



Universidad Nacional Autónoma de México
Facultad de Estudios Superiores Iztacala
Carrera de Biología

TESIS para obtener el título de Biólogo

Por:

Leopoldo José Luís Benítez González

Degradación de los Residuos Sólidos del Cigarrillo por crecimiento de
Pleurotus ostreatus (Jacq: Fr.) Kumm
y *Trametes versicolor* (L.: Fr.) Pilát.

Asesor: Biol. Víctor Manuel Esparza Martínez



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Agradecimientos y Dedicatorias

Esta tesis es dedicada especialmente a mi abuelita Isabel Angeles Lopez, contigo pase los primeros años de mi vida. Desde esos tiempos creíste en mi y hasta ahora tu sencillez y valor me sorprenden.

A mis padres Guadalupe y Leopoldo
que con su humildad y ganas de vivir me han
sacado adelante. Gracias por ofrecerme sin dudar,
la libertad de escoger mi camino.
Me siento muy orgulloso de ustedes.

A la UNAM por permitirme expandir mi mente
y a los profesores de la facultad que definitivamente
Influyeron en mi formación.

A mi asesor Victor Manuel Esparza Martinez,
por darme la oportunidad de trabajar con el
y dedicarle la vida a la ciencia.

A la Maestra Irma Delfin Alcala
por influir en mis ideas y dedicar su vida a la ciencia.

A todas esas personas que han coincidido en mi vida
y que de todas he aprendido.

No es la especie mas fuerte la que sobrevive, ni la mas inteligente,
sino la que responde mejor al cambio. **Charles Darwin.**

INDICE

1.	Resumen	1
2.	Introducción	2
	2.1 Residuos sólidos del cigarrillo.	2
	2.2 Biología de los hongos basidiomicetos.	3
	2.3 Cultivo de <i>Pleurotus ostreatus</i> y <i>Trametes versicolor</i> .	4
3	Antecedentes	5
	3.1 Biotecnológicos.	5
	3.2 Medicinales y terapéuticos.	7
4	Justificación	8
5	Hipótesis	9
6	Objetivos	9
7	Material y Método	10
	7.1 Instalaciones.	10
	7.2 Obtención de colillas.	10
	7.3 Propagación de las cepas y obtención de micelio activado.	10
	7.4 Preparación del sustrato y siembra.	11
	7.5 Incubación.	11
	7.6 Fructificación y cosecha.	12
	7.7 Tratamiento de datos.	12
	7.8 Fotografías de la degradación física del sustrato.	13
	7.9 Cromatografía de gases.	13
8	Análisis y discusión de resultados	15
	8.1 Contaminación por colillas y Situación en México.	15
	8.2 Manejo separado de colillas 'Proyecto BioSoluciones'.	16
	8.3 Cultivo de los hongos en colillas de cigarrillo.	18
	8.4 Microscopia Electrónica de Barrido del sustrato.	21
	8.5 Fructificaciones de <i>Pleurotus ostreatus</i> .	23
	8.6 Análisis del lixiviado.	31
9	Conclusiones	36
10	Referencias	37

1. Resumen

En México y en el mundo se desechan diariamente colillas y filtros de cigarrillo, que representan un problema de contaminación por la acumulación de sustancias tóxicas y residuos sólidos. En busca de respuesta a este problema se investigó la capacidad de los hongos *Pleurotus ostreatus* y *Trametes versicolor* para degradar estos contaminantes. Los filtros se acopiaron en contenedores específicos que fueron distribuidos en la UNAM campus Iztacala, México, como parte de la difusión del proyecto Biosoluciones. Se colectaron 8 kg de filtros en 2 años. Posteriormente, se diseñaron tres bioensayos generales con tres tratamientos de mezclas de colillas y paja de trigo, inoculados con las cepas de *Pleurotus ostreatus* y *Trametes versicolor*. Se determinaron los periodos de incubación, fructificación y los ciclos de cultivo, así como el número de cosechas, el peso de la biomasa generada, el diámetro del píleo, la eficiencia biológica y la reducción del volumen del sustrato. Se registraron también las características fenotípicas de los hongos cosechados.

La siembra se realizó en agosto de 2010. En todos los tratamientos hubo crecimiento micelial de los hongos: *P. ostreatus* invadió totalmente el sustrato a los 8 días y *T. versicolor* a los 15 días. *P. ostreatus* formó cuerpos fructíferos a los 25 días y el cultivo finalizó a los 70 días. No se obtuvieron fructificaciones con *T. versicolor*; *Pleurotus ostreatus* tuvo la capacidad de crecer en el lixiviado producto del contacto de las colillas con el agua, invadió totalmente la superficie del sustrato a los 13 días de haber sido inoculado. El peso de las colillas se redujo en un 18% con *P. ostreatus* y en un 14% con *T. versicolor*. No existieron diferencias significativas entre los tratamientos de eficiencia biológica de *P. ostreatus*, tuvo un promedio de 44.81%, por tanto no es necesario mezclar las colillas con paja, se pueden utilizar solo colillas para la degradación. En cuanto a la producción de biomasa, no existieron diferencias significativas entre los tratamientos, siendo el grupo control el que más biomasa generó 11 g por cada 50 g de sustrato, seguido del tratamiento de 100% colillas, que generó 10 g por cada 50 g de sustrato; en promedio se generaron 7 g de biomasa por cada 50 g de sustrato húmedo.

Fotografías de microscopía de barrido revelan que *P. ostreatus* modificó la composición del acetato de celulosa. Esta opción biotecnológica se propone como una alternativa para disminuir el problema de los residuos sólidos del cigarrillo.

2. Introducción

2.1 Residuos sólidos del cigarrillo.

Las colillas y filtros de cigarrillo son parte importante de los residuos sólidos que contaminan suelos y aguas superficiales, por su tamaño pueden no notarse entre la “basura”, pero su degradación en el ambiente es lenta y diariamente se desechan millones de filtros y colillas. Este residuo sólido generado es de lenta degradación en el ambiente y contiene numerosas sustancias tóxicas para el hombre y el ambiente (Kathleen, 2000). El filtro se compone de acetato de celulosa y se fabrica a partir de la pulpa de la madera, en el proceso de producción de los cigarrillos, las fibras se pegan entre sí con triacetina, un agente endurecedor que proporciona rigidez al filtro (British American Tobacco Caribbean & Central América, 2008).

En cada cigarrillo se encuentran numerosos compuestos que son retenidos por el filtro para evitar que lleguen a los pulmones de los fumadores. En el tabaco procesado y en el humo desprendido se mencionan *hidrocarburos aromáticos policíclicos*: benzopireno. *Nitrosaminas*: nitrosodimetilamina, nitrosopirrolidina, nitrosodietanolamina, nitrosonornicotina, 4-(metilnitrosamina)-1-(3-piridil)-1-butarona, nitrosomorfolina. *Aldehídos*: formaldehído, acetaldehído, crotonaldehído. *Compuestos orgánicos miscelaneos*: 1,1-dimetilhidrazina, etilcarbamato. *Sustancias inorgánicas*: hidracina, arsénico, níquel, cromo, cadmio, plomo, entre otros (British American Tobacco Caribbean & Central América, 2008).

El problema de contaminación es más grave cuando el fumador no dispone de un contenedor adecuado para desechar el filtro, generando un impacto negativo en el medio ambiente. Los mayores puntos de contaminación por colillas de cigarrillo son las zonas urbanas, principalmente calles, áreas verdes y casi cualquier sitio donde afectan no solo el paisaje sino que se acumulan en suelos y aguas superficiales. Consideremos que en 2009, la Encuesta Global de Tabaquismo en Adultos (GATS por sus siglas en ingles) revela que en México existen cerca de 10.9 millones de fumadores adultos, de los que 8.1 millones son hombres y 2.8 millones son mujeres. El 99% de los hombres y el 96% de las mujeres fuman cigarrillos obtenidos por procesos industriales. En promedio los hombres

fuman 9.7 y las mujeres 8.4 cigarrillos al día. Es inevitable pensar en otro problema asociado al tabaquismo: las colillas y filtros de cigarrillo.

2.2 Biología de los hongos basidiomicetos.

La evolución ha adaptado organismos a diversos ambientes, entre ellos, los hongos basidiomicetos que son capaces de crecer y degradar materiales constituidos por celulosa, hemicelulosa y lignina (Marzullo *et al.*, 1995). Producen un conjunto de enzimas extracelulares para metabolizar la lignina que les confiere, también la capacidad de degradar un amplio abanico de contaminantes. La aplicación de estos hongos para tratar y recuperar espacios contaminados tiene un interés creciente (Martín *et al.*, 2004). Lo que permite considerar a los filtros de cigarrillo como un sustrato idóneo para el crecimiento de estos hongos.

Estos hongos lignícolas, saprofitos, se reproducen por esporas de origen sexual y asexual y se nutren por absorción. Los cuerpos fructíferos de los hongos son generalmente blandos y crecen en suelos con alto contenido de materia orgánica y humedad (Garcés *et al.*, 2005). Una característica relevante de los hongos es que degradan la lignina, un polímero polifenólico heterogéneo que es uno de los tres componentes de la madera. En algunos casos, el resultado final de su acción confiere una apariencia blanquecina a la madera atacada como consecuencia de la desaparición de la lignina (Martín *et al.*, 2004), de ahí que se les conozca como “hongos de la pudrición blanca”.

Se ha experimentado el empleo de este hongo para la degradación de hidrocarburos aromáticos y ya se ha demostrado su capacidad para degradar pirenos, benzoantroceno y benzopireno, y podría ser promisorio para solucionar problemas de derrames petroleros y contaminación (Wolter *et al.*, 1997).

El tipo y el alcance de la degradación por la acción de sus enzimas dependen, en parte, de parámetros físicos y químicos tales como temperatura, pH, y en especial de la composición del sustrato. Las relaciones entre las características estructurales y la degradación enzimática son necesarias no sólo para los fines comerciales y prácticos,

sino también para una mejor comprensión del mecanismo de reacción (Haigler & Weimer, 1991).

2.3 Cultivo de *Pleurotus ostreatus* y *Trametes versicolor*.

Dentro del grupo de los basidiomicetos se encuentran las especies *Pleurotus ostreatus* y *Trametes versicolor*, que por sus propiedades y antecedentes se han hecho candidatos para ser incluidos en procesos de degradación, gracias a su acción enzimática sobre diversos contaminantes y sustratos. Estos hongos producen un sistema complejo de enzimas que es denominado en forma general *celulasa*; cada sistema o complejo celulasa está compuesto de una variedad de enzimas con diferentes especificidades y modos de acción, que actúan en sinergismo para hidrolizar la celulosa (Haigler & Weimer, 1991).

Comúnmente, el cultivo de *Pleurotus ostreatus* se realiza sobre sustratos lignocelulósicos, los cuales pueden ser enriquecidos o no, y pasteurizados o esterilizados. Un medio de cultivo equilibrado es obligado para conseguir la máxima producción. Debe ser utilizado, si fuera necesario, un suplemento de microelementos críticos (Garcés *et al.*, 2005). Se requieren 17 elementos, entre los cuales, los más relevantes son: 1% de nitrógeno en peso del sustrato húmedo; fósforo, potasio, azufre y magnesio; además, se requieren en proporciones menores calcio, hierro, zinc, cobre, molibdeno y manganeso (Arenas, 1992).

Este hongo tiene la capacidad de adaptarse a numerosos sustratos y climas, y por ser comestible se ha impulsado su cultivo en diversas regiones del mundo (Guzmán *et al.*, 1993). Es bastante larga la lista de materiales que se pueden emplear como sustrato básico para la producción de *Pleurotus ostreatus* (Diwakar, 1989; Kerem *et al.*, 1992; Hincapié, 1993; Jwanny *et al.*, 1995). Debido a la producción de enzimas como fenoloxidasas (lacasa), peroxidasas, catecoloxidasas, fenolmonoxidasas, treolasas y B-1,4 exoglucanasa, el hongo degrada eficientemente los sustratos lignocelulósicos gracias a la acción celulolítica, xilanolítica y lignolítica de tales enzimas (Akhmedova, 1994).

A los hongos del género *Trametes* se les reconoce principalmente como productores de celulasas y enzimas ligninolíticas. Algunas especies como *Trametes*

versicolor, *T. trogii* y *T. gallica* son eficientes degradadores de celulosa, hemicelulosa y lignina, los tres principales componentes de la madera. Reconociendo estas capacidades de *Trametes versicolor* aún son pocos los estudios realizados para uso biotecnológico (Márquez *et al.*, 2007).

3. Antecedentes

Existen numerosos trabajos de investigación que reportan el uso de diferentes sustratos para el crecimiento del hongo *Pleurotus ostreatus*, además de que muestran los parámetros de crecimiento del organismo. Algunos de ellos han tenido como propósito, resaltar la capacidad del hongo de concentrar metales pesados y de metabolizar contaminantes ambientales, entre ellos, derivados del petróleo, a partir de lo cual concluyen que el cultivo de *Pleurotus* puede ser una alternativa para resolver problemas de contaminación.

3.1 Biotecnológicos.

- Martín *et al.* (2004), mencionan que los hongos basidiomicetos tienen la capacidad de transformar una gran variedad de compuestos orgánicos llevándolos hasta dióxido de carbono y agua propiedad que ofrece un potencial indiscutible para su utilización en procesos de tratamiento de contaminantes. Ese potencial radica fundamentalmente en su sistema enzimático (Akmedova,1994) y en su vigoroso crecimiento que les permite, a través del desarrollo de su micelio colonizar diferentes tipos de sustratos y acceder a los compuestos que constituyen las contaminaciones.
- Dávila & Vázquez-Duhalt (2006), mencionan que las enzimas ligninolíticas producidas por los hongos de la pudrición blanca (*P. ostreatus*) son catalizadores poco específicos, que incluyen peroxidasas y lacasas y que en ambos casos el mecanismo de reacción involucra la formación de radicales libres, lo que se puede interpretar como propiedades antioxidantes (Kapich, 1992); Estas dos características son muy convenientes para fines ambientales ya que esas

especies son capaces de oxidar una gran diversidad de compuestos orgánicos con estructuras químicas diversas (Sánchez, 2009; Wolder, 1997).

- Delfín & Duran (2003), observaron el crecimiento de micelio y la fructificación de *Pleurotus ssp.*, en residuos de pañales desechables. Los resultados obtenidos en la fibra de algodón confirman que la celulosa, componente mayoritario del pañal desechable, es un sustrato adecuado para el cultivo de *Pleurotus* y que se pueden lograr resultados más adecuados si se le mezcla con materiales de desecho que mejoren su estructura física y aporten lignina y nitrógeno orgánico.
- Ferrera, Lara y Sánchez (2008), probaron el potencial de ocho cepas de *Pleurotus ostreatus* para crecer en medios de cultivo y suelo adicionados con petróleo crudo ligero como fuente de carbono. Las cepas tuvieron la capacidad de formar cuerpos fructíferos hasta concentraciones de 25,000 mg/l de crudo ligero, éstos tuvieron una coloración café oscura en comparación con la típica coloración gris claro de la especie.
- González *et al.*, (2005), reportan a *Pleurotus ostreatus* como degradador del insecticida carbaryl (metil-carbamato) en cultivo líquido y sólido a diferentes concentraciones de glucosa. La degradación se registró como óptima a la concentración 100 mM de glucosa con 125 ppm de carbaryl; a concentraciones menores de glucosa no se presentó degradación significativa.
- Rodríguez (2005), reporta a *Pleurotus ostreatus* como eficaz para remover metales pesados: plomo, cadmio, cobre y cobalto. Los resultados variaron entre los metales, siendo algunos removidos en mayor cantidad que otros, los índices más relevantes fueron reportados para cobalto y cadmio, cuyas concentraciones fueron disminuyendo desde el principio hasta el final del periodo de investigación.
- Gayosso *et al.*, (2008) evaluaron la actividad enzimática de *Pleurotus ostreatus* en presencia de bifenilospoliclorados encontrando que la versátil peroxidasa fue inducida 27 veces y la lacasa fue inducida 11.4 veces, ambas a los 12 días de la inoculación; en tanto que la manganeso peroxidasa no registró inducción. Las

actividades lacasa y versátil peroxidasa podrían estar relacionadas con la remoción de bifenilopoliclorados bajo condiciones específicas de cultivo.

- Sánchez *et al.* (2009), estudiaron el crecimiento en medio sólido del género *Pleurotus* para conocer la capacidad de degradar al insecticida endosulfan. Todas las cepas tuvieron la capacidad de crecer en presencia del insecticida, pero se presentó una reducción en la velocidad de crecimiento. Se redujo el contenido inicial de endosulfan de un sustrato contaminado al crecer y fructificar en el.
- Fazaeli *et al.* (2003), reportaron que el tratamiento de materiales lignocelulósicos con *Pleurotus ostreatus* ocasiona cambios en la composición química, reduciendo las fracciones fibra detergente neutro, fibra detergente ácido, celulosa y hemicelulosa.
- Márquez *et al.* (2007) concluyen que se observó que *Trametes versicolor* produce mayor cantidad de xilasas que *Pleurotus ostreatus* con valores similares de tiempo de fermentación en cultivo sólido, lo que permite considerar con potencial a esta especie de hongo para producir enzimas con posible aplicación comercial.

3.2 Medicinales y terapéuticos.

En el micelio y en los cuerpos fructíferos de *P. ostreatus* y *T. versicolor* se han descubierto moléculas benéficas para el hombre, con propiedades antitumorales y antioxidantes entre muchas otras, lo que concede importancia a su micelio y cuerpos fructíferos para su posible utilización en tratamientos o extracción de sustancias activas, lo cual podría lograrse a partir de la biomasa generada en la degradación de las colillas. Entre sus características destacan:

- *Trametes versicolor* tiene propiedades antitumorales en animales con diferentes tipos de cáncer. El extracto de este hongo llamado Krestín Polisacárido (PSK) actúa directamente sobre células tumorales, así como indirectamente elevando los niveles de inmunidad celular. Se ha comprobado también su capacidad como inhibidor en el crecimiento de tumores, en algunos casos evitando la metástasis.

Contiene varios tipos de estantinas que previenen el incremento de colesterol (Hobbs, 1986).

- *Pleurotus ostreatus* presenta la mayoría de los aminoácidos esenciales y minerales, contiene vitaminas como la tiamina (B1), riboflavina (B2), ácido ascórbico, ácido nicotínico y ácido pantoténico; además de ácido fólico, tocoferol, piridoxina, cobalamina y provitaminas como ergosterina y carotenos (Hincapié, 1993).
- En los cuerpos fructíferos de *Pleurotus ostreatus* se encontró un inhibidor competitivo de la enzima 3-hidroxi-3metil-glutonnil coenzima A reductasa, que baja el colesterol de la sangre (Gunde, 1995).

4. Justificación

Sin duda uno de los grandes retos de la humanidad en este siglo XXI, es el de convertir los procesos productivos en procedimientos limpios y eficientes energéticamente. La investigación deberá estar enfocada a la utilización de nuevas herramientas biotecnológicas para la prevención, control y remediación de los contaminantes ambientales. En este trabajo se analiza la posibilidad de utilizar los sistemas enzimáticos de hongos basidiomicetos para la degradación primaria de colillas de cigarrillo que conlleve a una reducción o a la eliminación de su impacto ambiental.

Las colillas son parte de los contaminantes tóxicos para el suelo y las aguas superficiales de zonas urbanas debido a que se desechan en cualquier lugar y sin control alguno, además de que su degradación natural es lenta. Se genera un impacto ambiental negativo cuando los fumadores desechan los filtros en cualquier sitio dado que no encuentran recipientes adecuados para hacerlo, a lo que se agrega que no existe procedimiento para el manejo de separación de colillas. La educación ambiental y el uso de la biotecnología ambiental ofrecen la posibilidad de realizar estudios básicos y aplicados encaminados a reducir este impacto negativo. Es por esto que para cualquier país que busque tener un desarrollo sustentable e impulsar soluciones a la contaminación, es necesario desarrollar investigaciones relacionadas con el tratamiento

de los desechos. Se propone la utilización de las colillas de cigarrillo como sustrato para el cultivo de los hongos *Pleurotus ostreatus* y *Trametes versicolor* como una alternativa para realizar un ciclo integral de manejo separado y tratamiento de los residuos sólidos del cigarrillo. En la Facultad de Estudios Superiores Iztacala hay la determinación de procurar el mejor tratamiento para el manejo y tratamiento adecuados de los residuos, a la vez que promover la educación ambiental en la población del plantel, para contribuir a dicho fin se tratará de mantener la permanencia de contenedores específicos para el desecho de las colillas. Adicionalmente se obtendrán las características del crecimiento en laboratorio y las ventajas e inconvenientes del cultivo de estos hongos en colillas de cigarrillo.

5. Hipótesis

- ❖ Debido a que los componentes mayoritarios de los filtros de cigarrillo son la celulosa y el acetato de celulosa, y que los principales sustratos de los hongos basidiomicetos contienen celulosa, hemicelulosa y lignina, el crecimiento micelial de los hongos será positivo en las colillas y las condiciones de incubación permitirán invadir el sustrato y degradarlas por la acción de sus complejos enzimáticos.

6. Objetivos

General

Determinar la degradación de los filtros de cigarrillo con el crecimiento del micelio de *Pleurotus ostreatus* (Jacq: Fr.) Kumm y *Trametes versicolor* (L.: Fr.) Pilát.

Particulares

- ❖ Implementar un manejo separado de las colillas de cigarrillo en el campus de la Facultad de Estudios Superiores Iztacala.
- ❖ Evaluar la capacidad de *P. ostreatus* para crecer en cultivo líquido del remanente de colillas.

- ❖ Conocer la apariencia del acetato de celulosa antes y después del tratamiento por medio de microscopía electrónica de barrido (MEB).
- ❖ Obtener un registro fotográfico de esta investigación.

7. Materiales y método

7.1 Instalaciones.

La investigación se realizó en las instalaciones de la UNAM FES Iztacala, en el espacio denominado Planta piloto y laboratorio para la enseñanza en la producción de hongos comestibles y medicinales cultivados del área de proyectos productivos del jardín botánico. Se utilizaron las áreas de esterilización y siembra, incubación y fructificación.

7.2 Obtención de colillas.

Se colocaron 140 contenedores diseñados y contruidos para la colecta de colillas, en lugares específicos del campus, en paralelo con la difusión del proyecto para el reciclaje de filtros de cigarrillo: 'BioSoluciones' se participó en eventos de la facultad y en espacios ambientales y de salud. Se monitorearon los contenedores para conocer su efectividad y/o defectos.

7.3 Propagación de las cepas y obtención de micelio activado.

El micelio de las cepas se obtuvo a partir de medio de cultivo en agar papa dextrosa (PDA) de las instalaciones de la UNAM campus Iztacala, llevándose a cabo su propagación en frascos con 500g de semilla de sorgo como sustrato, en los que se obtuvo el micelio activado (el micelio activado permite un crecimiento vigoroso) de los hongos que se usó como inóculo en los tratamientos. Los frascos se esterilizaron en autoclave a 121°C y 15 lb. /pulg² durante 40 min, con 4 días de prueba de esterilidad; posteriormente se llevaron a la cámara de siembra donde se inocularon con los mecheros encendidos y luz ultravioleta, a una tasa de inoculación del 10% en peso. Las condiciones de incubación fueron: temperatura de 20 a 28° C, fotoperiodo de 24 horas de oscuridad, el

área se mantuvo limpia durante todo el proceso. Se revisó y llevó un registro del desarrollo del micelio hasta obtener la invasión total del sustrato (Sánchez, 2002).

7.4 Preparación del sustrato y siembra.

El diseño experimental consistió en la elaboración de 3 bioensayos con 3 tratamientos y un control, cada uno con 4 repeticiones. Las colillas se hidrataron en agua destilada en frascos independientes durante 24 horas, al siguiente día se depositaron en rejillas durante 10 minutos para escurrirlas, pesarlas, envasarlas y hacer las mezclas. Los tratamientos fueron mezclas de colillas de cigarrillo y paja de trigo formando sustratos de 50 g por cada unidad experimental: El tratamiento A fue de 100% filtros de cigarrillo; el B tuvo 75% de filtros y 25% de paja y, el tratamiento C tuvo 50% de filtros y 50% de paja. El grupo control consistió sólo en paja de trigo.

Cada tratamiento se colocó independientemente en bolsas de polipapel, las bolsas se introdujeron en la autoclave a 121°C y 15 lb. /pulg² durante 40 min, con 4 días de prueba de esterilidad. Posteriormente se llevaron a la cámara de siembra con los mecheros encendidos y luz ultravioleta para la inoculación. Se determinó el pH inicial y final de los sustratos en solución al 10% en agua destilada utilizando un potenciómetro ORION modelo 720 A.

La siembra se realizó distribuyendo homogéneamente el micelio activado en todo el volumen de sustrato, en condiciones de asepsia. Al realizar la siembra se tuvo especial cuidado en la preparación del sustrato verificando que se encontrara a temperatura ambiente y que los granos de sorgo quedaran colocados lo mas equidistantes que se pudiera para que el micelio de cada grano tuviera que colonizar a la mínima distancia posible. Se utilizó una taza de inoculación del 10% (Sánchez, 2002). Posteriormente se trasladaron las unidades experimentales al área de incubación, colocando aleatoriamente las bolsas dentro de la incubadora.

7.5 Incubación.

La incubación fue la etapa que permitió la invasión del micelio en el sustrato. Se mantuvo la temperatura de 20 a 28°C, manteniendo el área limpia durante todo el

proceso. Se revisó y registró periódicamente el desarrollo del micelio. Una vez concluido el tiempo de incubación, que se determinó por ausencia visible del sustrato, se registraron los periodos de invasión del sustrato y formación de primordios, así como la temperatura y el pH. Finalmente se trasladaron las bolsas a los anaqueles del área de fructificación.

7.6 Fructificación y cosecha.

En el cultivo de *Trametes versicolor* no aparecieron primordios ni cuerpos fructíferos. En todos los tratamientos con *Pleurotus ostreatus* se observó la presencia de primordios por lo que se perforaron las bolsas de plástico y se expusieron a la luz solar en el área de fructificación que se mantuvo en las condiciones descritas por Sánchez & Royse en 2002, para la producción de cuerpos fructíferos, que consisten en fotoperiodo de 12 horas de luz natural / 12 horas de oscuridad, humedad relativa superior a 50%, ventilación tres veces al día y temperatura de 20-28°C.

La cosecha de los cuerpos fructíferos se realizó manualmente en la madurez de los hongos que se determinó observando que no se presentara el píleo totalmente plano o comenzara a enrizarse hacia arriba. Para la cosecha se utilizó un cuchillo sumergido en agua clorada, cortando la base del estípite justo en la base del tallo en la unión con el sustrato.

7.7 Tratamiento de datos.

Los valores resultantes del cultivo fueron tratados por ANOVA factorial en el software Microsoft Excel Mac 2011. Algunas variables consideradas para la comparación de los tratamientos fueron las mismas utilizadas por Salmones *et al.*, y Bautista *et al.*, en 2003, al estudiar la interacción entre el crecimiento micelial y la productividad de *Pleurotus sp.*, y la evaluación de la producción sobre paja de trigo como sustrato, donde determinaron el tiempo de incubación, los días requeridos para la formación de primordios y el número de cosechas. Otro parámetro considerado en nuestro estudio fue la eficiencia biológica (EB) que se determinó como la relación entre el peso fresco de los carpóforos y el peso seco del sustrato expresado en porcentaje. El peso seco del sustrato se obtuvo pesando consecutivamente los sustratos después de sacarlos de una estufa, hasta registrar un peso constante.

El tamaño de las fructificaciones se aplicó con base en el criterio de Sihuana *et al.*, 2009, en que se clasifica el diámetro del píleo de los cuerpos fructíferos adultos en cuatro grupos, G1: menores de 5 cm, G2: 5 a 9.9 cm, G3 10 a 14.9 cm, G4 15 cm o más. Los cuerpos fructíferos obtenidos fueron pesados y fotografiados. Se les mantiene almacenados a baja temperatura para un futuro estudio del análisis de su composición química.

7.8 Fotografías de la degradación física del sustrato.

Se tomaron fotografías de microscopia electrónica de barrido MEB con el equipo Oxford Instruments INCA x-sight JEOL JSM 6380LV de la Unidad de Biotecnología y Prototipos de la Facultad de Estudios Superiores Iztacala, antes y después del cultivo con los hongos, con la finalidad de conocer y detectar cambios en la apariencia del sustrato.

7.9 Cromatografía de gases.

El lixiviado de la hidratación de las colillas fue utilizado como cultivo líquido para conocer la capacidad de *P. ostreatus* de crecer sobre él. Se analizaron las muestras del lixiviado antes del cultivo, por medio del cromatógrafo de gases Agilent Technologies 6850 network GC system para conocer la presencia/ausencia específicamente del benceno, nicotina y otros hidrocarburos aromáticos policíclicos HAP que han sido descritos como componentes de las colillas de cigarrillos (British American Tobacco Caribbean & Central América, 2008).

El pH inicial y el pH final del lixiviado fue registrado directamente del cultivo líquido, utilizando el mismo potenciómetro mencionado para la lectura de los sustratos.

MATERIALES Y MÉTODO	
MATERIAL DE PARTIDA	
Micelio vegetativo en agar papa dextrosa (caja petri) Áreas de esterilización y siembra, incubación y fructificación	
OBTENCIÓN DE COLILLAS	
140 contenedores durante 2 años	
PREPARACIÓN DE INOCULO ACTIVADO	
Frascos con 500g de sustrato (semilla de sorgo) Autoclave 121°C y 21lb./pulg2, durante 40 minutos 4 días de prueba de esterilidad Taza de inoculación del 10%	
TRATAMIENTOS	
A= (100% Colillas) B= (75% Colillas, 25% Paja de trigo) C= (50% Colillas, 50% Paja de trigo) CONTROL= (100% Paja de trigo)	
SIEMBRA	
Taza de inoculación del 10% Cámara de siembra Luz ultravioleta y mecheros	
CRECIMIENTO DEL MICELIO	
Oscuridad 24hrs. Temperatura 20 - 28 °C. pH cercano a 7 Fotografías del sustrato a los 7 y 28 días Tiempo de invasión del sustrato (días)	
FRUCTIFICACIÓN	
12hrs. luz - 12hrs. Oscuridad. Temperatura 20 - 28°C, pH cercano a 7. Diámetro del píleo y fotografías del sustrato a los 70 días.	
Eficiencia Biológica (%)	Peso fresco de los carpoforos / peso seco del sustrato X 100
Producción de biomasa (g)	Peso fresco de los carpoforos de todas las cosechas
Tiempo hasta la fructificación (días)	Días transcurridos hasta la aparición de primordios
Ciclo del cultivo (días)	Días transcurridos desde la aparición de primordios hasta la ultima cosecha
Conservación de los cuerpos fructíferos a baja temperatura	
ANÁLISIS DEL SUSTRATO	
Fotografías de Microscopia Electrónica de Barrido (MEB) Peso final del sustrato (g) Reducción de masa del sustrato (%)	
CRECIMIENTO EN LIXIVIADO	
Oscuridad 24hrs. Temperatura 20 - 28°C Fotografías a los 13 días	
ANÁLISIS DEL LIXIVIADO	
Cromatografía de gases	

8. Análisis y discusión de resultados

En el presente trabajo de investigación se estudió la capacidad de *Pleurotus ostreatus* y *Trametes versicolor* para crecer y degradar las colillas de cigarrillo. Los resultados que a continuación se describen se realizaron con base en metodologías publicadas. La discusión y los resultados de este trabajo abordan de una manera general a los residuos sólidos del cigarrillo.

8.1 Contaminación por colillas y situación en México.

Cualquier país interesado en el desarrollo sustentable y la disminución de la contaminación deberá realizar investigación y mostrar interés en las alternativas de biorremediación y degradación de residuos sólidos.

En la actualidad, y ante la problemática ambiental que sufre nuestro planeta, es necesario impulsar soluciones reales que ofrezcan la mitigación o disminución de contaminantes y/o permitan la reintegración de éstos al medio ambiente, mediante la investigación científica y tecnológica, y a través de procesos biotecnológicos. Del total de los residuos sólidos generados en las ciudades, aproximadamente 40%, son materiales celulósicos o lignocelulósicos, que en su mayoría no reciben tratamiento (Osorio, 2007).

En México no existe una cultura que contemple la contaminación por colillas de cigarrillo y que permita aplicar al menos una alternativa de tratamiento para estos residuos, las colillas desechadas en la vía pública son conducidas por el agua y el viento hacia alcantarillados y las colillas provenientes de los hogares son transportadas con el resto de “la basura” a rellenos sanitarios o basureros municipales. En el 2009, la encuesta Global de Tabaquismo en Adultos (GATS) reveló que en México existen cerca de 10 millones de fumadores, el 7.6% de éstos equivale a 760 000 habitantes que fuman diario y en promedio consumen 9 cigarrillos por día, totalizando el consumo de solo estos fumadores, el desecho diario de colillas equivaldría a cerca de 6,840.000.

En otros países como España, La Asociación Española Contra el Cáncer (AECC) afirma que cada año se tiran 4.5 billones de colillas y que es la parte mas toxica del

cigarro. Según el Ministerio de Salud de Argentina es la principal causa de contaminación en el mundo. México no es la excepción, puede notarse en casi cualquier sitio el gran desecho de colillas, sin que haya un lugar adecuado y específico para depositarlas. También en México y en otros países se han dictado leyes que prohíben fumar en espacios públicos cerrados, lo que ha provocado que los negocios destinen áreas específicas al aire libre para fumadores, lo que da lugar a la concentración de filtros de cigarrillo en esos sitios, comportamiento que favorece su acopio.

8.2 Manejo separado de colillas 'Proyecto BioSoluciones'.

La persistencia de la recolección de colillas en la FES Iztacala contribuirá a disminuir la contaminación ambiental local. La disponibilidad de colillas de cigarrillo no se limita a la FES Iztacala, sino que es un problema de todas las zonas urbanas, lo que puede servir como un soporte que respalde la utilización de los filtros de cigarrillo como un sustrato para el crecimiento del hongo *Pleurotus ostreatus* como parte de un tratamiento primario que haga que su degradación sea más rápida. La participación en eventos ambientales permitió al autor del estudio dar a conocer esta alternativa de degradación de colillas a la población del *campus*, a la vez que le condujo a recopilar una base de datos de cerca de 500 correos electrónicos para difundir la información del proyecto sin tener la necesidad de imprimir demasiados medios de información (Figura 1).



Figura 1. Exposición de reciclaje de materiales en el día mundial del medio ambiente del *campus*

Los contenedores ayudaron a separar los filtros de cigarrillo de manera específica, gracias a su diseño que no permite el depósito de otra clase de “basura”. Durante el desarrollo del proyecto ‘Biosoluciones’ se acopiaron 8 kilogramos de colillas. Se diseñaron, construyeron, distribuyeron y monitorearon los 140 contenedores, revisándolos frecuentemente para la separación de otros residuos depositados en ellos, fue parte del proyecto la preparación y esterilización de los sustratos para el crecimiento de los hongos (Figura 2).

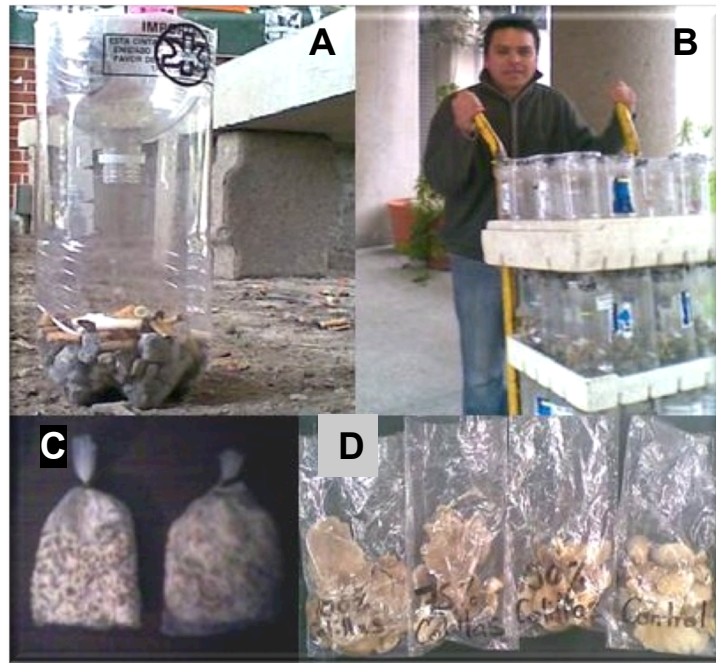


Figura 2. A: Diseño del contenedor para colillas; B: Distribución de los contenedores; C: Bolsas con sustrato y D: Hongos cosechados

La experiencia en el manejo de colillas permitió constatar que la permanente difusión de este proyecto ayudaría a la separación de colillas del *campus*, además de fortalecer la cultura del reciclaje en las nuevas generaciones de estudiantes. Por otro lado, aún falta mucho para encontrar y aplicar tratamientos que ayuden a la disminución de contaminantes sólidos en el ambiente, por lo que es claro que falta investigación y apoyo para lograr un manejo integral de las colillas de cigarrillo y otros residuos sólidos en la FES Iztacala.

8.3 Cultivo de los hongos en colillas de cigarrillo.

El crecimiento de los hongos en los filtros de cigarrillo fue positivo en todas las unidades experimentales de todos los tratamientos, lo que permite extender la posibilidad de utilizar sustratos contaminantes con contenidos de celulosa, materia orgánica e inorgánica para degradarlos más rápido que en forma natural en el ambiente. Los parámetros de crecimiento de los hongos se registraron desde el inicio hasta el final del cultivo. La temperatura tuvo una media de 26°C, mientras que la humedad relativa una media del 57%. El pH inicial un promedio de 7.69 y el final un promedio de 7.14. Estos parámetros son similares a los reportados por Sánchez & Royse en 2002 para el crecimiento de estos hongos en diferentes sustratos. El peso seco del sustrato tuvo una media de 21 g.

Se registraron diferencias en el tiempo de invasión del sustrato, encontrando que *P. ostreatus* invadió totalmente el sustrato a los 8 días y tuvo la capacidad de fructificar, en tanto que *T. versicolor* invadió el sustrato a los 15 días de haber sido inoculado pero en este cultivo no se obtuvieron primordios ni fructificaciones. El micelio de *P. ostreatus* no presentó contaminación por microorganismos competidores durante el proceso, en contraste, el micelio de *T. versicolor* presentó al cabo de 22 días contaminación por otro microorganismo (Figura 3).

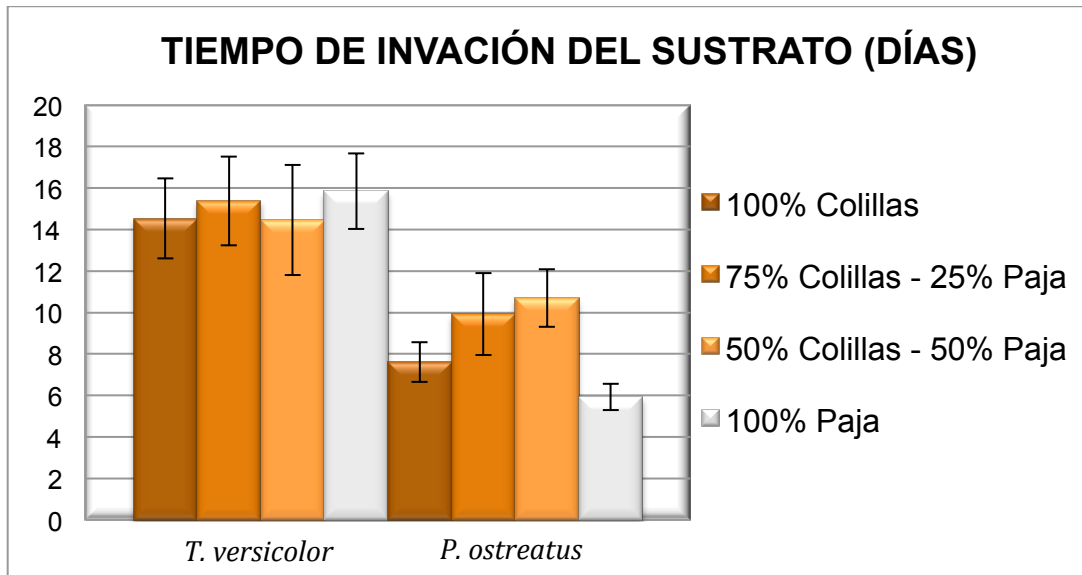


Figura 3.- Tiempo en días de la invasión del sustrato por especie

Debido a que el micelio de *T. versicolor* presentó contaminación en todas las unidades experimentales, el experimento se suspendió una vez que se tomó nota del tiempo de invasión del sustrato. Se puede suponer que *T. versicolor* necesita un sustrato más específico para su crecimiento y fructificación y/o es poco resistente a los compuestos tóxicos de las colillas.

La celulosa y el acetato de celulosa de los filtros de cigarrillo son afectados por las enzimas de los hongos, comenzando la degradación por el papel de celulosa que recubre a los filtros y afectando después al acetato de celulosa. El peso seco de una colilla se redujo al cabo de 70 días de tratamiento en un 18% con *Pleurotus* y en un 14% con *Trametes*, lo que indica un avance en la degradación de estos residuos a compuestos más simples (Figuras 4 y 5).



Figura 4. Estado de las colillas de los 8 a los 70 días de tratamiento.
Arriba: tratamiento con *P. ostreatus*, Abajo: tratamiento con *T. versicolor*



Figura 5. Comparación de la vista superior de una colilla de cigarrillo después del tratamiento con *Pleurotus ostreatus*

Al cabo de 100 días y una vez que se deshidrataron, se pesaron los sustratos remanentes encontrando que los pesos de los diferentes tratamientos no variaban significativamente (ANOVA $\alpha=0.05$ Probabilidad=0.49), pesando en promedio 37.06 g de sustrato y ± 3.45 de desviación estándar (Figura 6).

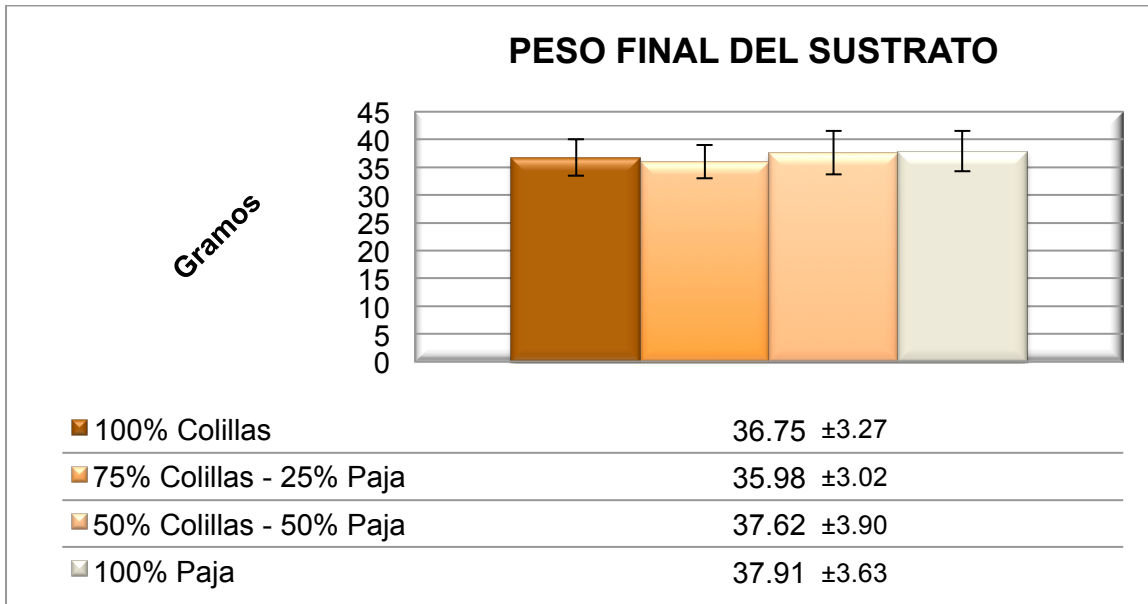


Figura 6. Pesos finales de los sustratos remanentes (gramos)

La diferencia de peso entre el peso inicial de los sustratos equivale porcentualmente a una reducción del sustrato del 18% en promedio con ± 1.73 de desviación estándar (Figura 7), lo que representa un avance en el manejo y degradación

de las colillas, considerando que éstas son desechadas incontroladamente y que su degradación en el ambiente es lenta (Kathleen, 2000).

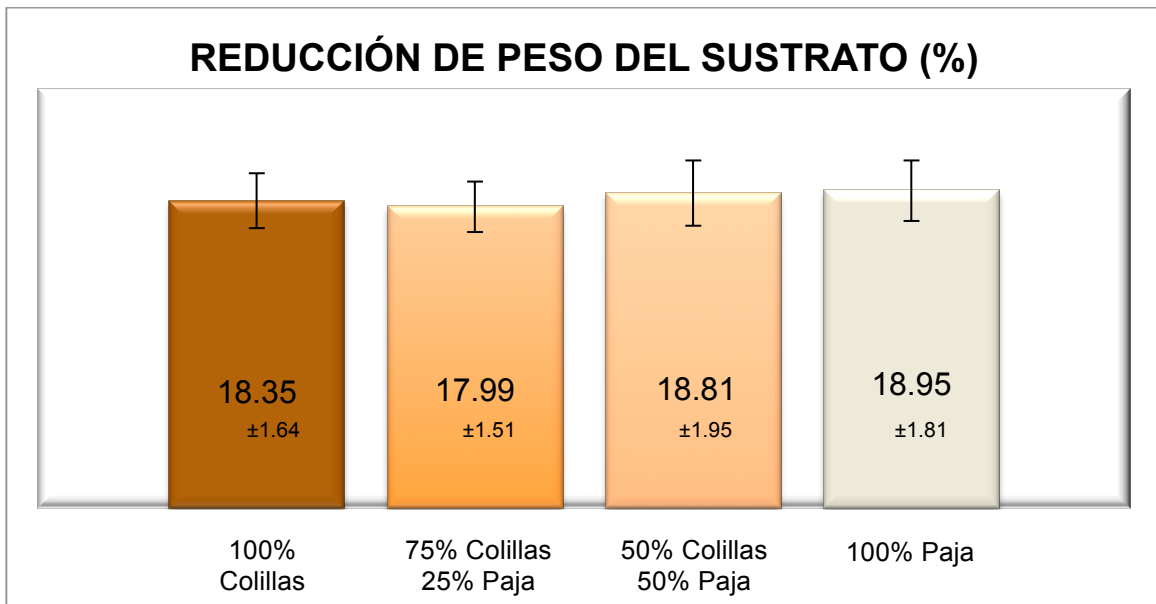


Figura 7. Porcentaje de reducción de peso por tratamiento

En este trabajo se observó que la especificidad del sustrato no fue determinante ni en el desarrollo del crecimiento de *P. ostreatus* ni en el proceso de degradación, lo que permite considerar adecuado al tratamiento del sustrato con 100% colillas.

8.4 Microscopía electrónica de barrido del sustrato.

Se tomaron fotografías en microscopía electrónica de barrido (MEB) a 500X para conocer la apariencia estructural del acetato de celulosa pre y post tratamiento de 100% de colillas, en que se cultivaron las dos cepas. En cuanto a la apariencia general del acetato de celulosa, se puede observar que éste es fibroso, cada fibra en forma de triplete, con espacios entre ellas. Fazaeli *et al.*, en 2003 mencionan que *P. ostreatus* puede cambiar la composición química estructural del sustrato en que crece, reduciendo las fracciones fibra detergente neutro, fibra detergente ácido, celulosa y hemicelulosa. Para confirmar esta aseveración se realizaron observaciones en el microscopio de barrido en las que se observa el acetato de celulosa sin tratamiento y el acetato de celulosa después de 70 días de tratamiento con los hongos (Figura 8).

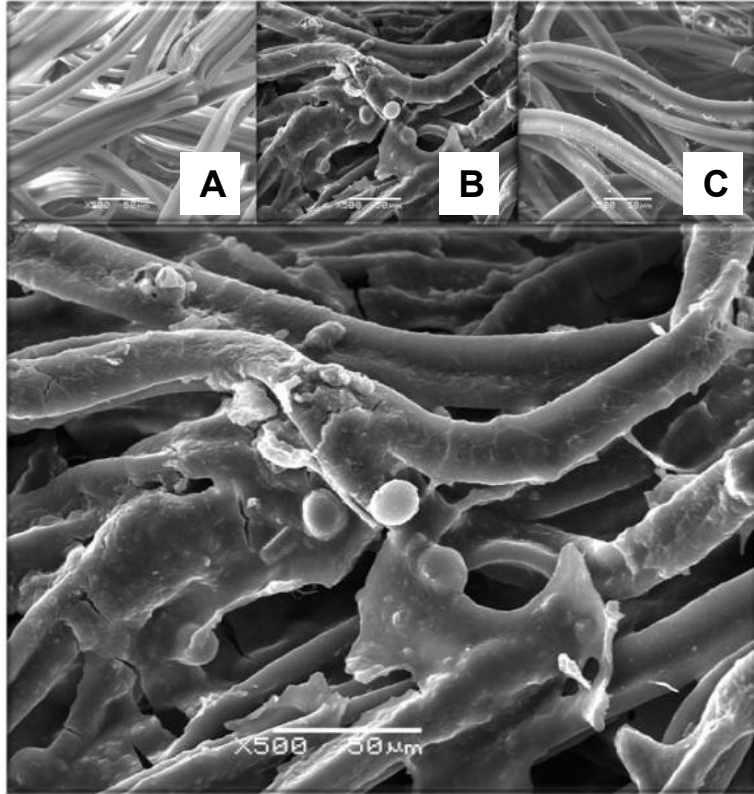


Figura 8. Fibras de acetato de celulosa a los 70 días de tratamiento, donde A: Sin tratamiento; B: cultivo de *Pleurotus ostreatus* y C: cultivo de *Trametes versicolor*
Abajo: Ampliación del resultado del cultivo de *P. ostreatus*

Se observa que la apariencia del acetato de celulosa es afectada de alguna manera en el cultivo con *P. ostreatus*, en tanto que no es afectada en el cultivo de *T. versicolor* (no hubo fructificación, sólo crecimiento de micelio). Hay que considerar que la degradación enzimática es afectada significativamente por los rasgos estructurales de los materiales celulósicos (Haigler & Weimer, 1991), por tanto es necesario el estudio avanzado de rasgos estructurales de las colillas.

En este experimento, el acetato de celulosa después del cultivo podría ser estudiado para medir el tiempo de degradación completa en el ambiente, esto permitiría conocer el tiempo que tardaría una colilla en degradarse después de un tratamiento primario; al resolver esta pregunta, y de contestarse con una reducción significativa en el tiempo de degradación, podría proponerse la instalación de una planta de tratamiento para las colillas. El cultivo de *P. ostreatus*, es actualmente un procedimiento accesible y

económico, que sólo requiere contar con las condiciones básicas de invernadero. Profundizando aún más en esta problemática, se podrían utilizar las colillas inoculadas como un vehículo para introducirlas en rellenos sanitarios y facilitar la degradación de la materia orgánica, ayudando a la vez a la restauración de esos sitios.

8.5 Fructificación de *Pleurotus ostreatus*.

Las fructificaciones de *P. ostreatus* se manifestaron en todos los tratamientos a los 25 días en promedio, periodo similar a lo señalado por Sihuanca *et al.* en 2009, quienes registran la aparición de fructificaciones de *Pleurotus* a los 22 días en sustrato de paja de cebada (Figura 9).



Figura 9. Arriba: invasión de micelio a las colillas, a los 8 días
Abajo: fructificación de *Pleurotus* en el sustrato 100% colillas, a los 25 días

En cuanto al tiempo de formación de primordios, no hubo diferencias significativas entre los tratamientos ± 1.96 de desviación estándar (ANOVA $\alpha=0.05$ Probabilidad=0.42), encontrándose que en promedio, la formación de primordios ocurrió a los 25 días de la inoculación (Figura 10).

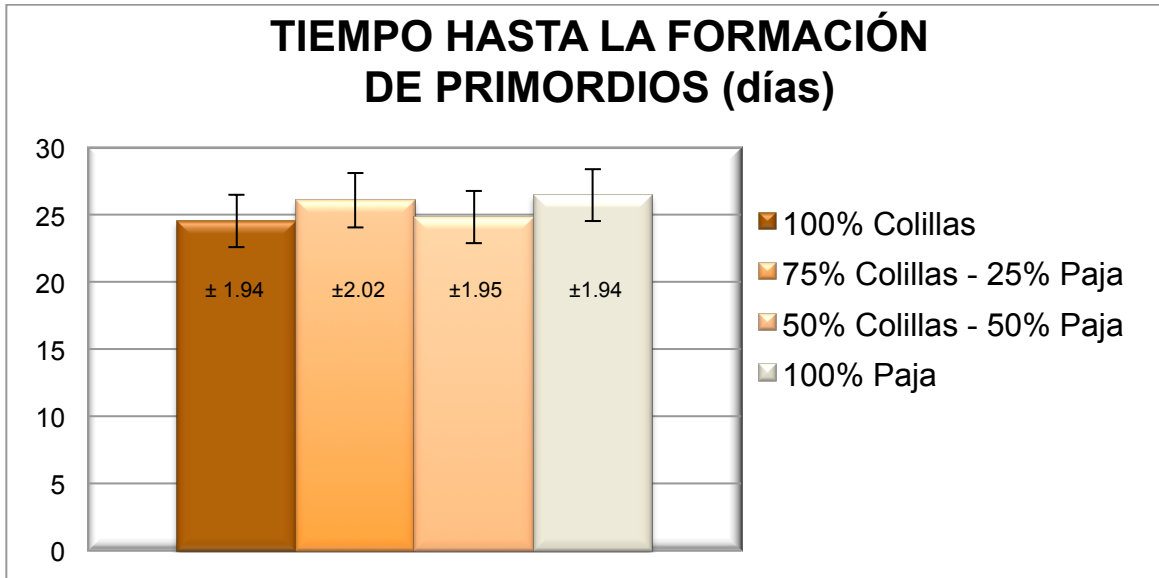


Figura 10. Tiempo que llevó la formación de primordios en los diferentes tratamientos

Entre los tratamientos no existen diferencias significativas, lo que indica que *P. ostreatus* puede ser cultivado en 100% colillas sin necesidad de utilizar paja de trigo, sin embargo, no se descarta la posibilidad de hacer mezclas con otros residuos lignocelulósicos. Es bastante larga la lista de materiales que se pueden emplear como sustrato básico para la producción de *P. ostreatus* (Diwakar, 1989; Kerem *et al.*, 1992; Hincapié, 1993; Jwanny *et al.*, 1995, y muchos más). Aproximadamente el 40% de los residuos de las ciudades son materiales celulósicos o lignocelulósicos, que en su mayoría no reciben tratamiento (Osorio, 2007).

La capacidad de crecimiento de *Pleurotus ostreatus* en colillas, indica que este hongo tiene las condiciones para crecer y degradar estos residuos. En todas las unidades experimentales invadió totalmente el sustrato, lo que permite considerar utilizarlas en su propia degradación sin usar paja y/o el mezclar colillas con otros residuos urbanos, como por ejemplo pañales desechables. Delfín & Durán (2003) obtuvieron crecimiento micelial y primordios en desechos de pañales desechables y pasto de poda, concluyendo que se pueden obtener mejores resultados con la adición de algún nutriente y/o determinar mezclas de sustratos de manera específica para la degradación de estos residuos sólidos (Figura 11).



Figura 11. Crecimiento micelial y fructificaciones en sustratos con contenidos de pañales desechables y pasto de poda (fuente Delfín & Durán, 2003)

Con estos antecedentes podemos corroborar que *P. ostreatus* tiene la capacidad de invadir diferentes sustratos con contenidos de celulosa. Entre las limitaciones de la degradación por los hongos, se encuentran el grado final de degradación y el tiempo requerido para alcanzarlo. En el análisis de varianza ($\alpha=0.05$ Probabilidad=0.332) de la eficiencia biológica de *P. ostreatus* se encontró que no hay diferencias significativas entre los tratamientos con un promedio de 44.81% y con ± 19.95 de desviación estándar (Figura 12).

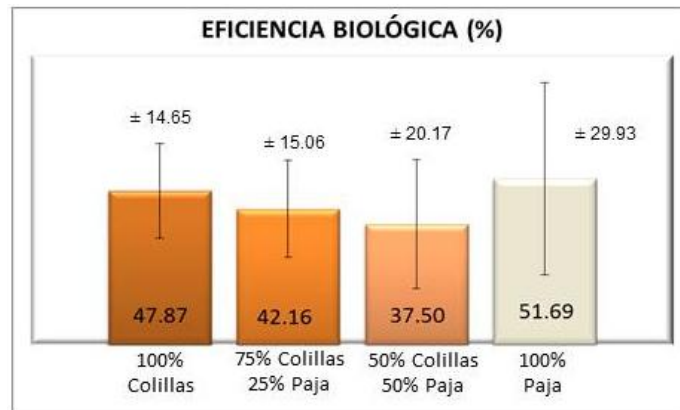


Figura 12. Eficiencia biológica de los diferentes tratamientos

Se observa que el grupo control tiene mayores valores de EB seguido del tratamiento A, lo que significa que la composición 100% filtros es adecuada para el crecimiento del hongo.

En un total de la biomasa generada (cuerpos fructíferos) por las dos cosechas se obtuvo un promedio de 14.72g por cada 50g de sustrato húmedo (Figura 13).

BIOMASA GENERADA EN EL CULTIVO DE <i>P. ostreatus</i>			
(Gramos)			
TRATAMIENTOS	1RA COSECHA	2DA COSECHA	TOTAL
A: 100% colillas	10.05 ± 3.08	5.26 ± 0.97	15.31 ± 4.05
B: 75% colillas – 25% Paja	8.85 ± 3.16	5.28 ± 0.97	14.13 ± 4.13
C: 50% Colillas – 50% Paja	7.88 ± 4.24	4.65 ± 0.97	12.53 ± 5.21
CONTROL: 100% Paja	11.36 ± 5.46	5.55 ± 0.82	16.91 ± 6.28

Figura 13. Biomasa generada a partir de 50g sustrato (peso húmedo)

El grupo control fue el que más biomasa generó: 11g por cada 50g de sustrato, seguido del tratamiento A que generó 10g por cada 50g de sustrato. Lo anterior confirma que el sustrato con 100% colillas no se diferencia significativamente del sustrato en que comúnmente se cultiva *P. ostreatus*. Se puede suponer que con la estandarización de este tratamiento se puede llegar a una buena producción de biomasa a partir de residuos sólidos del cigarrillo (Figura 14).

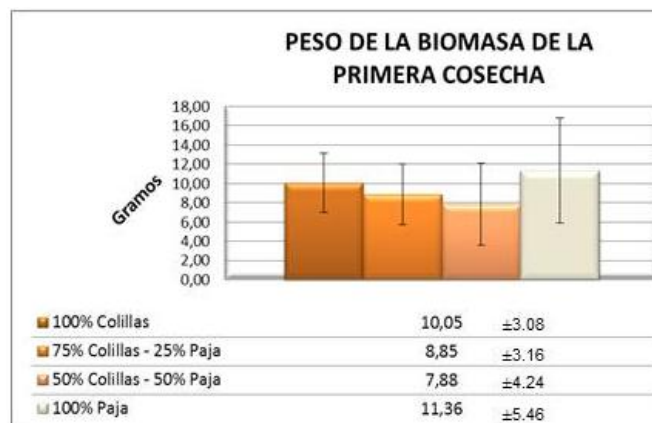


Figura 14. Biomasa generada en la primera cosecha

En el total de biomasa obtenida de la primera cosecha se registró un promedio de 9.54g con ± 3.98 de desviación estándar (ANOVA $\alpha=0.05$ Probabilidad=0.167). De la segunda cosecha se obtuvo un peso de biomasa que en promedio fue de 5.18 g con ± 0.95 de desviación estándar. En el análisis de varianza no se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos (Figura 15).

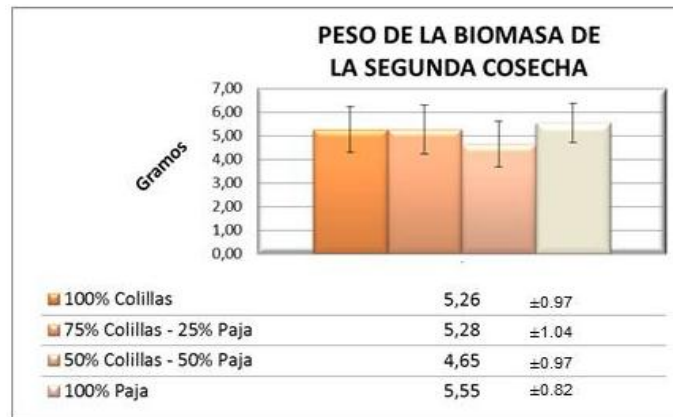


Figura 15. Biomasa generada en la segunda cosecha

En cuanto al tiempo hasta la primera cosecha no existieron diferencias significativas registrándose un promedio de 25 días con ± 1.96 de desviación estándar (ANOVA $\alpha=0.05$ Probabilidad=0.042). De igual manera, el tiempo hasta la segunda cosecha fue en promedio de 32 días con ± 1.25 de desviación estándar. No se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos. Y finalmente, el tiempo hasta el final del ciclo del cultivo fue de 70 días, sin que hubiera diferencias significativas entre los tratamientos.

Se consideró importante tomar nota del olor y color de los cuerpos fructíferos, ya que un estudio previo de Ferrera *et al.* (2008) describe los cuerpos fructíferos crecidos en suelos adicionados con petróleo crudo ligero, resaltando que se obtuvieron coloraciones más oscuras que la típica coloración de la cepa (Figura 16).



Figura 16. Fructificaciones obtenidas por Ferrera en suelos adicionados con petróleo crudo ligero. Izquierda: cultivo de *P. ostreatus* sin petróleo. Derecha: cultivo de *P. ostreatus* con petróleo crudo ligero

En este experimento son de resaltar las diferencias en la morfología del grupo control en comparación con el tratamiento 100% colillas, en este último se observa una coloración café oscura de las fructificaciones, en comparación con el típico color claro de la cepa cultivada en paja de trigo (grupo control). Estos resultados son similares a los de Ferrera aunque para considerar que las coloraciones obtenidas en este experimento se deban a la acumulación de sustancias tóxicas y/o al colorante del papel que cubre las colillas será necesario realizar estudios que ayuden a determinar estas aseveraciones (Figura 17).

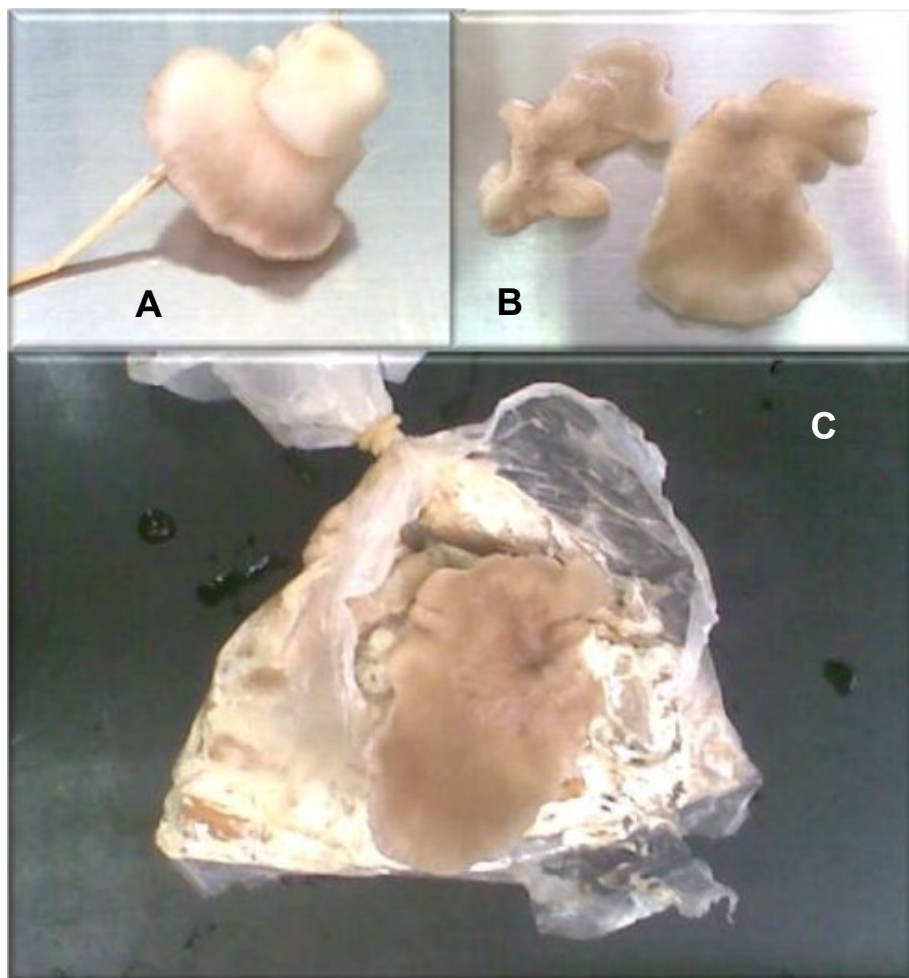


Figura 17. A: fructificaciones de *P. ostreatus* en el grupo control
B y C fructificaciones en el sustrato 100% colillas

El hecho de obtener carpóforos a partir de estos sustratos no determina la viabilidad comestible de ellos, surge por ello la necesidad de investigaciones que aborden la toxicidad de los carpóforos.

Sin embargo el crecimiento micelial de los hongos en las colillas sugiere una ruta de biorremediación de suelos, por ejemplo, se ha demostrado la viabilidad de tratamientos, en condiciones naturales, depositando inóculos de estirpes miceliales en el suelo y constatando la efectividad de los mismos al obtener reducciones de hasta el 40% para diferentes moléculas de hidrocarburos aromáticos policíclicos (Martín *et al.*, 2004).

Los cuerpos fructíferos se compararon y clasificaron según Sihuana (2009), quien ordena el tamaño de los cuerpos fructíferos. En este trabajo, todos los púleos correspondieron a la clasificación G2, a excepción del grupo control que se clasificó en la categoría G4. No se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos para producir púleos (Figura 18), registrándose un promedio de 5.71cm de diámetro con ± 1.55 de desviación estándar (ANOVA $\alpha=0.05$ Probabilidad=0.240).

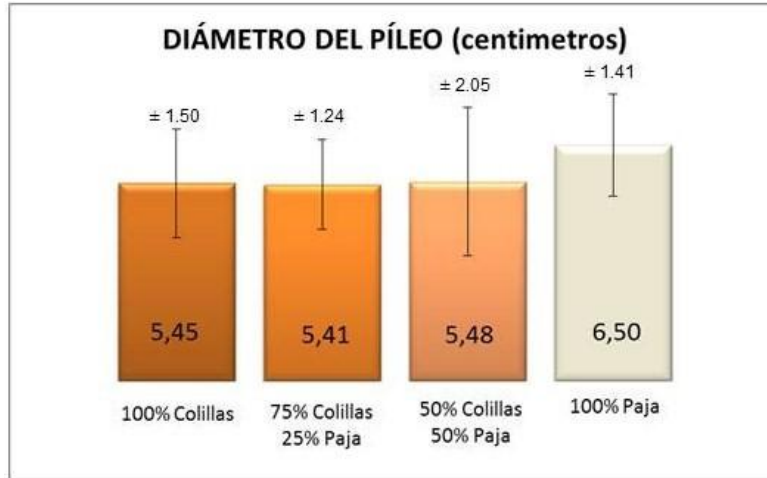


Figura 18. Diferentes diámetros del píleo resultantes de los tratamientos

Un resultado no esperado fue la formación de primordios de *P. ostreatus* en una sola colilla (Figura 19). Para el crecimiento de este hongo se requieren 17 microelementos, entre los cuales, los más relevantes son: 1% de nitrógeno del peso del sustrato húmedo; fósforo, potasio, azufre y magnesio; además, requiere en proporciones menores calcio, hierro, zinc, cobre, molibdeno y manganeso (Arenas, 1992). Por lo que es de importancia conocer la presencia atómica de los elementos presentes en las colillas, para lograr una estandarización del sustrato.

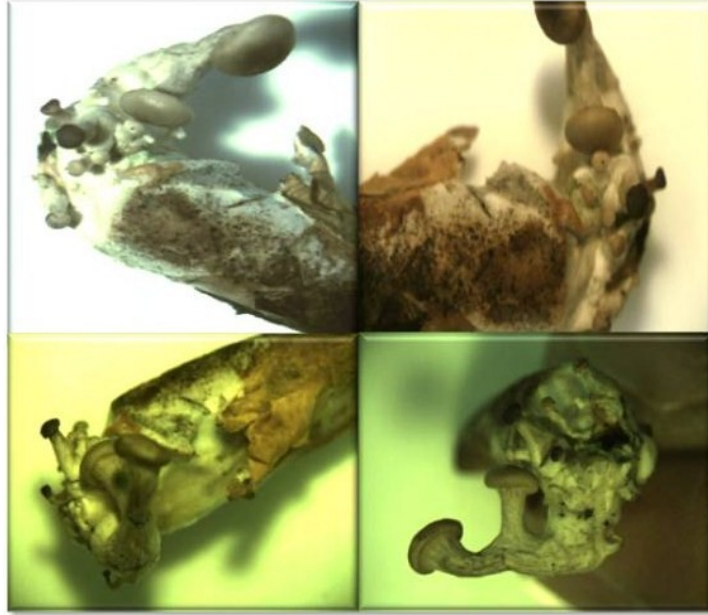


Figura 19. Fructificaciones de *P. ostreatus* en una sola colilla de cigarrillo

8.6 Análisis del lixiviado.

Se realizó un bioensayo para conocer la capacidad de *P. ostreatus* de crecer en el lixiviado de colillas. Adicionalmente se hizo una cromatografía de gases que reveló la presencia de sustancias que son trasladadas al agua cuando entra en contacto con las colillas, las más sobresalientes fueron: benceno, azabencenoazina y ácido butírico.

Pleurotus ostreatus registró crecimiento positivo e invadió totalmente el sustrato líquido a los 13 días de haberse inoculado bajo las condiciones de incubación descritas por Sánchez & Royse en 2002 (Figura 20).



Figura 20. A: Lixiviado generado por el contacto del agua con colillas
B y C: Invasión del micelio de *P. ostreatus* en el lixiviado a los 13 días de la inoculación

Los resultados anteriores muestran que *P. ostreatus* puede desarrollarse en el lixiviado resultante del tratamiento de las colillas, lo que abre otras expectativas para el tratamiento al suponerse que es posible degradar sustancias confinadas en el filtro de los cigarrillos, es decir, no sólo degradar el residuo sólido, sino residuos químicos que fueron absorbidos por el filtro al ser fumado (moléculas tóxicas y contaminantes). Lo que conduce a considerar la posibilidad de hacer estudios de la presencia y concentración específicas de sustancias tóxicas presentes en el agua que entra en contacto con las colillas. La cromatografía de gases reveló la presencia del benceno en el lixiviado antes del cultivo (Figura 21).

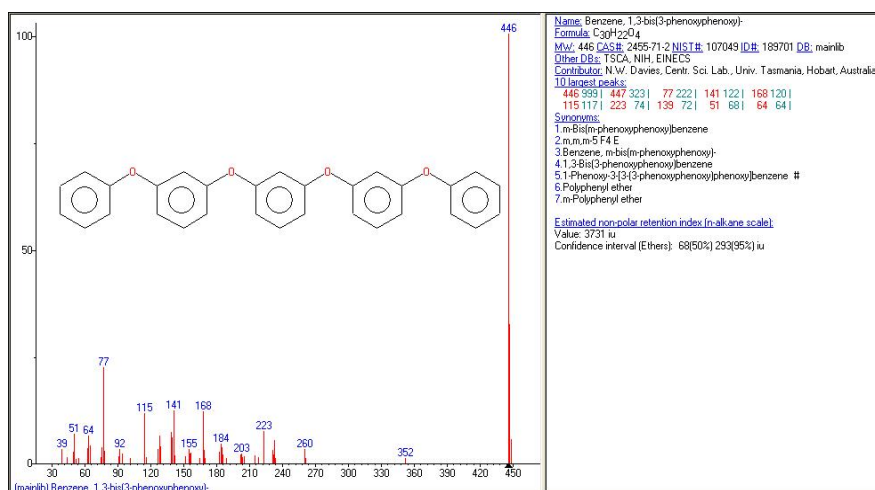


Figura 21. Molécula de benceno identificada en la cromatografía de gases antes del cultivo en el lixiviado de colillas

El benceno es un compuesto tóxico que puede absorberse a través de la piel, por inhalación ocasiona vértigo, somnolencia, dolor de cabeza, náuseas, jadeo, convulsiones y pérdida del conocimiento, puede ser carcinógena para los seres humanos. Otra sustancia contaminante que se identificó en la cromatografía de gases fue la nicotina (Figura 22), en ocasiones mencionada como “piridina”. Esta sustancia provoca por inhalación: vértigo, dolor de cabeza, náuseas, jadeo y pérdida del conocimiento, además se describe como peligrosa para el ambiente poniendo especial atención a los organismos acuáticos (IPCS, 1991).

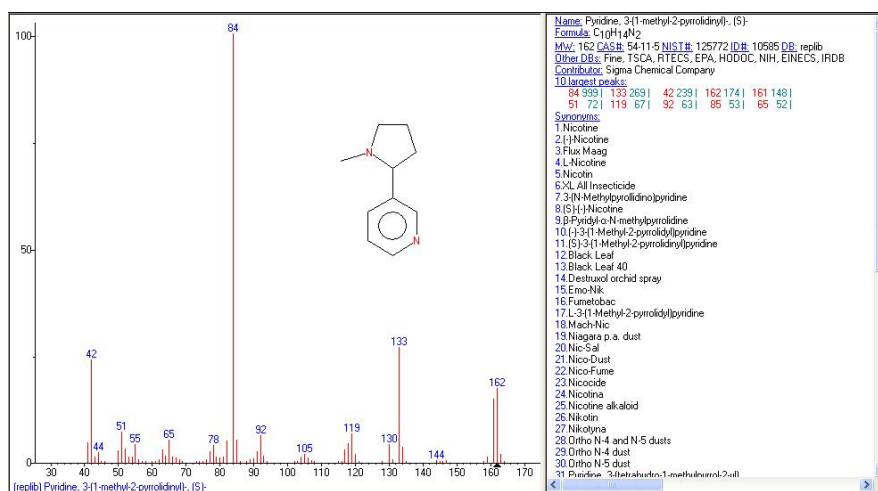


Figura 22. Molécula de nicotina encontrada por cromatografía de gases antes del cultivo en el lixiviado de colillas

Otra sustancia identificada en el lixiviado fue el ácido butírico (figura 23). Se trata de una sustancia moderadamente ácida que se puede absorber por inhalación del vapor. Provoca tos, dificultad respiratoria, jadeo y dolor de garganta. La sustancia es nociva para los organismos acuáticos (IPCS 1991).

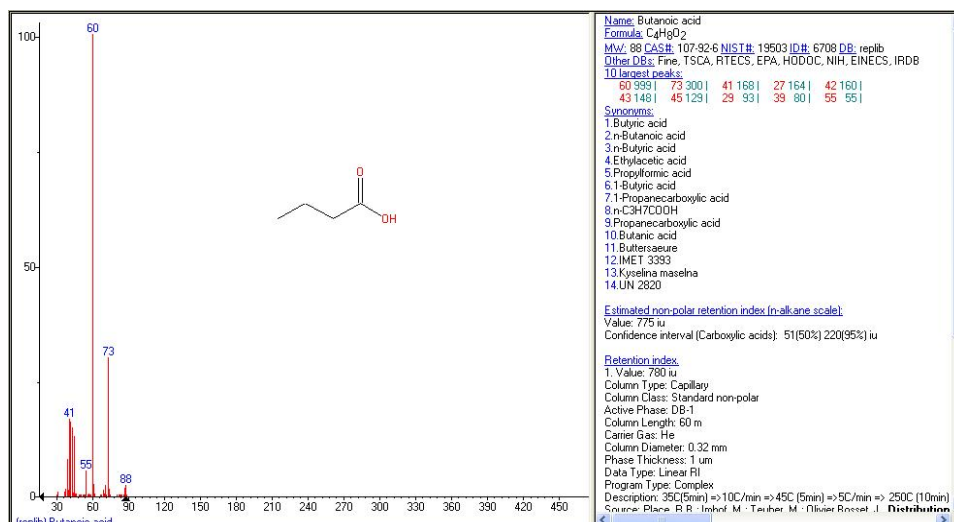


Figura 23. Molécula del ácido butírico encontrada por la cromatografía de gases antes del cultivo en el lixiviado de colillas

Sería conveniente investigar en estudios posteriores cuáles son las moléculas presentes pre y post tratamiento, así como su degradación y la formación de sustancias más simples, posiblemente tóxicas. Las enzimas pudieron haber degradado algunas de las moléculas presentes en los filtros de cigarrillos ya que los hongos basidiomicetos tienen la capacidad de degradar la lignina, un polímero heterogéneo refractario a la despolimerización. Las enzimas de las especies ensayadas rompen las moléculas de lignina, lo que al eliminar dicha barrera química posibilita el acceso de enzimas específicas a los polisacáridos de la madera que constituyen una importante fuente de energía. La peculiar irregularidad de la estructura del polímero de lignina, hace que estas enzimas se caractericen por unos mecanismos de acción no específicos que oxidan los anillos aromáticos constitutivos de dicho polímero.

Dávila & Vázquez-Duhalt en 2006, concluyen que las enzimas de los hongos son catalizadores poco específicos y que son capaces de oxidar una gran diversidad de compuestos orgánicos con estructuras químicas diversas; González *et al.*, en 2005, reportan a *Pleurotus ostreatus* como degradador del insecticida carbaryl (metil-carbamato) en cultivo líquido y sólido; Rodríguez reporta en 2005, a *Pleurotus ostreatus* como un organismo eficaz para remover metales pesados, entre ellos plomo, cadmio, cobre y cobalto.

Conociendo estos antecedentes de *P. ostreatus* puede pensarse que algunas moléculas pudieran haber sido mineralizadas por la acción de las enzimas. La mineralización de un compuesto implica su alteración estructural y la formación de intermediarios metabólicos que pueden servir de elementos estructurales de la célula o de combustible al oxidarse. Los intermediarios pueden convertirse en distintos compuestos orgánicos antes de su combustión final. En el proceso de transformación de un compuesto en otro, la molécula puede sufrir la pérdida de uno o más de sus elementos estructurales o sólo una mera reordenación de sus átomos (Martín *et al.*, 2004).

Por tanto es necesario un análisis completo del lixiviado para determinar su composición y saber qué sustancias específicas son degradadas por las enzimas y realizar análisis para conocer la inducción de las enzimas por la presencia de estas moléculas en el método utilizado en este experimento, por ejemplo, el tratamiento del antraceno ha permitido determinar cómo se produce la apertura del anillo aromático por hongos basidiomicetos (Hammel, 1991).

La técnica de tratamiento utilizada en este experimento, requiere estudios adicionales para conocer con mayor profundidad los mecanismos biológicos responsables de la degradación de los componentes de los filtros de cigarrillo.

9. Conclusiones

A partir de los resultados podemos concluir que los micelios de ambos hongos resultan ser eficientes degradadores de las colillas de cigarrillo, logrando una descomposición parcial de estos residuos que se manifiesta como un cambio en la apariencia de los filtros. Es de resaltar que *P. ostreatus* es un degradador más eficiente que *T. versicolor*.

Con *P. ostreatus* no existen diferencias significativas entre las mezclas de sustrato, para la producción de biomasa y para la reducción de la masa de sustrato, cualquiera de las mezclas puede ser utilizada para la degradación de las colillas.

Adicionalmente conviene considerar que en promedio se generaron 7 g de biomasa (hongos comestibles) por 50 g de sustrato húmedo. *Pleurotus ostreatus* tuvo la capacidad de desarrollar micelio, invadiendo totalmente la superficie del lixiviado resultante del contacto de las colillas con el agua.

La utilización de contenedores específicos para el desecho de los filtros de cigarrillo, disminuye la contaminación de suelos y aguas superficiales y podría contribuir a promover la educación ambiental indispensable en la población de fumadores.

En general se puede concluir que es posible obtener múltiples beneficios utilizando los hongos *Pleurotus ostreatus* y *Trametes versicolor* para el tratamiento de los residuos sólidos del cigarrillo. Este estudio es un modelo funcional para el manejo de los residuos sólidos del cigarrillo y surge como línea de investigación nueva y con posibilidad de estudios futuros acerca de estos residuos contaminantes, ya que en los últimos años se ha producido un avance importante en el conocimiento de los hongos basidiomicetos y su aplicación en procesos relacionados con la degradación.

10. Referencias

- Akmedova Z. 1994. Cellulolytic, xylanolytic and lignolytic enzymes of the fungus *Pleurotus ostreatus*. Prikl. Biokhim. Mikrobiol. Pp. 42-48.
- Arenas M. 1992. Evaluación de diferentes sustratos para el cultivo de *Pleurotus ostreatus*. Tesis de grado. Universidad Nacional de Colombia. Facultad de Ciencias Agropecuarias, Departamento de Agronomía. Pp. 64.
- Bautista N. Bautista-García N., Venegas R., López L. & Portugal D. 2003. Evaluación de la producción de *Pleurotus ostreatus* sobre paja de trigo como sustrato en un modulo rústico en Galeana, municipio de Zacatepec, Estado de Morelos, México. Laboratorio de Micología. Centro de Investigaciones Biológicas, Universidad Autónoma del Estado de Morelos. Pp 1-10.
- Dávila G. & Vázquez-Duhalt R. 2006. Enzimas ligninolíticas fúngicas para fines ambientales. Instituto de Biotecnología. Universidad Nacional Autónoma de México. Pp 1-27.
- Delfín I. & Durán C. 2003. Biodegradación de residuos urbanos lignocelulósicos por *Pleurotus*. Revista internacional de contaminación ambiental. Universidad Nacional Autónoma de México. México. Pp. 37-45.
- Diwakar B., Munjal R., Bahukhandi D. 1989. Cultivation of *Pleurotus* species on different agricultural residues. Indian Phytopathology. Pp 492-495.
- Fazaeli H., Azizi A., Jelan ZA., Mirhadi SA. 2003. Effect of fungal treatment on the chemical composition, in vitro digestibility and in sacco degradability of wheat straw. Proc. BR soc.Anim. Sci. Pp 166.
- Ferrera R., Lara M., Sánchez J. 2009. El género *Pleurotus* y su capacidad de crecer en medios de cultivo y suelo con diferentes concentraciones de petróleo.

Departamento de Biotecnología Ambiental. Colegio de Postgraduados.
México. Pp. 185-189.

- Garcés A., Vélez N., Ruiz S., Serna J., Suárez E. 2005. Evaluación de algunos residuos orgánicos como sustrato para el cultivo de hongos comestibles. Colombia. Revista Lasallista de Investigación. Vol. 2. Núm. 002. Pp. 15-20.
- Gayosso M., Esparza F., Ríos E., Rodríguez R. 2009. Evaluación de la actividad enzimática de actividad *Pleurotus ostreatus* en presencia de bifenilospoliclorados. CIEA & CICTA. México. Pp. 191-197.
- González N., Holmquist O., Velásquez W. 2005. Biodegradación de carbamatos mediados por aislados del hongo de podredumbre blanca *Pleurotus sp.* en medio sólido y líquido. Venezuela. Sociedad Venezolana de Microbiología.
- Gunde N. & Cimerman A. 1995. *Pleurotus* fruiting bodies contain the inhibitor of 3 hidroxy-3-methyl-glutaryl coenzima A reductasa. Lovastain. Experimental Mycology. 1: 1-6.
- Guzmán G. & Mata G. 1993. El cultivo de los hongos comestibles. México. Instituto Politécnico Nacional. Pp. 245.
- Guzmán G. & Mata G. 1993. Cultivation of *Lentinus boryanus* in wood shavings in México. Crypt. Bot. Pp. 47-49.
- Guzmán, G., Mata G., Salmones D., Soto C., Guzmán L. 1993. El cultivo de los hongos comestibles, con especial atención a las especies tropicales y subtropicales en esquilmos y residuos agroindustriales. México. Instituto Politécnico Nacional. Pp. 245.
- Haigler H. & Weimer J. 1991. Byosynthesis and biodegradation of cellulose. Marcel Dekker. New York, Basel, Hong Kong.

- Hincapié J. 1993. Fertilización mineral del hongo comestible *Pleurotus ostreatus*. Tesis de grado ingeniero agrónomo. Universidad Nacional de Colombia. Facultad de Ciencias Agropecuarias. Pp. 91.
- Hobbs C. 1986. Medicinal Mushrooms, an Exploration of Tradition, Healing & Culture. Interwave Press, Inc. CO. US 161p.
- Hammel K., Green B., Gai W., 1991. Ring fussion of anthracene by a eukaryote. Proc. Natl. Acad Sci. Pp. 10605-10608.
- Jwanny E., Rashad M., Abdu H. 1995. Solid state fermentation of agricultural wastes into food through *Pleurotus ostreatus* cultivation. Applied Biochemistry and Biotechnology. Enzyme Engineering and Biotechnology. Pp. 71-78.
- Kapich A. & Shishkina L. 1992. Antioxidants properties of wood destroying basidiomycetes. Miklogiya i Fitopatologiya. pp. 486-492.
- Kathleen M. 2000. Cigarette Butts as litter – Toxic as well as ugly. Underwater Naturalist, Bulletin of the America Littoral Society. USA. Pp. 1-7.
- Kawai H., Sugahara T., Matsuzawa M., Sumiyashiki M., Aoyagi Y., Hosogai Y. 1986. Mineral contents in edible mushrooms. Nippon Shokuhin Kogyo Gakkaishi. pp. 250-255.
- Kerem Z., Friesem D., Hadar Y. 1992. Lignocellulose degradation during solid-state fermentation: *Pleurotus ostreatus* versus *Phanerochectechry sosporium*. Applied and Environ. Microbiol. Pp. 1121-1127.
- Martín C., González A., Blanco M. 2004. Tratamientos biológicos de suelos contaminados: contaminación por hidrocarburos. Aplicaciones de hongos en tratamientos de biorrecuperación. Revista Iberoamericana de Micología. España. Pp. 103-120.

- Márquez A., Mendoza G., González S., Buntinx S. Loera O. 2007. Actividad fibrolítica de enzimas producidas por *Trametes sp.* EUM1, *Pleurotus ostreatus* IE8 y *Aspergillus niger* AD96.4 en fermentación sólida. México. Pp. 780-785
- Marzullo L., Canio R. Giardina P. Sartini MT., Sania G., 1995. Veratryl alcohol oxidasa from *Pleurotus ostreatus* participates in lignin biodegradation and prevent polymerization of lacase-oxidized substrates. Biol. Chem. Pp. 3823-3827.
- Osorio G., 2007. Nuevas soluciones para conservar el medio ambiente. Ciencia UANL. Universidad Nacional de Nuevo León. México. Pp. 59-62.
- Poidexter L. & Miller P. 1994. Predictability of biorremediation performance can not be made with a high level of confidence. American Academy of Microbiology, Washington DC, USA.
- Rodríguez K. 2005. Eficacia del hongo *Pleurotus ostreatus* como biorremediador de suelos contaminados con metales pesados. Tesis Biología. Maestro en Ciencias. Universidad de Puerto Rico. Pp. 83.
- Salmones D., Gaitan-Hernández R., Pérez R., Guzmán G 2003. Estudios sobre el género *Pleurotus*. VIII. Interacción entre crecimiento micelial y productividad. Revista Iberoamericana de Micología. México. Pp. 173-176.
- Sánchez J. & Royse D. 2002. La biología y el cultivo de *Pleurotus sp.* Limusa. México. Pp. 290.
- Sánchez J., Orozco G., Hernández D., Nieto M., Marque F. 2009. El sustrato degradado por *Pleurotus pulmonarius* para la degradación del insecticida endosulfan. Centro de Educación Científica y Educación Superior de Ensenada. México. Pp. 199-208.
- Sihuanca D., Mata G., Marín M., Ticante J., Linares G., Galicia V. 2009. Preservación de cepas silvestres de *Pleurotus spp.*, en la región de Atlixco, Puebla. Posgrado en Ciencias Ambientales. México. Pp. 1-10.

Wolter M., Zadrazil F., Martens R., Bahadir M. 1997. Degradation of eight highly condensed polycyclic aromatic hydrocarbons by *Pleurotus ostreatus* in solid straw substrate. Appl. Microbiol Biotechnol. Alemania. Springer Verlag. Pp. 398-404.

Asociación Española Contra el Cáncer (AECC). 2009. Fecha de consulta 2012.
<https://www.aecc.es/SobreElCancer/Prevencion/Tabaco/Paginas/Informaciontabaco.aspx>

British American Tobacco Caribbean & Central América. 2008. Fecha de consulta 2011.
http://www.batcentralamerica.com/OneWeb/sites/BAT_58VLSP.nsf/vwPagesWebLive/B30BC3791B532B6980256BCA0075620A?opendocument&DTC=&SID=

Ministerio de Salud de Argentina 2012. Fecha de consulta 2012.
http://msal.gov.ar/hm/Site_tabaco/tabacoymedioambiente.asp

Philip Morris Internacional. 2008. Fecha de consulta 2010.
http://www.philipmorrisinternational.com/ES/pages/spa_ES/ourbus/Production.asp

Programa Internacional de Seguridad Química. Fichas Internacionales de Seguridad Química (benceno). Fecha de consulta 2011.
http://actrav.itcilo.org/osh_es/m%F3dullos/ic/71432.htm

Programa Internacional de Seguridad Química. Fichas Internacionales de Seguridad Química (piridina). Fecha de consulta 2011.
http://training.itcilo.it/actrav_cdrom2/es/osh/ic/110861.htm

Programa Internacional de Seguridad Química. Fichas Internacionales de Seguridad Química (ácido butírico). Fecha de consulta 2011.

http://actrav.itcilo.org/osh_es/m%F3dulos/ic/93652.htm

Encuesta Global de Tabaquismo en Adultos (GATS) 2009. Fecha de consulta 2011.

www.conadic.salud.gob.mx/pdfs/pie/GATS_2009.pdf2