

DETERMINACION TAXONOMICA Y ENZIMATICA CUALITATIVA DE HONGOS EN ASERRIN DE *Pinus radiata* EN DIVERSAS CONDICIONES NATURALES.

(*Taxonomic and qualitative enzymatic determination of fungi isolated from sawdust of Pinus radiata stored under diverse natural condition*)

Eduardo Valenzuela & Sylvia Barrera.

Instituto de Microbiología, Facultad de Ciencias, Universidad Austral de Chile.
Casilla 167, Valdivia, Chile. E-mail: evalenzu@uach.cl

Palabras clave: aserrín, enzimas, hongos, *Pinus radiata*, taxonomía, Chile.

Key words: sawdust, enzymes, fungi, *Pinus radiata*, taxonomy, Chile.

RESUMEN

En el Aserradero Vista Alegre de Valdivia, Décima Región de Chile, mediante los métodos de las diluciones seriadas y lavado de partículas, se realizó un estudio taxonómico y enzimático cualitativo comparativo, de hongos aislados a partir de aserrín de *Pinus radiata* D. Don, depositado entre uno y veinte años en condiciones naturales.

Por el método de las diluciones seriadas, en el aserrín de un año se aislaron 10 géneros fúngicos, y sólo 1 en aserrín depositado por 20 años, mientras por el método de lavado de partículas 8 y 5 respectivamente. Los hongos mitosporicos del género *Penicillium* fueron los de mayor frecuencia en los sustratos en estudio y control. Además se detectó la presencia de algunos fitopatógenos como *Cylindrocarpon destructans*, *Fusarium oxysporum* y *Pesotum* sp.

El mayor número de taxa fúngicos con actividad amilolítica (12), proteolítica (10), celulolítica (20) y lignolítica (4), se detectaron en el aserrín de un año. La totalidad de las cepas, sin importar el período de depósito, presentaron actividad celulolítica, en especial las del género *Penicillium*. La actividad lignolítica se presentó en un número menor de cepas, tales como: *Acremonium butyri*, *Sporotrichum* sp. *Trichoderma harzianum* y micelios de Basidiomycetes en el aserrín de un año y *Fusarium oxysporum* y *T. harzianum* en el de veinte años.

Se concluye que no existe una marcada diferencia

en la actividad lignocelulolítica entre los hongos aislados del aserrín depositado por uno y veinte años en condiciones naturales, pero existe una mayor diversidad y abundancia fúngica en el aserrín de un año.

SUMMARY

A taxonomic and qualitative enzymatic comparative study of fungi has been done. They were isolated using the method of series of dilution and washing of particles, taking the *Pinus radiata* D. Don sawdust stored between 1 and 20 years under natural conditions in the Vista Alegre sawmill of Valdivia.

Through the method of series of dilution, 10 fungal genera were isolated in sawdust stored for 1-year as compared to 4 in sawdust stored for 20 years, whereas through the method of particle washing 8 and 5 were isolated in each case accordingly. Mitosporic fungi belonging to the *Penicillium* genus were isolated with high frequency from the substrata in study and control. Besides, fungi of phytopathological importance, such as, *Cylindrocarpon destructans*, *Fusarium oxysporum* and *Pesotum* sp. were detected. The highest number of fungal taxa with amylolytic (12), proteolytic (10), cellulolytic (20) and lignolytic (4) activity was detected in 1-year storage sawdust. Most of isolated strains, neglecting the storage period of sawdust, showed cellulolytic activity, specially those of the genus *Penicillium*. The lignolytic activity was detected in a small number of strains such as: *Acremonium butyri*, *Sporotrichum* sp. *Trichoderma*

harzianum and *Basidiomycete* mycelia, in the 1-year sawdust and *F. oxysporum* and *T. harzianum* in that of 20-years.

It is concluded that there is not a marked difference in the lignocellulolytic activity among fungi isolated from sawdust stored for 1 and 20 years under natural conditions yet there is certainly a major diversity and fungal abundance in the 1-year sawdust.

INTRODUCCION

En Chile existen aproximadamente 1.818.185 há de plantaciones arbóreas exóticas de las cuales el 76 % corresponden a bosques de *Pinus radiata* D. Don, ubicados entre la V y X Región (Instituto Forestal, 1996). El auge de la actividad forestal ha traído como consecuencia el aumento de los residuos forestales, así del aserrío de 1 m³ real de madera se generan aproximadamente 0.21 m³ de corteza, 0.20 m³ de tapas, 0.044 m³ de despuntes y 0.035 m³ de aserrín (Ortiz, 1995).

En Chile, existen sobre 500 mil m³ de aserrín depositados en patios o que son eliminados por diferentes vías, pues la degradación del aserrín de *P. radiata* en condiciones naturales es casi nula y su acumulo en montículos limita y contamina la superficie útil de suelo y los cursos de agua (Fundación Chile, 1995). Además, modifica el pH del suelo por los ácidos orgánicos e inorgánicos que resultan de su parcial degradación por los escasos organismos del suelo (Donoso, 1994). El aserrín, a su vez, genera problemas ambientales por incendios y autocombustión, contaminando el aire al emitir gases tóxicos y partículas en suspensión. En Chile el uso rentable e industrializado de los residuos forestales no se ha llevado a cabo en forma integral, pero principalmente se usan como combustible.

A nivel mundial, desde aserrines de distintas maderas se han aislado hongos pertenecientes a las Divisiones Basidiomycota, Ascomycota y sus hongos mitosporicos relacionados, principalmente de los géneros *Aspergillus*, *Clonostachys*, *Fusarium*, *Paecilomyces*, *Penicillium* y *Trichoderma* (Teixeira *et al.*, 1993). Los estudios micológicos de aserrín de *P. radiata* depositado en condiciones naturales por periodos prolongados de tiempo son escasos; Lohmeyer *et al.* (1993) describieron 24 especies de *Basidiomycetes* que se desarrollaron en aserrín de *P. radiata* tras cinco años de almacenamiento.

En la literatura micológica chilena no se registran datos de los hongos que colonizan el aserrín de *P. radiata*, pero si de los que se desarrollan en madera no manufacturada. Peredo *et al.* (1984), determinaron el estado sanitario de la madera almacenada de *P. radiata* y su influencia en el pulpaje kraft. Peredo & Peredo (1987), identificaron los hongos presentes en madera almacenada durante perio-

dos de tiempo prolongado, Valenzuela *et al.* (1992), estudiaron la influencia de los cambios químicos producidos por diferentes especies de hongos que se desarrollaron en madera rolliza de *P. radiata* depositada por un año en un bosque de la X Región. Los resultados de estos autores indican que cualitativamente son pocos los hongos que se desarrollan en madera no manufacturada de *P. radiata*.

Los antecedentes expuestos indican, que en Chile, toneladas de aserrín se encuentran depositadas en condiciones naturales, las cuales ocupan un espacio físico, inmovilizan temporalmente elementos químicos y generan problemas ambientales. Es por ello, que el conocimiento de los hongos que colonizan este sustrato y la detección de las enzimas involucradas en la degradación de compuestos lignocelulósicos, podrían ser aprovechados en procesos de biodegradación con miras a la utilización del aserrín como soporte en cultivos agroforestales, cultivo de setas comestibles o para producir proteínas de tipo no convencional.

MATERIALES Y METODOS

1) Procesamiento del aserrín de *Pinus radiata*: las muestras de aserrín se obtuvieron desde montículos depositados por uno y veinte años en condiciones naturales en el Aserradero Vista Alegre de Valdivia. De la superficie e interior de cada montículo se tomaron separadamente 10 submuestras de aserrín, cada una de 30 g. La muestra control de aserrín se obtuvo a partir de un tronco de *P. radiata* de 16 años recién talado. Las submuestras recolectadas del aserrín depositado por un año se mezclaron con una espátula estéril; obteniéndose una muestra única a partir de la cual y por triplicado se pesaron 10 g de ella para el aislamiento de hongos. Igual procedimiento se realizó con las muestras de aserrín depositadas por veinte años y el control.

2) Obtención de cultivos fúngicos: para el aislamiento de los hongos las muestras únicas de aserrín y control se procesaron individualmente por el método de las diluciones seriadas y lavado de partículas. Para el primer caso, en un matraz estéril se depositaron 10 g de la muestra única y se adicionaron 100 ml de H₂O destilada estéril. La suspensión obtenida se agito a 1500 r.p.m. por 15 min, tras lo cual se realizaron las diluciones seriadas hasta 10⁷ como lo señala Pochon & Tardieux (1965). Cada dilución se sembró por triplicado e independientemente en los medios de cultivo agar extracto de malta (AEM) y agar papa dextrosa (PDA), ambos al 2%. Para ello, en placas de Petri estériles se depositaron 0.1 ml de una mezcla de antibióticos (penicilina 6x10⁻⁵ g y estreptomycin 0.25 g en 5 ml de agua destilada), 1 ml de la dilución a ensayar y 15 ml del medio de cultivo respectivo. Sembradas las pla-

cas se incubaron a 23 ± 2 °C hasta por 20 días.

Para el aislamiento de los hongos por el método de lavado de partículas se utilizó un cilindro plástico (16 x 9.6 cm de diámetro), con uno de sus extremos unido a un embudo, se introdujeron en el cilindro tres tamices de porosidad decreciente (1.5, 1 y 0.5 mm); 10 g de la muestra de aserrín a analizar se depositó en el embudo y luego se lavó con 1000 ml de H₂O destilada estéril. Terminado el lavado se extrajeron los tamices del cilindro y de cada tamiz se tomaron con una pinza estéril 10 partículas de aserrín que fueron sembradas por triplicado en los mismos medios de cultivos y condiciones usadas para el método de las diluciones seriadas.

Las colonias fúngicas que fueron surgiendo se repicaron en placas Petri que contenían AEM al 2% y se incubaron a 23 ± 2 °C por 7 días, luego mediante exámenes microscópicos se determinó la pureza de los cultivos obtenidos. Por último, cada cepa obtenida se sembró por triplicado en tubos de cepario que contenían AEM al 2% y se incubaron a 23 ± 2 °C por 7 días, tras lo cual se almacenaron a 4°C hasta realizar su estudio taxonómico y enzimático cualitativo.

3) Determinación taxonómica de las cepas fúngicas: para realizar la determinación taxonómica, cada cepa se cultivó en placas Petri que contenían AEM al 2% y se incubaron a 23 ± 2 °C por 14 días, tras lo cual se realizó una caracterización macroscópica de las colonias (color, olor, tamaño y textura) de acuerdo a los criterios señalados por Stalpers (1978). Para la caracterización microscópica y morfométrica, se realizaron preparaciones en fresco, utilizando H₂O destilada como líquido de montaje, en estas preparaciones se determinaron y midieron las estructuras fúngicas de importancia taxonómica (entre otras: células conidiogénicas, conidióforos, conidios, esporangios, hifas, etc.). Finalmente, se confrontaron los datos macro-microscópicos y morfométricos de las cepas estudiadas con las claves de identificación de von Arx (1981), esto permitió asignar las cepas hasta el rango de género. Para la determinación de especie la metodología empleada fue la estipulada en claves según autores como: Cole & Kendrick (1973), De Hoog & Hermanides-Nijhof (1977), Domsch *et al.* (1980), Kurtzman & Fell (1998), Nelson *et al.* (1983), Ramírez (1982), Raper & Fennell (1965), Rifai (1969), Samson (1974), Stalpers (1984), Upadhyay (1981) y Zycha *et al.*, (1969).

4) Determinación enzimática cualitativa de las cepas fúngicas: la detección de las enzimas amilasas y celulasas se realizó de acuerdo a los métodos señalados por Pochon & Tardieux (1965), las proteasas de acuerdo al método señalado por Macc Faddin (1976) y la lacasa según los procedimientos de Stalpers (1978). Para la detección de amilasas, las cepas fueron cultivadas individualmente y

por triplicado en placas de Petri que contenían agar almidón de arroz al 2 % como única fuente de carbono. Sembradas las placas se incubaron a 23 ± 2 °C por 15 días, tras lo cual se agregó a las placas solución de yoduro al 1 %. Una reacción positiva (presencia de la enzima) se apreció por una coloración amarillenta alrededor de la colonia. Para la detección de las celulasas, las cepas fueron cultivadas en placas de Petri que contenían agar celulosa al 1.5% como única fuente de carbono y NH₄NO₃ como fuente de nitrógeno. Sembradas las placas se incubaron a 23 ± 2 °C por 15 días. Una reacción positiva se detectó por el crecimiento del hongo en este medio de cultivo. Para la detección de enzimas proteolíticas las cepas se cultivaron en tubos que contenían medio gelatina al 12 % y se incubaron a temperatura ambiente por 14 días. La licuefacción del medio indicó la presencia de proteasas. Para la detección de lacasa cada cepa se sembró en placas de Petri que contenían AEM al 2%, pH 4.8 y se incubaron a 23 °C por 14 días, tras lo cual en el margen de las colonias se depositaron independientemente 0.05 ml de sol. A (1-naftol 0.1 M en etanol al 96%) o sol. B (benzidina 0.1 M en etanol al 96%). La reacción positiva se visualizó por una coloración azul oscura.

RESULTADOS Y DISCUSION

Se aislaron un total de 18 géneros fúngicos desde los aserrines estudiados y la mayor diversidad de géneros se determinó en el aserrín depositado por un año (Tabla 1). Por el método de las diluciones seriadas, en el aserrín de un año se aislaron 15 taxa fúngicos (53 cepas) y sólo 6 (23 cepas) en aserrín depositado por 20 años, mientras por el método de lavado de partículas 10 (28) y 6 (13) respectivamente. En el control se obtuvo resultados similares al aserrín de 20 años (Tabla 1).

En la literatura consultada no se encontraron trabajos específicos sobre aserrín de *P. radiata* depositado en las condiciones del presente estudio, pero los datos obtenidos son semejantes a los de Peredo *et al.* (1984), quienes aislaron 19 géneros fúngicos desde madera rolliza y astillas de *P. radiata*. Por su parte, Valenzuela *et al.* (1992), al estudiar los hongos que se desarrollaron en madera rolliza de *P. radiata* depositada por un año en el bosque, aislaron en total 13 géneros fúngicos, mayoritariamente mitosporicos (*Aspergillus*, *Aureobasidium*, *Fusarium*, *Penicillium* y *Trichoderma*), micelios de *Basidiomycetes* y *Zigomycetes* (*Absidia*, *Mucor*, *Rhizopus*). En el presente estudio en las muestras de aserrín control, de uno y veinte años (Tabla 1), predominaron los hongos mitosporicos, mayoritariamente del género *Penicillium*; también se aislaron *Zigomycetes* como *Absidia corymbifera* desde el aserrín control, *Rhizopus stolonifer* y *Mucor hiemalis* desde el aserrín de uno y veinte años respectivamente.

Según Teixeira *et al.* (1993), en los montículos de aserrín se favorecería el desarrollo de hongos termófilos y termotolerantes debido a las altas temperaturas generadas por el calor disipado por el metabolismo fúngico, lo que podría repercutir en el escaso número de géneros fúngicos que se desarrollan en este sustrato. En el presente estudio no se pudo aseverar que los hongos aislados fueran termófilos o termotolerantes, pues la temperatura utilizada en la fase experimental para su cultivo fue de 23 ± 2 °C, que favorece el desarrollo de hongos mesófilos. Además, se puede especular que las condiciones climáticas de la X Región de Chile (Donoso, 1994), contribuirían al desarrollo de hongos mesófilos. Al parecer, como indican Eriksson *et al.* (1990), el limitado número de géneros fúngicos se debería a la composición química del aserrín, que es rico en resinas, taninos y polisacáridos complejos, como la lignina,

todos sustratos de difícil degradación.

Por el método de las diluciones, se aisló un número mayor de cepas, debido a que este favorecería a los hongos que producen gran cantidad de esporas, sobredimensionando el número de aislamientos, mientras que el método de lavado de partículas, permite eliminar la mayoría de las esporas sueltas, favoreciendo las estructuras vegetativas adheridas a las partículas de aserrín. Por este último método se logró aislar desde el control un número mayor de cepas miceliales de *Basidiomycetes* y 6 cepas de *Pesotum* sp. Además desde el aserrín depositado por un año se aislaron 2 cepas de micelios estériles y 7 cepas de *Aureobasidium pullulans* var. *melanigenum*, que también se aislaron en menor cantidad desde el aserrín depositado por veinte años (Tabla 1).

La importancia de *Pesotum* sp., radica en que

Tabla 1. Taxa aislados desde aserrín de *Pinus radiata* control y depositado en condiciones naturales en el Aserradero Vista Alegre de Valdivia.

Taxa	Aserrín control				Aserrín 1 año				Aserrín 20 años			
	A	B	A*	B*	A	B	A*	B*	A	B	A*	B*
<i>Absidia corymbifera</i>	+	-	1	0	-	-	0	0	-	-	0	0
<i>Acremonium butyri</i>	-	-	0	0	+	-	6	0	-	-	0	0
<i>Aspergillus</i> subgénero <i>Fumigati</i>	-	-	0	0	+	+	2	1	-	-	0	0
<i>Aureobasidium pullulans</i> var. <i>melanigenum</i>	-	-	0	0	+	+	3	7	-	+	0	2
<i>Clonostachys rosea</i>	-	-	0	0	+	+	1	1	-	+	0	1
<i>Cylindrocarpon destructans</i>	-	-	0	0	-	+	0	2	-	-	0	0
<i>Fusarium oxysporum</i>	-	-	0	0	+	+	2	3	-	+	0	1
<i>Mucor hiemalis</i>	-	-	0	0	-	-	0	0	+	-	2	0
<i>Paecilomyces farinosus</i>	-	-	0	0	-	-	0	0	+	-	4	0
<i>Paecilomyces variotii</i>	+	-	1	0	-	-	0	0	-	+	0	1
<i>Penicillium claviforme</i>	-	-	0	0	-	+	0	2	-	-	0	0
<i>Penicillium</i> serie <i>Brevi-compactum</i>	+	-	12	0	+	-	8	0	+	+	10	8
<i>Penicillium</i> serie <i>Citrinum</i>	-	-	0	0	+	-	5	0	-	-	0	0
<i>Penicillium</i> serie <i>Decumbens</i>	-	+	0	1	-	-	0	0	-	-	2	0
<i>Penicillium</i> serie <i>Frequentans</i>	-	-	0	0	-	-	0	0	+	-	0	0
<i>Penicillium</i> serie <i>Raistrickii</i>	-	-	0	0	-	+	0	2	-	-	2	0
<i>Penicillium</i> serie <i>Ramigena</i>	+	-	2	0	+	-	5	0	+	+	1	0
<i>Pesotum</i> sp.	-	+	0	6	-	-	0	0	-	-	0	0
<i>Phialophora fastigiata</i>	-	+	0	2	-	-	0	0	-	-	0	0
<i>Rhinocladiella atrovirens</i>	-	-	0	0	+	-	4	0	-	-	0	0
<i>Rhizopus stolonifer</i>	-	-	0	0	+	-	1	0	-	-	0	0
<i>Scytalidium lignicola</i>	-	-	0	0	+	-	1	0	-	-	0	0
<i>Sporotrichum</i> sp.	-	-	0	0	-	+	0	2	-	-	2	0
<i>Trichoderma harzianum</i>	-	-	0	0	+	-	1	0	+	-	0	0
<i>Trichoderma koningii</i>	-	-	0	0	+	+	7	6	-	-	0	0
<i>Trichoderma longibrachiatum</i>	-	-	0	0	+	-	2	0	-	-	0	0
<i>Trichosporon pullulans</i>	+	+	4	6	-	-	0	0	-	-	0	0
Basidiomycetes (micelios)	+	+	3	10	+	-	5	0	-	-	0	0
Micelio estéril	-	-	0	0	-	+	0	2	-	-	0	0
Total	6	5	23	25	15	10	53	28	6	6	23	13

A = método de las diluciones. B = método lavado de partículas. A* = número de cepas aisladas por el método de las diluciones. B* = número de cepas aisladas por el método lavado de partículas. + = se aisló por el método empleado. - = no se aisló por el método usado.

las especies de este género son descritas como los estados conidiales de *Ceratocystis*, principal agente causal del manchado azul de la madera (Upadhyay, 1981). De acuerdo a Saelzer (1993), la madera de *P. radiata* es una de las más susceptibles al ataque por este hongo manchador y su coloración es objetable a la hora de su comercialización.

Es importante señalar que en el presente estudio el aserrín usado como control se obtuvo de un tronco de *P. radiata* recién talado, el hallazgo de *Pesotum* sp., permitiría indicar que este hongo se encuentra colonizando los árboles de *P. radiata* antes de su tala, datos que concuerdan con los de Aguilar & Osorio (1986). En lo que respecta a *Aureobasidium pullulans* var. *melanigenum* se le considera un pudridor blando de la madera y según Quiroz (1989), uno de los principales causantes de biodeterioro en madera de *P. radiata* en Chile. Como se ha indicado, desde el aserrín control y del de un año, se aislaron micelios de *Basidiomycetes* lo que concuerda parcialmente con los resultados de Lohmeyer *et al.* (1993), quienes describieron los basidiocarpos de 24 especies fúngicas en aserrín almacenado por cinco años. En el presente trabajo no se obtuvieron los basidiocarpos, pero los micelios podrían corresponder a alguno de los hongos descritos por estos autores.

Desde el punto de vista fitopatógeno cabe señalar que tanto desde el aserrín de uno y veinte años se aisló *Fusarium oxysporum*, especie que según Agrios (1988) y Butin & Peredo (1986), produce pudrición de semillas de *P. radiata* y otras especies de importancia agroforestales; también causa la denominada "caída de plántulas" en viveros y según Donoso (1994), daño a nivel de raíces en plantaciones y bosques de *P. radiata*. Desde el aserrín de un año, se aisló *Cylindrocarpon destructans*, considerado por Agrios (1988), un fitopatógeno que causa enfermedades semejantes a las de *F. oxysporum* en *P. radiata*. La presencia de estos fitopatógenos en el aserrín de *P. radiata* depositado en aserraderos o el bosque, indicarían que este sustrato sería un reservorio, desde el cual pueden diseminarse estos hongos y causar enfermedades en plantaciones o viveros forestales.

Los resultados de la detección cualitativa de las enzimas de las cepas fúngicas, independientemente del taxon ensayado, fueron principalmente las celulasas y las menos detectadas, las lacasas (Tabla 2). En el presente estudio la totalidad de las cepas de *Absidia corymbifera*, *Paecilomyces variotii*, *Penicillium* serie *Decumbens*, *P.* serie *Ramigera*, *Pesotum* sp., y *Phialophora fastigiata*, aisladas desde el control, resultaron amilasa positiva. *P. fastigiata* es citada por Nilsson (1974), como amilolítica, por su parte, *Trichosporon pullulans* resultó amilasa débil a diferencia de lo señalado por Fogarty & Kelly (1990); es posible que esta cepa produjera una baja cantidad de

enzima.

También casi la totalidad de las cepas aisladas desde el aserrín de un año presentaron actividad amilolítica, de ellas 4 taxa son de *Penicillium*, lo que se homologa con los datos obtenidos por Crippa *et al.* (1987), quienes reportaron a este género con marcada tendencia amilolítica. También destacan las taxa de *Trichoderma* (*T. harzianum* y *T. koningii*), que han sido reportadas por Domsch *et al.*, (1980) y Crippa *et al.*, (1987) como amilasa positivos. Por su parte, desde el aserrín depositado por veinte años, en las cepas pertenecientes a 6 taxa se detectó actividad amilolítica, destacando la del género *Penicillium*.

En lo que respecta a la degradación de proteínas, su importancia radica en que son utilizadas por los microorganismos en la primera etapa de colonización de los restos vegetales como una fuente de nitrógeno. En el presente estudio, sólo en las cepas del género *Penicillium* aisladas desde el aserrín control se determinó actividad proteolítica. Desde el de un año, las cepas pertenecientes a 10 taxa resultaron proteasa positivas, *Acremonium butyri* y *Trichoderma koningii*, resultaron proteasa negativos, lo que concuerda con Domsch *et al.* (1980), quienes señalan que cepas de estas especies aisladas desde diversos sustratos orgánicos, incluidos restos de coníferas, no presentan actividad proteolítica. Por otra parte, desde el aserrín de veinte años (Tabla 2), las cepas pertenecientes a 4 taxa resultaron ser proteolíticas, 3 de ellas (*Clonostachys rosea*, *Fusarium oxysporum* y *Mucor hiemalis*) concuerdan con lo descrito por Domsch *et al.*, (1980).

Respecto a la actividad celulolítica, de los taxa aislados desde el control, *Pesotum* sp. y *Trichosporon pullulans* resultaron negativos, comportándose como colonizadores primarios del aserrín de *P. radiata*, aspecto que concuerda con lo propuesto por González (1980) y Hudson (1968). Por el contrario, en el aserrín de uno y veinte años, la totalidad de las cepas fueron celulolíticas. De acuerdo a Crippa *et al.*, (1987); Esterbauer *et al.*, (1991) y Goyal *et al.* (1991), entre los taxa celulolíticos se encuentran *Aspergillus*; *Fusarium*; *Penicillium*; *Rhizopus* y *Trichoderma*. Si se analizan los resultados obtenidos en el presente estudio (Tablas 1 y 2), puede apreciarse que algunas especies de los géneros antes citados se aislaron con frecuencia en las muestras de aserrín de uno y veinte años.

A pesar que muchas especies de hongos mitospóricos son celulolíticas, se consideraba que carecían de enzimas para hidrolizar la celulosa lignificada. Sin embargo, un número creciente de estos hongos se reportan como capaces de causar la llamada pudrición blanda. Los hongos de pudrición blanda degradan celulosa y/o hemicelulosa, pero serían inactivos frente a la lignina. Durante mucho tiempo se les consideró de poca importancia,

Tabla 2. Determinación enzimática cualitativa de cepas fúngicas aisladas desde aserrín de *Pinus radiata* control y depositados en el Aserradero Vista Alegre de Valdivia.

TAXA	Aserrín control				Aserrín 1 año				Aserrín 20 años			
	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
<i>Absidia corymbifera</i>	+	+	-	-								
<i>Acremonium butyri</i>					+	+	+	-				
<i>Aspergillus</i> subgénero Fumigati					d	+	-	+				
<i>Aureobasidium pullulans</i> var. <i>melanigenum</i>					+	+	-	+	+	+	-	d
<i>Clonostachys rosea</i>					-	+	-	+	-	+	-	+
<i>Cylindrocarpon destructans</i>					+	+	-	+				
<i>Fusarium oxysporum</i>					-	+	d	+	-	+	+	+
<i>Mucor hiemalis</i>									-	+	-	+
<i>Paecilomyces farinosus</i>									d	+	-	-
<i>Paecilomyces variotii</i>	+	+	-	-					+	+	-	-
<i>Penicillium claviforme</i>					-	+	-	+				
<i>Penicillium</i> serie Brevicompactum	-	+	-	+	+	+	-	-	+	+	-	+
<i>Penicillium</i> serie Citrinum					+	+	-	-				
<i>Penicillium</i> serie Decumbens	+	+	-	+								
<i>Penicillium</i> serie Frequentans									+	+	-	-
<i>Penicillium</i> serie Raistrickii					+	+	-	-				
<i>Penicillium</i> serie Ramigena	+	+	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-
<i>Pesotum</i> sp.	+	-	-	-							-	-
<i>Phialophora fastigiata</i>	+	+	-	d								
<i>Rhinocladiella atrovirens</i>					-	+	d	-				
<i>Rhizopus stolonifer</i>					-	+	-	-				
<i>Scytalidium lignicola</i>					+	+	-	+				
<i>Sporotrichum</i> sp.					+	+	+	+				
<i>Trichoderma harzianum</i>					+	+	+	-	+	+	+	-
<i>Trichoderma koningii</i>					+	+	-	-				
<i>Trichoderma longibrachiatum</i>					+	+	-	-				
<i>Trichosporon pullulans</i>	d	-	-	-								
Basidiomycetes (micelios)	-	+	-	-	-	+	+	+				
Micelio estéril					-	+	-	+				
Total reacciones positivas	6	7	0	2	12	20	4	10	6	10	2	4

1= amilasa, 2 = celulasa, 3 = lacasa, 4 = proteasa. + = reacción positiva. - = reacción negativa. d = reacción débil.

pues su acción era enmascarada por los hongos de pudrición blanca y parda. De acuerdo a Fogarty & Kelly (1990), entre los hongos estudiados, se consideran pudridores blandos: *Aureobasidium pullulans*, *Clonostachys rosea*, *Paecilomyces variotii*, *Phialophora fastigiata* y *Trichoderma koningii*.

La lignina es después de la celulosa el material orgánico más abundante en los vegetales. Según Eriksson *et al.* (1990), es difícil de degradar por sus diferentes tipos de enlaces entre los anillos aromáticos y su estructura globular. En los vegetales la lignina actúa como sustancia de relleno o cementante, otorgando a la madera resistencia a la degradación microbiana. De acuerdo a Sutherland *et al.* (1983), constituye una barrera que debe hidrolizarse antes

que la mayor parte de la celulosa sea accesible a las enzimas. Los mecanismos bioquímicos de la degradación de la lignina no han sido aún plenamente dilucidados. Eriksson *et al.*, (1990) y Gómez (1995), indican que su biodegradación se realiza principalmente por procesos oxidativos y se ha encontrado que la habilidad lignolítica de los hongos está asociada con la capacidad de producir lacasas y fenoloxidasas extracelulares.

En el presente estudio, entre las cepas con actividad lacasa, cabe destacar los micelios de *Basidiomycetes*. Estos por sus características microscópicas podrían corresponder a *Aphylophorales*, hongos que presentan una alta capacidad para degradar lignina y/o celulosa, y que constituyen básicamente la microbiota terciaria que colo-

niza los restos vegetales muertos. Causan una pudrición blanca o parda y sus correspondientes cepas miceliales se aíslan mayoritariamente de sustratos lignocelulósicos en avanzado estado de degradación. González (1980) y Hudson (1968), señalan que este tipo de micota, debería imperar en los restos vegetales depositados en el suelo por períodos prolongados de tiempo. Valenzuela *et al.* (1992), aislaron mayoritariamente micelios de Basidiomicetes a partir del octavo mes desde madera rolliza de *P. radiata* depositada en un bosque durante un año.

También se ha señalado que algunas especies de hongos mitospóricos causantes de pudrición blanda, son capaces de degradar la lignina. Estos hongos la modifican más lentamente que los hongos de pudrición blanca. De acuerdo a Kerm, citado por Eriksson *et al.* (1990), *T. harzianum* degrada lignina aunque no significativamente, Iwahara, citado por Sutherland *et al.* (1983), indican que *F.*

oxysporum degrada fracciones de bajo peso molecular de lignina sintética y puede degradar lignocelulosa parcialmente.

De los resultados expuestos se concluye que el aserrín depositado por un año en condiciones naturales presentó una micota más diversa y no existen marcadas diferencias en la actividad lignocelulolítica entre los taxa aislados del aserrín de *P. radiata* depositado por uno y veinte años en condiciones naturales.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen el financiamiento de este trabajo a la Universidad Austral de Chile (proyecto DID S-98-28 y S-20013).

REFERENCIAS

- Aguilar, A. & Osorio, M. (1986). Descripción e identificación de organismos manchadores asociados a la madera aserrada de pino insigne (*Pinus radiata*). Informe de convenio 97. Serie Técnica. Facultad de Ciencias Forestales Universidad Austral de Chile
- Agrios, G. (1988). Fitopatología. Editorial Limusa S. A, Mexico
- Arx, A. von (1981). The genera of fungi sporulating in pure culture. Verlag von J. Cramer, Germany
- Butin, H. & Peredo, H. (1986). Hongos parásitos en coníferas de América del sur con especial referencia a Chile. J. Cramer, Berlin
- Cole, G. & Kendrick, B. (1973). Taxonomic studies of *Phialophora*. Mycologia 65: 661-688
- Crippa, A; Bruno, E; Mangiarotii, A. & Caretta, G. (1987). Extracellular enzymatic activities of 32 fungal species. Boletín Micológico 3: 129-134
- De Hoog, G. & Hermanides-Nijhof, E. (1977). The black yeast and allied Hyphomycetes. Centraalbureau voor schimmelcultures. Baarn. Studies in Mycology 15.
- Domsch, K; Gams, W. & Traute-Heidi, A. (1980). Compendium of soil fungi. Academic Press Ltda, London.
- Donoso, C. (1994). Ecología Forestal del bosque y su medio ambiente. Editorial Universitaria.
- Esterbauer, H; Steiner, W; Labudova, I; Herman, A. & Hayn, M. (1991). Production of *Trichoderma* cellulase in laboratory and pilot scale. Bioresource Technology 36:51-65
- Eriksson, K; Blanchette, R. & Ander, P. (1990). Biodegradation of lignin. En: Microbial and enzymatic degradation of wood components, pp. 255-333. Springer Verlag, New York.
- Fundación Chile (1995). Pellets de aserrín combustible del futuro. Chile Forestal 234: 52-53
- Fogarty, W. & Kelly, M. (1990). Microbial enzymes and biotechnology. Elsevier Applied Science, London and New York.
- Gomez, A. (1995). Evaluación de la biodegradación de la lignina en *Pinus radiata* D. Don por la acción de hongos de pudrición blanca y su efecto en el pulpage kraft. Tesis de magister en Ciencias Forestales. Facultad de Ciencias Forestales Universidad de Chile.
- Gonzalez, A. (1980). Los pudridores de la madera denominada "huempe" o palo podrido de los bosques del sur de Chile y su etiología. Tesis Facultad de Ciencias, Universidad Austral de Chile.
- Goyal, A; Ghosh, B. & Eveleigh, E. (1991). Characteristics of fungal cellulases. Biosource Technology 36: 37-50
- Hudson, H. (1968). Ecology of fungi on plant remains above the soil. New Phytologist 67: 837-874
- Instituto Forestal Filial Corfo (1996). Estadísticas Forestales 1995. Boletín estadístico 45:27
- Kurtzman, P. & Fell, J. (1998). The yeasts, a taxonomic study. Vol. 1 y 2 Ed. Elsevier.
- Lohmeyer, T; Christian, J. & Gruber, O. (1993). *Clitocybe puberula* Kuyper, *Lentinaria albobinacea* Pilant and other fungi from sawdust deposits near Burghausen upper Bavaria. Zeitschrift fur Mykologie 59:193-214
- Macc Faddin, E. (1976). Biochemical test for identification of medical bacteria. The Williams & Wilkins Company, Baltimore.
- Nelson, P; Toussoun, T. & Marasas, W. (1983). *Fusarium* species: An illustrated manual for identification. Pennsylvania state University Press.
- Nilsson, T. (1974). The degradation of cellulose and the production of cellulase, xylanase, mannanase and amylase by wood-attacking

microfungi. *Studia Forestalia Suecica* 114:1-61

Ortiz, L. (1995). Aprovechamiento energético de la biomasa forestal. *Chile Forestal* 232: 24-25

Peredo, M.; Peredo, H.; Zarate, M.; Alonso, O.; Inzunza, L. & Torres, M. (1984). Estudio preliminar del estado sanitario de la materia prima madera y análisis de su influencia en el pulpaje kraft. Informe de convenio. Serie Técnica. Facultad de Ciencias Forestales Universidad Austral de Chile.

Peredo, M. & Peredo, H. (1987). Identificación de microorganismos en madera de *Pinus radiata* D. Don almacenada durante períodos prolongados estación de corte n°2. Informe de convenio. Serie Técnica. Facultad de Ciencias Forestales Universidad Austral de Chile.

Pochon, J. & Tardieux, P. (1965). Técnicas de análisis en microbiología de suelo. Editorial Técnica e Investigación, Burgos España.

Quiroz, I. (1989). Control biológico in vitro de hongos biodeterioradores de madera de *Pinus radiata*. Tesis Escuela Ingeniería Forestal, Facultad de Ciencias Forestales Universidad Austral de Chile.

Ramirez, C. (1982). Manual and atlas of the *Penicillia*. Elsevier Biomedical Press. Amsterdam.

Raper, K. & Fennell, D. (1965). The genus *Aspergillus*. The Williams & Wilkins Company Baltimore U.S.A.

Rifai, M. (1969). A revision of the genus *Trichoderma*. Commonwealth Mycological Institute Kew, Surrey Englannd. Mycological papers N°116

Saelzer, D. (1993). Evaluación in vitro e in situ de preservantes antimanchas alternativos al pentaclorofenato de sodio. Tesis Escuela Ingeniería Fores-

tal, Facultad de Ciencias Forestales Universidad Austral de Chile.

Samson, R. (1974). *Paecilomyces* and some Hyphomycetes. Centraalbureau voor schimmelcultures. Baarn. Studies in Mycology N°6

Stalpers, J. (1978). Identification of wood-inhabiting Aphyllophorales in pure culture. Centraalbureau voor schimmelcultures. Baarn. Studies in Mycology N°16

Stalpers, J. (1984). A revision of the genus *Sporotrichum*. Centraalbureau voor schimmelcultures Baarn. Studies in Mycology N°24

Sutherland, J.; Pometto, A. & Crawford, D. (1983). Lignocelulose degradation by *Fusarium* species. *Canadian Journal of Botany* 61:1194-1198

Teixeira, M.; Santos, L.; Frota, M.; Carvalho, K.; Dos Santos, K.; Da Silva, M. & Duran, N. (1993). Thermophilic and thermotolerant fungi induced by sawdust mixtures at the amazoniam region. Third Brazilian Symposium on the chemistry of lignins and other wood components.

Upadhyay, H. (1981). A monograph of *Ceratocystis* and *Ceratocystiopsis*. The University of Georgia Press.

Valenzuela, E.; Peredo, H.; Vives, I. & Gonzalez, A. (1992). Influence of the chemical changes produced by fungi in *Pinus radiata* wood in the forest with the object of pulp production. Fifth International Conference on Biotechnology in the pulp and paper industry. Kyoto, Japan, pp. 68-70

Zycha, H.; Siepmann, R. & Linnemann, G. (1969). *Mucorales*. Verlag Von J. Cramer, Germany.