

Obtención de extractos celulolíticos a partir de *Pleurotus ostreatus* empleando como sustrato lirio acuático

TOVAR-JIMÉNEZ, Xochitl*†, TELLEZ-JURADO, Alejandro, LÓPEZ-MEDINA, Emma Nallely, FAVELA-TORRES, Ernesto y HERNÁNDEZ-ALDANA, Ithzmalzin

Recibido 3 de Julio, 2017; Aceptado 19 de Agosto, 2017

Resumen

El lirio acuático se considera una plaga ya que reduce la cantidad de oxígeno disuelto e impide el paso de luz evitando el crecimiento de la flora y fauna acuática, sirve como nicho para la reproducción de mosquitos los cuales son vectores de enfermedades. Las alternativas de solución a dichos problemas van desde la erradicación hasta el control y manejo, sin embargo, los altos costos ocasionan que no se aplique de forma permanente. Una opción es el aprovechamiento de la biomasa del lirio cuya composición química incluye lignina (3%), celulosa (18%) y hemicelulosa (40-55%), la cual pueden ser utilizada para obtener productos de valor agregado como las enzimas, en este sentido, las enzimas celulolíticas de los hongos como *Pleurotus ostreatus* son las más importantes desde el punto de vista industrial, debido a que su actividad es mayor que la de las obtenidas de levaduras y bacterias. Por lo antes mencionado, el objetivo del trabajo fue obtener un extracto celulolítico a partir de *P. ostreatus* empleando como sustrato lirio acuático (hoja y bulbo) por medio de fermentación en medio sólido. Se encontró que la mayor actividad celulolítica para hoja y bulbo se presenta al cabo de 12 h de incubación.

Lirio acuático, *Pleurotus ostreatus*, actividad celulolítica

Abstract

The water hyacinth is considered a pest species because it reduces the amount of dissolved oxygen and prevents the passage of light avoiding the growth of aquatic flora and fauna, serves as a niche for the reproduction of mosquitoes, which are vectors of diseases. Alternative solutions to such problems range from eradication to control and management; however, high costs do not apply permanently. One option, is the use of water hyacinth biomass whose chemical composition includes lignin (3%), cellulose (18%) and hemicellulose (40-55%), which can be used to obtain value added products such as enzymes. In this sense, the cellulolytic enzymes of fungi like *Pleurotus ostreatus* are the most important from the industrial point of view, because their activity is greater than that obtained from yeasts and bacteria. The aim of the work was to obtain a cellulolytic extract from *P. ostreatus* using as substrate water hyacinth (leaf and bulb) by solid-state fermentation. It was found that the highest cellulolytic activity with leaf and bulb like substrate occurs after incubation for 12 h.

Water hyacinth, *Pleurotus ostreatus*, cellulolytic activity

Citación: TOVAR-JIMÉNEZ, Xochitl*†, TELLEZ-JURADO, Alejandro, LÓPEZ-MEDINA, Emma Nallely, FAVELA-TORRES, Ernesto & HERNÁNDEZ-ALDANA, Ithzmalzin. Obtención de extractos celulolíticos a partir de *Pleurotus ostreatus* empleando como sustrato lirio acuático. Revista de Ingeniería Biomédica y Biotecnología. 2017, 1-1: 26-34

* Correspondencia al autor (email: xtovar@upp.edu.mx)

† Investigador contribuyendo como primer autor

Introducción

El lirio acuático (*Eichhornia crassipes*) es una planta libre flotadora perteneciente a la familia de las Pontederiaceae, proveniente de Brasil, a finales de 1800 fue introducida a América del Norte como una planta ornamental, en África a principios de 1900 y en Europa en 1930, ahora está naturalizada en más de 50 países de América Central, Asia, Australia y Nueva Zelanda. La presencia de lirio acuático se debe principalmente a las combinaciones de características biológicas únicas de la planta, al calentamiento global por el efecto invernadero y a los procesos acelerados de eutrofización (Yan, Song & Guo, 2017).

El lirio puede medir hasta 1 m de altura, está formada por hojas dispuestas en una roseta basal, pecíolos cortos/globosos cuando se trata de plantas jóvenes o largos/cilíndricos en el caso de plantas maduras; tiene raíces fibrosas y un tallo horizontal llamado rizoma o estolón que conecta varios individuos entre sí (Figura 1). Su productividad anual promedio es de 50 kg/m² (peso seco); un grupo de plantas de tamaño mediano puede contener hasta dos millones de individuos por ha, con un peso aproximado de 270 a 400 t. Por su abundancia en cuerpos de agua, además de su incontrolable y rápido crecimiento, el lirio ocasiona daños hacia actividades recreativas e industriales, así mismo genera problemas de salud humana y a los ecosistemas. Entre los efectos negativos más importantes pueden citarse la pérdida de agua de cuerpos de agua por transevaporación, la disminución de oxígeno disuelto, la alteración irreversible de ecosistemas, además de ser nichos para la reproducción de mosquitos vectores de enfermedades (Rezania, Ponraj, Din, Songip, Sairan & Chelliapan, 2015).

Se estima que en México existe alrededor de 40,000 ha con presencia de lirio, cubriendo desde 10 hasta 100 % del espejo de agua. El manejo de la planta representa problemas debido, a su alto contenido de humedad (~95 %), lo que encarece su transporte y disposición (Martínez & Gómez, 2007).

Existen tres estrategias para el manejo de la planta: 1) *extracción mecánica* la cual permite mantener limpios los cuerpos de agua, sin embargo, la extracción, transporte y disposición final encarecen el proceso por lo que esta estrategia no se aplica de forma permanente. En este sentido, dependiendo del interés socio-económico de cada cuerpo de agua, hay programas permanentes de extracción mecánica, un ejemplo de ello son los canales y presas destinadas a actividades recreativas, como Xochimilco o la Presa San Antonio de Huasca de Ocampo, Hgo., en donde la presencia de lirio representa un riesgo para los motores; 2) El *control biológico* con hongos filamentosos (*Cercospora piaropi* y *Acremonium zonatum*) y artrópodos (*Neochetina bruchi* y *N. eichhorniae*) ha dado buenos resultados en México y otros países; sin embargo, tanto por los costos del tratamiento como por el impacto de las condiciones climáticas (temperatura, lluvia, corrientes de agua y luminosidad) sobre la efectividad del tratamiento, este método no se aplica de forma permanente como método de control. 3) El uso de *herbicidas* como diquat, glifosato y ácido 2,4-dicloro fenoxiacético para el control de malezas; no obstante, su aplicación implica diversos grados de toxicidad para especies endémicas de peces y plantas, así como, para hortalizas y cultivos agrícolas. Aunque los herbicidas se utilizan en el mundo para el control de malezas, su uso es cada vez más restringido (Rezania et al., 2015; Martínez & Gómez, 2007).

A pesar de las numerosas propuestas para la erradicación y manejo del lirio, la excesiva presencia de la planta sigue afectando numerosos cuerpos de agua, canales y sistemas de drenaje, provocando problemas ecológicos, económicos y de salud. Por su naturaleza fibrosa y su alto contenido de agua, energía y proteína, el lirio puede usarse en una variedad de aplicaciones (Jongmeesuk, Sanguanchaipaiwong & Ochaikul, 2014).

Se ha determinado que la biomasa del lirio acuático es capaz de generar bio-productos, es decir, abono orgánico, bioles y biogás, mediante la implementación de biodigestores. También en algunos estudios se propone al lirio acuático como fitorremediador, captando metales pesados presentes en el agua, sin embargo, depende del grado de contaminación, la disponibilidad del metal para su absorción y la interacción de la planta con su hábitat (Rai, 2009).

En algunos lugares lo utilizan como alimento para animales y fertilizante orgánico (Tham, 2012). Por otra parte, la biomasa del lirio acuático puede ser empleada para obtener productos de valor agregado como por ejemplo enzimas a partir de microorganismos que utilizan como sustrato la celulosa, hemicelulosa y lignina, aprovechando la composición química de la pared celular del lirio (Jongmeesuk, Sanguanchaipaiwong & Ochaikul, 2014).

Particularmente, las celulasas como su nombre lo indica, son capaces de hidrolizar la celulosa, homopolímero compuesto por unidades de glucosa unidas mediante un enlace glicosídico β -1,4. Estas enzimas están clasificadas de acuerdo con su sitio de acción en el sustrato celulósico y se dividen en tres grandes grupos:

Endoglucanasas (EnG), exoglucanasas o también conocidas como celobiohidrolasas (ExG) y las β -glucosidasas (BG) que hidrolizan celobiosa y oligosacáridos solubles, siendo la glucosa el resultado final de la acción degradativa del complejo celulolítico sobre el polímero de celulosa (Gurgel, Marabezi, Ramos & Curvelo, 2012).

Por otra parte, los hongos son los principales microorganismos degradadores de los residuos lignocelulósicos, siendo los más rápidos y eficientes para esto, los basidiomicetos ya que tienen sistemas ligninolíticos, los cuales se dividen en tres grupos, con base en la pudrición que generan en la madera: hongos de podredumbre blanda, parda y blanca (Hatakka & Hammel, 2011; Elisashvili, Kachlishvili, Tsiklauri, Metreveli, Khadziani & Agatos, 2011).

En este sentido, *Pleurotus ostreatus* es un hongo saprofito o parásito débil que pertenece al grupo de podredumbre blanca, ya que degrada preferentemente a la lignina de las plantas, usando enzimas oxidativas extracelulares para romper este biopolímero altamente recalcitrante. *P. ostreatus* es capaz de producir un complejo enzimático hidrolítico en distintos residuos lignocelulósicos y bajo diferentes estrategias de cultivo. El micelio de *este basidiomiceto* puede crecer en una temperatura entre 0 y 35 °C, con un óptimo de 30 °C, y en un intervalo de pH entre 5.5 y 6.5. Se ha observado que después de cosechar los cuerpos fructíferos de *P. ostreatus*, en los materiales usados como sustratos las cantidades finales de hemicelulosa, celulosa y lignina se han reducido en un 80 % sugiriendo que todos los materiales que contienen estos compuestos, pobres en nitrógeno pueden ser usados como como fuente de alimento para el hongo (Vaca, Izurieta & Espín, 2014; Sánchez, 2009).

Metodología a desarrollar

Aislamiento y crecimiento de *P. ostreatus*

P. ostreatus se aisló a partir del cuerpo fructífero de una seta, en placas petri con agar papa dextrosa (PDA y gentamicina (20 mg/2 mL) 50 µL de antibiótico /20 mL de medio de cultivo) para evitar el crecimiento de bacterias, se incubó por 7 días a $26\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$. Al cabo de este tiempo se observó microscópicamente.

Cinética de producción de actividad celulolítica de *P. ostreatus*

Se realizó una cinética de producción de actividad celulolítica de *P. ostreatus* a $26 \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ en medio líquido el cual estaba conformado de: glucosa (10.5 g/L), extracto de levadura (5.0 g/L), $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (2.0 g/L), Na_2HPO_4 (0.5 g/L), MgSO_4 (0.5 g/L), $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ (0.3 g/L), FeSO_4 (0.02 g/L), ZnSO_4 (0.02 g/L), MnSO_4 (0.02 g/L), CuSO_4 (0.25 g/L) y gentamicina (125 µL). El cultivo se agitó a 150 r.p.m. y cada 12 h se tomó muestra para determinar la actividad celulolítica, esto con la finalidad de determinar el tiempo de incubación en el cual se presenta mayor actividad celulolítica.

Obtención del extracto crudo enzimático

El extracto crudo enzimático (ECE) se obtuvo a partir de un cultivo de *P. ostreatus* de 12 h, tomando en cuenta las condiciones establecidas en la cinética de producción de actividad celulolítica de dicho hongo, el cultivo líquido se centrifugó a 4000 rpm por 10 min y el sobrenadante se consideró como ECE-12h.

Fermentación en medio sólido de *P. ostreatus* empleando como sustrato lirio acuático

Para llevar a cabo la fermentación en medio sólido (FMS), se pesaron 0.2 g de lirio acuático (hoja o bulbo) en tubos de ensaye y se ajustó el contenido de humedad al 70 %, para posteriormente esterilizar a $120\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 30 min y adicionar 0.5 mL de una solución de sales minerales [NaNO_3 (80 mg/L), MgSO_4 (0.02 g/L), K_2HPO_4 (0.5 g/L,) y KCl (10 mg/L)]. Con la finalidad de determinar que tipo de sustrato e inoculación permitía obtener mayor actividad celulolítica se inocularon con 1.2 mL del ECE-12 h 45 tubos de ensaye que contenían hoja y 45 tubos de ensaye que tenían bulbo. De igual forma, a 45 tubos de ensaye con hoja y 45 tubos de ensaye con bulbo, se les adicionó un fragmento de 1 cm^2 de micelio-agar de *P. ostreatus* de 7 días de crecimiento. Todos los tubos se incubaron a una temperatura de $26\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 15 días, cada 24 h se tomó una muestra para determinar la actividad celulolítica y proteína extracelular. Cabe mencionar que todos los experimentos se realizaron por triplicado.

Determinación de la actividad celulolítica por el método del ácido 3-5, dinitrosalicílico

Se colocó en un tubo de ensayo 450 µL de carboximetilcelulosa (CMC) al 0.2 % como sustrato, previamente disuelto en buffer de acetatos (100 mM, pH 5.3), se adicionó 50 µL del ECE-12h e incubó a $40\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 20 min. Transcurrido el tiempo, se añadió 750 µL de DNS y llevó a ebullición durante 10 min en baño María, seguido de un enfriamiento en baño de hielo, hasta leer su absorbancia a una longitud de onda de 640 nm. Se calculó la actividad enzimática restando el valor de la absorbancia obtenida de los azúcares reductores generados. Como blanco de la reacción se utilizó agua destilada que sustituye la CMC 0.2 % y se trató bajo las mismas condiciones.

A partir de una curva estandar utilizando glucosa como patrón, se determinó la cantidad de enzima requerida para liberar 1 μmol de celulosa por minuto bajo las condiciones de reacción y se expresaron los resultados en unidades de actividad (UA), (Dhillon, Kaur, Brar & Verma, 2012).

Determinación del contenido de proteína extracelular

A 300 μL de la muestra (ECE-12 o extracto micelio-agar) se adicionó 1 mL del reactivo C preparado al instante (A (NaOH 0.4 %; $\text{KNaC}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 0.16 %; Na_2CO_3 2 %; SDS 1 %) y B ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 4 %); [100:1 v/v]), se incubó 15 min a 25 °C para después adicionar 100 μL de Fenol Folin-Ciocalteu con agua (1:1 v/v), se incubó 30 min a 37 °C, y leyó la absorbancia a 660 nm, la concentración de proteína se calculó a partir de una curva patrón preparada con albúmina bovina sérica (BSA) en concentraciones de 0 a 120 $\mu\text{g/mL}$ (Lowry, Rosengrough, Farr & Randall, 1951; Peterson, 1977)

Resultados

Aislamiento y crecimiento de *P. ostreatus*

En la Figura 2 se muestran las imágenes de *Pleurotus ostreatus* luego de 7 días de cultivo a 25°C. Macroscópicamente el cultivo presentó esporas y desarrollo de micelio blanco algodónoso con abundante micelio aéreo y con formación de anillos desde el centro de la caja hacia su periferia. Así mismo, microscópicamente se observaron basidiosporas.

Cinética de producción de actividad celulolítica de *P. ostreatus*

En la Gráfico 1 se muestran los resultados de la cinética de producción de enzimas celulolíticas de *P. ostreatus*, donde se observa que a las 12 h el extracto enzimático presenta mayor actividad enzimática, por lo cual para la FMS se empleó un cultivo de 12 h de *P. ostreatus*.

Fermentación en medio sólido de *P. ostreatus* empleando como sustrato lirio acuático

En la Gráfico 2 se muestran los resultados de la actividad celulolítica y de proteína extracelular del extracto enzimático obtenido a partir del cultivo de 12 h de *P. ostreatus*, donde se observa que la mayor producción de celulasas se obtiene a las 24 h (12.83 UA/gms para hoja (Gráfico 2a) y 9.92 UA/gms para bulbo (Gráfico 2b), así mismo, el máximo contenido de proteína extracelular se presenta en este tiempo.

En la Gráfico 3 se muestran los resultados de la actividad celulolítica y de proteína extracelular del extracto enzimático obtenido con micelio-agar de *P. ostreatus*. Donde se observa el mismo comportamiento que cuando se empleó un ECE-12 h de *P. ostreatus*, la mayor producción de enzimas fue a las 24 h, en hoja se obtuvo 9.15 UA/gms (Gráfico 3a) y 6.56 UA/gms en bulbo (Gráfico 3b). En cuanto al contenido de proteína extracelular, se obtiene la mayor cantidad al tiempo de 24 h de incubación.

En general, las enzimas xilanolíticas y celulolíticas se expresan simultáneamente durante la fermentación en fase sólida en sustratos agrícolas (Membrillo, Sánchez, Meneses, Favela & Loera, 2011), esto se debe a que el hongo causa modificaciones en la estructura de la lignocelulosa, lo cual estimula la liberación secuencial de enzimas extracelulares.

La degradación de la celulosa por hongos requiere de un complejo celulolítico de al menos tres enzimas que actúan en forma sinérgica: β -1,4 endoglucanasa, β -1,4 exoglucanasa y β -glucosidasa (Hatakka & Hammel, 2010; Elisashvili *et al.*, 2011; Sánchez, 2009). *P. ostreatus* es un hongo que degrada eficientemente la lignina y celulosa, ya que produce durante su crecimiento enzimas lignocelulolíticas. Por lo que, *P. ostreatus* es capaz de ocasionar cambios en la composición química del lirio acuático, reduciendo las fracciones fibra detergente neutro, fibra detergente ácido, celulosa y hemicelulosa (Sun, Zhang & Zhang, 2004; Castro, De Aguiar-Paiva, Souza-Días & Dos-Santos, 2004; Fazaeli, Azizi, Jelan & Mirhadi, 2003; Villa-Cruz, Huerta-Palacios & Sánchez-Vázquez, 1999). Así mismo, la producción de enzimas celulolíticas puede variar dependiendo del microorganismo, el sustrato de crecimiento y de las condiciones de cultivo, así como del tiempo de incubación (Park, Kang, Lee, Hong & Kim, 2002; Nsereko, Morgavi, Rode, Beauchemin & McAllister, 2000). De igual forma, Benitez Moreno, Rincón & Codón (2006) mencionan que la expresión de los genes de enzimas hidrolíticas está controlada por la fuente de carbono, de modo que la transcripción se reprime en presencia de fuentes fácilmente asimilables. Además, Deshpande Nair & Khedkar (2000), indican que las condiciones del pretratamiento, pH, concentración y tipo de sustrato, tipo de inoculación y temperatura de incubación afectan la producción de enzimas celulolíticas, todo lo anterior coincide con los resultados obtenidos en este estudio, ya que se observó que la mayor actividad celulolítica producida por *P. ostreatus* se presenta al hidrolizar la hoja de lirio acuático con los dos tipos de inoculación evaluados, sin embargo, al emplear el cultivo de 12 h, permitió obtener mayor actividad enzimática en comparación a la inoculación con micelio-agar.

Deshpande, Bhotmange, Chakrabarti & Shastri (2008) concluyen que el lirio acuático debido a su biomasa lignocelulosa es un sustrato potencial para la producción de enzimas sacarificantes (celulolíticas y xilanolíticas) e indican que la máxima actividad celulolítica producida por *Trichoderma reesei* (QM 9414 mutant), al emplear como sustrato lirio acuático es de 1.2 UI/gms al cabo de 10 días de incubación. Por otra parte, el alto contenido de proteína extracelular indica la posibilidad de que el microorganismo no presentó problemas para asimilar los sustratos empleados, además refleja principalmente la concentración de enzima extracelular producida en el periodo, ya que es la proteína soluble presente después de la extracción, y no la proteína de la célula fúngica (Dhillon *et al.*, 2012).

Agradecimiento

Los autores agradecen al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por el apoyo otorgado para desarrollar el proyecto denominado “Manejo sustentable de lirio acuático para el saneamiento y protección de cuerpos de agua” a través de la Convocatoria de Proyectos de Desarrollo Científico para atender Problemas Nacionales 2014.

Conclusiones

La cinética de crecimiento de *P. ostreatus*, mostró que el extracto enzimático producido a las 12 h presenta mayor actividad celulolítica. Y al emplear el cultivo de 12 h de *P. ostreatus* es posible obtener mayor actividad enzimática en comparación a la inoculación con micelio-agar. Así mismo, se obtiene mayor actividad enzimática al emplear como sustrato hoja de lirio acuático.

Referencias

- Benítez, T., Moreno, MMA., Rincón, AM., Codón, AC. (2006). Características de Levaduras y Hongos Filamentosos de Interés en Agroalimentación ¿Adaptación al Ambiente?. Boletín Informativo de la Sociedad Española de Microbiología, 41, 17-27.
- Castro, AL., De Aguiar-Paiva, PC., Souza-Días, E., Dos-Santos, J. (2004). Avaliação das alterações bromatológicas e degradabilidade do residuo de lixiviadora do algodón após tratamento biológico com *Pleurotus sajor-caju*. Ciência e Agrotecnologia, 28, 608-661.
- Deshpande, P., Sajitha, N., Shubhangi, K. (2000). Water hyacinth as carbon source for the production of cellulase by *Trichoderma reesei*. Applied Biochemistry Biotechnology, 158, 552-560.
- Deshpande, SK., Bhotmange, MG., Chakrabarti, T., Shastri, PN. (2008). Production of cellulase and xylanase by *Trichoderma reesei* (QM 9414 mutant), *Aspergillus niger* and mixed culture by solid state fermentation (SSF) of water hyacinth (*Eichhornia crassipes*). Indian Journal of Chemical Technology, 15, 449-456.
- Dhillon, GS., Kaur, S., Brar, SK., Verma, M. (2012). Potential of apple pomace as a solid substrate for fungal cellulase and hemicellulase bioproduction through solid-state fermentation. Industrial Crops and Products, 38, 6-13.
- Elisashvili, V., Kachlishvili, E., Tsiklauri, N., Metreveli, E., Khadziani, T., Agatos, N. (2011). Lignocellulose-degrading enzyme production by white-rot Basidiomycetes from the forests of Georgia. Microbiology Biotechnology, 25, 331-339.
- 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. Proceedings of the British Society of Animal Science, 3, 166.
- Gurgel, AV., Marabezi, K., Ramos, LA., Curvelo, AA. (2012). Characterization of depolymerized residues from extremely low acid hydrolysis (ELA) of sugarcane bagasse cellulose: Effects of degree of polymerization, crystallinity and crystallite size on thermal decomposition. Industrial Crops and Products, 36, 560-571.
- Hatakka A., Hammel K.E. (2011). Fungal Biodegradation of Lignocelluloses. In: Hofrichter M. (eds) Industrial Applications. The Mycota (A Comprehensive Treatise on Fungi as Experimental Systems for Basic and Applied Research), vol 10. Springer, Berlin, Heidelberg. pp. 319-335.
- Jongmeesuk, A., Sanguanchaipaiwong, V., Ochaikul, D. (2014). Pretreatment and enzymatic hydrolysis from water hyacinth (*Eichhornia crassipes*). KMITL Science Technology Journal, 14, 79-86.
- Lowry, OH., Rosengrough, NJ., Farr, AL., Randall, UL. (1951). Protein measurement with the folin phenol reagent. Journal Biology Chemistry, 193, 265-275.
- Martínez, M., Gómez, MM. (2007). Integrated control of *Eichhornia crassipes* by using insects and plant pathogens in México. Crop Protection, 26, 1234-1238.

Membrillo, M., Sánchez, C., Meneses, M., Favela, E., Loera, O. (2011). Particle geometry affects differentially substrate composition and enzyme profiles by *Pleurotus ostreatus* growing on sugar cane bagasse. *Bioresource Technology*, 102, 1581-1586.

Nsereko, VL., Morgavi, DP., Rode, LM., Beauchemin, KA., McAllister, TA. (2000). Effects of fungal enzyme preparations on hydrolysis and subsequent degradation of alfalfa hay fiber by mixed rumen microorganisms *in vitro*. *Animal Feed Science and Technology*, 88, 153-170.

Park, YS., Kang, SW., Lee, JS., Hong, SI., Kim, SW. (2002). Xylanase production in solid state fermentation by *Aspergillus niger* mutant using statistical experimental designs. *Applied Microbiology Biotechnology*, 58, 762-766.

Peterson, GL. (1977). A Simplification of the protein assay method of Lowry *et al.* Which is more generally applicable. *Analytical Biochemistry*, 83, 346-356.

Rai, PK. (2009). Heavy metal phytoremediation from aquatic ecosystems with special reference to macrophytes. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, 39, 697-753.

Rezania, S., Ponraj, M., Din, MFM., Songip, AR., Sairan, FM., Chelliapan, S. (2015). The diverse applications of water hyacinth with main focus on sustainable energy and production for new era: an overview. *Renewable & Sustainable Energy Reviews*, 41, 943-954.

Sánchez, C. (2009). Lignocellulosic residues: Biodegradation and bioconversion by fungi. *Biotechnology Advances*, 27, 185-194.

Sun, X., Zhang, R., Zhang, Y. (2004). Production of lignocellulolytic enzymes by *Trametes gallica* and detection of polysaccharide hydrolase and laccase activities in polyacrylamida gels. *Journal Microbiology*, 44, 220-231.

Tham, HT. (2012). Water Hyacinth (*Eichhornia crassipes*) – Biomass production, ensilability and feeding value to growing cattle. Doctoral Thesis. Swedish University of Agricultural Sciences. Uppsala. Mekong Delta, Vietnam. 24-28.

Vaca, M., Izurieta, B., Espín, N. (2014). Obtención de extractos enzimáticos con actividad celulolítica y ligninolítica a partir del hongo *Pleurotus ostreatus* 404 y 2171 en rastrojo de maíz. *Revista Politécnica*, 33, 1-7.

Villa-Cruz, V., Huerta-Palacios, G., Sánchez-Vázquez, JE. (1999). Fermentation of a mixture of corn-cobs and coffee pulp for the cultivation of *Pleurotus ostreatus*. *Micol. Neotrop. Appl*, 12, 67-74.

Yan, SH., Song, W., Guo JY. (2017) Advances in management and utilization of invasive water hyacinth (*Eichhornia crassipes*) in aquatic ecosystems—a review. *Critical reviews in biotechnology*, 37, 218-228.

Tham, HT. (2012). Water Hyacinth (*Eichhornia crassipes*) – Biomass production, ensilability and feeding value to growing cattle. Doctoral Thesis. Swedish University of Agricultural Sciences. Uppsala. Mekong Delta, Vietnam. 24-28.

Vaca, M., Izurieta, B., Espín, N. (2014). Obtención de extractos enzimáticos con actividad celulolítica y ligninolítica a partir del hongo *Pleurotus ostreatus* 404 y 2171 en rastrojo de maíz. *Revista Politécnica*, 33, 1-7.

Villa-Cruz, V., Huerta-Palacios, G., Sánchez-Vázquez, JE. (1999). Fermentation of a mixture of corn-cobs and coffee pulp for the cultivation of *Pleurotus ostreatus*. Micol. Neotrop. Appl, 12, 67-74.

Yan, SH., Song, W., Guo JY. (2017) Advances in management and utilization of invasive water hyacinth (*Eichhornia crassipes*) in aquatic ecosystems—a review. Critical reviews in biotechnology, 37, 218-228.