

DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE LACASAS Y LIGNINA PEROXIDASAS DE HONGOS DEGRADADORES DE COLORANTES SELECCIONADOS PARA EL TRATAMIENTO DE AGUAS RESIDUALES DE LA INDUSTRIA TEXTIL

Koch Alma, Naranjo Blanca, Páez Maritza

Laboratorio de Microbiología – Biotecnología
Departamento de Ciencias de la Vida
Escuela Politécnica del Ejército
almakoch@yahoo.com.mx

RESUMEN

Se determinó la actividad enzimática de lacasas y lignina peroxidasas de hongos degradadores de colorantes. Este trabajo se lo realizó por la necesidad de disponer de tratamientos biológicos que erradiquen los problemas de contaminación provenientes de las industrias textiles.

Se reactivaron cinco hongos seleccionados por su alta capacidad de degradación de colorantes, C20AL, C18BL, C7AL, C2BL y C1BA, todos pertenecen al género *Fusarium*. Para determinar la actividad enzimática de lacasas y lignina peroxidasas se realizaron pruebas cualitativas con un diseño completamente al azar con tres repeticiones y pruebas cuantitativas con un arreglo factorial tomando en cuenta el sustrato, hongo y medio de producción de enzimas. En la prueba cualitativa de actividad ligninolítica en medio con guaiacol, los cinco hongos presentaron crecimiento y cambio de coloración del medio por oxidación del guaiacol. La prueba semi-cuantitativa de actividad celulolítica expresó halos de aclaramiento de hidrólisis de celulosa. La presencia de la enzima lacasa se midió cualitativamente por el cambio de coloración del medio por oxidación del ABTS, en esta prueba todos los hongos presentaron cambio de coloración siendo el mejor el hongo C1BA.

En las pruebas cuantitativas se realizó un ensayo de cuantificación de actividad enzimática durante 40 días tanto para lacasas como para lignina peroxidasas. El mejor tratamiento a lo largo del ensayo enzimático de lacasas fue el ABTS.C1BA.M3, con el valor más alto de 308,64 U.L⁻¹enz. El mejor tratamiento de actividad lignino peroxidásica, fue de igual forma el tratamiento ABTS.C1BA.M3, con el máximo valor de 210,53 U.L⁻¹enz.

ABSTRACT

This investigation determined the enzymatic activity of laccases and lignin peroxidases of selected dyes degrading fungi. This work was conducted because of the lack of biological treatments that eradicate the pollution problems of the textile industry.

Five fungi selected for their high capacity to degrade dyes, were reactivated, C20AL, C18BL, C7AL, C2BL and C1BA, all belonging to the genus *Fusarium*.

To determine the enzymatic activity of laccases and lignin peroxidases qualitative tests were performed with a completely randomized design with three replications and quantitative tests with a factorial arrangement taking into account the substrate, fungus and enzyme production medium. In the qualitative test of ligninolytic activity in guaiacol medium, all five dye-degrading fungi showed growth and change in coloration of the medium due to oxidation of the guaiacol. In the semi-quantitative test for cellulolytic activity, all studied fungi exposed hydrolysis of cellulose haloes. The presence of the enzyme laccase was qualitatively measured by change of coloration of the medium by oxidation of ABTS, in this test all selected fungi presented a change of coloration, the best fungi was C1BA. In the quantitative tests, a enzyme quantification assay was examined over a period of 40 days for both the laccase and lignin peroxidases. The best long term treatment for laccase was ABTS.C1BA.M3, with the highest value of 308,64 U.L⁻¹enz. The best treatment for lignin peroxidase activity, was also the ABTS.C1BA.M3, with its maximum value of 210.53792 U.L⁻¹enz.

1 INTRODUCCIÓN

El teñido textil se emplea cada vez con mayor frecuencia en el país, tanto a nivel artesanal como industrial, lamentablemente sin considerar las medidas de seguridad tanto personales como ambientales. Evidencia de ello es la fabricación de pantalones en Pelileo, ropa de todo tipo de Atuntaqui, Otavalo, Ibarra; ropa de cuero en Quisapincha y Cotacachi, ropa de cama en la Provincia del Cotopaxi. La actividad de la industria textil, vestuarios y cuero en el Ecuador consumía diariamente para el año 2005, 182.000 litros de agua (Rodríguez *et al.*, 2006).

Una gran variedad y cantidad de productos químicos son utilizados en el proceso de teñido. Se estima que aproximadamente diez mil colorantes y pigmentos diferentes son empleados en esta industria y que la producción mundial asciende a 7×10^5 toneladas anuales, de las cuales un poco más del 10% se pierde durante el proceso de coloración de fibras (Young & Yu, 1997).

Se reconoce que en la industria textil los residuos de colorantes son los más difíciles de tratar, debido a que la mayoría son de origen sintético y poseen estructuras moleculares aromáticas complejas lo cual hace muy complicado su proceso de biodegradación (Castillo, 2004). Los tratamientos utilizados para la remoción de efluentes con colorantes provenientes de la industria textil son del tipo físico, químico y biológico (Castillo, 2004).

Los tratamientos biológicos, aeróbico, anaeróbico o mixto, utilizan diferentes tipos de microorganismos como bacterias, algas, levaduras y hongos; son considerados efectivos para la remoción de sustancias tóxicas y del exceso de materia orgánica (Haug *et al.*, 1991).

Los hongos ligninolíticos u hongos de podredumbre blanca forman parte de los microorganismos más utilizados para la biorremediación de efluentes contaminados por la industria textil, ello, considerando su capacidad para degradar la lignina, polímero con una alta concentración de anillos aromáticos y un profundo grado de polimerización (Casillo, 2004). La biodegradación de lignina es fundamental en el reciclaje del carbono en los ecosistemas terrestres y después de la celulosa, es el mayor componente de la materia vegetal y la forma más abundante de material aromático en la biosfera (Yaovapa, 2005).

La mayor parte de los hongos ligninolíticos pertenecen al grupo basidiomicetos, este grupo degrada completamente la lignina a través de la secreción de enzimas que son esenciales para la transformación inicial de la lignina y en conjunto logran su degradación (Dávila & Vásquez, 2006).

El mecanismo enzimático producido por los hongos ligninolíticos viene dado por la acción de oxidasas y peroxidasas, estas enzimas no presentan una especificidad alta, por lo tanto pueden tener actividad sobre diferentes compuestos de tipo fenólicos y azo (Casillo, 2004).

Las enzimas o biocatalizadores son proteínas cuya función es catalizar las reacciones que realizan los seres vivos. Las enzimas se diferencian entre sí por su especificidad, actividad enzimática, cinética de reacción, temperatura, pH (Rubilar, 2007). Se conoce que la degradación de la lignina es catalizada por un complejo extracelular que producen los hongos, cuando han sido expuestos a condiciones de limitación de nutrientes en el medio de cultivo (Córdoba 2009). Este complejo está compuesto por tres enzimas ligninolíticas involucradas en la degradación de lignina, la manganosa peroxidasa (MnP), la lignina peroxidasa (LiP) y las lacasas (Selvam *et al.*, 2003).

Las lacasas (benzodiol:oxígeno, óxidoreductasas) son glicoproteínas que requieren de oxígeno (O_2) para oxidar fenoles, polifenoles, aminas aromáticas, sustratos orgánicos por medio de la substracción de un electrón transformándolo en H_2O_2 y radicales activos (Selvam *et al.*, 2003). El pH óptimo de las lacasas, dependiendo del sustrato que se esté oxidando puede variar entre 3.5 y

7.5 (González, 2009). Se ha reportado que son enzimas capaces de oxidar principalmente sustancias recalcitrantes, como clorofenoles, hidrocarburos aromáticos policíclicos, compuestos organofosforados, fenoles y colorantes aromáticos (Sandoval & Ospina, 2008).

Las lignina peroxidasas contienen un grupo hemo-férrico y es oxidada por el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) generando un intermediario deficiente de electrones el cual es conocido como compuesto I: dicho componente puede ser reducido ya sea por un donador de electrones o por sustratos fenólicos, generando el compuesto II el cual regresará a su estado de reposo inicial por medio de una reducción posterior, que dará como resultado un compuesto fenólico oxidado y agua (Dávila & Vasquez, 2006). Las lignina peroxidasas se diferencian de otras peroxidasas por su alto potencial de óxido-reducción, lo que permite oxidar directamente compuestos aromáticos no fenólicos (Usnayo, 2007), y presentan un pH óptimo menor/igual a 3 (Quintero *et al.*, 2006).

2 MATERIALES Y MÉTODOS

El presente proyecto de investigación se desarrolló en el Centro de Investigaciones Científicas (CEINCI) de la Escuela Politécnica del Ejército, a cargo del Departamento de Ciencias de la Vida, de la Escuela Politécnica del Ejército.

2.1 Reactivación de los cinco hongos degradadores de colorantes

En el presente proyecto de investigación se utilizaron hongos degradadores de colorantes reactivos aislados en el estudio realizado por Valenzuela (2011). Los cinco mejores hongos degradadores, fueron conservados en refrigeración en agar extracto de malta (AEM). Para la reactivación de los cinco hongos se procedió bajo condiciones estériles a sembrar por punción en medio de agar extracto de malta (AEM) con 500 mg.L^{-1} de cloranfenicol. Tanto el medio como las cajas petri fueron esterilizados en autoclave a 121°C durante 15 min (Usnayo, 2007). Seguidamente se incubaron las cajas a 28°C y una humedad relativa de 80%, las cajas fueron observadas tanto macroscópica como microscópicamente para descartar cualquier tipo de contaminación.

En los hongos cultivados en medio AEM, la observación macroscópica se concentró en las características estructurales tales como: forma de crecimiento, color de la cepa fúngica, textura (Usnayo, 2007). Para identificar las principales características microscópicas de los hongos, con la colaboración del Ing. Abraham Oleas, docente de la Carrera de Ciencias Agropecuarias de la ESPE.

Para la conservación de los hongos, se procedió a resembrarlos en un medio estéril de potato dextrosa broth (PDB) con 500 mg.L^{-1} de cloranfenicol, se incubaron durante 3 días a 30°C y 100 r.p.m. Cuando los hongos han crecido, se refrigeraron para mantenerlos (Usnayo, 2007).

2.2 Actividad ligninolítica en un medio con guaiacol

A partir de los hongos obtenidos en la reactivación se realizó la primera prueba cualitativa de actividad ligninolítica en un medio con guaiacol. El medio con guaiacol consta de AEM con

diferentes concentraciones de guaiacol según el crecimiento de los hongos en este alcohol (Koduri & Ming, 2011). Se utilizaron concentraciones de guaiacol de 1, 2 y 3 mL.L⁻¹, con y sin la presencia de producto lignocelulósico, aserrín, en una concentración de 4 g.L⁻¹ (Usnayo, 2007). La siembra fue empleando la técnica de punción en medio sólido a partir de medio líquido PDB. Tanto el medio como las cajas petri fueron esterilizados en autoclave a 121°C durante 15 min. El crecimiento de los hongos en cajas Petri fue evaluado microscópicamente todos los días, después de dos y cuatro semanas de incubación a 28°C y una humedad relativa del 80-85%.

2.3 Actividad celulolítica en agar carboximetilcelulosa

Se realizó una prueba semi-cuantitativa de actividad celulolítica a partir de los hongos obtenidos en la reactivación. Esta prueba se realizó mediante una siembra en punción, en agar carboximetilcelulosa (CMC). Las cajas fueron incubadas a 30°C, por 72 h. Transcurrido el tiempo de incubación, se realizó una tinción con la adición de 5 mL de rojo congo al 1%, como revelador. Se dejó actuar el colorante durante 15 min, se retiró el exceso y se lavó con 5 mL de una solución de cloruro de sodio (NaCl) 2M, durante 15 min. Finalmente, se cerraron las cajas con parafilm y se llevaron a refrigeración durante 12 h (Gaitán & Pérez, 2007; Valencia, 2009).

Luego de las 12 h, se determinó la actividad celulolítica por la presencia de zonas de aclaramiento (halos) debido a la hidrólisis de la celulosa, cuyo diámetro fue medido en centímetros (Gaitán & Pérez, 2007; Valencia, 2009).

2.4 Presencia de la enzima lacasa en un medio con ABTS

Para la prueba cualitativa con ABTS, los hongos degradadores fueron sembrados en un medio con ABTS. La técnica de siembra fue en forma de discos de agar provenientes de la reactivación de los hongos en AEM. La presencia de la enzima lacasa fue evaluada por el cambio de coloración del medio con ABTS (Córdoba, 2009).

El pH se ajustó a 5,8-6,0 con la adición de sales de fosfato diácido de potasio (KH₂PO₄) al 0,1% y sulfato de magnesio heptahidratado (MgSO₄.7H₂O) al 0,05%.

2.5 Medios naturales para la producción de enzimas

Los hongos reactivados en medio PDB, fueron sembrados en tres medios naturales para la producción de enzimas. Los medios naturales se diferencian por el tipo de sal utilizada y su concentración. Los medios se homogenizaron y se incubaron durante 40 días para la ejecución del ensayo enzimático. El sobrenadante se filtró para eliminar los restos celulares antes de medir la concentración de enzima. (Castillo, 2004).

2.6 Cuantificación enzimática de lacasas y lignina peroxidasas

Para la cuantificación de la actividad enzimática de lacasa y lignina peroxidasas se utilizaron dos sustratos ABTS y O-toluidina. Se utilizó como extracto crudo el medio natural para la producción de enzimas, que se encontraban en incubación a 30°C y 100 r.p.m. al paso de los días en el que se realizó el ensayo enzimático. El extracto crudo fue previamente filtrado con filtros millipore para jeringa de 0,2 µm. Todo el ensayo se realizó por triplicado.

En los ensayos de cuantificación se utilizaron blancos y mezclas de reacción, ambos se mantuvieron a baño maría a 30°C, por 1 h. Después fueron enfriados en agua e inmediatamente se

procedió a leer la absorbancia, para la enzima lacasa utilizando como sustrato ABTS se leyó a 420 nm y con el sustrato O-toluidina a 627nm. Para la enzima lignina peroxidasas utilizando como sustrato ABTS se leyó a 420 nm (Castillo, 2004).

La actividad enzimática se calculó a partir de las lecturas de D.O. mediante la siguiente ecuación (Chaparro & Rosas; 2006):

$$AE = \frac{\Delta DO \times fd \times Vt}{\Delta t \times \epsilon \times L \times Venz}$$

Donde:

AE: Actividad enzimática en unidades internacionales por litro de disolución de enzima (U.L⁻¹enz).

ΔDO: Diferencia de densidad óptica.

fd: Factor de conversión debido al coeficiente de extinción molar.

Vt: Volumen total de la solución (mL).

Δt: Tiempo de reacción en el baño maría (minutos).

ε: Coeficiente de extinción molar

L: Longitud de la celda (cm).

Venz: Volumen de la solución de extracto crudo utilizada (mL).

Una unidad (U) de actividad enzimática se define como la cantidad de enzima capaz de oxidar 1 μmol de sustrato, por minuto, a un pH establecido y a 30°C.

2.7 Análisis Estadístico

En esta investigación se aplicó para las pruebas cualitativas y semi-cuantitativas un diseño completamente al azar (DCA) unifactorial (Gutiérrez & de la Vara, 2008), con tres repeticiones. La variable independiente estuvo constituida por los hongos degradadores de colorantes, mientras que las variables dependientes fueron en la prueba cualitativa de actividad ligninolítica el crecimiento del hongo y el cambio de color del medio, en la prueba cualitativa de presencia de enzima lacasa el cambio de color del medio y finalmente en la prueba semi-cuantitativa de actividad celulolítica el diámetro del halo de hidrólisis.

En las pruebas cuantitativas, se implementaron un arreglo factorial. Para el análisis de actividad enzimática de lacasas, se utilizó un arreglo factorial mediante los siguientes factores 5x3x2=30 con tres repeticiones, lo señalado corresponde a 5 hongos, 3 medios naturales para la producción de enzimas y 2 sustratos. Para el análisis de la actividad enzimática de lignina peroxidasas, se utilizó un arreglo factorial mediante los siguientes factores 5x3x1=15 con tres repeticiones. Para esto se presentan 5 hongos, 3 medios naturales para la producción de enzimas y 1 sustrato.

Para evaluar el efecto individual y en conjunto de las variables que se generaron en el presente estudio de investigación, se realizó un análisis de varianza (ANOVA) de un factor y para identificar las diferencias estadísticamente significativas, también se utilizó las pruebas de comparación de medias de Tukey y Duncan, al 95% de confianza (Martínez de Lejarza, 2004).

Los resultados fueron procesados en los programas estadísticos Excel Windows vista 2007 y SPSS 15.0.

3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 Características macroscópicas y microscópicas de los cinco hongos degradadores de colorantes

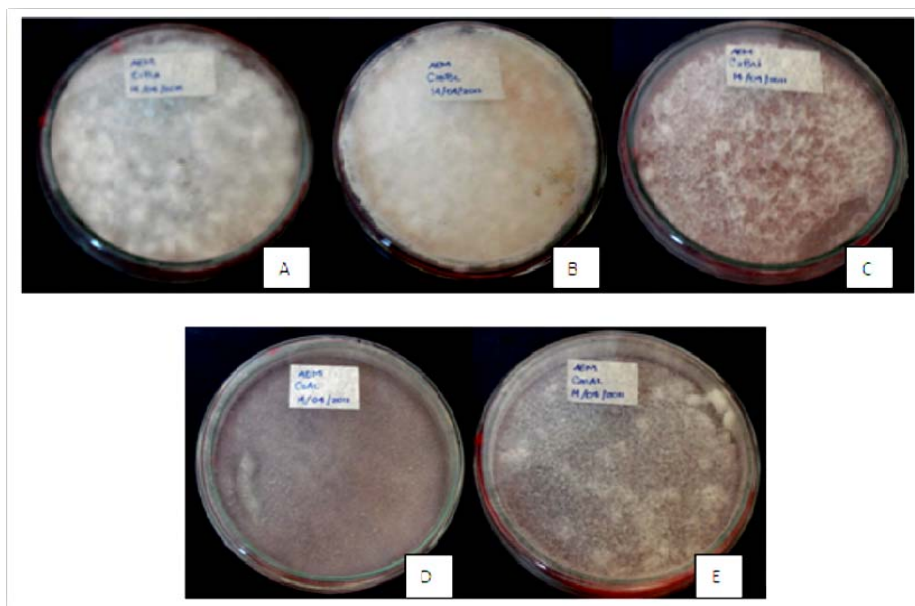


Figura 1 Morfología macroscópica de los cinco hongos degradadores de colorantes: A) C1BA; B) C18BL; C) C2BL; D) C7AL; E) C20AL

Durante las observaciones macroscópicas y microscópicas se determinó que los cinco hongos degradadores pertenecen al género *Fusarium*. En la siguiente tabla se presentan las características microscópicas de los cinco hongos seleccionados.

Tabla 1 Características microscópicas de los cinco hongos degradadores de colorantes

HONGOS	MORFOLOGÍA MICROSCÓPICA
C1BA Género: <i>Fusarium</i>	Conidias pequeñas. Hifas tabicadas. Clamidospora.
C18BL Género: <i>Fusarium</i>	Población integralmente de microconidias, muy pocas macroconidias. Hifas tabicadas. Conidióforo simple.
C2BL Género: <i>Fusarium</i>	Población rica en microconidias. Hifas tabicadas. Ausencia de conidióforos.
C7AL Género: <i>Fusarium</i>	Macroconidias grandes y pequeñas unicelulares. Ausencia clamidospora. Conidióforos unicelulares. Hifas tabicadas. Ocasionalmente formación de rizomorfos.
C20AL Consortio con dos hongos ambos del género: <i>Fusarium</i>	Consortio con dos hongos del género <i>Fusarium</i> diferencia en el tamaño de esporas. Microconidas. Hifas tabicadas.

3.2 Actividad ligninolítica en un medio con guaiacol

En los cinco hongos degradadores de colorantes reactivados se realizó una prueba cualitativa de actividad ligninolítica en un medio con guaiacol, se observó el crecimiento del hongo y el cambio de color del medio a las concentraciones de 1, 2 y 3 mL.L⁻¹ en presencia y ausencia de aserrín. Los análisis de ANOVA indican que al menos un tratamiento es significativamente diferente, la prueba de Duncan indica que el mejor tratamiento es el establecido por la concentración de 1 mL.L⁻¹ de guaiacol en presencia y ausencia de aserrín.

3.3 Actividad celulolítica en medio agar carboximetilcelulosa

La actividad celulolítica fue determinada mediante la medición del diámetro de halos de hidrólisis de los cinco hongos degradadores de colorantes. El análisis de ANOVA demuestra que al menos un hongo presenta una media de diámetro de halo de hidrólisis significativamente diferente, ello se confirma con la prueba de Tuckey que indica que el hongo con el mayor valor de media de halo de hidrólisis de 3,22 cm es el C18BL, mientras que en el hongo con el valor inferior de media de 2,65 cm es el C1BA.

3.4 Presencia de enzima lacasa en un medio con ABTS

La presencia de la enzima lacasa se determinó cualitativamente por el cambio de color en el medio por la oxidación del sustrato ABTS. El análisis de ANOVA expone que ningún hongo es significativamente diferente a los demás en esta prueba, sin embargo el hongo C1BA expone el mejor valor de media, mientras que el hongo C7AL presenta el menor.

3.5 Cuantificación de la enzima lacasa con dos sustratos ABTS y O-toluidina

Para evaluar el mejor tratamiento, de la interacción sustrato, hongo y medio, en dependencia de la actividad enzimática de lacasas se realizó un análisis de varianza ANOVA diario y mediante una tabla de cotejo se escogió el mejor tratamiento a lo largo de los días. La tabla de cotejo expone que el mejor tratamiento a lo largo de las mediciones de actividad enzimática durante 40 días, es el que utiliza como sustrato ABTS, el hongo C1BA y el medio natural de producción de enzimas M3 y el día que presentó mayor actividad fue el día 16 con un valor de 308,64 U.L.⁻¹enz.

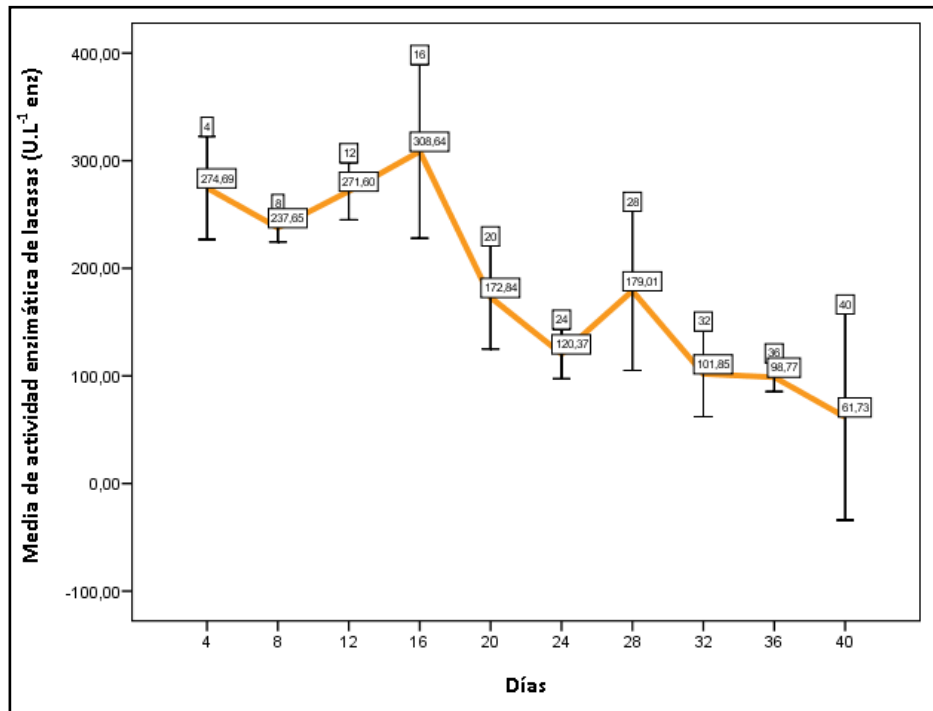


Figura 2 Actividad enzimática de lacasas del tratamiento ABTS.C1BA.M3 a durante 40 días.

3.6 Cuantificación de la enzima lignina peroxidasa utilizando como sustrato ABTS

Con el fin de observar el mejor tratamiento, de la interacción sustrato, hongo y medio, en dependencia de la actividad enzimática de lignina peroxidasa de igual forma se realizó un análisis de varianza ANOVA diario y la tabla de cotejo indica que el mejor tratamiento a lo largo de los días es el ABTS.C1BA.M3, el cual el día 16 presentó su valor más alto de 210,53 U.L.⁻¹enz.

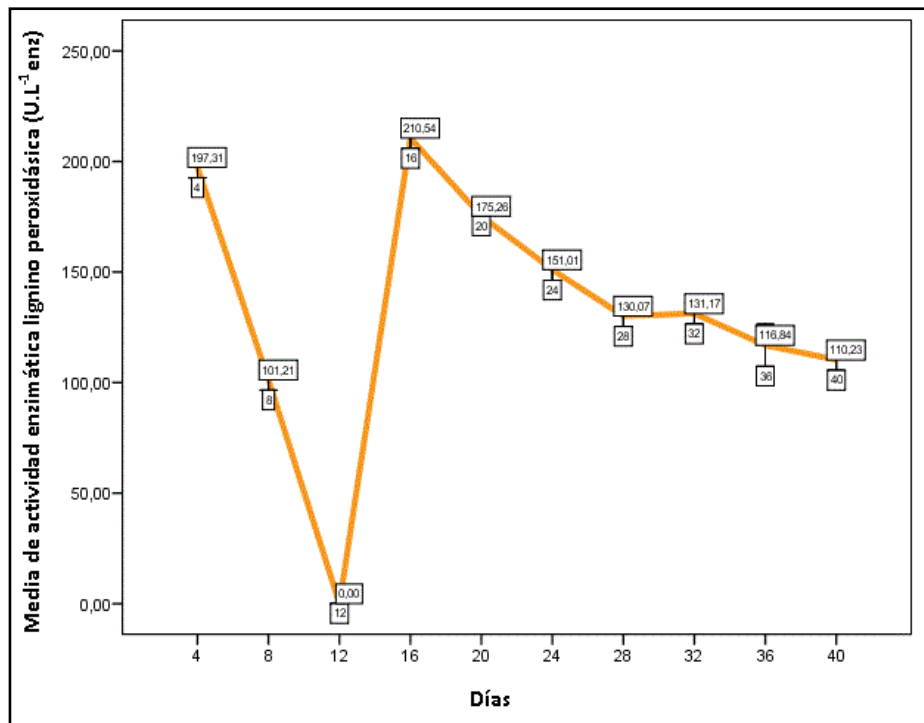


Figura 3 Actividad enzimática lignino peroxidásica del tratamiento ABTS.C1BA.M3 durante 40 días de ensayo enzimático.

3.7 Efectividad de tres diferentes medios para la producción de lacasas

Se realizó un análisis de ANOVA diario de la variable actividad enzimática de lacasas en dependencia del medio de producción de enzimas y mediante una tabla de cotejo se valoró y escogió el mejor medio durante los 40 días del ensayo enzimático.

Tabla 2 Tabla de cotejo de efectividad de tres medios para la producción de enzimas durante 40 días de ensayo enzimático de lacasas

ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE LACASAS (U.L-1enz)										
MEDIO	DÍA									
	4	8	12	16	20	24	28	32	36	40
M1										
M2										
M3	119,45	156,80	114,85	111,76	83,97	60,22	69,79	54,15	52,47	8,95

La tabla de cotejo confirma que el mejor medio para la producción de enzimas durante los 40 días de ensayo enzimático de lacasas es el medio M3.

3.8 Efectividad de tres diferentes medios para la producción de lignina peroxidasas

De igual forma que para las enzimas lacasas se realizó un análisis de ANOVA diario de la variable actividad enzimática lignino peroxidásica en dependencia del medio de producción de enzimas y mediante una tabla de cotejo se valoró y escogió el mejor medio durante los 40 días del ensayo enzimático.

Tabla 3 Tabla de cotejo de efectividad de tres medios para la producción de enzimas durante 40 días de ensayo enzimático de lignina peroxidasas

ACTIVIDAD ENZIMÁTICA LIGNINO PEROXIDASICA (U.L ⁻¹ enz)										
MEDIO	DÍA									
	4	8	12	16	20	24	28	32	36	40
M1			150,57							
M2										
M3	76,71	92,37		149,47	137,78	135,58	125,88	121,25	114,85	22,04

La tabla de cotejo confirma que el mejor medio para la producción de enzimas durante los 40 días de ensayo enzimático de lignina peroxidasas es el medio M3.

4 CONCLUSIONES

- Los hongos estudiados pertenecen al género *Fusarium*.
- Los cinco hongos seleccionados presentaron actividad ligninolítica, identificados por el crecimiento y cambio de coloración del medio por oxidación del guaiacol.
- Los hongos estudiados presentaron actividad celulolítica medida por el diámetro de halos de aclaramiento de hidrólisis de celulosa, el hongo C18BL presentó mayor actividad celulolítica, mientras que el hongo C1BA mostró la más baja.
- Todos los hongos seleccionados poseen resultados positivos para la presencia de lacasas en medio con ABTS, ya que gracias a la oxidación del mismo se observó un cambio de coloración en el medio. El hongo C1BA presenta el mejor resultado en esta prueba y el menor resultado el hongo C7AL.
- El mejor tratamiento de actividad enzimática de lacasas fue el ABTS.C1BA.M3 (sustrato ABTS, hongo C1BA y medio natural de producción de enzimas M3), con el valor más alto de actividad enzimática de 308,64 U.L⁻¹enz al día 16.
- El mejor tratamiento de actividad lignino peroxidásica fue el ABTS.C1BA.M3 (sustrato ABTS, hongo C1BA y medio natural de producción de enzimas M3), con el valor más alto de actividad enzimática de 210,53 U.L⁻¹enz al día 16.
- La expresión enzimática de lacasas y de lignina peroxidasas alcanzó su valor óptimo al día 16 de 40 días de ensayo enzimático.
- Los hongos que presentaron menor actividad celulolítica son aquellos que más actividad enzimática de lacasas y lignina peroxidasas presentaron.
- El medio natural de producción de enzimas M3 fue el más favorable para la producción de lacasas y lignina peroxidasas.

5 REFERENCIAS

1. Castillo, D. (2004). "Aislamiento de hongos degradadores de colorantes empleados en la industria textil". Proyecto previo a la obtención del título de Maestro en Tecnología Avanzada. Centro de investigaciones en Biotecnología Aplicada. Tepetitla de Lardizabal Tlaxcala. Pp 4-10, 21 y 24. [Versión Electrónica].
2. Chaparro, D. & Rosas, D. (2006). "Aislamiento y evaluación de la actividad enzimática de hongos descomponedores de la madera en la reserva natural la Montaña del Ocaso, Quimbaya-Quindo". Proyecto previo a la obtención del título de Microbiólogo Industrial. Pontificia Universidad Javeriana. Bogotá. Colombia. Pp 24, 27. [Versión Electrónica].
3. Córdoba, K. (2009). "Resistencia Natural de *Guadua angustifolia* Kunth. Al ataque de hongos ligninolíticos como alternativa hacia nuevas posibilidades de uso". Proyecto previo a la obtención del título de Maestra en Ciencias Biológicas. Pontificia Universidad Javeriana. Bogotá. Colombia. Pp 41-43. [Versión Electrónica].
4. Dávila, G., & Vásquez, R. (2006). "Enzimas ligninolíticas fúngicas para fines ambientales". Mensaje Bioquímico 30. Pp 29-55. [Versión Electrónica].
5. Gaitán, D y Pérez L (2007). "Aislamiento y evaluación de microorganismos celulolíticos a partir de residuos vegetales frescos y en compost generados en un cultivo de crisantemo (*Dendranthema grandiflora*)". Pontificia Universidad Javeriana. Bogotá. Colombia. [Versión Electrónica].
6. González, K. (2009). "Propiedades físico-químicas y cinéticas de la enzima lacasa inmovilizada de *Fusarium proliferatum*". Departamento de Microbiología y Biología Celular. Facultad de Farmacia. Universidad de La Laguna. Tenerife-España. Pp 2-5. [Versión Electrónica].
7. Gutiérrez, H y de la Vara, R (2008) "Análisis y diseño de experimentos". Segunda edición. McGrawHill. México. Pp.59-98 y 128-164.
8. Haug, W., Schmidt, A., Nörtemann, B., Hempel, D., Stolz, A & Knackmuss, H. (1991). Mineralization of sulfonated azo dye mordant yellow 3 by 6-aminonaphthalene-2-sulfonate-degrading bacterial consortium. *Applied and environmental microbiology*.57(11):3, 144-149. [Versión Electrónica].
9. Koduri, R & Ming. T. (2011). Oxidation of Guaiacol by Lignin Peroxidase. USA: American Society for Biochemistry and Molecular Biology. *The Journal of Biological Chemistry*, 270, 22254-22258. [Versión Electrónica].
10. Martínez de Lejarza, J. (2004) "Análisis de varianza por un factor" <http://www.docstoc.com/3262706/ANOVA-ANOVA-ANC81LISIS-DE-LA-VARIANZA-POR-UN-FACTOR-JUAN>
11. Quintero, J., Feijoo, G & Lemar, J. (2006). "Producción de enzimas ligninolíticas con hongos basidiomicetos cultivador sobre materiales lignocelulósicos". *Vitae*, Vol 13, Num 2. Pp. 61-67. <http://redalyc.uaemex.mx/src/inicio/ArtPdfRed.jsp?iCve=169813258008>

12. Rodríguez, S., Fernández, M., Bermúdez, M & Morris, H. (2001). Tratamiento de efluentes industriales coloreados por *Pleurotus* spp. Santiago de Cuba-Cuba. Revista Iberoamericana de Micología.
13. Rubilar, O. (2007). "Biorremediación de suelos contaminados con pentaclorofenol (PCF) por hongos de pudrición blanca". Tesis para optar al grado de Doctor en Ciencias de Recursos Naturales. Universidad de la Frontera. Temunco. Chile. Pp 43-48
14. Sandoval, N. & Ospina, X. (2008). "Evaluación de inductores metálicos y co-sustratos para la remoción de negro reactivo 5 empleando *Pleurotus ostreatus* inmovilizado en Fique". Proyecto previo a la obtención del título de Microbiólogo Industrial. Pontificia Universidad Javeriana. Bogotá. Colombia. Pp 50-54. [Versión Electrónica]
15. Selvam, K., Swaminathen, F & Keon-Sang C. (2003). Decolourization of azo dyes and a dye industry effluent by a white rot fungus *Thelephora* sp. *Bioresource Technology*, 88, 115-119. [Versión Electrónica].
16. Usnayo, P. (2007) "Optimización de Medios de Cultivo, para la producción de enzimas ligninolíticas, por cepas fúngicas aisladas del Altiplano Boliviano". Trabajo de grado para optar al título de Lic. En Bioquímica. La Paz: Bolivia. [Versión Electrónica].
17. Yaovapa, T., Toru, J., Yoshimasa, M., Shigeharu, M., Savitr, T., Napavarn, N., Moriya, O & Toshiaki, K. (2005). "Symbiotic Fungi Produce Laccases Potentially Involved in Phenol Degradation in Fungus Combs of Fungus-Growing Termites in Thailand". *Environmental Molecular Biology Laboratory RIKEN*. Saitama. Japan [Versión Electrónica].
18. Young, L & Yu, J. (1997). Ligninase-catalyzed decolorization of synthetic dyes. *Water Res*, 31, 1187. [Versión Electrónica].