dyes. *Brazilian Journal of Microbiology* [en línea]. 2016, 47(4), 828–834 [consultado el 16 de marzo de 2024]. ISSN 1517-8382. doi:10.1016/j.bjm.2016.06.010
37. SABATÉ, Jose et al. PCR differentiation of *Saccharomyces cerevisiae* from *Saccharomyces bayanus*/*Saccharomyces pastorianus* using specific primers. *FEMS Microbiology Letters* [en línea]. 2000, 193 (2), 255–259 [consultado el 15 de julio del 2024]. ISSN 1574-6968. doi.org/10.1111/j.1574-6968.2000.tb09433.x
38. KUMARAVEL, Ramaprabha; SHANMUGAM, Venkat Kumar. Biomimetic and ecological perspective towards decolorization of industrial important Azo Dyes using bacterial cultures – A Review. *Sustainable Chemistry for the Environment* [en línea]. 2024, 100130 [consultado el 17 de agosto de 2024]. ISSN 2949-8392. doi:10.1016/j.scenv.2024.100130
39. SATHISHKUMAR, Kuppusamy et al. Sequential electrochemical oxidation and bio-treatment of the azo dye congo red and textile effluent. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* [en línea]. 2019, 200, 111655 [consultado el 17 de agosto de 2024]. ISSN 1011-1344. doi:10.1016/j.jphotobiol.2019.111655
40. AL-TOHAMY, Rania et al. Ecofriendly biodegradation of Reactive Black 5 by newly isolated *Sterigmatomyces halophilus* SSA1575, valued for textile azo dye wastewater processing and detoxification. *Scientific Reports* [en línea]. 2020, 10(1) [consultado el 17 de agosto de 2024]. ISSN 2045-2322. doi:10.1038/s41598-020-69304-4

ANEXOS

Anexo 1



Figura 4. Desarrollo de experimento de biodegradación de colorante azo cristal violeta por levadura residual industrial (LRI) en medio de caldo de papa (CP). El primer vial (control) contiene solo LRI en vinaza de caña de azúcar, del 2.º al 7.º vial se observa la LRI en medio CP con 0, 25, 50, 100, 300 y 500 mg/L de CV

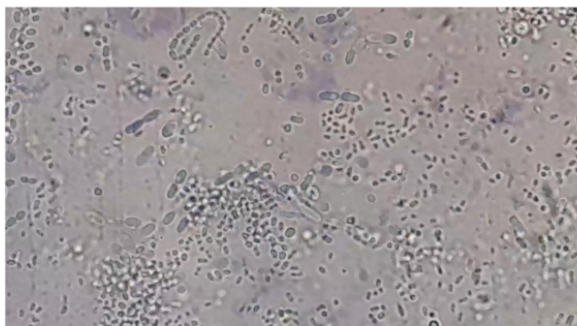


Figura 5. Observación microscópica a 10X de biodegradación de colorante azo cristal violeta por levadura residual industrial (LRI) en medio de caldo de papa conteniendo 25 mg/L de CV después de 7 días de incubación a 22 °C. Se muestra la presencia de células de LRI (incoloras) en su totalidad demostrando la biodegradación de casi 100 % del CV

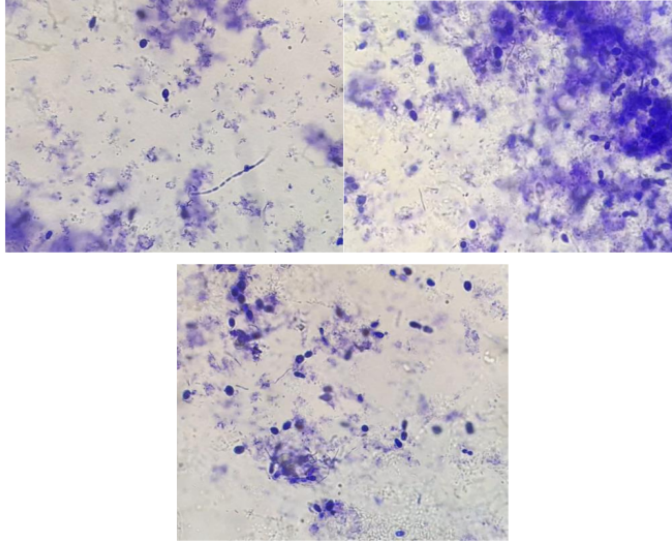


Figura 6. Observación microscópica a 40X de biodegradación de colorante azo cristal violeta por levadura residual industrial (LRI) en medio de caldo de papa conteniendo 50 (A), 100(B) y 300 (C) mg/L de CV después de 7 días de incubación a 22 °C. Se muestra que la totalidad de la LRI corresponde a células azules elipsoides de LRI que están en proceso de biodegradación de CV

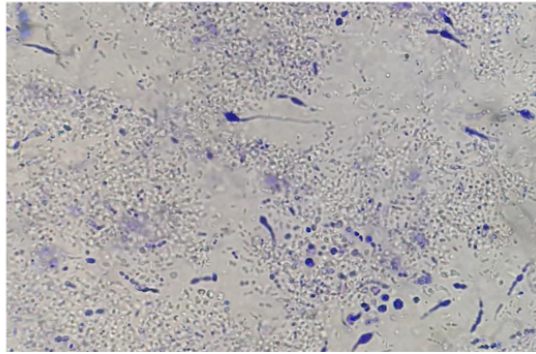


Figura 7. Observación microscópica a 40X de biodegradación de colorante azo cristal violeta por levadura residual industrial (LRI) en medio de caldo de papa conteniendo 500 mg/L de CV después de 14 días de incubación a 22 °C. Se muestra la presencia de células azules de LRI (espermatozoide like) de forma ahusada con prolongación de pseudohifas tipo filamentosa con morfología diferente a las levaduras silvestres originales (células azules elipsoides)



Figura 8. Observación microscópica a 40X de biodegradación de colorante azo cristal violeta por levadura residual industrial (LRI) en medio de caldo de papa conteniendo 500 mg/L de CV después de 14 días de incubación a 22 °C. Se muestra la presencia de células de LRI (incoloras) de 4 a 5 veces más grandes que las levaduras silvestres originales (células azules elipsoides)



Figura 9. Observación microscópica a 100X de biodegradación de colorante azo cristal violeta por levadura residual industrial (LRI) en medio de caldo de papa conteniendo 500 mg/L de CV después de 14 días de incubación a 22 °C. Se muestra la presencia de células de LRI (incoloras) de 4 a 5 veces más grandes que las levaduras silvestres originales (células azules)

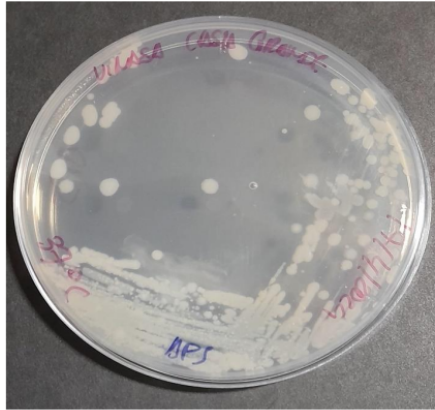


Figura 10. Observación macroscópica de levadura residual industrial (LRI) en medio agar papa sacarosa después de 2 días de incubación a 22 °C. Se muestra la presencia colonias cremosas de 3 mm de diámetro de LRI.

Anexo 2

CONSTANCIA DE CO-ASESORÍA

El que suscribe Dr. Mario Esparza Mantilla, con DNI 18199986, docente Investigador RENACYT N° P0002287, del Laboratorio de Biotecnología-Centro de Investigación Muchik, Trujillo-Perú. Hace constar que ha brindado el co-asesoramiento correspondiente para el desarrollo de la siguiente investigación en formato de proyecto de tesis titulada **"Biotecnología ambiental para la biodegradación de colorantes hospitalarios y de laboratorios biomédicos (tinción Gram) aplicando levaduras residuales industriales"**, con autoría de las estudiantes de la Escuela de Ingeniería Ambiental de la Universidad Continental: Bach. Flora Yvonne Chávez Salas y Bach. Sofia Esther Manrique Llanos

El proyecto de tesis fue ejecutado en parte, con mi asesoría presencial en el Laboratorio antes mencionado, y se aplicó el control de calidad en los procesos experimentales, apoyando en los procesos co - Asesoría en Investigación de Tesis de Ingeniería Ambiental.

Trujillo, 5 de Junio del 2024



Dr. Mario Esparza Mantilla
CBP 5073
Celular: +51-913931217



Biotecnología Ambiental para la Biodegradación de Colorantes Hospitalarios y de Laboratorios Biomédicos (Tinción Gram) Aplicando Levaduras Residuales Industriales

INFORME DE ORIGINALIDAD

19%	18%	11%	10%
INDICE DE SIMILITUD	FUENTES DE INTERNET	PUBLICACIONES	TRABAJOS DEL ESTUDIANTE

FUENTES PRIMARIAS

1	Submitted to Universidad Continental	2%
	Trabajo del estudiante	
2	ouci.dntb.gov.ua	2%
	Fuente de Internet	
3	pmc.ncbi.nlm.nih.gov	1%
	Fuente de Internet	
4	hdl.handle.net	1%
	Fuente de Internet	
5	patents.google.com	<1%
	Fuente de Internet	
6	repositorio.ucv.edu.pe	<1%
	Fuente de Internet	
7	repositorio.continental.edu.pe	<1%
	Fuente de Internet	
8	www.researchsquare.com	<1%
	Fuente de Internet	
9	avesis.cumhuriyet.edu.tr	<1%
	Fuente de Internet	
10	ufsj.edu.br	<1%
	Fuente de Internet	

11	repositorio.unsm.edu.pe Fuente de Internet	<1 %
12	sappg.ufes.br Fuente de Internet	<1 %
13	Deep Patel, Greeshma Nair, Femina Patel, Bhavna Soni. "Electrochemical degradation of reactive dyes mixture over DSA electrodes: A sustainable approach", Materials Today: Proceedings, 2023 Publicación	<1 %
14	Mohammad Rasoul Hadiani, Kianoush Khosravi Darani, Nahid Rahimifard, Habibollah Younesi. "Biosorption of low concentration levels of Lead (II) and Cadmium (II) from aqueous solution by Saccharomyces cerevisiae : Response surface methodology", Biocatalysis and Agricultural Biotechnology, 2018 Publicación	<1 %
15	Zunaira Irshad, Ismat Bibi, Aamir Ghafoor, Farzana Majid et al. "Ni doped SrFe12O19 nanoparticles synthesized via micro-emulsion route and photocatalytic activity evaluation for the degradation of crystal violet under visible light irradiation", Results in Physics, 2022 Publicación	<1 %
16	hal.archives-ouvertes.fr Fuente de Internet	<1 %
17	Submitted to Escuela Politecnica Nacional Trabajo del estudiante	<1 %

18	Mohammad Rasoul Hadiani, Kianoush Khosravi-Darani, Nahid Rahimifard, Habibollah Younesi. "Assessment of Mercury biosorption by <i>Saccharomyces cerevisiae</i> : Response surface methodology for optimization of low Hg (II) concentrations", <i>Journal of Environmental Chemical Engineering</i> , 2018 Publicación	<1 %
----	---	------

19	avesis.usak.edu.tr Fuente de Internet	<1 %
----	--	------

20	krclib.ncl.res.in Fuente de Internet	<1 %
----	--	------

21	html.rincondelvago.com Fuente de Internet	<1 %
----	--	------

22	pubs.rsc.org Fuente de Internet	<1 %
----	--	------

23	Andreia De Rossi, Cesar V.T. Riguetto, Aline Dettmer, Luciane M. Colla, Jeferson S. Piccin. "Synthesis, characterization, and application of <i>Saccharomyces cerevisiae</i> /alginate composites beads for adsorption of heavy metals", <i>Journal of Environmental Chemical Engineering</i> , 2020 Publicación	<1 %
----	---	------

24	repositorio.unica.edu.pe Fuente de Internet	<1 %
----	--	------

25	Fatih Deniz. " Cost-efficient and sustainable treatment of malachite green, a model micropollutant with a wide range of uses,	<1 %
----	---	------

from wastewater with M. J. Roemer plant, an effective and eco-friendly biosorbent ",
Journal of Taibah University for Science, 2023

Publicación

26 Ramaprabha Kumaravel, Venkat Kumar Shanmugam. "Biomimetic and ecological perspective towards decolorization of industrial important Azo Dyes using bacterial cultures – A Review", Sustainable Chemistry for the Environment, 2024

Publicación

27 Submitted to University of Sydney

Trabajo del estudiante

28 link.springer.com

Fuente de Internet

29 www.hindawi.com

Fuente de Internet

30 revistas.udea.edu.co

Fuente de Internet

31 Sudarshan Sahu, Anupreet Kaur, Gursharan Singh, Shailendra Kumar Arya. "Integrating biosorption and machine learning for efficient remazol red removal by algae-bacteria Co-culture and comparative analysis of predicted models", Chemosphere, 2024

Publicación

32 www.nature.com

Fuente de Internet

33 Duarte, Elsa Maria Leclerc. "Tuberculose Bovina: deteccao Molecular e Genotipagem

De Mycobacterium Bovis", Universidade de Evora (Portugal), 2021

Publicación

34	ddd.uab.cat Fuente de Internet	<1 %
35	www.wjgnet.com Fuente de Internet	<1 %
36	Submitted to Colorado State University Fort Collins Trabajo del estudiante	<1 %
37	anvur.it Fuente de Internet	<1 %
38	www1.ufrb.edu.br Fuente de Internet	<1 %
39	Submitted to International School of Uganda Trabajo del estudiante	<1 %
40	Submitted to Loyola University, Chicago Trabajo del estudiante	<1 %
41	Submitted to North London Collegiate School (Singapore) Trabajo del estudiante	<1 %
42	repositorio.utelesup.edu.pe Fuente de Internet	<1 %
43	www.researchgate.net Fuente de Internet	<1 %
44	repositorio.ufsm.br Fuente de Internet	<1 %
45	Submitted to Westlake Academy Trabajo del estudiante	<1 %

46	repositorio.uss.edu.pe Fuente de Internet	<1 %
47	repositorio.utn.edu.ec Fuente de Internet	<1 %
48	ri.biblioteca.udo.edu.ve Fuente de Internet	<1 %
49	Submitted to Kaunas University of Technology Trabajo del estudiante	<1 %
50	Ejarque Gonzalez, Elisabet. "From Flood to Drought: Transport and Reactivity of Dissolved Organic Matter Along a Mediterranean River.", Universitat de Barcelona (Spain) Publicación	<1 %
51	academic.oup.com Fuente de Internet	<1 %
52	archive.laprensa.com.sv Fuente de Internet	<1 %
53	koasas.kaist.ac.kr:8080 Fuente de Internet	<1 %
54	Submitted to uncedu Trabajo del estudiante	<1 %
55	www.akgec.ac.in Fuente de Internet	<1 %
56	www.coursehero.com Fuente de Internet	<1 %
57	digibug.ugr.es Fuente de Internet	<1 %

58	dominiodelasciencias.com Fuente de Internet	<1 %
59	dr.ntu.edu.sg Fuente de Internet	<1 %
60	ir.nctu.edu.tw Fuente de Internet	<1 %
61	renati.sunedu.gob.pe Fuente de Internet	<1 %
62	repositorio.cucba.udg.mx:8080 Fuente de Internet	<1 %
63	repositorio.puce.edu.ec Fuente de Internet	<1 %
64	repositorio.uam.es Fuente de Internet	<1 %
65	repository.udem.edu.co Fuente de Internet	<1 %
66	ruj.uj.edu.pl Fuente de Internet	<1 %
67	typeset.io Fuente de Internet	<1 %
68	upcommons.upc.edu Fuente de Internet	<1 %
69	www.europarl.europa.eu Fuente de Internet	<1 %
70	www.ucm.es Fuente de Internet	<1 %
71	Julia Guerra Hernández, Johana Espinoza Jarrin. "Remoción de metales pesados en	<1 %

agua empleando bioadsorbentes
magnéticos", Mundo Nano. Revista
Interdisciplinaria en Nanociencias y
Nanotecnología, 2024

Publicación

72	aequitas-jmp-blogspotcom.blogspot.com Fuente de Internet	<1 %
73	ava.cineca.it Fuente de Internet	<1 %
74	buleria.unileon.es Fuente de Internet	<1 %
75	doczz.es Fuente de Internet	<1 %
76	eprints.ucm.es Fuente de Internet	<1 %
77	lup.lub.lu.se Fuente de Internet	<1 %
78	opus.bibliothek.fh-aachen.de Fuente de Internet	<1 %
79	www.healthsystem.virginia.edu Fuente de Internet	<1 %
80	www.iagua.es Fuente de Internet	<1 %
81	www.jewiki.net Fuente de Internet	<1 %
82	www.scribd.com Fuente de Internet	<1 %

Excluir citas	Apagado	Excluir coincidencias	Apagado
Excluir bibliografía	Apagado		