



DEGRADACIÓN DE COLILLAS DE CIGARRILLO POR MEDIO DE UN PROCESO SECUENCIAL FÍSICO-BIOLÓGICO.

Estudiantes

Laura Alejandra Londoño Florez.

María Antonia Urrea Montoya.

Director

Luis David Gómez Méndez. M.Sc., Ph.D.

Codirectora

Ivonne Del Socorro Gutiérrez Rojas. M.Sc., Ph.D.

Trabajo de grado.

Microbiología Industrial.

Facultad de Ciencias

Departamento de Microbiología

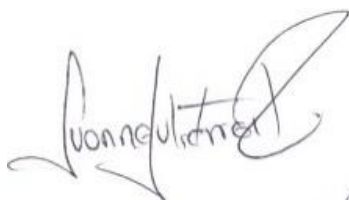
Pontificia Universidad Javeriana

Bogotá, D.C. 2021.

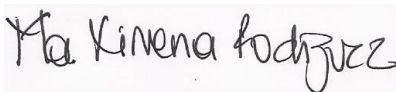
**DEGRADACIÓN DE COLILLAS DE CIGARRILLO POR MEDIO DE UN
PROCESO SECUENCIAL FÍSICO-BIOLÓGICO.**



Luis David Gómez Méndez. M.Sc., Ph.D.
Director



Ivonne Del Socorro Gutiérrez Rojas. M.Sc., Ph.D.
Codirectora



Maria Ximena Rodríguez Bocanegra. Ph.D.
Jurado

Facultad de Ciencias

Departamento de Microbiología

Pontificia Universidad Javeriana

Bogotá, D.C. 2021.

NOTA DE ADVERTENCIA

“La universidad no se hace responsable por los conceptos emitidos por sus alumnos en sus trabajos de tesis. Solo velará porque no se publique nada contrario al dogma y a la moral católica y por qué las tesis no contengan ataques personales contra persona alguna, antes bien se vea en ellas el anhelo de buscar la verdad y la justicia”.

Artículo 23 de la Resolución No 13 de Julio de 1996

AGRADECIMIENTOS

A Dios porque sin Él no hubiésemos llegado hasta aquí.

A nuestros padres y familiares por ser un apoyo incondicional y nuestra motivación para cumplir cada uno de los objetivos planteados, por ayudarnos a crecer y llegar hasta este punto, por guiarnos en cada paso que damos.

A Sebastián Rondón y Diego Rondón por su paciencia, ayuda y conocimientos que aportaron a la realización de esta investigación.

A David Gómez por su paciencia durante el proceso, por confiar en nosotras y brindarnos la oportunidad de realizar este proyecto bajo su supervisión y enseñanza diaria.

A cada uno de los profesores que estuvieron dispuestos a colaborarnos con cada espacio, equipo o técnica que requería algún tipo de enseñanza y guiarnos para ser excelentes profesionales.

A la Pontificia Universidad Javeriana y a la Facultad de Ciencias por abrirnos las puertas a lo que fue nuestro segundo hogar por muchos años.

Tabla de contenido

1. Resumen	6
2. Introducción.....	6
3. Marco Teórico	8
3.1 Generalidades del cigarrillo.....	8
3.2 Componentes del cigarrillo.....	8
3.3 Componentes de la colilla del cigarrillo	9
3.3.1 Acetato de celulosa.	9
3.3.2 Nicotina	10
3.3.3 Metales pesados.....	11
3.3.4 Hidrocarburos aromáticos policíclicos	11
3.4 Degradación físicoquímica.....	11
3.5 Degradación biológica.	12
4. Objetivo	13
5. Materiales y métodos.	13
5.1 Recolección de muestras.	13
4.2 Caracterización preliminar de las colillas de cigarrillo.	13
4.2.1 Determinación del peso inicial de las colillas de cigarrillo	13
4.2.2 Espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FTIR).	14
4.2.3 Análisis macroscópico de las colillas.	14
5.3 Pretratamiento de degradación de colillas de cigarrillo en exposición a luz ultravioleta (Fotólisis).	14
5.4 Reactivación de <i>Pleurotus ostreatus</i> y <i>Phanerochaete</i> sp. provenientes de la Colección de Microorganismos de la Pontificia Universidad Javeriana (CMPUJ)	14
5.5 Crecimiento de <i>Pleurotus ostreatus</i> y <i>Phanerochaete</i> sp. en agar M9 + Colilla.	15
6. Resultados y discusión.	16
6.1 Caracterización preliminar de las colillas de cigarrillo.	17
6.2 Crecimiento de <i>Pleurotus ostreatus</i> y <i>Phanerochaete</i> sp. en agar M9+CC.	18
6.3 Microscopía electrónica de barrido (SEM)	22

6.4 Espectroscopía infrarroja transformada de Fourier (FTIR)	23
7. Conclusiones.	26
8. Recomendaciones	28
9. Bibliografía	29
10. Anexos	34

1. Resumen

En Colombia y el mundo se desechan diariamente colillas de cigarrillo que representan un impacto negativo para el ambiente por la acumulación de sustancias tóxicas. Cada vez aumenta su consumo, por ello en busca de alternativas para dar solución a este problema, se realizó este trabajo para investigar la capacidad de *Pleurotus ostreatus* y *Phanerochaete* sp. en degradar estos contaminantes. Para ello, se recolectaron colillas de cigarrillo en la Pontificia Universidad Javeriana, se realizó su respectiva caracterización en cuanto a peso, morfología y grupo químicos funcionales. Seguido a esto, se sometieron a un tratamiento con fotólisis (UV-C) para luego, analizar nuevamente todos los parámetros mencionados anteriormente e identificar posibles cambios, entre los cuales se obtuvo que la disminución de peso después de la fotólisis fue significativa. Una vez obtenidos estos datos, se realizó el tratamiento biológico usando las colillas trozadas en un medio compuesto por sales, en el cual se inocularon *Pleurotus ostreatus* y *Phanerochaete* sp., respectivamente, para evaluar su crecimiento. Se realizó seguimiento al crecimiento de los hongos durante 30 días tomando mediciones de su crecimiento radial, obteniendo que *P. ostreatus* presentó mayor crecimiento (90 mm) a comparación de *Phanerochaete* sp. (75.9 mm). Finalmente se determinaron los mismos parámetros iniciales en los que se observó, a través de microscópica electrónica de barrido (SEM), colonización de las colillas de cigarrillo y la adherencia de las hifas a ésta. Por otro lado, respecto a los grupos funcionales identificados por espectroscopia infrarroja con transformada de Fourier (FTIR), se evidenció la aparición de alcoholes y la disminución de carbonilos asociados al acetato de celulosa.

2. Introducción

El consumo de cigarrillo es una problemática debido a que sus componentes afectan a todas las formas de vida ya que retienen compuestos que son altamente tóxicos (1), a su vez por el consumo de estos el medio ambiente se ve directamente afectado desde su producción hasta su desecho final.

El cigarrillo está dividido en la columna de tabaco y la zona de filtración y el papel que lo envuelve, el cual después de su consumo queda convertido en lo que se conoce como “colilla de cigarrillo” (CC) esta contiene tres partes principales, las cuales son el filtro, constituido por fibra de acetato de celulosa, metales como Cd, Fe, As, Ni, Cu, Zn y Mn, nicotina, tabaco sin quemar, alquitrán, arsénico, plomo, hidrocarburos poliaromáticos y ceniza, los cuales se reconocen como materiales de difícil degradación en el medio ambiente (2); el papel que lo envuelve, y el tabaco que queda allí después de ser quemado (3). Debido a estos componentes, las CC hacen parte de los residuos sólidos no aprovechables (4). Estos residuos generalmente son desechados incorrectamente por los consumidores ya que suelen arrojarlos al suelo, generando daños en cuerpos de agua y suelos, considerando que el tiempo estimado de degradación es de aproximadamente entre 7 y 10 años (5).

Se estima que en el mundo hay 1'337.000 millones de consumidores de tabaco (6), generando cerca de 4.5 billones de CC en el mundo (7). Se calcula que en Bogotá se generan al año, cerca de 315 toneladas de residuos de CC de las cuales el 60 % de estas son desechadas a las calles, terminando así en ríos, humedales y otros cuerpos de agua (8, 9).

En búsqueda de la solución a esta problemática se han desarrollado estudios que demuestran la ventaja de implementar tratamiento con luz UV (fotólisis) para promover la degradación de materiales como polímeros contaminantes provocando la ruptura de cadenas poliméricas, ocasionando la producción de radicales libres y reduciendo el peso molecular de la misma (10).

Asimismo, según estudios realizados en la Universidad Nacional Autónoma de México (11) y Maadani et al. (2020) (12), los hongos de podredumbre blanca son conocidos por su capacidad en degradar compuestos orgánicos complejos de manera efectiva. Debido a sistemas enzimáticos no específicos (13) estos hongos, durante su metabolismo secundario, en limitación de recursos de carbono y nitrógeno, secretan enzimas extracelulares, las cuales pueden estar involucradas en procesos de degradación (14,15,16).

De acuerdo con lo expuesto anteriormente, la siguiente investigación se enfocó en buscar estrategias secuenciales fisicoquímicas por medio de la fotodegradación mediante luz UV y

microbiológicas con la ayuda de los hongos *Pleurotus ostreatus* y *Phanerochaete* sp. provocando la aceleración en la degradación de las colillas de cigarrillo.

3. Marco teórico

3.1 Generalidades del cigarrillo

El cigarrillo es básicamente un cilindro pequeño y delgado que consta de tres partes básicas: la columna de tabaco, el filtro y el papel que lo envuelve (17); el cual está hecho de tabaco producto procesado a partir de las hojas de *Nicotiana tabacum* (18), cuyo componente activo es la nicotina y también posee otros compuestos como el alquitrán, formado por varios agentes químicos. Además de estos, son varias las sustancias presentes en el humo desprendido, como los hidrocarburos aromáticos policíclicos, las nitrosaminas aldehídos (formaldehído, acetaldehído), compuestos orgánicos y compuestos inorgánicos (arsénico, níquel, plomo, entre otros) (19).

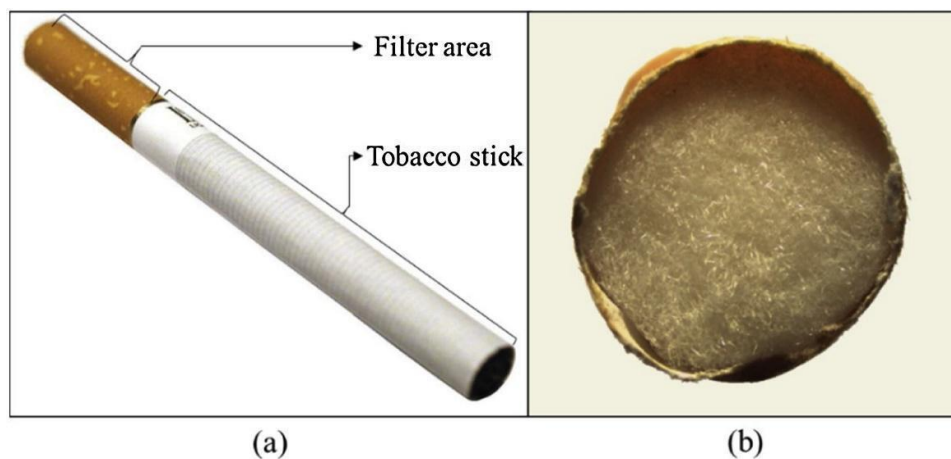


Figura 1. (a) Partes que constituyen el cigarrillo. (b) Parte del filtro de la colilla de cigarrillo compuesta por acetato de celulosa. Fuente: Rahman MT, 2021 (17).

3.2 Componentes del cigarrillo

El cigarrillo cuenta con diferentes componentes en su interior; en el cilindro que lo compone están los alcaloides, fenoles, ácidos orgánicos, sacaridos entre otros, uno de sus

componentes más importantes son la nicotina y los alcaloides, dichos componentes son precursores de las nitrosaminas, las cuales son precursores específicos del tabaco, también uno de sus como componentes adicionales que se encuentran en los cigarrillos está el azúcar y otros humectantes (20, 21). Adicional a esto en el área del filtro de cigarrillo se encuentra uno de los materiales que está en mayor cantidad y es el acetato de celulosa, este se encuentra constituyendo el filtro del cigarrillo, cuya función principal es retener el alquitrán y los demás productos perjudiciales para los pulmones de los fumadores, que se producen en la combustión del cigarrillo (17).

3.3 Componentes de las colillas de cigarrillo (CC)

3.3.1 Acetato de celulosa

El acetato de celulosa (AC) es el componente que se encuentra en mayor cantidad en el filtro de cigarrillo, este un polímero de glucosa que se obtiene a partir de la madera bloqueando los grupos hidroxilo de la celulosa con grupos acetato, esterificado con ácido acético (22); en este proceso se realiza una extracción de celulosa de la materia prima y seguido a esto se realiza una acetilación de ésta utilizando ácido sulfúrico como catalizador, (figura 2) (23). La estructura monomérica del AC está constituida por moléculas de glucosa unidas por un enlace éter (enlaces glucósidos β 1-4) y los grupos hidroxilo de la glucosa anhidra son reemplazadas por grupos acetilo en la posición 2, 3 y 6.

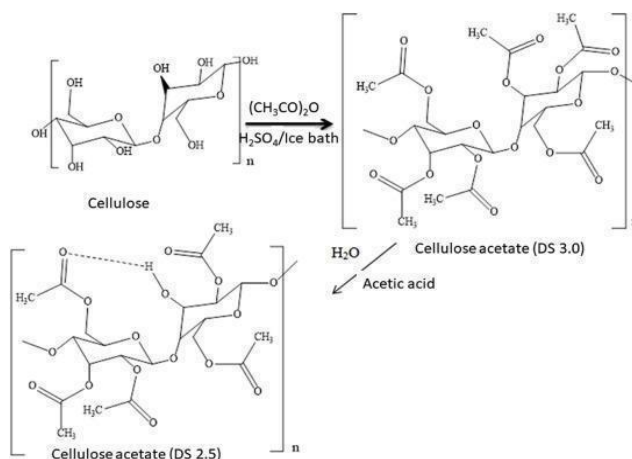


Figura 2. Reacción química para la formación de acetato de celulosa. Fuente: Heinze T. 2004. (24)

Se caracteriza por ser un termoplástico debido a que es ramificado de alto peso molecular en comparación con el material inorgánico y posee más propiedades fisicoquímicas (25), entre esas están que su consistencia es dura, brillante, incoloro, transparente, estable a los rayos UV y se utiliza para hacer gran variedad de productos de consumo como textiles, películas de plástico, explosivos adhesivos, entre otros (26).

Por otro lado, los filtros de AC tardan entre 7 y 10 años aproximadamente en ser degradados (27), dependiendo de las condiciones ambientales, tiempo en el cual van liberando las sustancias tóxicas retenidas. Lo anterior explica la importancia de generar mayor conciencia respecto a las rutas de degradación de este componente, surgiendo la necesidad de dar una salida viable a los productos residuales, de manera que pueda reducirse el impacto ambiental.

3.3.2 Nicotina

La nicotina es un alcaloide vegetal tóxico, el cual está clasificado como contaminante emergente importante y es extraída de la planta de tabaco. Esta es una 3-(1-metilpirrolidin-2-il) piridina, su fórmula molecular es $C_{10}H_{14}N_2$ (29). La nicotina es el principal alcaloide del tabaco, estas varían entre 10-20 mg por gramo en un cigarrillo (30). Esta cumple un papel como insecticida fitogénico, agente teratogénico, neurotoxina y fármaco ansiolítico (30). El consumo de tabaco ha resultado en una contaminación generalizada de nicotina en aguas superficiales, aguas residuales y agua mineral embotellada (31 y 32).

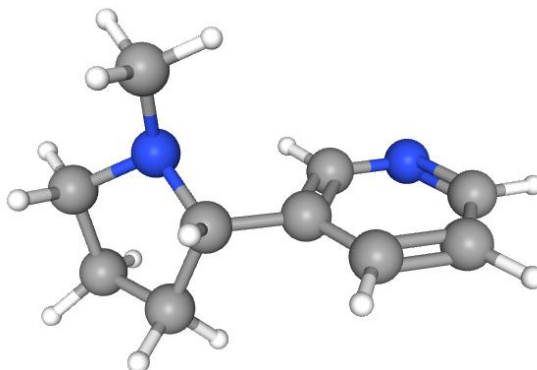


Figura 3. Estructura química de la nicotina. Tomado de: National Center for Biotechnology Information (30).

3.3.3 Metales pesados

Los metales pesados se encuentran como metales puros o metales asociados unidos químicamente a otros elementos o se pueden presentar como metales asociados naturalmente en las CC.

Es posible encontrarlos en las hojas del tabaco debido a que algunos fungicidas y pesticidas contienen metales pesados o de transición que son tóxicos o también son partículas que se pueden presentar en el aire (28). Según Moerman y Potts, el hierro, el manganeso, estroncio, aluminio, plomo y cobre son los principales metales que se lixivian en 24 horas y cada uno de estos metales pueden llegar a presentar entre 3, 9 y 38.1 kg por año en todo el mundo (33).

3.3.4 Hidrocarburos aromáticos policíclicos

Según Dobaradaran et al. (2020), las CC contienen altas concentraciones de hidrocarburos aromáticos policíclicos como el naftaleno y el fluoreno que se encuentran en altos niveles y otros como indeno, pireno, dibenz y antraceno, en bajos niveles (34, 35).

3.4 Degradación fisicoquímica

La fotólisis es una reacción química que se produce cuando se inician los mecanismos de radicales libres cuando se hace contacto entre el compuesto y los fotones que tienen niveles de energía suficientemente altos (36). Es un mecanismo muy común para degradar el acetato de celulosa y otros polímeros, este se degrada foto-químicamente por longitudes de onda UV inferiores a 280 nm. Esta degradación se da al desencadenar una ruptura en las cadenas principales del polímero, debido a la reacción fotoquímica generada. En la fotorreacción los enlaces saturados absorben la luz con longitudes de onda por debajo de 200 nm, a diferencia de los grupos carbonilos que tienen sus valores máximos de absorción entre 200 nm y 300 nm (37-38). La degradación estructural de ciertos polímeros puede conducir a la pérdida de propiedades mecánicas o aparición de productos volátiles como CO, CO₂ o agua (39).

3.5 Degradación biológica

Los hongos basidiomicetos como *Pleurotus ostreatus* y *Phanerochaete* sp. son degradadores activos de diversos componentes debido a que poseen un sistema multienzimático que cataliza la biodegradación de materiales constituidos por celulosa, hemicelulosa, lignina, entre otros. Por esta razón pueden eliminar parcial o totalmente compuestos orgánicos por medio de un mecanismo de degradación en el que se ve involucrada la participación de diferentes procesos (40). Se ha experimentado el empleo de estos hongos para la degradación de hidrocarburos aromáticos y se ha demostrado el potencial que podrían tener para minimizar el impacto de la actividad antropogénica (41).

En cuanto a *P. ostreatus*, este hongo tiene la capacidad de adaptarse fácilmente y tiene la capacidad de utilizar diferentes sustratos para su crecimiento, en especial los lignocelulósicos gracias a la acción de enzimas que produce. A los hongos del género *Phanerochaete* sp. se les reconoce como productores de enzimas celulasas y ligninolíticas (42).

La celulosa se degrada al lograr la hidrólisis completa por la acción de las enzimas exoglucanasas (celobiohidrolasas, CBH), endoglucanasas (EG) y β -glucosidasas; sin embargo, para degradar el acetato de celulosa con un DS (grado de sustitución) alto, se ve inhibido el efecto celulolítico debido a la presencia de grupos acetilos. Las enzimas que mejor actúan frente a la hidrólisis del acetato de celulosa son las endoglucanasas (43).

En estudios previos realizados en la Universidad Nacional Autónoma de México Por Benítez & Esparza (2007) (13), se investigó la capacidad de *Pleurotus ostreatus* y *Trametes versicolor* para degradar los contaminantes de las CC usando tratamientos de mezclas de colillas y paja de trigo, inoculados con estas cepas. Se determinó el peso de la biomasa generada, diámetro del crecimiento radial, eficiencia biológica y reducción del volumen del sustrato, así como características fenotípicas. Se llegó a la conclusión de que, en el caso de *Pleurotus ostreatus*, es posible la degradación usando únicamente colillas sin mezclas con paja y adicional a esto, modificó la composición del acetato de celulosa. De acuerdo con lo anterior, Maadani et al. (2020), afirman que *Pleurotus ostreatus* es más eficiente que *Trametes versicolor* para la degradación de colillas de cigarrillo, al producir mayor actividad enzimática (14).

Por otro lado, en un estudio realizado por Moriyoshi et al. (2013) (44), en el cual se evaluó el papel de la endo 1,4-β-glucanasa de *Neisseria sicca* para llevar a cabo la degradación de acetato de celulosa, se observó la producción de ácido acético y azúcares debido a la desacetilación y la hidrólisis, respectivamente, haciendo que el DS disminuyera. Por esta razón se llegó a concluir que se da una mejor degradación cuando se utilizan esterasas y endoglucanasas en conjunto.

Para una degradación completa y más efectiva se considera apropiado la combinación de una degradación biológica sumada a una fotoquímica (45,46), ya que se han realizado diversos estudios que buscan promover estrategias y teniendo en cuenta estos antecedentes, es importante seguir investigando qué tan efectivos podrían llegar a ser y el alcance al cual podrían llegar.

4. Objetivo.

Evaluar el efecto que tiene la fotólisis combinada con tratamiento biológico por parte de *Pleurotus ostreatus* y *Phanerochaete* sp., como proceso secuencial para la degradación de colillas de cigarrillos.

5. Metodología

5.1 Recolección de muestras de colillas de cigarrillo.

Las colillas de cigarrillo de marca Mustang[®], se recolectaron, en bolsas Ziploc[®], a partir de diferentes lugares de la Pontificia Universidad Javeriana, para posteriormente conservarlas en un lugar seco a temperatura ambiente. Se realizaron cortes transversales usando tijeras para que todas quedaran del mismo tamaño (4 cm aproximadamente), y luego se realizaron cortes longitudinales para poder apreciar la colilla en su interior.

5.2 Caracterización preliminar de las colillas de cigarrillo.

5.2.1 Determinación del peso inicial de las colillas de cigarrillo.

Se determinó el peso de las colillas seleccionadas para el estudio; estas fueron pesadas usando una balanza analítica marca OHAUS® de 0.1 mg de resolución. Cada colilla se pesó tres veces y se determinó, promedio, desviación estándar y coeficiente de variación.

5.2.2 Espectroscopía infrarroja transformada de Fourier (FTIR)

De la muestra total objeto de este análisis se tomaron dos CC previamente pesadas y se determinaron los grupos químicos funcionales a través de espectroscopía infrarroja transformada de Fourier (FTIR), empleando un espectrofotómetro FITR marca Shimadzu MIRacle acoplado con un ATR (reflectancia total atenuada) utilizando los parámetros reportados por Gómez-Mendez (2018) (46).

5.2.3 Análisis macroscópico de las colillas de cigarrillo.

A través de estereoscopio marca OLYMPUS®, se observaron las colillas recolectadas para conocer su estructura inicial.

5.3 Pretratamiento de degradación de colillas de cigarrillo a luz ultravioleta (Fotólisis).

Al finalizar la caracterización inicial de las colillas de cigarrillo, éstas fueron sometidas a fotodegradación en una cámara de irradiación UV, la cual estaba dotada de tres lámparas UV-C de 15W con un rango de longitud de onda UV de 200-280 nm. Las colillas se ubicaron a una distancia de 12 cm de las lámparas y fueron irradiadas por 96 horas. Consecutivamente al pretratamiento, se analizaron las mismas variables contempladas en el numeral 4.2, para así poder determinar si las CC presentaron alguna modificación, post-fotólisis, de acuerdo con su peso, a sus características estructurales y su composición química.

5.4 Reactivación de *Pleurotus ostreatus* y *Phanerochaete* sp. provenientes de la Colección de Microorganismos de la Pontificia Universidad Javeriana (CMPUJ).

A partir de una cepa inicial entregada por CMPUJ de *P. ostreatus* CMPUJH124 y *Phanerochaete* sp. CMPUJH123, se sembraron cuatro cajas en medio agar salvado de trigo

según Gómez-Méndez (2018) (46) por cada uno de los hongos y se llevaron a incubar las cajas por 10 días a 30 °C

5.5 Colonización de *Pleurotus ostreatus* y *Phanerochaete* sp. en agar M9 + CC.

Se tomaron las cepas de *P. ostreatus* y *Phanerochaete* sp. anteriormente reactivadas para retirar discos de micelio, cada disco se inoculó en el centro de cajas de Petri con agar M9 (25) + colillas trozadas y pretratadas (Anexo 1), se realizaron 15 réplicas de cada hongo. Se incubaron por 30 días en el cuarto de hongos de la Pontificia Universidad Javeriana a 25° C. Se empleó como control positivo *Pleurotus ostreatus* y *Phanerochaete* sp., en agar M9 (25) + glucosa 10 % (p/v) incubados a temperatura ambiente durante 30 días (mismas condiciones de crecimiento de agar M9 + CC).

5.6 Determinación de crecimiento radial de *P. ostreatus* y *Phanerochaete* sp. en M9+CC.

Debido a que estos hongos crecen en forma radial, se tomaron 6 medidas (horizontal, vertical y diagonal) del diámetro de micelio desde el centro de cada disco. Las lecturas se realizaron por 30 días.

5.7 Retiro de las CC del medio M9+CC y separación del micelio *Pleurotus ostreatus* y *Phanerochaete* sp y agar.

Se retiraron las CC de los medios en los cuales habías crecido *P. ostreatus* y *Phanerochaete* sp, para la separación del micelio y el agar de las CC, en un tubo Falcon™ de agregaron 3 trozos de CC con 50 mL de solución salina 0.85 % con tween 80 al 0.1 %, seguido a esto se llevó al vortex a una velocidad de 1000 rpm, este procedimiento se llevó a cabo tres veces consecutivas para lograr la separación total de estos

5.8 Caracterización de las colillas de cigarrillo post tratamiento biológico.

Seguido a la separación del micelio y el agar de las CC se realizó FTIR pos-tratamiento biológico para así identificar el cambio. Adicional a esto, se hizo análisis estructural con microscopía óptica y electrónica de barrido de las CC colonizadas por *Pleurotus ostreatus* y *Phanerochaete* sp.

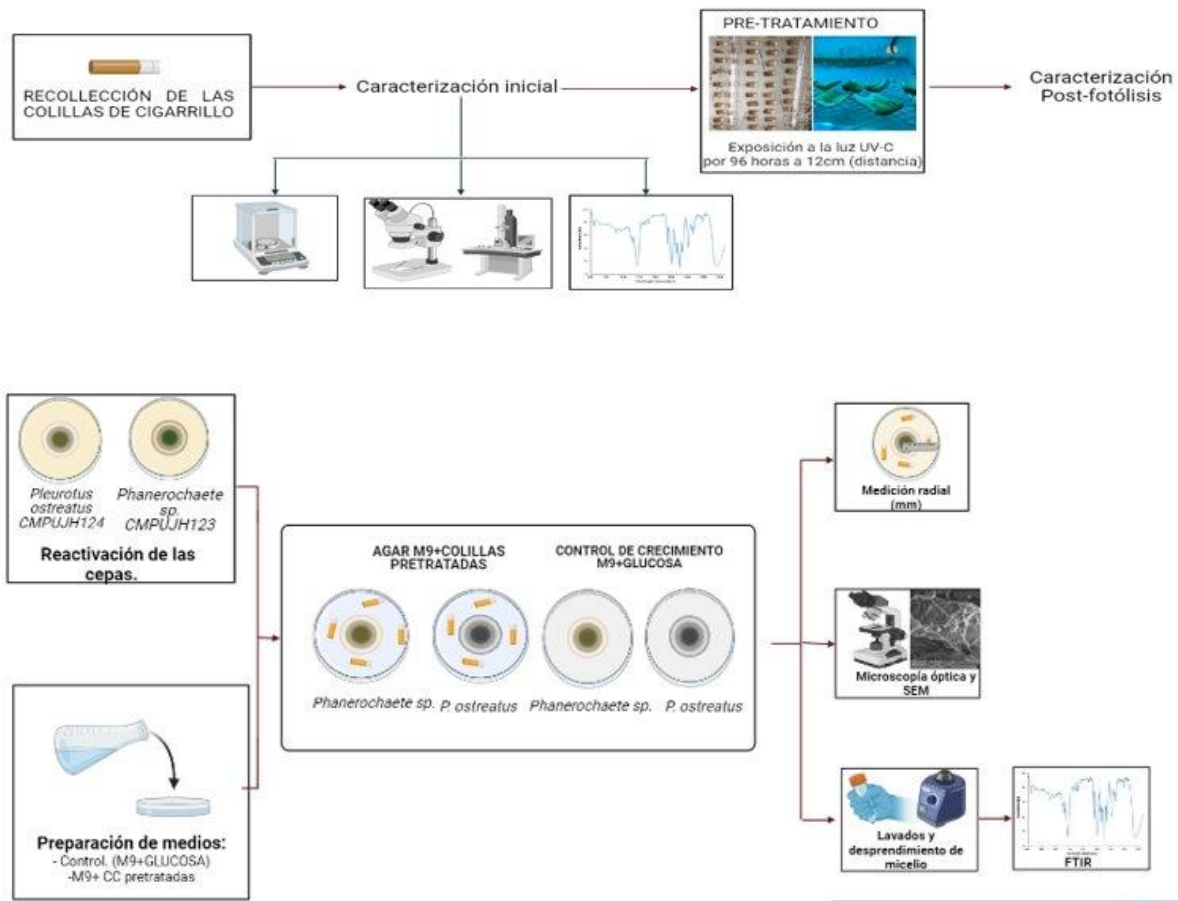


Figura 4. Esquema de metodología realizada.

6. Resultados y discusión

5.1 Caracterización preliminar de las colillas de cigarrillo.

5.1.1 Pesaje de las colillas de cigarrillo

Se realizó una prueba T-Student (Anexo 2) para evaluar el cambio en la masa de las CC pre y post fotólisis, el peso antes de la exposición fue de $0.2920 \pm 0.0001\text{g}$, mientras que después de la exposición la media fue de $0.2890 \pm 0.0001\text{g}$, dado que el valor de p (0.0005) es menor

que el alfa (0.05), esto quiere decir que si hubo un cambio significativo en el peso de las CC (figura 5). Según Alberti et.al. (2021) (47) esto se debe a que el acetato de celulosa se degrada fotoquímicamente a longitudes de onda ultravioleta inferiores a 280nm, sin embargo, tiene una fotodegradabilidad limitada debido a la falta de cromóforos para absorber la luz UV. (48).

A partir de lo anterior, se puede inferir que las CC al estar expuestas a la fotodegradación dieron como resultado la transformación debido a que estos tienen diferentes componentes asociados que pudieron foto-reaccionar como la nicotina (30) y el acetato de celulosa (47) que una de sus características es la susceptibilidad a la luz UV, como señala Chong B et al (2019) (49) , permitiendo que estos reaccionen a la luz UV-C y permita la descomposición de los mismos, lo anterior podría ser verificado a partir del análisis de grupos funcionales en FTIR, debido a que posterior a la fotólisis se evidencia presencia de grupos hidroxilos diferentes a la caracterización inicial; con lo cual se puede asumir que las CC presentan una degradación mínima por procesos de irradiación UV

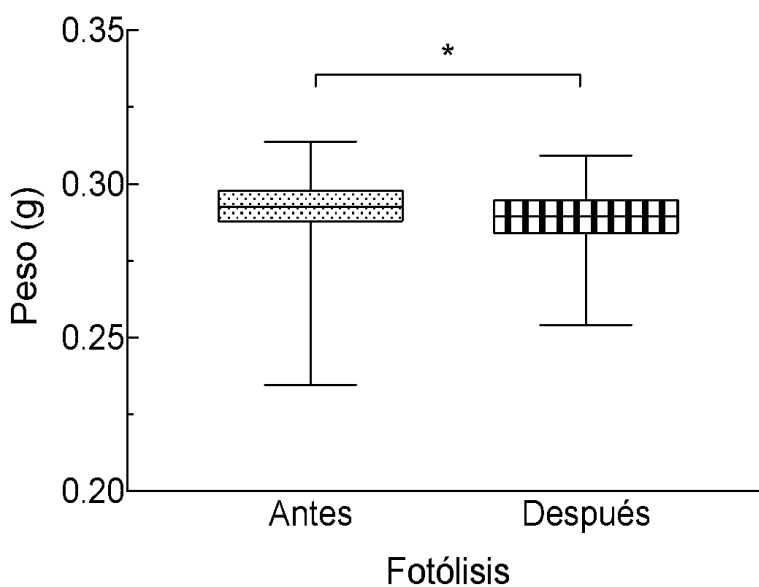


Figura 5. Prueba T para media de dos muestras emparejadas

5.1.2 Caracterización de cambios estructurales de las colillas de cigarrillo.

Gracias a la observación en el estereoscopio se pudo determinar que la exposición a luz UV generó decoloración de las CC (Figura 6) esto se debe, según Bhatnagar N. et al. (2016), a que la fotodegradación conduce a la división oxidativa del polímero lo cual conlleva al deterioro y la decoloración de este (50).

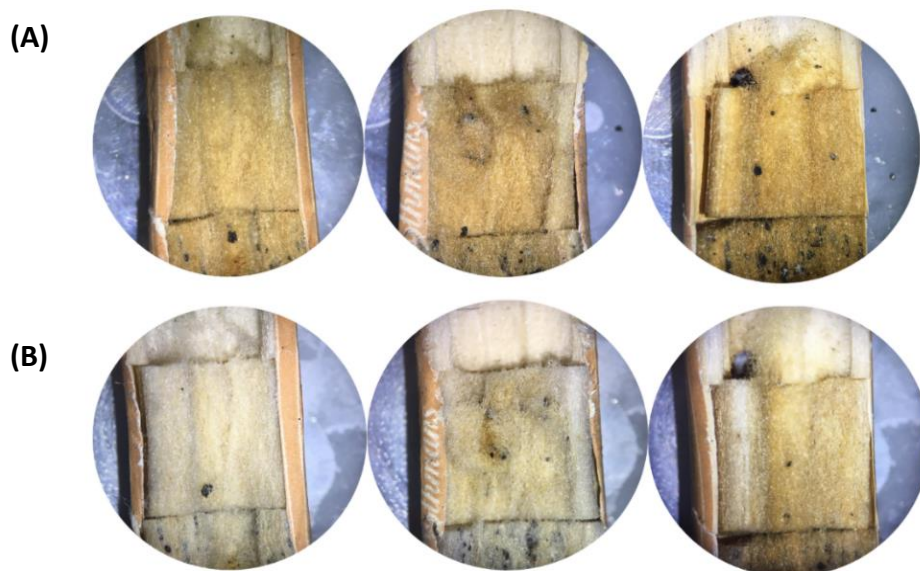


Figura 6. (A). Estructura de las colillas marca MUSTANG® antes de la exposición a luz UV-C(B). Estructura de las colillas marca MUSTANG® después de la exposición a luz UV-C.

5.1 Biodegradación por medio de *Pleurotus ostreatus* y *Phanerochaete sp.*

5.1.1 Crecimiento de *Pleurotus ostreatus* y *Phanerochaete sp.* en agar M9 + CC.

En cuanto al crecimiento de los hongos en agar M9 + CC, se registraron los datos del crecimiento radial (mm) cada tres días durante 30 días de tratamiento para realizar el respectivo seguimiento (Anexo 2), para *P. ostreatus* y para *Phanerochaete sp.* (Figura 8).

Respecto a la caracterización macroscópica, *P. ostreatus* presentó una textura algodonosa, color blanco - crema, sin presencia de pigmento difusible al medio. En el caso de *Phanerochaete* sp., se evidenció una textura correosa también con color blanco - crema, aplanada, de bordes irregulares y sin pigmentos difusibles al medio (Figura 7) .

P. ostreatus logró crecer a partir de las CC como fuente de carbono presente en el medio. Al observar el crecimiento micelial de *P. ostreatus*, no se evidenció ninguna interferencia con el desarrollo del micelio en el medio M9+CC, ni cambios aparentes en el color del micelio. En cuanto a la morfología del hongo tampoco se presentaron variaciones ni índices de contaminación (Figura 7A).

El rápido crecimiento de *P. ostreatus* en el medio se debe a su sistema enzimático no específico, el cual le da la capacidad a este hongo de crecer en sustratos complejos, además que este hongo se caracteriza por la tolerancia a los metales pesados y estos son un compuesto de las CC (51).

Respecto a *Phanerochaete* sp., a pesar de que el crecimiento fue menor en comparación al de *P. ostreatus* (Anexo 3) en el medio M9+CC, se presentó producción de micelio (Figura 8). Probablemente la adaptación de este hongo no fue igual a la de *P. ostreatus* debido a que no contenía algún otro compuesto en el medio que permitiera la producción necesaria de micelio en este periodo de tiempo (52), ya que el crecimiento de este hongo es más lento y necesita de un sustrato más específico y con mayores requerimientos para su crecimiento.

Otra razón por la que el crecimiento de *Phanerochaete* sp. se dio de esta manera, pudo ser porque este hongo es más susceptible a sustancias tóxicas y contaminantes como la nicotina o metales pesados que se encuentran en las CC debido a esto su crecimiento se detiene antes de finalizar los 30 días del tratamiento, (53) ya que no tuvo la capacidad de adaptarse y ajustarse al entorno alterado con el medio (54, 55).

Desafortunadamente, los controles de agar M9 + Glucosa se contaminaron, por esta razón no fue posible contrastar el crecimiento, con un medio enriquecido. Esto pudo haber sucedido por errores de manipulación, sin embargo, la morfología inicial se pudo contrastar con los hongos reactivados en agar PDA.

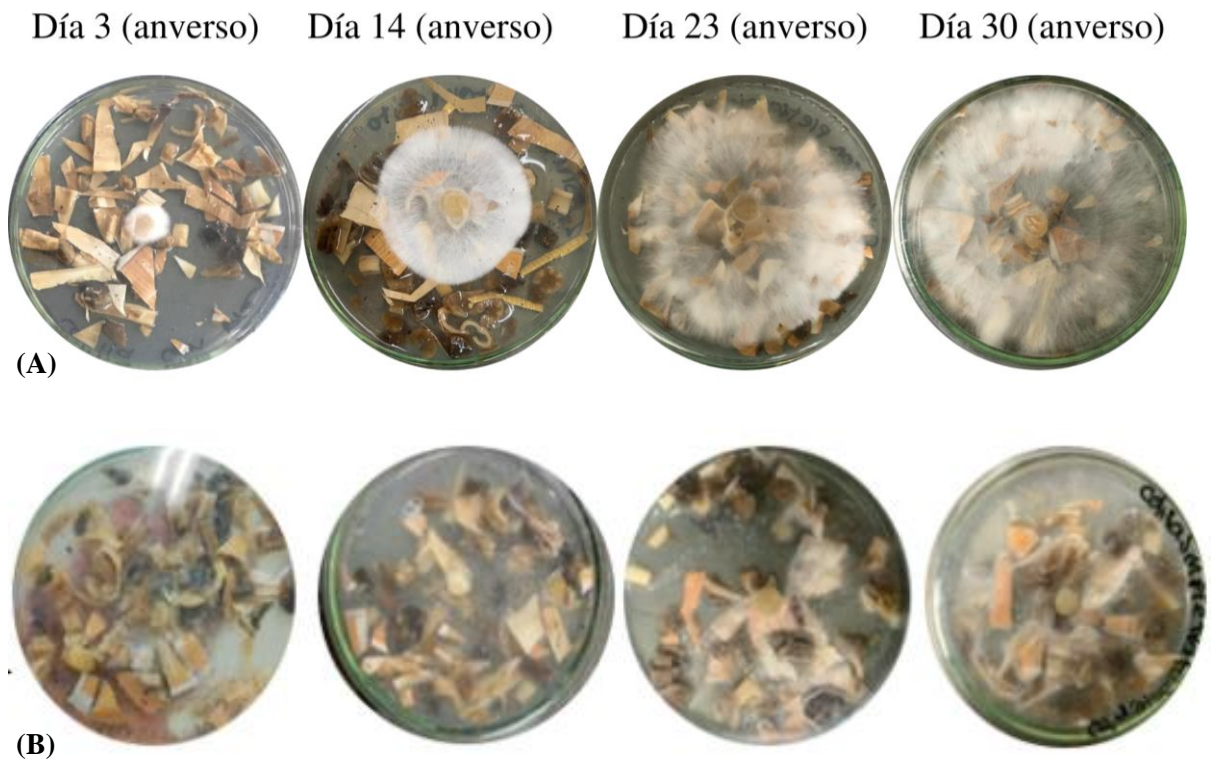


Figura 7. Producción de biomasa en un medio con colillas de cigarrillo durante 30 días. (A) Crecimiento de *Pleurotus ostreatus* en medio M9 + CC. (B) Crecimiento de *Phanerochaete* sp. en medio M9 + CC.

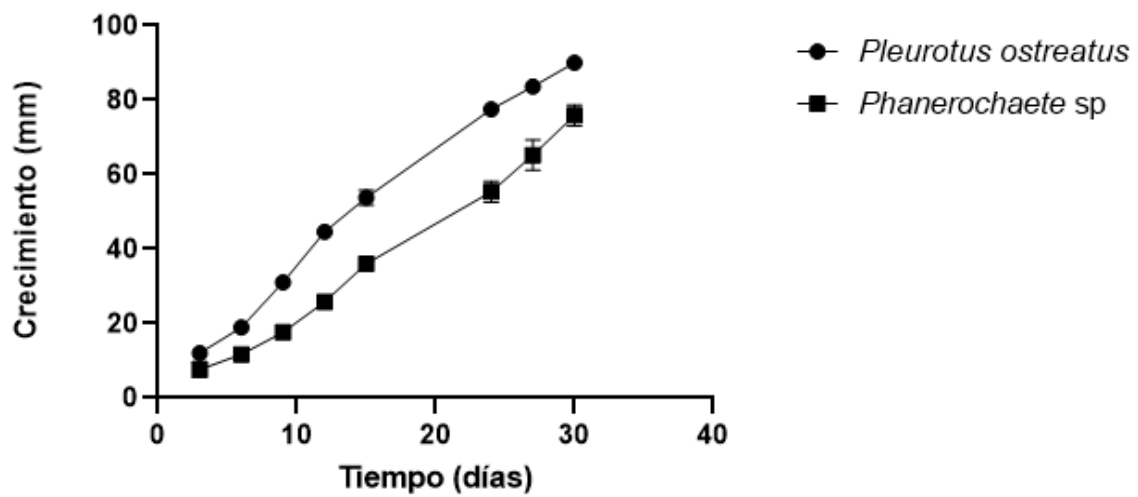


Figura 8. Crecimiento de *Pleurotus ostreatus* y *Phanerochaete* sp. en función del tiempo en agar M9 + CC.

De acuerdo con lo anterior, al realizar una comparación de *P. ostreatus* (figura 9 (A1)) y *Phanerochaete* sp. (Figura 9 (A2)) se observó que la colonización, en cuanto a la cantidad de micelio que se encuentra en el sustrato, fue menor en el caso de *Phanerochaete* sp. que en el de *P. ostreatus*.

La microscopía de estos hongos en 40X nos indica que, en el caso de *P. ostreatus*, hay presencia de hifas hialinas, delgadas, sin presencia de contaminación. (Figura 9B1), asimismo en la lámina de *Phanerochaete* sp. se pudo observar la presencia de posibles clamidosporas las cuales corresponden la morfología del filo Basidimycota del cual hace parte *Phanerochaete* sp. (Figura 9B2) (56).

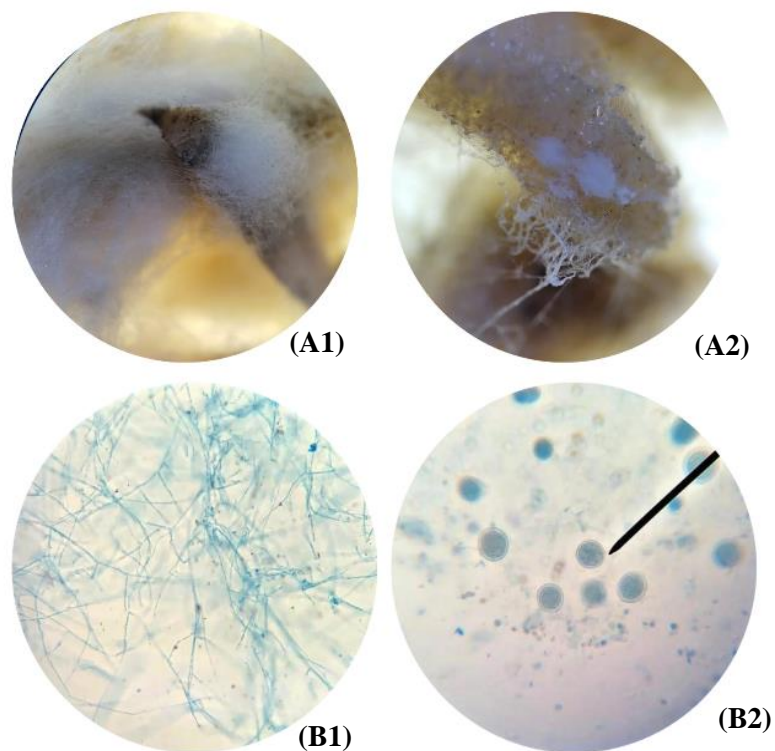


Figura 9. Microscopía de colonización en la colilla de cigarrillo de *Pleurotus ostreatus* (A1) y *Phanerochaete* sp. (A2) y microscopía de *Pleurotus ostreatus* (B1) y *Phanerochaete* sp. (B2).

5.3 Análisis de la estructura de las CC mediante microscopía electrónica de barrido (SEM)

Al observar la superficie del papel que rodea y cubre la CC (Figura 10A) fue posible identificar la presencia de fibras, así mismo después del proceso de fotólisis, se pueden apreciar las fibras de acetato de celulosa que se encuentran al interior de la colilla (Figura 10B) (57). El análisis SEM permitió evidenciar que *Phanerochaete* sp. y *P. ostreatus* fueron capaces de colonizar las CC por la presencia de hifas en la superficie de este (Figura 10C y D). Sin embargo, se pudo observar mayor colonización de *P. ostreatus* añadiendo que se observaron algunos pequeños poros en la fibra de la CC, a comparación de *Phanerochaete* sp., en el cual se observa poca colonización y no se observa presencia de porosidad a comparación con *P. ostreatus*.

En el estudio de Benítez & Esparza (2007), (13) se observó el crecimiento de *Pleurotus ostreatus* y *Trametes versicolor* en CC y los autores lograron observar que efectivamente estos hongos logran cambiar la estructura fibrilar del acetato de celulosa. Así mismo, la colonización del material de la colilla por parte de los hongos genera cambios en la topografía de la superficie de la colilla, las cuales están asociadas al desarrollo del micelio. Los microorganismos al ser capaces de secretar enzimas facilitan la adhesión a la superficie del material y pueden llegar a formar interfaces que también faciliten la penetración de las hifas y el crecimiento del micelio (42).

Se ha evidenciado que *P. ostreatus* participa en la biodegradación de colillas de cigarrillo, causando un daño estructural a las fibras del filtro por la formación de orificios en el material y una serie de irregularidades en la superficie, esto al mezclarlo con viruta de pino como sustrato para propiciar mejores resultados (58). Según un estudio realizado por Mayerhöfer et al. (2016), ciertos microorganismos presentan mayor crecimiento en los materiales deseados al combinarlos con celulosa, almidón, madera, semillas de linaza o plumas (59).

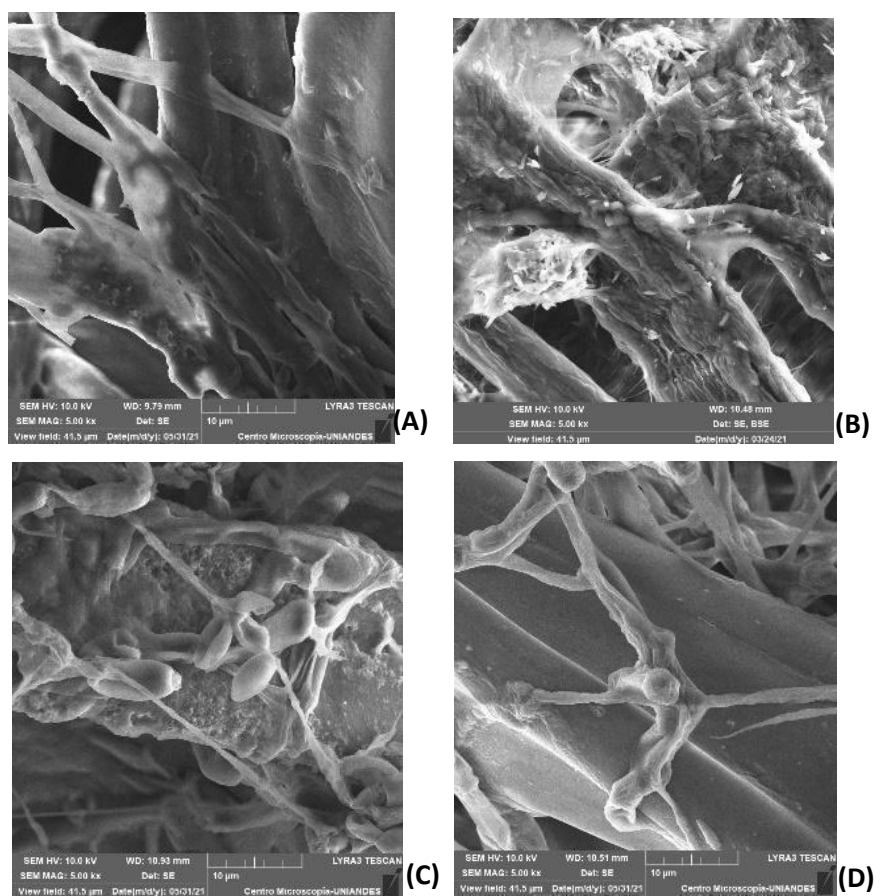


Figura 10. Imágenes SEM del papel de las colillas de cigarrillo (A), de las fibras que componen el interior de las colillas de cigarrillo seguido del proceso de fotólisis a un acercamiento de 5000x (B), colonización de *Phanerochaete* sp. en las colillas de cigarrillo (C) y colonización de *P. ostreatus* (D) en las colillas de cigarrillo con un aumento de 5000x.

5.4 Identificación de grupos funcionales de las CC mediante espectroscopía infrarroja transformada de Fourier (FTIR)

La FTIR determina las intensidades de bandas en la colilla de cigarrillo, que muestran la posible degradación o modificación de los componentes de esta una vez se va sometiendo a los diferentes tratamientos realizados. Las estructuras aromáticas y la identificación de los grupos funcionales en las colillas iniciales, tratadas con luz UV y biológicamente (Figura 11) se estudiaron utilizando la técnica FTIR.

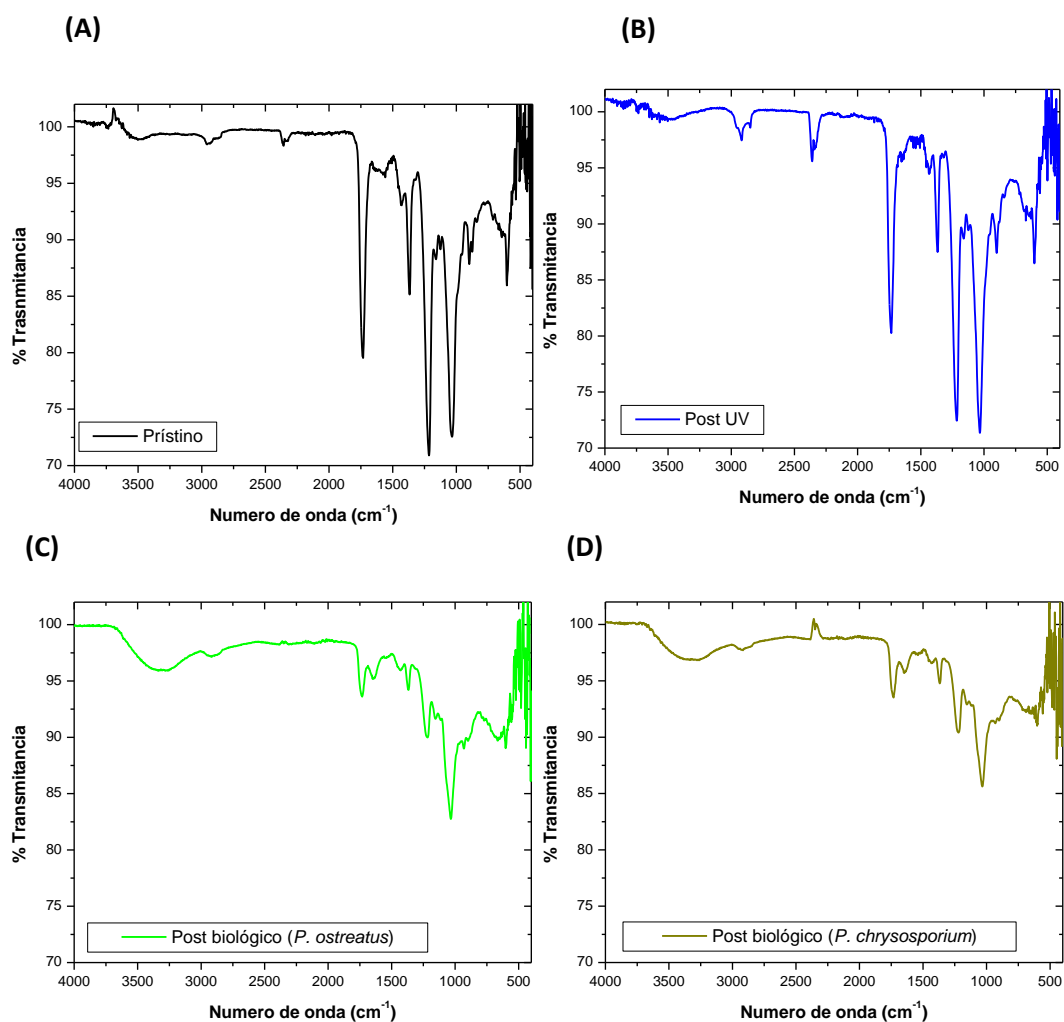
Con respecto a la identificación de enlaces y grupos funcionales de las CC en su estado inicial antes de ser sometidas a fotólisis (Figura 11A), se observaron vibraciones tipo OH (3500cm^{-1}), así como OH para CH_3 (3000cm^{-1}). También se pudo observar vibraciones de tensión asimétrica C=O (1742cm^{-1}) específicamente del grupo carbonilo del éster, las cuales pueden asociarse a la absorción por estiramiento C=O de ésteres carboxílicos saturados (53); así como vibraciones C=O acopladas a CH_3 (1374cm^{-1}) que pueden pertenecer a la flexión simétrica de C- CH_3 . En 1240cm^{-1} aparece nuevamente una vibración -C-O-C acoplada a CH_3 , pero en este caso se trata de una vibración de tensión relacionada con el estiramiento asimétrico del grupo carboxilato (60). Finalmente, resalta una vibración C-O que se destaca en 1048cm^{-1} .

Al comparar la Figura 11A (CC inicial) con un FTIR correspondiente a la estructura del acetato de celulosa, se puede afirmar que efectivamente la estructura química del compuesto que se encuentra en mayor cantidad conformando la CC, es un éster, en este caso, acetato de celulosa. Si la comparamos con la FTIR que se le realizó a la colilla luego del tratamiento con luz UV, podemos notar exactamente las mismas vibraciones entre los 500cm^{-1} y los 2000cm^{-1} . Las bandas correspondientes a alcoholes y fenoles (3000cm^{-1} - 3500cm^{-1}) tienen variaciones al estar un poco más marcados los picos, sin embargo, representan el mismo grupo funcional al presentarse en el mismo número de onda. Lo anterior nos indica que la fotólisis no representa un cambio en cuanto a la estructura química presente en la CC.

Respecto a la FTIR que se realizó a las colillas luego de someterse durante 30 días a tratamiento biológico, se obtuvo que tanto para el caso de *P. ostreatus* (Figura 11C), como para el caso de *Phanerochaete* sp. (Figura 11D), se observó la aparición de alcoholes en bandas más anchas (enlaces OH) que estén posiblemente asociados a procesos de degradación por fermentación de los hongos (3250cm^{-1}). Esto puede deberse a que a medida que los hongos crecen en la naturaleza sobre sustratos sólidos o residuos de materia orgánica, puede conducir a una fermentación más productiva (61). Guzmán et al. (año), afirman que *P. ostreatus* tiene la capacidad de crecer sobre numerosos sustratos y es larga la lista de materiales que se han empleado como sustrato básico para la producción de este hongo, esto se ve reflejado en la Figura 11C, al aprovechar el acetato de celulosa como sustrato para su desarrollo (62).

A su vez, se nota una disminución en la intensidad de las bandas que se marcan entre los 500 cm^{-1} y los 1750 cm^{-1} , las cuales reflejaban al grupo carbonilo y son características del AC, resaltando vibraciones tipo C-O (1076 cm^{-1}) en lugar de las mencionadas anteriormente; lo cual nos indica que efectivamente hay una degradación o consumo del acetato de celulosa por parte de ambos hongos. Lo anterior tiene sentido ya que estos hongos, debido a la producción de enzimas como lacasas, peroxidasas, fenolmonoxidasa y B-1,4 exoglucanasa; pueden llegar a degradar eficientemente los sustratos lignocelulósicos gracias a la acción celulolítica y ligninolítica de dichas enzimas (63).

La figura 11E muestra todos los FTIR integrados, donde se evidencia que efectivamente aparecieron más grupos alcoholes después del tratamiento biológico y disminuyó la cantidad de grupos carbonilo.



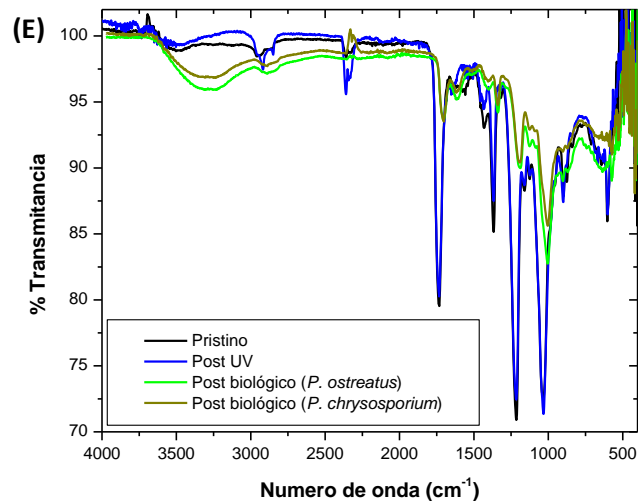


Figura 11. Determinación de los grupos químicos funcionales de colilla de cigarrillo marca Mustang® mediante Espectroscopia infrarroja en las diferentes fases del proceso de degradación: Colilla Mustang® inicial (A), seguido a la colilla con proceso de exposición a la luz UV (B), luego de ser colonizado por *P. ostreatus* (C) y *Phanerochaete* sp.(D). FTIR de todas las gráficas integradas (E).

7. Conclusiones

Al evaluar el efecto que tiene la fotólisis combinada con tratamiento biológico por parte de *Pleurotus ostreatus* y *Phanerochaete* sp. como proceso secuencial, se establece que ambos hongos tienen la capacidad de crecer en un medio con CC como sustrato, logrando la descomposición parcial de estos residuos que se manifiesta en los cambios de grupos funcionales presentes en estos.

La fotólisis efectivamente provocó cambios significativos en el pesaje de las CC, sin embargo, no hubo cambios respecto a los grupos funcionales de las CC. Los cambios en la estructura química de las CC se evidenciaron al combinarse la fotodegradación con el tratamiento biológico.

Pleurotus ostreatus presentó mayor crecimiento en el medio M9 + CC que *Phanerochaete* sp., lo que indica que se adapta más fácil.

8. Recomendaciones

Como recomendación para futuros hallazgos se sugiere llevar a cabo procedimientos que permitan observar específicamente la actividad enzimática de estos hongos e implementar técnicas que permitan determinar la composición inicial y final de las CC, como cromatografía, además se propone variar las distancias evaluadas entre la lámpara UV-C y las CC para lograr así una mayor degradación.

9. Bibliografía

1. Moerman J, Potts G. Analysis of metals leached from smoked cigarette litter. *Tobacco control*. 2011; 20:30–5.
2. Torkashvand J., Farzadkia M., Sobhi HR., Esrafil A. Littered cigarette butt as a well-known hazardous waste: A comprehensive systematic review. *Journal of Hazardous Materials*. 2019;383.
3. Chevalier Q, el Hadri H, Petitjean P, Bouhnik-Le Coz M, Reynaud S, Grassl B, et al. Nano-litter from cigarette butts: Environmental implications and urgent consideration. *Chemosphere*. 2018 Mar;194.
4. Bonanomi G, Incerti G, Cesarano G, Gaglione SA, Lanzotti V. Cigarette Butt Decomposition and Associated Chemical Changes Assessed by ¹³C CPMAS NMR. *PLOS ONE*. 2015 Jan 27;10(1).
5. Fukushi K, Ishio N, Hiroy K. Potential contribution of discarded cigarettes to anthropogenic eutrophication in an urban area. *Analytical Communications*. 1999;36(9–10).
6. Kaza S, Yao LC, Bhada-Tata, van Woerden F. What a Waste 2.0: A Global Snapshot of Solid Waste Management to 2050. *Urban Development*. 2018;5–7.
8. Araújo MCB, Costa MF. A critical review of the issue of cigarette butt pollution in coastal environments. *Environmental Research*. 2019 May;172.
9. SECRETARÍA DISTRITAL DE AMBIENTE. “Por el cual se establecen zonas libres de humo de tabaco, cigarrillos incluyendo cigarrillo electrónico, picaduras y sus derivados, se adoptan medidas restrictivas en la disposición de colillas de cigarrillo y se toman otras determinaciones. Bogotá; 2018.
10. Venugopal PD, Hanna SK, Gagliano GG, Chang HW. No Butts on the Beach: Aquatic Toxicity of Cigarette Butt Leachate Chemicals. *Tobacco Regulatory Science*. 2021 Jan 1;7(1).
11. Yousif E, Haddad R. Photodegradation and photostabilization of polymers, especially polystyrene: review. *SpringerPlus*. 2013 Dec 23;2(1).
12. Jureczko M, Przysaś W, Krawczyk T, Gonciarz W, Rudnicka K. White-rot fungi-mediated biodegradation of cytostatic drugs - bleomycin and vincristine. *Journal of Hazardous Materials*. 2021 Apr;407.
13. Benitez & Esparza. Degradación de los residuos sólidos del cigarrillo por el crecimiento de *Pleurotus ostreatus* y *Trametes versicolor*. [Ciudad de México]; 2007
14. Maadani Mallak A, Lakzian A, Khodaverdi E, Haghnia GH, Mahmoudi S. Effect of *Pleurotus ostreatus* and *Trametes versicolor* on triclosan biodegradation and activity of laccase and manganese peroxidase enzymes. *Microbial Pathogenesis*. 2020 Dec;149.

15. Espinosa-Páez E, Hernández-Luna CE, Longoria-García S, Martínez-Silva PA, Ortiz-Rodríguez I, Villarreal-Vera MT, et al. Pleurotus ostreatus: A potential concurrent biotransformation agent/ingredient on development of functional foods (cookies). *LWT*. 2021 Aug;148
16. Emami E, Zolfaghari P, Golizadeh M, Karimi A, Lau A, Ghiasi B, et al. Effects of stabilizers on sustainability, activity and decolorization performance of Manganese Peroxidase enzyme produced by *Phanerochaete chrysosporium*. *Journal of Environmental Chemical Engineering*. 2020 Dec;8(6)
17. Shen M, Li Y, Song B, Zhou C, Gong J, Zeng G. Smoked cigarette butts: Unignorable source for environmental microplastic fibers. *Science of The Total Environment*. 2021
18. Zhang H, Lu X, Wang Z, Yan X, Cui H. Excretion from long glandular trichomes contributes to alleviation of cadmium toxicity in *Nicotiana tabacum*. *Environmental Pollution*. 2021 Sep;285.
19. Dobaradaran S, Nabipour I, Saeedi R, Ostovar A, Khorsand M, Khajeahmadi N, et al. Association of metals (Cd, Fe, As, Ni, Cu, Zn and Mn) with cigarette butts in northern part of the Persian Gulf. *Tobacco Control*. 2017 Jul;26(4).
20. Bing X, Mengmeng F, Gang X, Jindi X, Songlin L, Xiaozhen C, Lisheng D, Yan Z. Investigation of the Chemical Compositions in Tobacco of Different Origins and Maturities at Harvest by GC-MS and HPLC-PDA-QTOF-MS. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2014; 62 (22)
21. Jiang Q, Dai D, Li H, Chen D.. Simultaneous determination of multiple components in cigarettes by mechanochemical extraction and direct analysis in real time mass spectrometry in minutes. *Analytica Chimica Acta*. 2019 Mayo; 1057.
22. Rahman MT, Mohajerani A. Thermal conductivity, and environmental aspects of cigarette butt modified asphalt. *Case Studies in Construction Materials*. 2021 Dec;15.
23. Fischer S, Thümmel K, Volkert B, Hettrich K, Schmidt I, Fischer K. Properties and Applications of Cellulose Acetate. *Macromolecular Symposia*. 2008 Jan;262(1).
24. Wsoo MA, Shahir S, Mohd Bohari SP, Nayan NHM, Razak SIA. A review on the properties of electrospun cellulose acetate and its application in drug delivery systems: A new perspective. *Carbohydrate Research*. 2020 May;491.
25. Kumuditha M. Weerakoon-Ratnayake, Swarnagowri Vaidyanathan, Charuni A. Amarasekara, Carey K. Johnson, Steven A. Soper. Chapter 7 - Single molecule analysis in nanofluidic devices. *Spectroscopy and Dynamics of Single Molecules*. 2019; 335-377.
26. Heinze T, Liebert T. 4.2 Chemical characteristics of cellulose acetate. *Macromolecular Symposia*. 2004 Mar;208(1).

27. Khoshnevisan K, Maleki H, Samadian H, Shahsavari S, Sarrafzadeh MH, Larijani B, et al. Cellulose acetate electrospun nanofibers for drug delivery systems: Applications and recent advances. *Carbohydrate Polymers*. 2018 Oct;198.
28. Smith EA, McDaniel PA. Covering their butts: responses to the cigarette litter problem. *Tobacco Control*. 2011 Mar 1;20(2).
29. National Center for Biotechnology Information. PubChem Compound Summary for CID 89594, Nicotine. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Nicotine>.
30. Benowitz NL, Hukkanen J, Jacob P. Nicotine Chemistry, Metabolism, Kinetics and Biomarkers. 2009.
31. Roder AL, Putschew A, Nehls T. Littered cigarette butts as a source of nicotine in urban waters. *Journal of Hydrology*. 2014 Nov; 519, 3466-3474
32. González S, Valcárcel Y, Montero J, Catalá M. Nicotine occurrence in bottled mineral water: Analysis of 10 brands of water in Spain. *Science of The Total Environment*. 2012 Feb; (416) 527-531.
33. Moerman JW, Potts GE. Analysis of metals leached from smoked cigarette litter. *Tobacco Control*. 2011 May 1;20(Supplement 1).
34. Moriwaki H, Kitajima S, Katahira K. Waste on the roadside, 'poi-sute' waste: Its distribution and elution potential of pollutants into environment. *Waste Management*. 2009 Mar;29(3).
35. Dobaradaran S, Schmidt TC, Lorenzo-Parodi N, Kaziur-Cegla W, Jochmann MA, Nabipour I, et al. Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) leachates from cigarette butts into water. *Environmental Pollution*. 2020 Apr;259.
36. Dobson RS, Burgess JE. Biological treatment of precious metal refinery wastewater: A review. *Minerals Engineering*. 2007 May;20(6).
37. Posada Bustamante B. La degradación de los plásticos. *Revista Universidad EAFIT*. 2012; 30:67–86.
38. Marzullo L, Cannio R, Giardina P, Santini MT, Sannia G. Veratryl Alcohol Oxidase from *Pleurotus ostreatus* Participates in Lignin Biodegradation and Prevents Polymerization of Laccase-oxidized Substrates. *Journal of Biological Chemistry*. 1995 Feb;270(8).
39. Tsang-a1, J. S., Madden, O., Coughlin, M., Maiorana, A., Watson, J., Little, N. C., & Speakman, R. J. Degradation of 'Lumarith' cellulose acetate. *Studies in conservation*, 2009; 54(2), 90-105.
40. Wolter M, Zadrazil F, Martens R, Bahadir M. Degradation of eight highly condensed polycyclic aromatic hydrocarbons by *Pleurotus* sp. Florida in solid wheat straw substrate. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 1997 Sep 26;48(3).

41. Maadani Mallak A, Lakzian A, Khodaverdi E, Haghnia GH, Mahmoudi S. Effect of *Pleurotus ostreatus* and *Trametes versicolor* on triclosan biodegradation and activity of laccase and manganese peroxidase enzymes. *Microbial Pathogenesis*. 2020 Dec;149.
42. Kuppuraj SP, Venkidasamy B, Selvaraj D, Ramalingam S. Comprehensive in silico and gene expression profiles of MnP family genes in *Phanerochaete chrysosporium* towards lignin biodegradation. *International Biodeterioration & Biodegradation*. 2021 Feb;157.
43. Kan CW, Yuen CWM, Jiang SQ. The effect of cellulase treatment on hydrolysis of linen. *Fibers and Polymers*. 2006 Sep;7(3).
44. MORIYOSHI K, OHMOTO T, OHE T, SAKAI K. Role of Endo-1,4- β -glucanases from *Neisseria sicca* SB in Synergistic Degradation of Cellulose Acetate. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*. 2003 Jan 22;67(2).
45. Ferreira da Silva I, Rodrigues da Luz JM, Oliveira SF, Humberto de Queiroz J, Megumi Kasuya MC. High-yield cellulase and LiP production after SSF of agricultural wastes by *Pleurotus ostreatus* using different surfactants. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*. 2019 Nov;22.
46. Gómez L. Evaluación de la descarga de plasma, fotocatalisis TiO₂/UV y la acción de *Pleurotus ostreatus*, en la transformación de polietileno de baja densidad (PEBD). [Bogotá]; 2018.
47. Alberti S, Sotiropoulou M, Fernández E, Solomou N, Ferretti M, Psillakis E. UV-254 degradation of nicotine in natural waters and leachates produced from cigarette butts and heat-not-burn tobacco products. *Environmental Research*. 2021 Mar; (194).
48. Puls, J., Wilson, S.A. & Hölder, D. Degradation of Cellulose Acetate-Based Materials: A Review. *J Polym Environ*. 2011 Nov; (19) 152–165.
49. Chong B, Werth V. 33 - Skin Disease in Cutaneous Lupus Erythematosus. *Dubois' Lupus Erythematosus and Related Syndromes (Ninth Edition)*. 2019; 395-406.
50. Bhatnagar N, Asija N. Durability of high-performance ballistic composites. *Lightweight Ballistic Composites*. 2016. 231-283.
51. Peng Y, Liu R, Cao J, Chen Y. Effects of UV weathering on surface properties of polypropylene composites reinforced with wood flour, lignin, and cellulose. *Applied Surface Science*. 2014 Oct;317.
52. Xu F, Chen P, Li H, Qiao S, Wang J, Wang Y, et al. Comparative transcriptome analysis reveals the differential response to cadmium stress of two *Pleurotus* fungi: *Pleurotus cornucopiae* and *Pleurotus*
53. Jeimmy Roxana Peña González. Procesos de biorremediación en el tratamiento de residuos sólidos de cigarrillo. [Bogotá]; 2017. *Journal of Hazardous Materials*. 2021 Aug;416.

54. Zafra G, Taylor TD, Absalón AE, Cortés-Espinosa D v. Comparative metagenomic analysis of PAH degradation in soil by a mixed microbial consortium. *Journal of Hazardous Materials*. 2016 Nov;318
55. Hassan Khalil, Estelle Legin, Bernard Kurek, Patrick Perre, Behnam Taidi. Morphological growth pattern of *Phanerochaete chrysosporium* cultivated on different *Miscanthus x giganteus* biomass fractions. *Research Square*. 2021
56. Cepero de García María Caridad, Restrepo Silvia, Franco Ana Esperanza, Cárdenas Martha, Vargas Natalia. *Biología de Hongos*. Bogotá; 2012. 248-undefined
57. Chen J, Xu J, Wang K, Cao X, Sun R. Cellulose acetate fibers prepared from different raw materials with rapid synthesis method. *Carbohydrate Polymers*. 2016 Feb;137
58. Quéméneur M, Chifflet S, Akrouf F, Bellaaj-Zouari A, Belhassen M. Impact of cigarette butts on microbial diversity and dissolved trace metals in coastal marine sediment. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*. 2020 Aug;240
59. Velioglu Z, Ozturk Urek R. Optimization of cultural conditions for biosurfactant production by *Pleurotus djamor* in solid state fermentation. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 2015 Nov; 120(5).
60. Mayerhöfer TG, Mutschke H, Popp J. Employing Theories Far beyond Their Limits-The Case of the (Boguer-) Beer-Lambert Law. *ChemPhysChem*. 2016 Jul 4;17(13).
61. Ruiz- Ramos J. Degradación de filtros de cigarro por medio de *Pleurotus ostreatus* var. crema BPR-1. [Ciudad de México]; 2019.
62. Guzmán G, & Mata G. El cultivo de los hongos comestibles. Instituto Politécnico Nacional de México. 1993;(245).
63. Akmedova, Z. Cellulolytic xylanolytic and lignolytic enzymes of the fungus *Pleurotus ostreatus*. 1994; (42-48)

ANEXOS

Anexo 1.

Componente	[]
Na ₂ HPO ₄	33.9 g/L
NaCl	2,5 g/L
KH ₂ PO ₄	15 g/L
NH ₄ Cl	5g/ L
Agar	15g/L

Tabla 1. Composición agar M9 + CC.

Anexo 2.

	<i>Variable 1</i>	<i>Variable 2</i>
Media	0,291624592	0,2886949
Varianza	0,000127324	8,7628E-05
Observaciones	98	98
Coefficiente de correlación de Pearson	0,705749868	
Diferencia hipotética de las medias	0	
Grados de libertad	97	
Estadístico t	3,573782723	
P(T<=t) una cola	0,000275113	
Valor crítico de t (una cola)	1,66071461	
P(T<=t) dos colas	0,000550226	
Valor crítico de t (dos colas)	1,984723186	

Tabla 2. Prueba T-Student para medias de dos muestras emparejadas

Anexo 3.

CRECIMIENTO RADIAL EN CAJA DE PETRI DE 90 mm de diámetro								
Hongo	#CAJA	Día 3 (mm)	Día 6 (mm)	Día 9 (mm)	Día 12 (mm)	Día 15 (mm)	Día 24 (mm)	Día 30 (mm)
Crecimiento <i>Pleurotus ostreatus</i>	A1	12	20,6	31,8	46	52,7	79	90
	A2	10,8	22	35	46,5	55,5	78,2	90
	A5	12	17,33	30	42,8	50	78,3	90
	A6	13	18	31,6	44	53,4	76,1	90
	A7	13,5	18,6	29,5	43,2	55,2	77,4	90
	A9	11,73	20,6	31	45,7	54,7	75,2	90
	A11	11,2	18,33	29,8	44,2	56,2	78,3	90
	A12	12,4	16	29,8	44,6	53	77,6	90
PROMEDIO		12,0787 5	18,9325	31,0625	44,625	53,8375	77,5125	90
DESVIACIÓN ESTANDAR		0,83015 7	1,853420	1,816541	1,336038	1,99494898	1,269912	0
Crecimiento <i>Phanerochaete sp.</i>	A16	5	11,2	17	25,4	33,3	55,3	73,2
	A17	5,3	10,5	20,2	22,8	35,7	53,4	72,4
	A18	8,7	12,3	18,3	24,2	34,9	57,9	77,3
	A21	5,9	11,4	17,8	27,2	32	58	79,2
	A23	6,5	11,7	15,2	26,4	37,1	53,2	78,6
	A24	9,3	12	17,1	28,6	39,5	50,4	78,5
	A25	10	12,4	19,2	25,9	38,8	56,9	75
	A28	10	11,9	16	25,6	36,7	58,2	73
PROMEDIO		7,5875	11,675	17,6	25,7625	36	55,4125	75,9
DESVIACIÓN ESTANDAR		1,99276 0	0,627352	1,637942	1,769533	2,57404629	2,852286	2,8198 27

Tabla 3. Crecimiento radial de los hongos en agar M9+CC.