

METODOS PARA EL ESTUDIO DE ALGUNAS CARACTERISTICAS DE LOS HONGOS XILOFAGOS COMO ORGANISMOS DEGRADADORES DE LA MADERA

Por *L. M. Pinzón-Picaseño, M. T. López Guerrero,
F. A. Véliz Avila y J. D. Martínez Marcial**

METHODS FOR THE STUDY OF SOME CHARACTERISTICS OF WOOD-DECAYING FUNGI AS ENEMIES OF TIMBER

SUMMARY

This paper describes four modified laboratory techniques useful to study the activity of wood-decaying fungus isolates. One for differentiation of rot-type, two techniques to estimate wood decaying capacity into aggressivity grades, and a simple technique to evaluate fungus tolerance against wood preservatives. Odds and disadvantages of each are discussed along with results from four isolates.

RESUMEN

En este trabajo son descritas cuatro técnicas de laboratorio para la caracterización de hongos xilófagos, desde el punto de vista de su actividad como organismos degradadores de la madera. Una para determinar tipo de pudrición, dos técnicas para evaluar capacidad de producir pudrición y traducirla a términos significativos de agresividad, y otra para estimar tolerancia al efecto tóxico de preservadores para madera. Las bondades y desventajas de cada una son discutidas y ejemplificadas con resultados de cuatro cepas.

INTRODUCCION

Los hongos xilófagos tienen importancia biológica por ser organismos desde parásitos de árboles hasta recicladores del material lignocelulósico en la naturaleza, y también

* Departamento de Botánica, Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México, Delegación Coyoacán 04510, México, D. F.

importancia económica por causar el deterioro de un valioso producto forestal, la madera.

Por su importancia económica, estos organismos han sido estudiados desde hace tiempo no sólo en sus aspectos taxonómicos, sino también como agentes biodegradadores de la madera. Sin embargo, en este último aspecto, actualmente se dispone de mucha información sobre las especies cosmopolitas y de climas templados o fríos, y muy poca sobre las especies tropicales. La información es todavía más escasa para especies neotropicales y para la micoflora xilófaga mexicana apenas ha sido iniciada su obtención.

Desde este punto de vista, la información más útil por obtener, es la concerniente al tipo de degradación que causan los hongos, la forma en que llevan a cabo su actividad y bajo qué condiciones es más propicia, su potencialidad para causar deterioro y su tolerancia relativa al efecto tóxico de los preservadores de madera.

De acuerdo con lo anterior, éste es un momento oportuno para promover métodos rápidos, sencillos, económicos y confiables que proporcionen tal información.

Así, este trabajo tiene por objeto describir, analizar y proponer una serie integrada de cuatro técnicas de laboratorio para la caracterización de hongos xilófagos, desde el punto de vista de su actividad como organismos degradadores de la madera. Una para determinar el tipo de pudrición que causan los hongos, dos técnicas para evaluar su capacidad de producir pudrición y traducirla a términos significativos de agresividad, y otra para estimar su tolerancia a preservadores para madera.

Estas técnicas han sido ensayadas tanto en sus versiones originales como con las modificaciones propuestas aquí para asegurar su factibilidad con los materiales y bajo las condiciones de nuestro medio. De tal manera que su presentación tiene como finalidad proponer la realización de trabajos similares siguiendo una metodología establecida para el estudio de la micoflora xilófaga de las diversas regiones del país en instituciones locales, aún con escasos recursos económicos y humanos.

MATERIALES Y METODOS

Cepas de hongos. La tabla 1., muestra las cepas utilizadas para este trabajo y su procedencia. Las cepas de *Lenzites trabea* y *Polyporus sulphureus* fueron generosamente proporcionadas por el Princes Risborough Laboratory (Reino Unido), de su Colección de Cultivos de Hongos Degradadores de la Madera. Las cepas mexicanas fueron aisladas de fructificaciones de madera deteriorada en la selva alta perennifolia, de la Estación de biología Tropical Los Tuxtlas, Ver., del Instituto de Biología de la U.N.A.M.

Para el aislamiento, fueron tomados pequeños fragmentos del contexto de la fructificación y cultivados en benomyl agar (extracto de malta, 20 g; agar, 15 g; fungicida benomyl [benlate], 0.008 g; fenol, 0.05 g; agua destilada, 1 l; el benomyl y el fenol son mezclados en 2 ml de etanol 50% y son añadidos al medio después de la esterilización), medio recomendado por Levy (1976). El micelio desarrollado fue transferido a malta agar (extracto de malta, 30 g; agar, 15 g; agua destilada, 1 l) e integrado a la colección de cultivos. Frascos pastilleros rectangulares de 40 ml de capacidad y tapadera de plástico, son muy útiles y económicos para estos cultivos.

Fase de cultivo inicial. Para obtener suficiente cantidad de inóculo con desarrollo micelial homogéneo para las técnicas, las cepas fueron sembradas a cajas petri de

TABLA 1. Cepas de hongos utilizadas

HONGO	CEPA	PROCEDENCIA
<i>Lenzites trabea</i> (Pers.) Fr.	FPRL 108E	Fructificación sobre ciprés, Kenia.
<i>Polyporus sulphureus</i> (Bull.) Fr.	FPRL 29	Fructificación sobre haya, sin localidad.
<i>Cymatoderma</i> sp.	LB 179	Estación de Biología Tropical Los Tuxtlas, Ver.
<i>Cymatoderma caperatum</i> (Berk. et Mont.) Reid	LB 145	Estación de Biología Tropical Los Tuxtlas, Ver.

sechables con malta agar (extracto de malta, 30 g; agar, 15 g; agua destilada, 1 l). Fueron incubadas durante 14 días a 26 °C y obscuridad, sobre rejillas de plástico (protectores de fregadero) en el interior de cajas de plástico cristal CIPSA tipo camiseta de 28 × 27 × 16 cm, con agua destilada en el fondo para proporcionar una alta humedad relativa que evite la desecación del medio de cultivo. Concluido el período de incubación, el micelio estuvo listo para la inoculación de los cultivos de ensayo.

Determinación del tipo de pudrición. Esta técnica fue modificada a partir del método del medio de aserrín de Badcock descrito por Carey (1975), empleando aserrín de pino en lugar del de abeto o de haya que originalmente es sugerido. El medio contiene: aserrín de pino secado al aire, 1 Kg; harina de maíz, 30 g; harina de hueso, 20 g; agua destilada, la necesaria para proporcionar 200-300% de humedad. El medio de aserrín fue vaciado a tubos de cultivo de 2 × 20 cm, comprimiéndolo ligeramente y dejando libres unos 2 cm a partir de la boca del tubo. Los tubos fueron tapados con algodón y esterilizados en autoclave a 121 °C y 15 lb/pul² de presión, durante 1 hr. Posteriormente fueron inoculados con micelio tomado a la misma distancia radial del centro de las colonias desarrolladas en la fase de cultivo inicial. Dos tubos inoculados por cada cepa fueron colocados en una caja de plástico cristal, como las descritas antes, sobre soportes de aluminio para mantenerlos fijos en posición inclinada (figura 1.). La caja contenía agua destilada en el fondo para mantener una humedad relativa alta en su interior. En estas condiciones, los tubos fueron incubados a 26 °C y obscuridad durante 4 semanas.

Las lecturas de los resultados fueron tomadas a las 3 y 4 semanas de incubación, de acuerdo con el siguiente criterio: *pudrición morena*, cuando el sustrato presentó un tono más claro en la zona colonizada por el micelio, reacción que identifica a un hongo celulolítico; *pudrición blanca*, cuando el sustrato presentó un tono más oscuro en la zona colonizada por el micelio, reacción que señala a un hongo capaz de degradar tanto a la celulosa como a la lignina. Estas reacciones difieren un poco de las descritas en la técnica original, lo cual se debe al cambio en el tipo de aserrín.

Capacidad de producir pudrición. Método de malta agar-bloque. Esta técnica es muy similar a la sugerida por Carey (1975), pero difiere por el empleo de madera de liquidámbar en

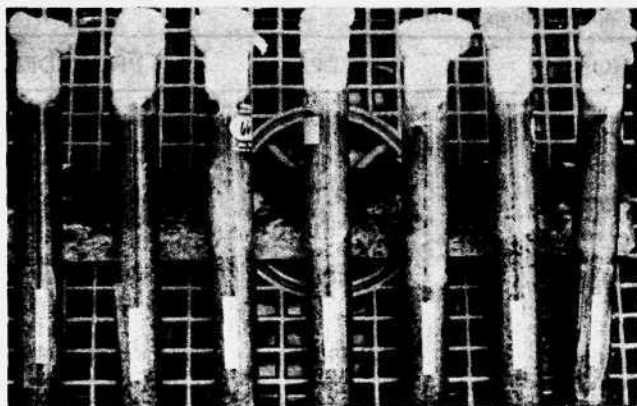


Fig. 1. Aspecto de los cultivos en la técnica para determinar tipo de pudrición.

lugar de la de haya y por colocar 2 bloques de ensayo por caja petri en lugar de 3, esto es con el fin de aproximarla más a las condiciones de la técnica descrita posteriormente. También difiere en que para la evaluación de los resultados ha sido adicionado un sistema para clasificar a los hongos en categorías de agresividad que es propuesto por primera vez.

Para este método, son utilizadas cajas petri de vidrio de 20×100 mm. Fueron esterilizadas y a cada una se les añadieron 30 ml de malta agar (extracto de malta, 30 g; agar, 15 g; agua destilada, 1 l) esterilizado en autoclave. Una vez enfriado el medio, sobre su superficie fue colocado un disco de malla de plástico (mosquitero) de unos 8 cm de diámetro con una perforación central de 1.5 cm de diámetro. Estos discos fueron esterilizados previamente en autoclave. Después, las cajas fueron incubadas durante 3 días para verificar su esterilidad. Entonces, la superficie del medio expuesta por la perforación de la malla fue inoculada con un bloque de 1 cm^2 de medio de cultivo con micelio, obtenido con un sacabocados esterilizado en alcohol y flameado, a partir de la misma distancia radial del centro de la colonia de los cultivos obtenidos en la fase inicial ya descrita. Las cajas inoculadas fueron incubadas durante 14 días a 26°C y oscuridad, dentro de cajas de plástico con agua destilada en el fondo para proporcionar alta humedad relativa en su interior.

Para esta técnica fueron utilizados bloques de pino como representantes de la madera de gimnospermas y de liquidámbar, como representante de la madera de angiospermas. En ambos casos utilizada madera de albura. Los bloques fueron cortados a un tamaño de $30 \times 10 \times 5$ mm, con la dimensión mayor en la dirección longitudinal de la madera. Los bloques fueron numerados con lápiz, secados en horno a 105°C durante 24 hrs, enfriados en un desecador con pentóxido de fósforo y pesados en una balanza analítica con aproximaciones de 0.0001 g, para obtener su peso anhidro inicial P_1 . Luego, fueron colocados en frascos de vidrio con las tapaderas aflojadas $\frac{1}{4}$ de vuelta y esterilizados en autoclave a 121°C y 15 lb/pul² de presión durante 1 hr. Entonces, fueron expuestos al micelio desarrollado durante 14 días en las cajas petri con mallas de plásti-

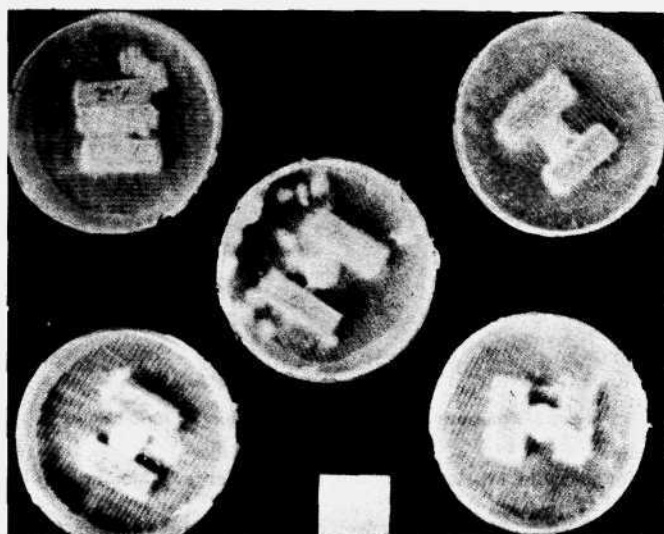


Figura 2. Desarrollo de los cultivos en la técnica de malta agar-bloque.

co. Fueron empleados 10 bloques de cada madera por cepa y otros 20 como testigos. Por cada caja petri fueron colocados 2 bloques paralelamente opuestos y a la misma distancia entre el sitio de inoculación y el borde de la colonia. Los testigos ocuparon cajas con medio sin inocular. La figura 2. muestra los cultivos ya incubados.

La fase de exposición al ataque de los hongos duró 46 días bajo las mismas condiciones de incubación. Transcurrido este período, los bloques fueron extraídos individualmente de sus cultivos, cepillados cuidadosamente para eliminar el micelio superfi-

TABLA 2. Determinación del tipo de pudrición.

HONGO	I.	II.	
<i>Lenzites trabea</i>	morena	morena	(Cartwright y Findlay, 1958; Nobles, 1965).
<i>Polyporus sulphureus</i>	morena	morena	(Cartwright y Findlay, 1958; Nobles, 1965; Bakshi, 1971).
<i>Cymatoderma</i> sp.	blanca		
<i>Cymatoderma caperatum</i>	blanca		

I. Experimento.

II. Bibliografía.



Figura 3. Preparación de cultivos para la técnica de suelo-bloque.

cial y sometidos a secado, enfriado y pesado final similares al inicial para obtener su peso anhidro final P_f .

Con estos datos, fueron calculados los valores porcentuales de la pérdida de peso sufrida por los bloques debida al ataque de los hongos. Estos valores son considerados como la capacidad de producir pudrición, expresada en %. A su vez, estos valores fueron convertidos a términos significativos en categorías de agresividad (ver tabla 3.).

Capacidad de producir pudrición. Método de suelo-bloque. Esta técnica fue modificada a partir de un método rutinario del Princes Risborough Laboratory del Reino Unido (sin publicar; Carey, comunicación personal), difiriendo de él en el tipo de madera, el tipo de suelo, el tamaño de los frascos de cultivo y el número de bloques por frasco. Aquí

TABLA 3. Fórmula para calcular capacidad de producir pudrición y su interpretación en categorías de agresividad.

$$\text{Capacidad de producir pudrición (\%)} = \% \text{ de pérdida de peso} = \frac{P_i - P_f}{P_i} \times 100$$

Donde: P_i = peso anhidro inicial

P_f = peso anhidro final

(%) DE PESO PERDIDO CATEGORIA DE AGRESIVIDAD CLAVE

< 5	ligeramente agresivo	A
6 - 15	moderadamente agresivo	B
16 - 25	agresivo	C
26 >	altamente agresivo	D

también ha sido adicionada la proposición de clasificar a los hongos dentro de categorías de agresividad.

Este método es bastante similar al de malta agar-bloque pero difiere en los siguientes aspectos. Los recipientes de cultivo consisten en frascos tipo tarro conserva de 235 ml de capacidad. Como medio de cultivo, es utilizado suelo que para fines de reproducibilidad fue seleccionado de acuerdo con las recomendaciones para ensayos afines de las normas ASTM D 1413-61 y D 2017 (American Society for Testing and Materials, 1967) y AWPA M 10-71 (American Wood Preservers' Association, 1971), cuyas especificaciones son: suelo franco arenoso, con capacidad de retención de agua entre 20 y 40%, pH de 5 a 7 y cuyo volumen normalizado (118 cm^3 , o sea la mitad de la capacidad del frasco de cultivo) debe pesar más de 90 g. El suelo utilizado fue recolectado cerca del volcán Xitle en la Sierra del Ajusco, D. F., a 3,000 msnm, del horizonte 0-20. El suelo secado al aire, homogeneizado y tamizado con malla No. 10, es franco arenoso, con una capacidad de retención de agua de 39.3%, un pH de 5.7 y su volumen normalizado pesó 98.8 g. La figura 3 muestra como fueron preparados los cultivos.

Un volumen normalizado de suelo fue colocado en cada frasco de cultivo el que previamente contenía agua destilada calculada para alcanzar un 130% de su capacidad de retención de agua para ese volumen. En el suelo, enterrados hasta que su superficie coincidiera con la del suelo, fueron colocados dos bloques de madera con pesos anhidros iniciales (P_i) ya conocidos, como en la técnica anterior. El número de repeticiones fue similar. Estos cultivos fueron esterilizados en autoclave durante 1 hr. Después, cada bloque fue inoculado con 1 cm^2 de medio con micelio desarrollado en la fase de cultivo inicial, con excepción de los testigos. Entonces, los cultivos fueron incubados durante 46 días bajo las condiciones ya descritas. Al final de este período, los bloques recibieron el mismo tratamiento que en la técnica anterior para obtener su peso

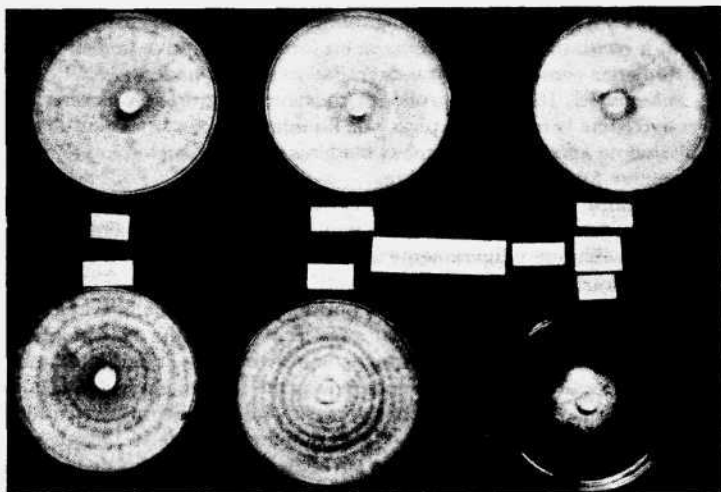


Figura 4. Crecimiento micelial a los 12 días de incubación en la prueba de tolerancia a la creosota.

anhidro final (P_f). La evaluación de los resultados fue también de la misma manera (ver tabla 3.).

Tolerancia a preservadores para madera. Este método es muy similar al de Schmitz (1931), difiriendo de él principalmente en la forma en que son evaluados los resultados.

Esta técnica consistió en emplear malta agar (extracto de malta, 25 g; agar, 15 g; agua destilada, 1 l) adicionado con concentraciones gravimétricas de creosota en escala logarítmica. El medio con preservador fue preparado y esterilizado en autoclave en matraces cerrados herméticamente y vertido en dosis de 20 ml a cajas petri desechables. Después, fue inoculado con discos de 1 cm de diámetro de medio de cultivo y micelio previamente desarrollado en la fase de cultivo inicial. Los discos de inóculo fueron obtenidos con un sacabocados esterilizado en alcohol y flameado, a la misma distancia radial del centro de la colonia. Las cajas inoculadas, una por cada variable, fueron incubadas durante 12 días bajo las mismas condiciones que en los casos anteriores, pero guardando en la misma caja de plástico camisera solamente aquellas de la misma concentración de preservador, para no mezclar el posible efecto de los componentes más volátiles de la creosota. Tres mediciones del crecimiento diametral fueron tomadas a ángulos de 120° entre sí sobre el fondo de la caja petri cada 2 días, utilizando una regla de plástico transparente. Con estas lecturas, el porcentaje de crecimiento relativo de las cepas fue calculado y los valores finalmente transferidos a categorías de tolerancia de acuerdo con la tabla 5. La figura 4 muestra el crecimiento obtenido al final del período de incubación.

RESULTADOS

Las tablas 2, 4 y 5 muestran los resultados obtenidos en este trabajo. A partir de esta información, a continuación es presentada en forma descriptiva la caracterización de las cepas estudiadas como organismos degradadores de la madera.

Lenzites trabea FPRL 108E, comprobó ser causante de pudrición morena; fue ligeramente agresivo hacia la madera de pino y de liquidámbar con la técnica de malta agar-bloque y altamente agresivo hacia ambas maderas con la de suelo-bloque; se comportó como ligeramente tolerante a la creosota.

Polyporus sulphureus FPRL 29, ratificó ser causante de pudrición morena; fue moderadamente agresivo hacia la madera de pino tanto en la técnica de malta agar-bloque como en la de suelo-bloque y ligeramente agresivo hacia la madera de liquidámbar con ambas técnicas; la cepa mostró ser no tolerante a la creosota.

Cymatoderma sp. LB 179, es causante de pudrición blanca; fue ligeramente agresivo hacia la madera de pino y de liquidámbar en la técnica de malta agar-bloque, moderadamente agresivo hacia la madera de pino y agresivo hacia la de liquidámbar con la técnica de suelo-bloque; es una cepa moderadamente tolerante a la creosota.

Cymatoderma caperatum LB 145, resultó ser causante de pudrición blanca; mostró ligera agresividad hacia la madera de pino y de liquidámbar en la técnica de malta agar-bloque, mientras que fue moderadamente agresivo hacia la madera de pino y altamente agresivo hacia la de liquidámbar con la técnica de suelo-bloque; resultó ser moderadamente tolerante a la creosota.

DISCUSION

La técnica para determinar tipo de pudrición es sencilla, muy económica y mostró ser confiable por confrontación bibliográfica (ver tabla 2.), pero su desarrollo requiere mucho tiempo (6 semanas). Los dos métodos para determinar agresividad son económicos y rápidos (8-9 semanas), para el tipo de información que proporcionan. El manejo de los bloques es laborioso pero las evaluaciones por pérdida de peso son muy exactas y confiables. Los resultados de ambas técnicas pueden ser equivalentes o diferir (ver tabla 4.). Esto indica que algunos hongos actúan similarmente en condiciones algo diferentes y otros son más activos bajo las condiciones de alguna de las dos técnicas. Es-

TABLA 4. Valores de capacidad de producir pudrición y categorías de agresividad.

HONGO	METODO	MADERA	C.P.P. *	CATEGORIA DE AGRESIVIDAD	CLAVE
<i>Lenzites trabea</i>	malta agar-bloque	pino	2.95	ligeramente agresivo	A
		liquidámbar	4.81	ligeramente agresivo	A
	suelo-bloque	pino	33.17	altamente agresivo	D
		liquidámbar	45.17	altamente agresivo	D
<i>Polyporus sulphureus</i>	malta agar-bloque	pino	15.51	moderadamente agresivo	B
		liquidámbar	4.39	ligeramente agresivo	A
	suelo-bloque	pino	6.00	moderadamente agresivo	B
		liquidámbar	2.34	ligeramente agresivo	A
TESTIGOS	malta agar-bloque	pino	-0.52		
		liquidámbar	0.08		
	suelo-bloque	pino	0.78		
		liquidámbar	1.05		
<i>Cymatoderma</i> sp.	malta agar-bloque	pino	5.31	ligeramente agresivo	A
		liquidámbar	4.86	ligeramente agresivo	A
	suelo-bloque	pino	13.74	moderadamente agresivo	B
		liquidámbar	22.10	agresivo	C
<i>Cymatoderma caperatum</i>	malta agar-bloque	pino	-0.20	ligeramente agresivo	A
		liquidámbar	1.39	ligeramente agresivo	A
	suelo-bloque	pino	13.32	moderadamente agresivo	B
		liquidámbar	32.33	altamente agresivo	D
TESTIGOS	malta agar-bloque	pino	-1.07		
		liquidámbar	-0.45		
	suelo-bloque	pino	1.02		
		liquidámbar	1.34		

* Capacidad de producir pudrición. Valores promedio de 10 repeticiones.

TABLA 5. Conversión de los valores absolutos de crecimiento diametral a porcentajes relativos de crecimiento diametral y a categorías de tolerancia. Promedios de 3 mediciones por colonia.

HONGO	INCUBACION	(%) RELATIVO DEL CRECIMIENTO DIAMETRAL CONCENTRACION DE DE CREOSOTA (% GRAVIM.)						CATEGORIAS DE TOLERANCIA A LA CREOSOTA
		0.0	0.0001	0.001	0.01	0.1	1.0	
<i>Lenzites trabea</i>	6 días	100	- -	95	65	52	31	ligeramente tolerante
	12 días	100	- -	100	100	86	40	ligeramente tolerante
<i>Polyporus sulphureus</i>	6 días	100	- -	91	91	61	TRAZAS	no tolerante
	12 días	100	- -	78	100	77	TRAZAS	no tolerante
<i>Cymatoderma</i> sp. A	6 días	100	97.8	83.06	79.2	60.7	27.4	ligeramente tolerante
	12 días	100	100	100	100	100	54.4	moderadamente tolerante
<i>Cymatoderma caperatum</i>	6 días	100	100	100	86.5	42.7	22.7	ligeramente tolerante
	12 días	100	100	100	100	100	56.8	moderadamente tolerante
CRECIMIENTO RELATIVO (%)	CATEGORIA DE TOLERANCIA	CLAVE						
0 - 20	no tolerante	I			Crecimiento relativo = (%)	crecimiento diametral en cada concentración (mm)		
21 - 40	ligeramente tolerante	II						
41 - 60	moderadamente tolerante	III						
61 - 80	tolerante	IV						
81 - 100	muy tolerante	V						
						$\frac{\text{crecimiento diametral a la concentración 0.0 (mm)}}{\text{crecimiento diametral en cada concentración (mm)}} \times 100$		

to debe tenerse en cuenta para otros tipos de bioensayos (pruebas de resistencia natural de la madera al ataque de hongos, ensayos toximétricos de preservadores con madera tratada), eligiendo el método más favorable para cada hongo.

La técnica de tolerancia a preservadores puede ser utilizada para prescribir soluciones inmediatas a problemas prácticos, por su gran sencillez y rapidez (4 semanas). Aunque fue propuesta para la evaluación toximétrica de preservadores, es más adecuada para estimar la tolerancia de los hongos. Si el grado de tolerancia varía con el tiempo de incubación (ver tabla 5.), resulta más seguro basarse en la categoría mayor. Esta información amplía el criterio para reubicar la importancia económica de hongos poco agresivos pero muy tolerantes a uno o más preservadores. Algunos preservadores no hidrosolubles no se incorporan homogéneamente al medio de cultivo produciendo efectos locales en el crecimiento, aún así, se logran buenos resultados.

Por último, es interesante señalar que los datos de tipo de pudrición y agresividad, por ser características fisiológicas, pueden ser útiles en estudios taxonómicos y valiosos en patología forestal.

LITERATURA CITADA

- American Society for Testing and Materials, 1967. *Books of standards. Part 16. Structural sandwich constructions, wood, adhesives*. American Society for Testing and Materials, Filadelfia, 896 p.
- American Wood Preservers' Association, 1971. Revised standard method for testing wood preservatives by laboratory soil-block cultures. Designation M 10-71. *Proc. Amer. Wood Pres. Ass.* 67:75-82.
- Bakshi, B. K., 1971. *Indian polyporaceae on trees and timber*. Indian Council of Agricultural Research, Nueva Delhi, 246 p.
- Carey, J. K., 1975. Isolation and characterization of wood-inhabiting fungi. In: Lavelock, D. W. y R. J. Gilbert (Eds.). *Microbial aspects of the deterioration of materials*. Academic Press. Londres, 261 p.
- Cartwright, K. St. G. y W. P. K. Findlay, 1958. *Decay of timber and its prevention*. Her Majesty's Stationery Office. Londres, 332 p.
- Levy, J. F., 1976. Isolation and identification of the fungal flora in treated wood. *International Research Group on Wood Preservation. Document IRG/WP/144*. 5 p.
- Nobles, M. K., 1965. Identification of cultures of wood-inhabiting hymenomycetes. *Can. J. Bot.* 43:1097-1139.
- Schmitz, H., 1931. A suggested toximetric method for wood preservatives. *Proc. Amer. Wood Pres. Ass.* 27:81-86.