

PUDRICIÓN BLANDA DE LAS MADERAS DE PINO CARIBE Y MELINA EN CAJAS CON SUELOS NO ESTÉRILES DEL BOSQUE NUBLADO Y SUS AGENTES CAUSALES

Sari Mohali¹, Osvaldo Encinas² y Feraida Castro³

RESUMEN

Estudios de laboratorio para conocer los mecanismos de degradación de la madera de Pino caribe y Melina por acción de microorganismos presentes en suelos de un bosque nublado cercano a la ciudad de Mérida, Venezuela, contenidos en cajas de plástico y mantenidos permanentemente humedecidos. Después de seis semanas, las probetas de ambas maderas se sintieron blandas al tacto y, en los cortes para observaciones microscópicas de luz y electrónico de barrido, se confirmó la presencia de cavidades en la pared secundaria de las fibras, pequeñas en etapas incipientes de deterioro y más grandes en etapas más avanzadas, características del ataque de pudrición blanda tipo I, cavidades. En la madera de Melina además se verificó la presencia de erosión de las paredes del lumen de las fibras, característica de pudrición blanda tipo II, pero no se observó deterioro de los elementos vasculares. Aislamientos realizados en las maderas degradadas, permitieron identificar a *Doratomyces stemonitis* y *Fusarium sp.*, hongos imperfectos, como causantes de la pudrición blanda en las maderas estudiadas en los suelos del bosque nublado cercano a Mérida.

Palabras clave: microbiología de maderas; pudrición blanda; cavidades; erosión; Pino caribe; Melina; *Doratomyces stemonitis*; *Fusarium sp.*

¹ Ing. For, MSc. Profesor Facultad de Ciencias Forestales y Ambientales, ULA, Mérida, Venezuela, Grupo de Investigación en Conservación de Maderas, GICOM.

² Ing. For, MSc, PhD. Profesor Facultad de Ciencias Forestales y Ambientales, ULA, Mérida, Venezuela. Grupo de Investigación en Conservación de Maderas, GICOM.

³ Ing. Ind For, MSc. Profesora Universidad Experimental de Guayana, Upatá, Venezuela

SOFT ROT DEGRADATION OF CARIBBEAN PINE AND MELINA WOODS, IN BOXES CONTAINING UNSTERILE SOILS FROM CLOUDY FOREST AND THEIR CAUSAL AGENTS

ABSTRACT

Using plastic boxes containing soils from a cloudy forest near to Mérida city, Venezuela, soft rot attack was observed in Caribbean pine and Melina woods. After six weeks incubation, the secondary wall of pine fibers showed small holes like cavities (Soft rot attack Type I, cavity) smaller in the beginning of the attack and larger in later steps of the attack; Melina wood showed also erosion in the lumen of cells (Soft rot Type II, erosion). No attack was observed in Melina vessels. Later isolations had demonstrated that the imperfect fungi *Doratomyces stemonitis* and *Fusarium* sp. cause this soft rot attack in both woods.

Keywords: wood microbiology; soft rot type I and II; Caribbean pine wood; Melina wood; *Doratomyces stemonitis*; *Fusarium* sp.

INTRODUCCIÓN

La madera, al igual que todos los materiales lignocelulósicos, es susceptible a su degradación por diversos agentes destructores; el proceso de deterioro biológico se inicia generalmente en las células del parénquima radial o longitudinal de la madera, que contienen la mayor cantidad de reservas alimenticias sin aparente degradación de la pared celular lignificada, aunque recientes investigaciones señalan la posibilidad de que aún en estas etapas iniciales se aprecia cierto grado de deterioro en la pared (Encinas, 1996). En etapas avanzadas del deterioro, ocurre degradación de las paredes lignificadas y finalmente descomposición completa de la madera. La biodegradación es causada por hongos, bacterias e insectos, que poseen los sistemas adecuados para utilizar alguno o todos los componentes de la madera como fuente de alimento.

Los hongos destructores de la madera han sido agrupados tradicionalmente según el tipo y características de pudrición que producen, pero se considera este sistema de clasificación no muy preciso (Blanchette et al., 1990). Los hongos de pudrición blanda aparecen cuando no se ha iniciado el desarrollo de los hongos de pudrición marrón y blanca, usualmente hongos Basidiomicetes, y en situaciones donde existe alto contenido de humedad en el suelo, baja aireación, altas temperaturas, altas concentraciones de nitrógeno, o la presencia de algún componente químico en la madera que favorece su desarrollo (Eaton y Hale, 1993); estos hongos de pudrición blanda son generalmente Ascomicetes y Deuteromicetes. Así, los hongos de pudrición blanda ocasionan daños en la madera en servicio en situaciones donde el contenido de humedad es alto durante ciertos períodos del año, como en los suelos de los Altos Llanos Occidentales (Encinas, 2000), y se considera que su presencia debe ser común en otros tipos de suelos sometidos a condiciones similares de humedad. Con el propósito de ampliar el conocimiento acerca de los hongos de pudrición blanda, se presentan los resultados obtenidos utilizando un novedoso método que simula las condiciones de campo, pero en laboratorio, utilizando para el efecto, cajas de plástico conteniendo suelos no estériles, donde se asegura la presencia de microorganismos propios de cada sitio de donde provienen, manteniendo los suelos humedecidos y en un ambiente con temperatura favorable. Mediante observaciones periódicas de pequeñas estacas de madera, se detecta la acción de microorganismos destructores de la madera presentes en ese tipo de suelo; la forma en que se presenta el deterioro en la pared celular permite diferenciar el tipo de pudrición presente y junto con

aislamientos e identificación de los microorganismos, se puede conocer cuales son los microorganismos que deterioran la madera y sus mecanismos de acción.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se utilizó el método de suelos no estériles en cajas de plástico, según norma europea (ENV-807, 1995). Simples cajas de plástico de 50 cm x 40 cm x 25 cm de profundidad fueron llenadas con suelo del bosque nublado cercano a la ciudad de Mérida, situado a 1.750 msnm, y colocados en un cuarto acondicionado a 27 °C de temperatura y 75 % de humedad relativa constantes; las cajas se mantuvieron permanentemente humedecidas mediante riego periódico con agua corriente y fueron cubiertas con plástico grueso para evitar la presencia de otros microorganismos ajenos a este creado microcosmos terrestre.

En las cajas se colocaron probetas de madera de Pino caribe (*Pinus caribaea* Mor. var. *hondurensis* Barrett & Golfari) proveniente de las plantaciones del Estado Monagas, y de Melina (*Gmelina arborea* Roxb.) proveniente de las plantaciones de la Reserva Forestal de Ticoporo, Estado Barinas. Las probetas utilizadas fueron de 5 mm x 10 mm en sección transversal y 25 cm de largo, las que se enterraron hasta la mitad de su longitud en los suelos de las cajas. Periódicamente, durante ocho semanas, las probetas se examinaron para verificar si mantenían su consistencia original, hasta que, blandas al tacto, se advertía la presencia de degradación por acción de hongos de pudrición blanda. Las probetas afectadas se retiraron de las cajas y se limpiaron cuidadosamente con una brocha pequeña y de las probetas aún húmedas se prepararon los cortes longitudinales y transversales para ser observadas en el microscopio de luz y al microscopio electrónico de barrido.

Para las observaciones al microscopio de luz, los cortes finos se hicieron con hojillas de afeitar, se colorearon con azul de anilina al 0,5 % en ácido láctico y safranina al 0,1 % en glicerol y fueron observadas con un microscopio de luz normal dotado también con luz polarizada. Las muestras para el microscopio electrónico de barrido se prepararon a partir de pequeños bloques de madera (aproximadamente 5 mm en todas las dimensiones) que fueron inmersos en glutaraldehído al 5 % en buffer de cacodilato de sodio 0,1 M y pH 6,3, para fijación de los tejidos, con postfijación en tetraóxido de osmio al 1 % en el

mismo buffer (Dykstra, 1992). Después de siete días de fijación, las muestras se deshidrataron en una serie ascendente de etanol (20, 50, 70, 80, 90 y 100 %), etanol-acetona (1:1) y finalmente acetona; luego, las muestras se secaron al vacío durante 48 horas a 30°C se recubrieron con plata antes de su observación en un microscopio electrónico de barrido Hitachi S-2500.

De las probetas atacadas, se efectuaron aislamientos y reaislamientos de los microorganismos, para lo que se removieron pequeñas astillas en forma aséptica, que fueron colocadas en solución cloro – alcohol durante tres minutos y luego se lavaron con agua destiladas tres veces. Estos fragmentos se colocaron en cápsulas de Petri que contenían malta agar al 2 %. Finalmente se procedió a la identificación de los microorganismos presentes. Para confirmar que los microorganismos aislados fueron los agentes causales de la pudrición blanda, se realizaron ensayos de inoculación de probetas de madera sana de pino y melina con los dos principales microorganismos aislados y, para efectos comparativos de su capacidad degradante, adicionalmente se prepararon otras probetas que fueron inoculadas con *Gloeophyllum trabeum*, hongo de pudrición marrón, y *Trametes versicolor*, hongo de pudrición blanca.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En todas las probetas de madera de Pino caribe y Melina, se apreció un ablandamiento del tejido detectable por simple presión de los dedos. En la madera de Pino caribe este ablandamiento se apreció a partir de las seis semanas y en los cortes transversales vistos al microscopio se observó que el tejido parenquimático radial fue parcialmente destruido por el hongo. En la pared secundaria (S2) se observaron perforaciones o cavidades, tanto en madera temprana como en madera tardía, cavidades características de la degradación de la madera por hongos de pudrición blanda del tipo I (Corbett, 1965), inicialmente en forma aislada y muy pequeñas en etapas iniciales del ataque, que se hacen más grandes a medida que continúa el ataque (Figura 1 a), siguiendo la dirección concéntrica de las microfibrillas de la pared celular hasta que finalmente llega a degradar toda la pared secundaria, dejando remanente sólo la lámina media que, en etapas avanzadas, también es degradada totalmente.

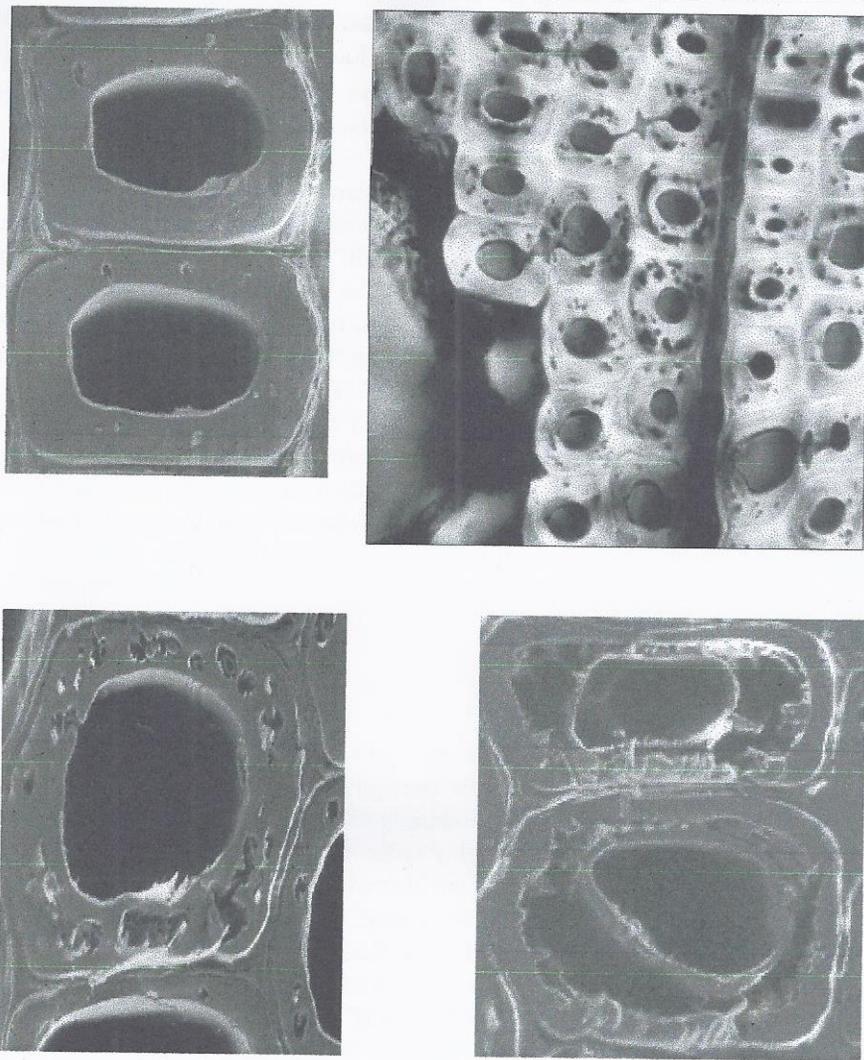


Figura 1. Corte transversal de madera tardía de pino caribe atacada por pudrición blanda. a) Se diferencian los diferentes grados de ataque, tal como se observan con el microscopio de luz, Barra 20 μm ; donde se observan las cavidades características de la degradación de la madera por hongos de pudrición blanda del tipo I: inicialmente las cavidades pequeñas se presentan en la capa S2 de la pared celular, posteriormente las cavidades se hacen mas grandes y degradan toda la pared secundaria, en la secuencia que se ilustra con las microfotografías de la Figura 1 b, c y d, obtenidas con el microscopio electrónico de barrido en probetas diferentes pero de la misma madera.

En las observaciones de los cortes longitudinales, tanto en el sentido radial como tangencial, se apreciaron líneas traslúcidas al microscopio de luz polarizada con una inclinación parecida a la que siguen las microfibrillas de que está compuesta la pared secundaria, señal que la celulosa de la pared secundaria había sido degradada, observable por la pérdida de birrefringencia a la luz polarizada (Nilsson y Daniel, 1989). Con mayores aumentos (100 x) en el corte longitudinal fue posible observar la formación de cavidades con puntas en forma de ángulos, con aspecto de diamante, unidos por micro hifas que siguen la orientación de las microfibrillas de la pared secundaria S2 (Figura 2). Esta forma de degradación es típica de los hongos de pudrición blanda (Eaton y Hale, 1993), donde los extremos de éstas micro hifas, denominadas proboscis, siguen la dirección de las microfibrillas y luego de un corto recorrido el espacio degradado se amplía tomando el aspecto de diamante que vuelve a terminar con la elongación de una nueva fina hifa.

Las observaciones de las muestras en el microscopio electrónico de barrido confirmaron las observaciones hechas con el microscopio de luz; en las etapas iniciales del ataque, las pequeñas cavidades se circunscriben a la capa S2 de la pared secundaria (Figura 1 b), pero en etapas más avanzadas estas cavidades pueden presentarse también en áreas próximas a las capas S1 o S3, que no son atacadas inicialmente (Figura 1, c y d). En las etapas avanzadas, inclusive la lámina media es degradada por acción del hongo.

En la madera de Melina, también se verificó, aunque en menor proporción que en la madera de Pino caribe, la degradación por el hongo de pudrición blanda: primeramente es atacada la madera temprana y posteriormente la madera tardía. No se apreció degradación de los vasos. Además de las cavidades típicas en la pared S2, se observó en el lúmen de las células de la madera tardía, erosión de la pared celular, forma muy característica de degradación de la pared celular conocido como pudrición blanda tipo II (Corbett, 1965); este tipo de erosión es apreciado en cortes longitudinales de la madera, donde la erosión, que también sigue la dirección de las microfibrillas, se observa como finas y traslúcidas líneas entramadas.

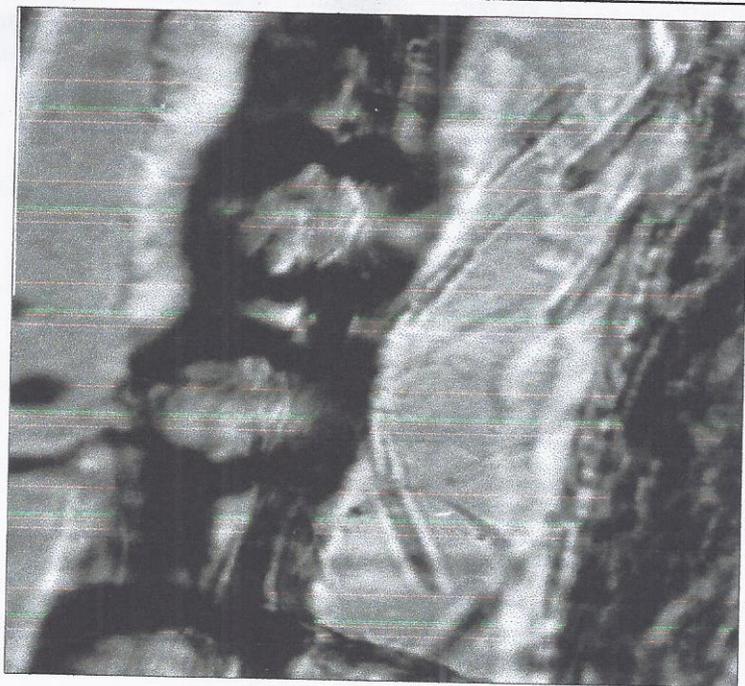


Figura 2. Corte longitudinal radial de la madera de pino caribe visto al microscopio de luz. Se observan cavidades con puntas angulares, con aspecto de diamante, siguiendo la dirección de las microfibrillas de la capa S2. Se aprecian los extremos de las cavidades mostrando proboscis, microhifa que también sigue la dirección de las microfibrillas. Barra 15 μm .

Los hongos de pudrición blanda son capaces de metabolizar la celulosa, principalmente aquella que no está conjugada con la lignina, en particular la del tipo guayacil (Eriksson et al., 1990), lo que explicaría la presencia del hongo solamente en la pared secundaria de las células en etapas iniciales del ataque, sin atacar la lámina media ni el tejido vascular de las maderas de latifoliadas (Rayner y Boddy, 1988). También pueden degradar fácilmente las células epiteliales poco lignificadas de los canales resiníferos de las coníferas (Zabel y Morrel, 1992). Sin embargo, en etapas avanzadas del ataque los hongos de pudrición blanda logran finalmente degradar todos los tipos de tejidos en la madera de coníferas y latifoliadas. Un patrón semejante de degradación de las maderas, ha sido observado en un ensayo de campo en la Reserva Forestal de Ticoporo en estacas de madera de Pino caribe sin tratamiento químico y también en estacas tratadas con triazoles, pero no en madera tratada con sales de cobre (Encinas, 2000), y en madera recolectada en terrenos húmedos del pie de monte andino.

AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE MICROORGANISMOS EN LAS MADERAS ENSAYADAS.

Los aislamientos y reaislamientos efectuados en las maderas con 8 semanas en las cajas conteniendo suelos no estériles, permiten señalar que las maderas ensayadas fueron colonizadas por hongos imperfectos identificados como *Cladosporium* sp., moho celulolítico según Herring y Dickinson (1999), *Penicillium* sp. y *Trichoderma* sp. (mohos), *Fusarium* sp. y *Doratomyces stemonitis* (= *Cephalotrichum stemonitis*), reportados como hongos de pudrición blanda por producir cavidades en las pared celular (Mckarg, 1984). Además de estos hongos imperfectos también se aislaron bacterias, como *Bacillus* sp. y otra Gram negativa que aún no ha sido identificada.

Fusarium sp. y *Doratomyces stemonitis* son los microorganismos que tienen importancia en esta investigación, debido a que han sido clasificados como hongos de pudrición blanda, y por lo tanto son capaces de degradar la madera. Monocultivos de estos hongos sobre maderas de Pino caribe y Melina, sin tratamiento químico alguno, e incubadas durante ocho semanas siguiendo la metodología de Eaton and Hale (1993), produjeron síntomas similares a los observados en las muestras de las cajas con suelos no estériles, confirmando su capacidad degradadora en las maderas ensayadas; se observó que *Doratomyces stemonitis* y *Fusarium* sp. producen pérdidas de peso hasta del 5 % después de

ocho semanas de incubación, tanto en la madera de Pino caribe como en la de Melina (Figura 3), bastante similar a las pérdidas de peso ocasionadas por cultivos de *Gloeophyllum trabeum*, pudrición marrón, aunque menores que las producidas por *Trametes versicolor*, pudrición blanca, en el mismo período.

Algunas especies de *Fusarium* pueden degradar la madera de *Betula pendula* tratada con CCA después de 12 meses en contacto con el suelo y otros hongos imperfectos como *Cladosporium resinae* y *Penicillium* sp., pueden degradar la madera de *Eucalyptus maculata* y *Pinus sylvestris*, también tratadas con CCA (Leightley y Francis, 1980). *Doratomyces stemonitis* y *Penicillium* sp., son hongos imperfectos que han sido reportados degradando las maderas de *Fagus sylvatica* y *Pinus sylvestris* tratadas con propiconazoles (Herring y Dickinson, 1999), resultados que se obtuvieron en condiciones muy similares a las adoptadas en este trabajo. *Doratomyces stemonitis* y *Fusarium* sp., producen pérdida de peso en las probetas de madera y cavidades en la pared secundaria de las fibras, típicas de los hongos de pudrición blanda, por lo que se deben considerar agentes causantes de pudrición blanda en las maderas de Pino y Melina en contacto con suelo no estéril del bosque nublado.

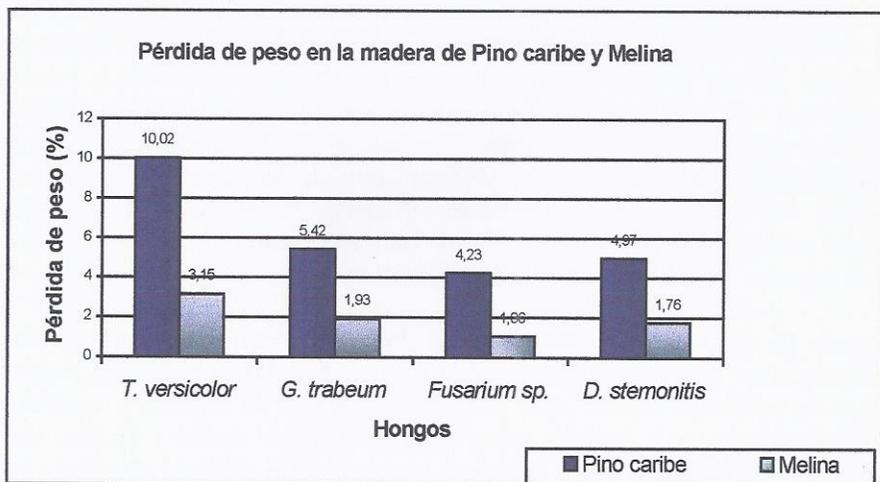


Figura 3. Pérdida de peso en maderas de Pino caribe y Melina, ocasionada por los hongos estándar *T. versicolor* y *G. trabeum* y por los hongos de pudrición blanda *Doratomyces stemonitis*; *Fusarium* sp, identificados en suelos no estériles de un bosque nublado de Mérida.

BIBLIOGRAFIA

1. Blanchette, R., Nilsson, T., Daniel, G. and Abad , A. 1990. Biological degradation of wood. *Archaeological Wood* 6: 141-174.
2. Corbett, N. 1965. Micromorphological studies on the degradation of lignified cell walls by ascomycetes and fungi imperfecti, *J. Inst. Wood Sci.* 14: 18-29.
3. Dykstra, M. J. 1992. *Biological electron Microscopy. Theory, Techniques and troubleshooting.* Plenum Press, New York. 360 pp.
4. Eaton, R. and Hale, M. 1993. *Wood: Decay, pest and protection.* Chapman & Hall, London. 546 p.
5. Encinas, O. 1996. Development and significance of attack by *Lasiodiplodia theobromae* (Oat) Griff. & Maubl. In Caribbean Pine wood. Doctoral thesis. *Acta Universitatis Agriculturae Sueciae. Silvestria* 8. Uppsala, Sweden.
6. Encinas, O. 2000. Biodegradación de maderas venezolanas en ensayos de cementerios de estacas en los Llanos Occidentales. *Acta Científica Venezolana* 51: 39-44.
7. ENV-807. 1995. Wood preservatives. Test for determining the toxic efficacy against soft rotting microfungi and soil-inhabiting microorganisms.
8. Eriksson, K.; Blanchette, R. and Ander, P. 1990. *Microbial and enzymatic degradation of wood and wood components.* Springer-Verlag, Berlin. 407 p.
9. Herring, I. and Dickinson, D. 1999. The use of organic wood preservatives in ground contact and the suitability of laboratory test procedures to determine their efficacy. The International Research Group on Wood Preservation. Rosenheim, Germany. Document IRG/WP/99-20175.

10. Leightley, I. and Francis, D. 1980. Soft rot stake test. Site: 03 Australia, Progress report. The International Research Group on Wood Preservation. North Carolina, USA. Document IRG/WP/1114.
11. Mckarg, P. 1984. Developments in unsterile soil soft rot testing. The International Research Group on Wood Preservation. Stockholm, Sweden. Document IRG/WP/2210.
12. Nilsson, T. and Daniel, G. 1989. Chemistry and microscopy of wood decay by some higher Ascomycetes. *Holzforschung* 43: 11-18.
13. Rayner, A. and Boddy, L. 1988. Fungal decomposition of wood. Its biology and ecology. John Wiley and Sons, London. 587 p.
14. Zabel, R. and Morrell, J. 1992. Wood microbiology and its prevention. Academic Press, San Diego. 476 p.