

COLONIZACION DE ASERRIN DE *Pinus radiata* D. Don POR CEPAS MICELIALES DE AGARICALES EN CONDICIONES DE LABORATORIO

(Colonization of sawdust of *Pinus radiata* D. Don through mycelial strains of
Agaricales under laboratory conditions)

Nancy Andrade S.¹ & Eduardo Valenzuela F.²

¹ Instituto de Producción y Sanidad Vegetal. Facultad de Ciencias Agrarias,
Universidad Austral de Chile. Casilla 567, Valdivia, Chile

² Instituto de Microbiología. Facultad de Ciencias,
Universidad Austral de Chile Casilla 167, Valdivia, Chile.

Palabras clave: Agaricales, aserrín, *Pinus radiata*, colonización.

Key word: Agaricales, sawdust, *Pinus radiata*, colonization.

RESUMEN

El aumento de aserrín de *Pinus radiata* D. Don, generado por la industria forestal chilena, suscita problemas debido a que su descomposición en forma natural es casi nula. Por lo que se determinó la capacidad que presentan 19 cepas miceliales de Agaricales para colonizar el aserrín de *P. radiata* sometido a distintos tratamientos físicos y químicos en condiciones de laboratorio. Los tratamientos que mejor promovieron la colonización del aserrín, fueron la esterilización tres veces en autoclave (121°C, 1 atm) por 20 min. y la adición de extracto de malta al 2%. De las 19 cepas miceliales ensayadas, 8 colonizaron el aserrín tras 21 días de incubación a 23 °C. La cepa UACHMGs-280 obtenida a partir del basidiocarpo de *Gymnopilus spectabilis* (Fr.) Smith y la cepa UACHMPc-99 obtenida a partir del basidiocarpo de *Pleuroflammula croceosanguinea* (Mont.) Sing., presentaron el mejor desarrollo.

INTRODUCCION

El aserrín de *Pinus radiata* que genera la industria forestal chilena, cada vez va en aumento, pues su descomposición natural en Chile es casi nula, lo que genera su acumulación, ocupa espacios físicos utilizables, contamina por arrastre aguas subterráneas e inmoviliza nutrientes útiles para los organismos del suelo. Sarles (1973), Herbert *et al.* (1991) y Arancibia (1993), indican que al añadir aserrín sin tratar al suelo, se debe elevar el contenido de N, de lo contrario se genera competencia entre las plantas y los

SUMMARY

The increase of sawdust from *Pinus radiata* D. Don produced by the Chilean forestal industry arises many troubles since its decomposition under natural conditions is almost impossible. A study was made to determine the capacity of 19 strains of Agaricales mycelia to colonize *P. radiata* sawdust submitted to different physical and chemical processes. The processes, under laboratory conditions, that best promoted the colonization of the sawdust were the sterilization three times in autoclave (121°C, 1 atm) for 20 min. and the addition of 2% malt extract. Of the 19 mycelial strains, 8 colonized the sawdusts after 21 days of incubation at 23 °C. The strain UACHMGs-280 obtained from basidiocarp of *Gymnopilus spectabilis* (Fr.) Smith and strain UACHMPc-99 obtained from basidiocarp of *Pleuroflammula croceosanguinea* (Mont.) Sing. exhibited the best development.

microorganismos por este sustrato. Rayner & Boddy (1988) y Sandler (1993), señalan que el aserrín incluye taninos y compuestos fenólicos dañinos para plantas y microorganismos del suelo. Para subsanar los problemas generados por los residuos forestales y darle un uso rentable, muchos investigadores han centrado su interés en los microorganismos como degradadores de estos residuos y su utilización en la fabricación de papel y depuración de desechos de plantas de celulosa (Beltrance *et al.*, 1984; Rayner & Boddy, 1988; Tanesaka *et al.*, 1993). A nivel nacional, en estudios de biodegradación de sustratos

lignocelulósicos se han empleado hongos **Aphylophorales**. Estos estudios se han centrado básicamente en la degradación de la lignina (Rosselot, 1986; Agosin *et al.*, 1990; Gómez, 1995), en el tratamiento de efluentes derivados de la fabricación de papel y en biopulpaje (Correa, 1991). En lo que respecta a los hongos **Agaricales** la mayoría de los estudios son de orden taxonómico y ecológico, (Singer, 1969; Horak, 1980; Garrido, 1981 y Valenzuela, 1993). Garnica (1995) y Valenzuela *et al.* (1997), han logrado la obtención de varias cepas de **Agaricales** xilotrofos y en ellas han detectado enzimas lignocelulolíticas. El uso potencial de estas cepas como degradadoras de residuos forestales ameritan su estudio.

En vista de lo anterior, se realizó un estudio en condiciones de laboratorio para determinar la capacidad de crecer de algunas cepas miceliales de **Agaricales** en aserrín de *P. radiata* sometido a tratamientos físico-químicos.

MATERIAL Y METODO

I. Tratamientos del aserrín. Aserrín de *P. radiata* de 2 años fue recolectado en el Aserradero Vista Alegre de Valdivia. Las muestras fueron tamizadas (tamaño partículas 3.35 - 1.52 mm), las fracciones obtenidas se mezclaron y luego se homogeneizaron a un 80 % de humedad. A continuación partidas de la muestra obtenida se sometieron por separado a los siguientes tratamientos: **(a)** matraces conteniendo 300 g de la muestra de aserrín se esterilizaron en autoclave tres veces por 20 min (121 °C, 1 at. de presión); **(b)** aserrín mezclado con agua hervida en proporción 1:2 hasta que la mezcla se enfrió; **(c)** aserrín adicionado con NH_4NO_3 al 1 %; **(d)** aserrín adicionado con extracto de malta (EM al 2 %) y **(e)** aserrín mezclado con CH_3COOH en proporción 1:2, la mezcla se mantuvo por 10 días a temperatura ambiente.

II. Masificación de cepas miceliales: Se utilizaron 19 cepas miceliales de **Agaricales**, provenientes del cepario del Instituto de Microbiología. Facultad de Ciencias, Universidad Austral de Chile (Tabla 1). Cada cepa se masificó en forma independiente, para lo cual desde el tubo del cepario respectivo se extrajo un pequeño inóculo y se sembró en placas Petri que contenían agar extracto de malta (AEM al 2%). Una vez sembradas las placas se incubaron a 23 °C por 7 a 21 días.

III. Determinación del crecimiento de las cepas miceliales en aserrín: los aserrines sometidos a los tratamientos físicos y químicos indicados en el punto I, fueron utilizados individualmente para determinar el crecimiento de las cepas miceliales señaladas en el punto II, para ello en cada una de 30 placas Petri de 9 cm de diámetro se depositaron 15 g del aserrín sometido al tratamiento

físico o químico respectivo y a continuación en forma independiente las placas fueron inoculadas con un disco de agar con micelio de 0.8 cm de diám. de la cepa micelial en estudio. Sembradas las placas, se incubaron a 23 °C por dos meses. Semanalmente se midió el diámetro (cm) de las colonias fúngicas desarrolladas.

RESULTADOS Y DISCUSION

En nuestros resultados, se observó crecimiento de algunas de las cepas ensayadas en el aserrín sometido a esterilización tres veces en autoclave (8 cepas), en aserrín adicionado de EM al 2% (8 cepas) y en el adicionado de NH_4NO_3 al 1% (4 cepas). No se detectó crecimiento de las cepas en el aserrín tratado con CH_3COOH y tampoco en el tratado con agua hervida (Tabla 1).

El crecimiento de la cepa UACHMGs-99 en aserrín sometido a esterilización en autoclave y en aserrín adicionado de EM al 2%, desarrolló abundante micelio algodonoso, de color blanco y colonizó el 100% del sustrato a los 14 días de cultivo (Fig. 1).

El aserrín de las coníferas incluido el de *P. radiata* se caracteriza por presentar una gran cantidad de taninos, resinas y lignina, esta última incrementa a medida que la especie vegetal se hace adulta y conlleva a que los residuos, entre ellos el aserrín sean más difíciles de degradar. Valenzuela *et al.* (1992), determinaron que en aserrín de *P. radiata* obtenido desde troncos de 10 años, dejados por un año en el bosque, el porcentaje de lignina extraída se incrementó y los porcentajes de extraíbles hidrosolubles (celulosa y hemicelulosa) disminuyeron, esto reflejaría la escasa participación de microorganismos lignolíticos en la degradación natural del aserrín. Por su parte, Saddler (1993), señala que los taninos y resinas del aserrín actúan como sustancias que absorben las exoenzimas de los microorganismos capaces de hidrolizar y degradar las hemicelulosas, celulosas y lignina impidiendo su acción, por lo tanto, sugiere realizar pretratamientos físicos, químicos o ambos para tener una mejor biodegradación de los sustratos lignocelulósicos, cuando se utilicen microorganismos. En el presente estudio entre los tratamientos a que fue sometido el aserrín de *P. radiata* (Tabla 1), la esterilización en autoclave mostró buenos resultados, en este caso la alta temperatura y presión deberían haber hidrolizado parcialmente algunos de los constituyentes de las resinas, hemicelulosas, celulosa y lignina, permitiendo a continuación una mejor colonización por las cepas ensayadas. Saddler (1993), señala 33 referencias de autores que han empleado altas temperaturas (entre 170 °C y 250 °C) para el pretratamiento de sustratos lignocelulósicos, logrando un incremento en la extracción de hemicelulosa y azúcares simples. Eriksson *et al.* (1990), indican que al someter la

Tabla 1. Determinación del crecimiento de cepas de Agaricales cultivadas en aserrín de *P. radiata* sometido a tratamientos físicos y químicos.

Taxa	Código cepa	Tratamiento				
		A	B	C	D	E
<i>Agrocybe praecox</i>	UACHMAp-480	-	-	-	-	-
<i>Collybia butyracea</i>	UACHMCb-442	+	+	+	-	-
<i>Conchomyces bursaeformis</i>	UACHMCb-310	+	+	+	-	-
<i>Coprinus disseminatus</i>	UACHMcd-403	-	-	-	-	-
<i>Coprinus disseminatus</i>	UACHMcd-443	-	-	-	-	-
<i>Gymnopilus chilensis</i>	UACHMGc-270	+	+	-	-	-
<i>Gymnopilus spectabilis</i>	UACHMGs-98	+	+	+	-	-
<i>Gymnopilus spectabilis</i>	UACHMGs-99	+	+	+	-	-
<i>Hypholoma fasciculare</i>	UACHMHf-100	+	+	-	-	-
<i>Marasmiellus alliodoros</i>	UACHMma-400	-	-	-	-	-
<i>Mycena galericulata</i>	UACHMMg-250	-	-	-	-	-
<i>Mycena patagonica</i>	UACHMmp-354	+	+	-	-	-
<i>Pholiota spumosa</i>	UACHMPs-428	-	-	-	-	-
<i>Pholiota</i> sp.	UACHMP-444	-	-	-	-	-
<i>Pleuroflammula croceosanguinea</i>	UACMPcs-280	+	+	-	-	-
<i>Pluteus nanus</i>	UACHMPn-240	-	-	-	-	-
<i>Tubaria furfuracea</i>	UACHMTf-259	-	-	-	-	-
<i>Tubaria furfuracea</i>	UACHMTf-412	-	-	-	-	-
<i>Tubaria furfuracea</i>	UACHMTf-427	-	-	-	-	-

A = aserrín esterilizado en autoclave. B = aserrín adicionado de EM al 2%. C = aserrín adicionado de NH_4NO_3 al 1%. D = aserrín tratado con CH_3COOH . E = aserrín sometido a ebullición. (+) se observó crecimiento. (-) no se observó crecimiento.

madera o sus componentes a la acción de altas temperaturas se generan condiciones de mayor accesibilidad para que actúen las enzimas de los microorganismos, en especial las que hidrolizan la lignina. El otro tratamiento que registró un resultado aceptable, fue pretratar el aserrín con EM al 2%, en este caso se ha enriquecido al aserrín con un azúcar simple (maltosa), esta, como otros carbohidratos simples de acuerdo a Campbell (1987), Saddler (1993) y Asiegbu *et al.* (1996), actúan como iniciadores, permitiendo un buen crecimiento de los microorganismos y una mejor adaptación al sustrato, así en etapas posteriores cuando se inicie la degradación de los constituyentes del complejo lignocelulósico, los microorganismos que son capaces de hacerlo, se encontrarían en toda su potencialidad.

De las 19 cepas ensayadas como potenciales colonizadoras del aserrín sometido a esterilización en autoclave, solamente 8 crecieron. Las cepas UACHMGs-99, UACHMPc-280 y UACHMCb-310, presentaron el máximo crecimiento, formando colonias de 9 cm de diámetro entre los 14 y 21 días de incubación. Colonias de menor tamaño fueron formadas por las cepas UACHMGs-98 (7.8 cm de diám.), UACHMCb-442 (7.4 cm de diám.) y UACHMHf-100

(7.2 cm de diám.). Al final del ensayo la cepa UACHMmp-354 colonizó en menor grado el aserrín sometido a esterilización, formando colonias de 4.5 cm de diám. (Fig.2). Por su parte, se observó que de las 19 cepas ensayadas como potenciales colonizadoras del aserrín tratado con EM al 2%, 8 crecieron, estas cepas son las mismas que colonizaron el aserrín sometido a esterilización. Las cepas UACHMGs-99, UACHMPc-280 y UACHMCb-310 presentaron el máximo crecimiento, formando colonias de 9 cm de diámetro entre los 14 y 21 días de incubación. Un moderado crecimiento y formación de colonias presentaron las cepas UACHMGs-98 (8.7 cm de diám.), UACHMCb-442 (7.0 cm de diám.) y UACHMHf-100 (6.8 cm de diám.). Al final del ensayo la cepa UACHMGs-270 colonizó en menor grado el aserrín tratado con EM, formando colonias de 4 cm de diám.(Fig.3).

Con respecto a las cepas miceliales de Agaricales empleados en el presente estudio, cabe señalar que Garnica (1995), Valenzuela *et al.* (1997) y Garnica & Valenzuela (1998), detectaron en forma cualitativa, en la mayoría de ellas, enzimas del complejo lignocelulolítico. El crecimiento de las cepas UACHMGs-99, UACHMPc-280 y UACHMCb-310, sobre aserrín sometido a tratamiento físico y químico

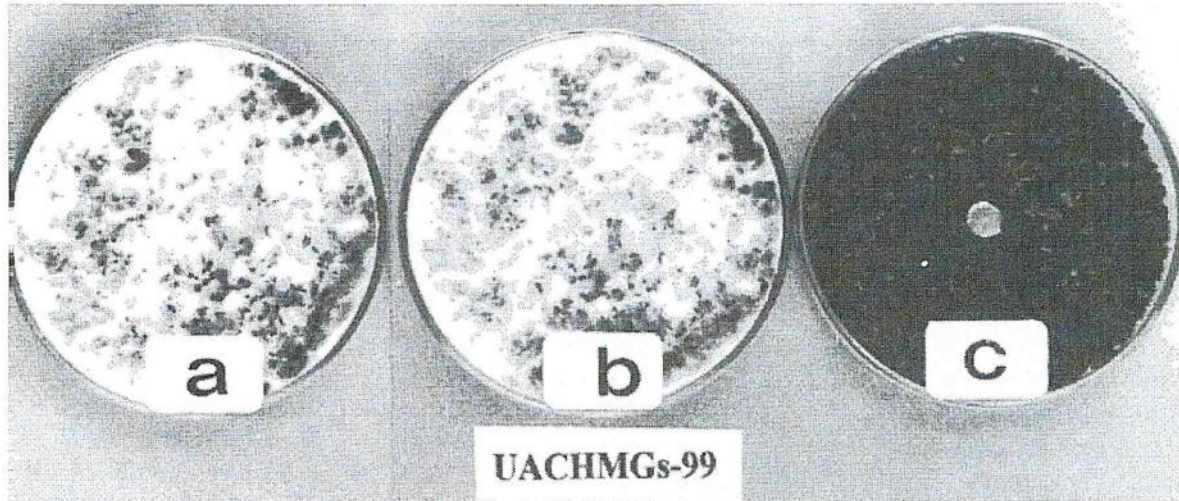


Figura 1. Crecimiento de la cepa UACHMGs-99 en: (a) aserrín sometido a esterilización en autoclave, (b) aserrín adicionado de EM al 2 % y (c) aserrín testigo.

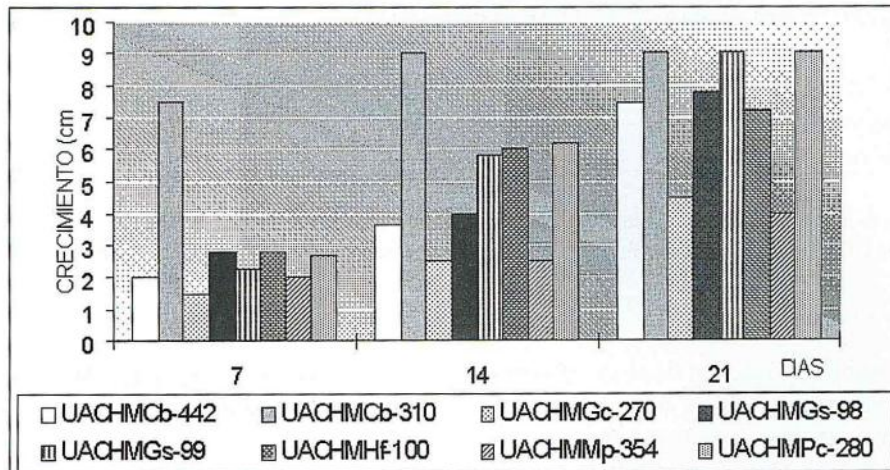


Figura. 2 Crecimiento de cepas miceliales de Agaricales en aserrín sometido a esterilización en autoclave.

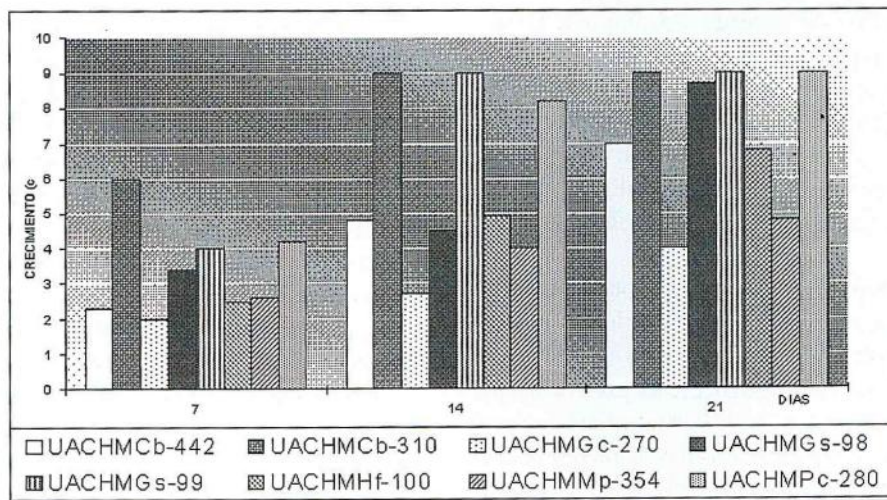


Figura. 3 Crecimiento de cepas miceliales de Agaricales en aserrín tratado con EM al 2%.

(Figura 2 y 3) se puede catalogar de bueno, los antecedentes bibliográficos que avalan los resultados obtenidos son escasos, al respecto se puede citar el trabajo de Lobos (1996), quien tras cultivar varias cepas miceliales de **Agaricales**, entre ellas la cepa UACHMPc-280, en aserrín de *P. radiata*, con y sin extraíbles y sometido a esterilización, determinó que todas las cepas colonizaron en un 95% el aserrín. Además, todas las cepas presentaron actividad para lacasa y peroxidasa y la mayor actividad para ambas enzimas se determinó en la cepa UACHMPc-280. Valdebenito (1997), tras usar aserrín esterilizado de *Nothofagus obliqua* Mirb. (roble) y *Weinmannia trichosperma* Cav. (tineo), con y sin extraíbles e inoculados con varias cepas, entre ellas la UACHMPc-280, determinó que las cepas ensayadas fueron capaces de degradar extraíbles, hidrosolubles y holocelulosa de ambos tipos de aserrín. La cepa UACHMPc-280, fue la mejor en degradar la lignina de ambos tipos de aserrín con y sin extraíbles y colonizó un 80 % de los aserrines tratados tras un mes de incubación a 23° C. Es importante destacar en este punto que a nivel mundial la mayoría de los estudios de biodegradación de desechos lignocelulósicos, incluido el aserrín, se han realizado con hongos pertenecientes a los **Aphylophorales**, especialmente con las especies *Coriolus versicolor* (Fr. ex L.) Qué. y *Phanerochaete chrysosporium*. Al respecto se

pueden citar los trabajos de Blanchette *et al.* (1985); Rosselot (1986); Morohoshi *et al.* (1988); Hayani *et al.* (1991); Orth *et al.* (1993) y Saddler (1993), quienes han detectado varias enzimas involucradas en la hidrólisis de la lignina (lacasas, peroxidasas y magnesio peroxidasa), además de la reducción del constituyente lignina en los desechos y la capacidad de colonizar los sustratos en mayor o menor medida por estos hongos. Otros investigadores como Steiner *et al.* (1989) y Ghareib & Dein (1990), han usado cepas de hongos mitospóricos de los géneros *Aspergillus*, *Trichoderma* y *Paecilomyces*, detectando en ellas una buena actividad lignocelulolítica.

Los resultados obtenidos permiten señalar que, pequeños volúmenes de aserrín de *P. radiata* generado a nivel local podría ser sometido a algún pretratamiento, luego a biodegradación con alguna de las cepas de **Agaricales** y tras la biodegradación el producto obtenido podría usarse para mejorar la estructura de suelos agrícolas o para el cultivo de plántulas.

AGRADECIMIENTOS

A los proyectos DID-UACH S 200013 y DID-UACH F-96-03 por financiar parte del presente estudio.

REFERENCIAS

- Arancibia, A. (1993). Uso de sustratos alternativos como reemplazo de tierra en la producción de plantas ornamentales. Tesis Escuela de Agronomía, Facultad de Agronomía, Universidad Católica de Valparaíso, Quillota.
- Agosin, E.; Blanchette, R.; Silva, H.; Lapierre, C.; Cease, K.; Ibañe, R.; Abad, A. & Muga, P. (1990). Characterization of Palo podrido a natural process of delignification in wood. Applied Environmental Microbiology 56:65 - 74
- Asiegbu, F.; Paterson, A. & Smith, J. (1996). The effects of co-fungal cultures and supplementation with carbohydrate adjuncts on lignin biodegradation and substrate digestibility. World Journal of Microbiology and Biotechnology 12:273-279
- Beltrance, P.; Carniti, P.; Focker, B.; Marzetti, A. & Sarto, V. (1984). Enzymatic hydrolysis of cellulosic materials; a kinetic study. Biotechnol. Bioeng. 26: 1233-1238
- Blanchette, R.; Ojten, L.; Effland, M. & Eslyn, W. (1985). Changes in structural and chemical components of wood delignified by fungi. Wood Science and Technology 19:35-46
- Campbell, R. (1987). Ecología microbiana. Limusa S.A. México.
- Correa, S. (1991). Procesos biológicos para la decoloración de efluente E1 del proceso pulpa Kraft de pino. Tesis Departamento de Ingeniería Química, Facultad de Ingeniería y Administración, Universidad de la Frontera, Temuco.
- Eriksson, K.; Blanchette, R. & Ander, P. (1990). Biodegradation of lignin. In: Microbial enzymatic degradation of wood and wood components. Springer-Verlag. New York. 255-333
- Garrido, N. (1981). Contribución al conocimiento de los Agaricales (Mycota - Basidiomycota) en plantaciones de *Pinus radiata* D. Don en la Octava Región. Tesis Dpto. Botánica, Facultad de Ciencias, Universidad de Concepción.
- Garnica, S. (1995). Caracterización morfológica y bioquímica de micelios obtenidos en cultivo puro de basidiocarpos de Agaricales *sensu lato* lignocelulolíticos. Tesis de Magister, Escuela de Graduados, Facultad de Ciencias, Universidad Austral de Chile, Valdivia.
- Garnica, S. & Valenzuela, E. (1998). Caracterización macro-microscópica de cultivos puros obtenidos a partir de basidiocarpos de Agaricales lignícolas. Bol. Soc. Micológica de Madrid 23: 5-18
- Ghareib, M. & Dein, M. (1990). Growth and enzyme activities of *Aspergillus sydowii* grown on alkali pretreated sawdust as influenced by some culture conditions. Egyptian Journal of Botany. 33:191-200
- Gómez, 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 pulpaje Kraft. Tesis Magister en Ciencias Forestales, Mención Tecnología e Industria de la madera, Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales, Universidad de Chile.

- Hayani, A.; Obeidou, W.; Kiffer, E.; Loubinoux, B. & Botton, B.** (1991). Estimation de la dégradation du bois et de la perte de lignine par mesure photométrique directe lors de l'altération d'échantillons de sciure par le champignon de pourriture blanche *Phanerochaete chrysosporium*. Comptes Rendus de l'Académie d'Agriculture de France. 77:171-177
- Herbert, M.; Karam, A. & Parent, L.** (1991). Mineralization of nitrogen and carbon in soil amended with composted manure. Biological Agricultural and Horticulture. 7:349-361
- Horak, E.** (1980). Flora criptogámica de Tierra del Fuego. Orden Agaricales. Buenos Aires. Argentina 11:1-524
- Lobos, C.** (1996). Determinación de enzimas ligninolíticas en cepas de *Peniophora pini* (Schleich. ex. Fr.) Boidin y *Pleuroflammula croceosanguinea* (Mont.) Sing. Seminario de Titulación, Escuela de Tecnología Médica, Facultad de Medicina, Universidad Austral de Chile, Valdivia.
- Morohoshi, N.; Honda, S. & Haraguchi, T.** (1988). Degradation of lignin by the extracellular enzymes of *Coriolus versicolor*. Bulletin of the Experimental Forests 13:23-29
- Orth, A.; Royse, J.; Tien, M. & Tien, Mi .** (1993). Ubiquity of lignin degrading peroxidases among various wood degrading fungi. Applied and Environmental Microbiology. 59:4017-4023
- Rayner, A. & Boddy, L.** (1988). Fungal decomposition of wood. Its biology and ecology. John Wiley. New York.
- Rosselot, G.** (1986). Degradación biológica de la lignina de paja de trigo (*Triticum aestivum*) y aserrín de álamo (*Populus* sp.) con el hongo de la pudrición blanca *Phanerochaete chrysosporium*. Tesis Escuela de Agronomía, Facultad de Agronomía, Pontificia Universidad Católica de Chile, Santiago.
- Saddler, J.** (1993). Bioconversion of forest and agricultural plant residues. CAB International UK.
- Sarles, R.** (1973). Using and marketing bark residues. Forest Products Journal 23:10-14
- Singer, R.** 1969. Mycoflora Australis. Verlag von Cramer. Lehre
- Steiner, J.; Zaldivar, M. & Contreras, I.** (1989). Utilización de desechos lignocelulósicos en la producción de celulasas por *Trichoderma aureoviride*. Res. Com. Primer Congreso Nacional de Biotecnología. Conicyt. Universidad de Talca. R-21. A 7
- Tanesaka, E.; Masuda, H. & Kinugawa, K.** (1993). Wood degrading ability of Basidiomycetes that are wood of composers, litter decomposers or mycorrhizal symbiots. Mycologia. 85: 347-354
- Valdebenito, M.** (1997). Determinación de la capacidad degradativa de cepas miceliales obtenidas de *Pleuroflammula croceosanguinea* (Mont.) Sing. y *Descolea antarctica* Sing., sobre aserrín de *Nothofagus obliqua* (roble) y *Weinmanni trichosperma* (tineo). Tesis de Licenciatura, Escuela de Ciencias, Facultad de Ciencias, Universidad Austral de Chile. Valdivia.
- Valenzuela, E.; Peredo, H.; Vives, I. & González, A.** (1992). Influence of the chemical changes produced by fungi in *Pinus radiata* D. Don wood in the forest with the object of pulp production. 5^o ICBPPI. Kyoto. Japon.
- Valenzuela, E.** (1993). Estudio sistemático, corológico y ecológico de los Agaricales *sensu lato* de los bosques autóctonos de la Región de los Lagos en Chile, Tesis Doctoral. Dpto. de Biología Vegetal, Facultad de Ciencias, Sección Biológica, Universidad de Alcalá de Henares. Madrid.
- Valenzuela, E.; Ramírez, C. & Garnica, S.** (1997). Macro-microscopic and qualitative enzymatic characterization of mycelial strains from basidiocarps of species of *Mycena* (Agaricales). Revista Chilena de Historia Natural 70:521