

AISLAMIENTO E IDENTIFICACION DE LOS HONGOS PRESENTES EN ALGUNAS MADERAS TRATADAS CON PENTACLOROFENOL^{1/}*

Elizabeth Lavagni**

Julieta Carranza**

ABSTRACT

Isolation and identification of fungi present on penta-chlorophenol treated wood. One hundred fungi were isolated from pentaclorophenol treated and not treated wooden stakes with ground contact. Most of the fungi isolated belonged to the Deuteromycetes, some of which were considered soft-rotters and highly tolerant to preservatives. Only two Basidiomycetes were isolated, and one of them caused an incipient decay and was very susceptible to the preservatives. *T. corrugata* is reported to cause white rot. It is suggested that the imperfects act as primary invaders changing the substrate to a less toxic one and making it more available to the Basidiomycetes attack.

INTRODUCCION

La madera es un recurso natural renovable de suma importancia económica por sus usos tan variados. A pesar de ser un material muy resistente presenta una serie de desventajas, entre ellas el tiempo relativamente corto de descomposición (Carranza, 1984; Panshin y De Zeew, 1970).

En esta rápida descomposición intervienen tanto factores bióticos como abióticos (Ananthanarayanan, 1979; Nicholas, 1973). Entre los factores bióticos, los hongos han sido considerados como uno de los organismos que causan mayores pérdidas al degradar la madera, ya que al alterar los componentes celulares cambian sus propiedades físicas y químicas (Nicholas, 1973; Nilsson, 1973).

El crecimiento de los hongos en la madera está regulado por varios factores como son: temperatura, humedad, oxígeno y un sustrato libre de sustancias tóxicas (Ananthanarayanan, 1979).

Por muchos años, el control de estos organismos se ha basado precisamente en la alteración de alguno de estos factores, principalmente del sustrato por medio de la impregnación de preservantes, entre ellos: creosota, pentaclorofenol, y sales de sulfato de cobre, dicromato de sodio y arseniatos. La efectividad de dichos preservantes depende de su toxicidad a los organismos presentes (Anathanarayanan, 1979; CENDES, 1969; Forest PL, 1967).

Se ha observado que a pesar de la alta toxicidad de los preservantes, ciertos hongos, son capaces de descomponerlos a formas menos tóxicas, haciendo el sustrato accesible a otros organismos menos tolerantes (Carranza, 1984; Levy, 1976; Line, 1977; Stranks y Hulme, 1976).

Los objetivos de esta investigación fueron los siguientes: 1) aislar e identificar los hongos que descomponen maderas tratadas con pentaclorofenol; 2) determinar la capacidad descomponedora de los hongos aislados; 3) determinar si los hongos presentes en maderas tratadas son los mismos

1/ Recibido para publicación el 21 de mayo de 1987.

* Parte de la tesis presentada para optar por el grado de Licenciatura, Escuela de Biología, Universidad de Costa Rica.

** Escuela de Biología, Universidad de Costa Rica. San José, Costa Rica.

presentes en maderas no tratadas; y 4) determinar la capacidad de tolerancia de los hongos a los preservantes.

MATERIALES Y METODOS

Las 23 estacas de madera utilizadas en el presente trabajo fueron extraídas del Cementerio de Maderas del Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza (CATIE), en Turrialba (González *et al.*, 1974). Algunas de estas maderas habían sido tratadas con pentaclorofenol.

Se tomó 3 muestras cilíndricas de cada una de las estacas con un taladrador Preesler: una de la parte enterrada, otra a nivel del suelo y la última, a unos 20 cm del suelo.

Pequeños fragmentos de cada una de estas partes se colocaron en medios de agar malta y se incubaron a 25°C. Los hongos que se aislaron con mayor frecuencia fueron utilizados para las pruebas de tolerancia. Se preparó medios de agar malta a los cuales se les agregó pentaclorofenol disuelto en diesel o una mezcla de sulfato de cobre, dicromato de sodio y arseniatos. Se utilizó concentraciones de 0,005 ppm, 0,01 ppm, 0,05 ppm, 0,1 ppm y 0,2 ppm. Se incubaron a 25°C y después de una semana, se midió el crecimiento en las diferentes concentraciones y se comparó con los testigos.

Para comprobar la capacidad degradante de los hongos aislados, se utilizaron dos tipos de cámaras de prodredumbre:

1) Para el hongo basidiomicete se prepararon 20 botellas francesas cuadradas (19,7 cm x 4,5 cm) con agar-malta, se inocularon con el hongo basidiomicete #137 y se incubaron por 8 días a 28°C. Al cabo de este período, se introdujo en las cámaras 2 muestras de madera sana (1 cm x 1 cm x 2 cm) de *Pouteria sp.*, clasificada como resistente (González *et al.*, 1974), previamente secada a 70°C y esterilizada. Las cámaras se mantuvieron por un período de 4 meses a 28°C. Se utilizó la técnica recomendada por la American National Standard (1978).

2) Para los imperfectos se utilizó 20 botellas cuadradas (19,7 cm x 4,5 cm) con vermiculita, las cuales fueron inoculadas con una suspensión de caseinato de sodio que contenía al hongo seleccionado. Muestras de madera sana (1 cm x 1 cm x 2 cm) de los géneros *Bombacopsis sessilis* (clasificada como poco resistente) y *Tetragastris sp.*, (clasificada como resistente) previamente secadas a 70°C y

esterilizadas, se introdujeron en las botellas. Las botellas permanecieron por 4 meses a 28°C. Se utilizó la técnica recomendada por Nilsson (1973).

Después de este período todas las muestras de madera fueron extraídas de las botellas y se calculó el porcentaje de pérdida de peso.

Las muestras de madera que presentaron mayor daño se fijaron en Formalina-Alcohol-Acido acético (FAA) para su posterior observación al microscopio de luz.

Se hicieron cortes al micrótopo de 10 μ y se colorearon con safranina. Se buscó daños en las paredes, erosiones o cavidades, que indicaran la acción fungosa.

RESULTADOS

Aislamientos

Cuarenta y tres hongos pertenecientes a 7 géneros diferentes, fueron aislados de 11 maderas tratadas con pentaclorofenol, y 57 hongos pertenecientes a 9 géneros diferentes, incluidos 2 basidiomicetes, se aislaron de 12 maderas sin tratamiento (Cuadro 1). Uno de los basidiomicetes, *Trametes corrugata*, no se pudo obtener en cultivo puro.

Los hongos aislados con mayor frecuencia, en ambos casos, pertenecieron al grupo de imperfectos y fueron: *Trichoderma viride*, *Scytalidium lignicola*, *Paecilomyces variotii* y *Fusarium sp.*

La mayoría de los hongos fueron aislados de la parte externa y media de las muestras. *T. viride* se aisló frecuentemente de la parte media, *P. variotii* y *S. lignicola* de la externa, y el basidiomicete 137, de las tres regiones (Cuadro 2). Aunque un mayor número de hongos se aisló de las maderas resistentes no tratadas, la diferencia no fue significativa con respecto a los aislamientos de las maderas poco resistentes tratadas (Cuadro 3).

Pruebas de tolerancia

El comportamiento de los 4 hongos utilizados en las pruebas de tolerancia fue semejante en todos los casos: para *T. viride* y *S. lignicola* se observó un 50% de reducción en el crecimiento en medios con una concentración de pentaclorofenol de 0,1 ppm; y para *P. variotii* y el basidiomicete 137 en 0,01 ppm; la misma reducción se obtuvo en concentraciones de 0,01 ppm de sales para los 3

Cuadro 1. Frecuencia de aislamiento de los hongos presentes en maderas sin y con tratamiento de pentaclorofenol.

Género y/o especie	Total	Frecuencia de aislamiento*	
		En maderas tratadas	En maderas no tratadas
<i>Trichoderma viride</i> (Bon.) Bain. Per.: S.F. Gray	21	9	12
<i>Scytalidium lignicola</i> Pesante	20	10	10
<i>Paecilomyces variotii</i> Bainier	18	7	11
<i>Fusarium sp.</i>	15	7	8
<i>Penicillium sp.</i>	12	5	7
<i>Rhizopus stolonifer</i> (Ehr.: Fr.) Vuill.	8	2	6
<i>Aureobasidium pullulans</i> (de Bary) Arnaud	4	3	1
Basidiomicete 137	1	—	1
<i>Trametes corrugata</i> (Pers.) Bres.	1	—	1
TOTAL	100	43	57

* Frecuencia de aislamiento: Número de veces que se aisló cada hongo en las maderas utilizadas

hongos imperfectos. El basidiomicete fue inhibido a 0,05 ppm de pentaclorofenol y en todas las concentraciones de sales; la concentración de 0,05 ppm de sales inhibió a los 3 hongos imperfectos, en cambio, 0,005 ppm de pentaclorofenol estimuló el desarrollo de los 4 hongos utilizados en las pruebas. De los hongos imperfectos, el más susceptible a las diferentes concentraciones fue *P. variotii* (Cuadro 4).

Pruebas de podredumbre

En las pruebas de podredumbre, las menores pérdidas de peso se obtuvieron en las maderas inoculadas con el basidiomicete 137. En el caso de los hongos imperfectos, las maderas expuestas a *T. vi-*

ride presentaron las mayores pérdidas de peso, seguidas por *S. lignicola* y *P. variotii* (Cuadro 5).

Al comparar mediante una prueba de "t" de Student, los pesos iniciales y finales de 10 trocitos de madera tomados aleatoriamente de cada tratamiento, se observó que había un efecto altamente significativo de *S. lignicola* y *T. viride* sobre la madera de *Bombacopsis sessilis*, así como del basidiomicete sobre la madera de *Pouteria sp.* Sin embargo, se notó un efecto apenas significativo de *P. variotii* sobre la madera de *Tetragastris sp.*

Al observar al microscopio de luz las láminas fijadas preparadas con muestras de maderas afectadas, se pudo notar que en el caso de *P. variotii*, las hifas se acumularon en el lumen de las traqueidas y se presentó una leve erosión en las paredes. *T. viride* se encontró abundantemente en el lumen de los

Cuadro 2. Frecuencia y localización de los hongos aislados de muestras de maderas no tratadas y tratadas con pentaclorofenol.

	Parte externa		Parte central		Parte interna	
	Tratadas	No tratadas	Tratadas	No tratadas	Tratadas	No tratadas
<i>Scytalidium lignicola</i>	10	10	9	9	7	7
<i>Trichoderma viride</i>	6	12	8	11	6	8
<i>Paecilomyces variotti</i>	6	10	3	9	3	8
<i>Fusarium sp.</i>	4	7	4	7	3	1
<i>Penicillium sp.</i>	5	7	2	6	1	1
<i>Rhizopus stolonifer</i>	2	4	0	3	0	0
<i>Aureobasidium pullulans</i>	3	1	3	1	0	0
<i>Trametes corrugata</i>	0	1	0	1	0	1
Basidiomicete 137	0	1	0	1	0	1
TOTAL	36	53	29	48	20	27

vasos. No se observó formación de cavidades pero sí una fuerte erosión en las paredes. *S. lignicola* presentó una colonización abundante de los rayos parenquimatosos, pero sin presentar erosión ni formación de cavidades. En el caso del basidiomicete, se observó hifas en los rayos parenquimatosos y una leve erosión en las paredes.

DISCUSION

El estudio de los agentes bióticos, en especial de los hongos, que son los causantes de las mayores pérdidas económicas al descomponer la madera, ha despertado el interés de diversos investigadores. Estos trabajos realizados en el campo o en el laboratorio, han demostrado la existencia en la madera de diversos géneros y especies de hongos imperfectos, ascomicetes y basidiomicetes (Ananthanarayanan, 1979; Carranza, 1984; Nicholas, 1973).

En esta investigación se aislaron e identificaron 100 hongos, incluyendo imperfectos y basidiomicetes, 43 de maderas tratadas con pentaclorofenol y 57 de no tratadas.

Los hongos que se aislaron con mayor frecuencia fueron del grupo de imperfectos, entre estos *T. viride* y *P. variotti*, habitantes comunes del suelo. Los hongos imperfectos han sido considerados invasores primarios de maderas en contacto con el suelo; la mayoría no atacan la estructura de la madera, pero obtienen nutrimentos principalmente de los contenidos celulares (Merrill y French, 1966; Shigo, 1967). Otros pocos causan podredumbres suaves al remover celulosa de las paredes secundarias (Nilsson, 1973; 1976).

S. lignicola y *P. variotti* causaron pérdidas de peso bajas y solo se observaron leves erosiones en las paredes, por lo que podría considerarse que producen estados incipientes de podredumbre suave, favorecidos por la poca resistencia de la madera. En

Cuadro 3. Resistencia de algunas maderas al ataque de agentes bióticos y número total de hongos aislados de cada una de ellas.

No. de muestra	Nombre científico/nombre común	Resistencia	Total de hongos aislados
131 A (no tratada)	<i>(Enterolobium schomburghii)</i> Harino/Guanacaste macho	Resistente	6
137 (no tratada)	<i>(Pouteria sp.)</i> Nispero cuascudo/lechillo	Resistente	6
204 (no tratada)	<i>(Trattinickia sp. o Protium sp.)</i> Caraño/Caraña/Carao amargo	Moderadamente resistente	6
211 A (no tratada)	<i>(Inga sp.)</i> (Guabo/Dulce guaba	Poco resistente	6
183 (no tratada)	<i>(Symphonia globulifera)</i> Cerillo	Resistente	5
131 (no tratada)	<i>(Enterolobium schomburghii)</i> Harino/Guanacaste macho	Resistente	5
134 (no tratada)	<i>(Tetragastris sp.)</i> Ciruelo	Resistente	5
211 (no tratada)	<i>(Inga-hayesii?)</i> Guabo	Poco resistente	5
131 W1.1 (no tratada)	<i>(Enterolobium schomburghii)</i> Harino/Guanacaste macho	Resistente	4
194 (no tratada)	<i>(Qualea cymulosa)</i> Gorgojo	Resistente	4
194 NE-1 (no tratada)	<i>(Qualea cymulosa)</i> Gorgojo	Resistente	4
194 W.1 (no tratada)	<i>(Qualea cymulosa)</i> Gorgojo	Resistente	3
163 (tratada)	<i>(Bombacopsis sessilis)</i> Bongo macho/Pochote o Ceibo	Poco resistente	5
195 S3 (tratada)	<i>(Chrysophyllum sp.)</i> Plátano	Poco resistente	5
138 (tratada)	<i>(Prioria copaifera)</i> Cativo blanco	Poco resistente	4
167 (tratada)	<i>(Dendropanax arboreus)</i> Nagua blanca/Zopilote	Poco resistente	4
167 NE-4 (tratada)	<i>(Dendropanax arboreus)</i> Nagua blanca/Zopilote	Poco resistente	4
195 N3 (tratada)	<i>(Chrysophyllum sp.)</i> Plátano	Poco resistente	4
179 (tratada)	<i>(Dialyanthera sp.)</i> Cebo	Muy poco resistente	4
195 NW1 (tratada)	<i>(Chrysophyllum sp.)</i> Plátano	Poco resistente	3
167 NE-2 (tratada)	<i>(Dendropanax arboreus)</i> Nagua blanca/Zopilote	Poco resistente	3
143 NE-3 (tratada)	<i>(Prioria copaifera)</i> Cativo negro	Poco resistente	3
156 W6 (tratada)	<i>(Spondias mombin)</i> Jobo/Jobo jocote	Muy poco resistente	3

Cuadro 4. Dosis letal media para los hongos aislados, en diferentes concentraciones de pentaclorofenol y de sales de sulfato de cobre, dicromato de sodio y arseniatos.

Hongo	LD 50	
	Concentración de pentaclorofenol (ppm)	Concentración de sales (ppm)
<i>Trichoderma viride</i>	0,1	0,01
<i>Scytalidium lignicola</i>	0,1	0,01
<i>Paecilomyces variotti</i>	0,01	0,01
Basidiomicete 137	0,01	(no creció)

Cuadro 5. Porcentaje de pérdida de peso de maderas atacadas por un basidiomicete y por hongos imperfectos.

Madera	Hongo	Promedio de pérdida de peso (g)	Ambito	Desviación estándar
<i>Pouteria</i> sp. (Nispero chicle)	Basidiomicete 137	5,64**	4,65-10,29	1,50
<i>Bombacopsis sessilis</i> (Pochote o ceibo)	<i>Scytalidium lignicola</i>	6,53**	8,42-11,40	0,97
<i>Tetragastris</i> sp. (Ciruelo)	<i>Paecilomyces variotti</i>	8,94*	5,34-14,28	2,34
<i>Bombacopsis sessilis</i> (Pochote o ceibo)	<i>Trichoderma viride</i>	44,50**	13,40-53,50	10,70

Prueba "t" de Student: * significativo, ** altamente significativo.

el caso de *T. viride*, como presenta pérdidas más altas, puede considerarse causante de un estado avanzado de podredumbre. Este hongo produce celulasas capaces de degradar la celulosa de la pared y causar pérdidas de peso más altas que los otros hongos. La madera utilizada (*Bombacopsis sessilis*) es poco resistente al ataque de hongos, por lo que se notó una fuerte erosión en las paredes, principalmente de los vasos.

La infección de las muestras de madera, se vio posiblemente favorecida por la presencia de abundantes micro y macro rajaduras, principalmente en la parte superior y a nivel del suelo, ocasionados por cortes de machete hechos cuando se limpiaba el terreno, o por raíces de plantas superiores; estas rajaduras son posibles vías de invasión

para toda clase de hongos (Ananthanarayanan, 1979).

Las maderas tratadas con pentaclorofenol, mostraron superficialmente una coloración verdusca debido a la presencia del preservante, que, en algunos casos, también apareció internamente. Esto indicó una buena retención del preservante durante el tiempo que estuvieron expuestas estas maderas al efecto de agentes bióticos y abióticos, el cual osciló entre 10 y 12 años. Los hongos aislados de estas muestras, principalmente *S. lignicola* y *T. viride* mostraron tolerancia a concentraciones altas de pentaclorofenol, lo que explica la gran incidencia de estos hongos, tanto en la parte externa como media de las muestras. Es interesante notar que estos mismos hongos se presentaron en gran abun-

dancia en las maderas no tratadas, de donde se aisló un número mayor de hongos, entre ellos *P. variotiti* y el basidiomicete 137, que en las pruebas de tolerancia al preservante mostraron poca o baja tolerancia.

La presencia de cuerpos fructíferos, tanto de basidiomicetes como de ascomicetes en la madera, es un signo seguro de podredumbre. Esto se pudo comprobar al tratar de obtener algunas muestras, ya que se presentó poca resistencia a la entrada del taladrador, y de una de ellas se aisló el basidiomicete 137. De la madera Guanacaste Macho (*Enterolobium schomburghii*) donde se observó el cuerpo fructífero de *Trametes corrugata*, no se pudo obtener micelio puro debido al rápido crecimiento de los hongos imperfectos y a su posible influencia antagónica contra los basidiomicetes. Este hongo ha sido señalado como causante de podredumbre blanca (Bakshi *et al.*, 1970).

Este efecto antagónico ha sido sugerido por varios investigadores como un posible método de control biológico para impedir la entrada a la madera de hongos causantes de podredumbre y evitar el uso de preservantes tóxicos para el ambiente y el hombre (Ricard, 1976).

El número de hongos aislados de maderas resistentes sin tratamiento y de maderas no resistentes con tratamiento, fue semejante, lo que indica la efectividad del preservante en impedir una mayor colonización de hongos en las maderas no resistentes. Los hongos basidiomicetes fueron observados en maderas no tratadas. En las pruebas de tolerancia a los preservantes, se pudo observar una tolerancia mayor en los hongos imperfectos y una menor en los basidiomicetes, lo que podría explicar en parte la no presencia de basidiomicetes en maderas tratadas.

El hecho de ser los hongos imperfectos más tolerantes a los preservantes y en general a sustancias tóxicas presentes en las maderas, hace pensar en una posible sucesión, en la cual los hongos imperfectos desintoxican el sustrato permitiendo la entrada de los hongos basidiomicetes (Greaves, 1972; Shigo, 1967).

RESUMEN

En el presente trabajo se aislaron 100 hongos de maderas tratadas y no tratadas con pentaclorofenol en contacto con el suelo.

La mayoría de los hongos aislados pertenecían al grupo de Deuteromicetes y presentaron alta tolerancia a los preservantes. Algunos ocasionaron pérdidas de peso altas, por lo cual se les consideró causantes de podredumbre suaves. Solo dos basidiomicetes fueron aislados, uno de ellos (no identificado) causó una podredumbre incipiente y presentó baja tolerancia a los preservantes. El otro basidiomicete, *T. corrugata* ha sido informado como causante de podredumbre blanca.

Se sugiere que los hongos imperfectos pueden actuar como invasores primarios, destoxificando el sustrato y haciéndolo más accesible a los hongos basidiomicetes.

LITERATURA CITADA

- AMERICAN NATIONAL STANDARD. 1978. Standard method of accelerated laboratory test of natural decay resistance of wood. ANSI/ASTMD. p. 2017-71.
- ANANTHANARAYANAN, S. 1979. Timber deterioration and its prevention. *Revue de Mycologie* 43(2): 131-139.
- BAKSHI, B.K.; SEN M.; SINGH, B. 1970. Cultural diagnosis of Indian Polyporaceae. *Indian Forest Records* 2(10): 245-76.
- CARRANZA, J. 1984. Isolation, identification and roles of fungi from creosote treated pine poles. *Turrialba* 34(4): 489-501.
- CENTRO DE DESARROLLO (CENDES). 1969. Madera preservada. Ecuador, Publicaciones del CENDES. p. 1-21.
- FOREST PRODUCTS LABORATORY. 1967. Factors influencing decay of untreated wood. U. S. Forest Service Res. 3 p. (Note FPL. 0154).
- GONZALEZ, G. *et al.* 1974. Evaluación de la durabilidad natural de ciento trece especies maderables de Panamá y comparación de esas mismas especies sometidas a un tratamiento preservador. San José, Universidad de Costa Rica, Laboratorio de Productos Forestales. p.1-11.
- GREAVES, H. 1972. Microbial ecology of untreated and copper-chrome-arsenic treated stakes exposed in a tropical soil. I. The initial invaders. *Can. J. of Micr.* 18: 1923-1931.
- LEVY, M.P. 1976. The effects of microorganisms of chromated-copper-arsenate preservatives in wood. *Beih. Mat. und Org.* 3: 297-306.
- LINE, M. A. 1977. Microorganisms tolerant to creosote in creosote treated soil. *Biodeterior. Bull.* (ISSN 0020-6164) 13(4): 102-107.

