

# 1. INTRODUCCION

Las biotecnologías, definidas por Ericksson (1990) como la explotación técnica (uso) de procesos biológicos, han sido desarrolladas desde tiempos remotos por variadas culturas en todo el planeta, pero a partir de la segunda mitad del siglo XX, han sufrido un fuerte incremento en lo relativo a su investigación y aplicación en múltiples campos como salud, industria y agricultura, entre otros. Una de estas biotecnologías es la conocida como biopulpaje, que se podría explicar brevemente como una técnica que utiliza organismos vivos (generalmente hongos), o los productos o sustancias que estos son capaces de sintetizar (enzimas), para la producción de pulpa, celulosa y papel.

Dentro de los productos forestales de exportación que Chile produce, se destaca claramente la celulosa. Este producto estrella del medio exportador, se fabrica en el país a partir de ***Pinus radiata D. Don*** (pino insigne o pino) y ***Eucalyptus globulus Labill*** (eucalipto) mediante el proceso Kraft principalmente. Además de este método de pulpaje, existen otros procesos de obtención de pasta como el pulpaje mecánico, el químico y al sulfito entre otros. No obstante el número de procesos que existen, Gómez (1995) menciona que la técnica Kraft se encuentra masificada a nivel mundial y estima que continuará siendo el método más importante de producción en los próximos años. De hecho el 81% de la pulpa química es derivada del proceso Kraft (González y Garay, 1998).

En la obtención de la pulpa, una actividad clave es la deslignificación de la materia prima. Esta tarea se logra a través de una combinación de presión, temperatura y reactivos químicos, sobre la madera, que varían según el método de pulpaje utilizado. En la mayoría de los procesos de pulpaje ocupados en la actualidad, la combinación de estas variables requiere de un alto consumo de reactivos y energía. Por otra parte, se suman a estos costos otros inconvenientes, como las descargas de efluentes contaminantes que son producto de los procesos de pulpaje y blanqueo, que aparte de causar un daño en sí al entorno natural y a la vida silvestre, disminuyen las posibilidades de venta del producto al extranjero.

En muchos lugares del mundo, la conciencia pública respecto al daño al medioambiente está teniendo un fuerte impacto en la industria de celulosa y papel. Por ejemplo, limitaciones de los volúmenes de contaminantes (aéreos, líquidos y sólidos) de las empresas, determina una restricción en el uso de cloro y dióxido de cloro para el blanqueo (Akhtar *et al.*, 1997a). Más aún, sumado a las presiones sociales y legales nacionales; las nuevas restricciones que están imponiendo los mercados mundiales, presentes en los tratados de libre comercio suscritos recientemente, han impulsado la búsqueda de procesos más limpios.

Bajo estos conceptos, el biopulpaje, biotecnología mediante la cual se ha descubierto y utilizado, parte de las bondades de los hongos de pudrición blanca (HPB), ha adquirido interés internacional. Estos hongos, que eran considerados una fuente de problemas y costos para el desarrollo de cualquier actividad forestal maderera, se muestran, en el presente, promisorios para los objetivos antes señalados. En sus procesos de degradación, estos organismos afectan en diversos grados a la lignina presente en la madera, dejando a su paso el característico color blanquecino en ella, siendo esta cualidad la que se está tratando de aprovechar. La virtud de esta tecnología, se encuentra en la capacidad de establecer reacciones específicas, ahorrar energía, entregar procesos más inocuos al medioambiente y en constituir una solución cuando la química tradicional es objetable (Eriksson, 1990). Además, el pretratamiento fungoso es un proceso natural; por lo tanto, no se advierten consecuencias negativas para el entorno (Akhtar *et al.*, 1998b).

En adición, a los efectos que estos hongos tienen sobre la pulpa, se encuentran cambios en las características de los papeles producidos; la mayoría positivos, algunos negativos y otros indiferentes, dependiendo de diversos factores que actúan generalmente en múltiples combinaciones. En el biopulpaje, como en cualquier proceso industrial que utiliza microorganismos, existe la posibilidad de aumentar la efectividad y la eficiencia del proceso con disminución de los costos involucrados, al optimizar las variables adecuadas (Akhtar *et al.*, 1996). Por lo antes expuesto, es necesario desarrollar los conocimientos sobre este tipo de hongos y evaluar tanto cuali como cuantitativamente los compuestos lignocelulósicos que han sido afectados en la madera sustrato, como la combinación de factores ambientales considerados, para obtener los mejores resultados posibles (variables respuesta).

La presente memoria está enfocada a realizar determinaciones de ciertos factores ecológicos que modifican el crecimiento y desarrollo de dos hongos de pudrición blanca: ***Lentinus edodes*** y ***Stereum hirsutum***, para hacer una contribución original de la capacidad lignívora utilizable en los procesos de pulpaje, bajo las variables estudiadas. Ambas especies, pertenecen al grupo de los ***Basidiomycetes*** y en particular a los denominados hongos lignívoros (destructores de madera). Además se trata de especies saprófitas y de alto valor nutritivo (***L. edodes***) y en el caso de ***S. hirsutum***, de un hongo cosmopolita de amplia distribución en Chile, por lo cual se evitan las complicaciones a menudo graves, implícitas en la introducción de entes ajenos al entorno.

Teniendo presente los propósitos de esta memoria, se establecen los siguientes objetivos.

### **Objetivo general**

Analizar el efecto de algunos factores ambientales sobre el crecimiento de dos hongos de pudrición blanca (***Lentinus edodes*** y ***Stereum hirsutum***) sobre dos especies forestales (***Pinus radiata*** y ***Eucalyptus globulus***).

### **Objetivos específicos**

- ✘ Establecer los óptimos de pH y temperatura del ambiente para obtener el mayor crecimiento de ambas especies de hongos por separado.
- ✘ Realizar determinaciones de pérdida de peso en las dos especies madereras, para albura y duramen, en forma separada después de ser atacadas por los hongos en cuestión, en los óptimos de pH y temperatura logrados en el objetivo anterior y bajo distintas condiciones de tiempo y humedad.
- ✘ Realizar determinaciones químicas de contenido de lignina, de los tratamientos que obtuvieron mayor y menor pérdida de peso, para las cuatro combinaciones de las especies leñosas bajo la acción de cada uno de los hongos determinados en el objetivo anterior.

## **2. REVISION BIBLIOGRAFICA**

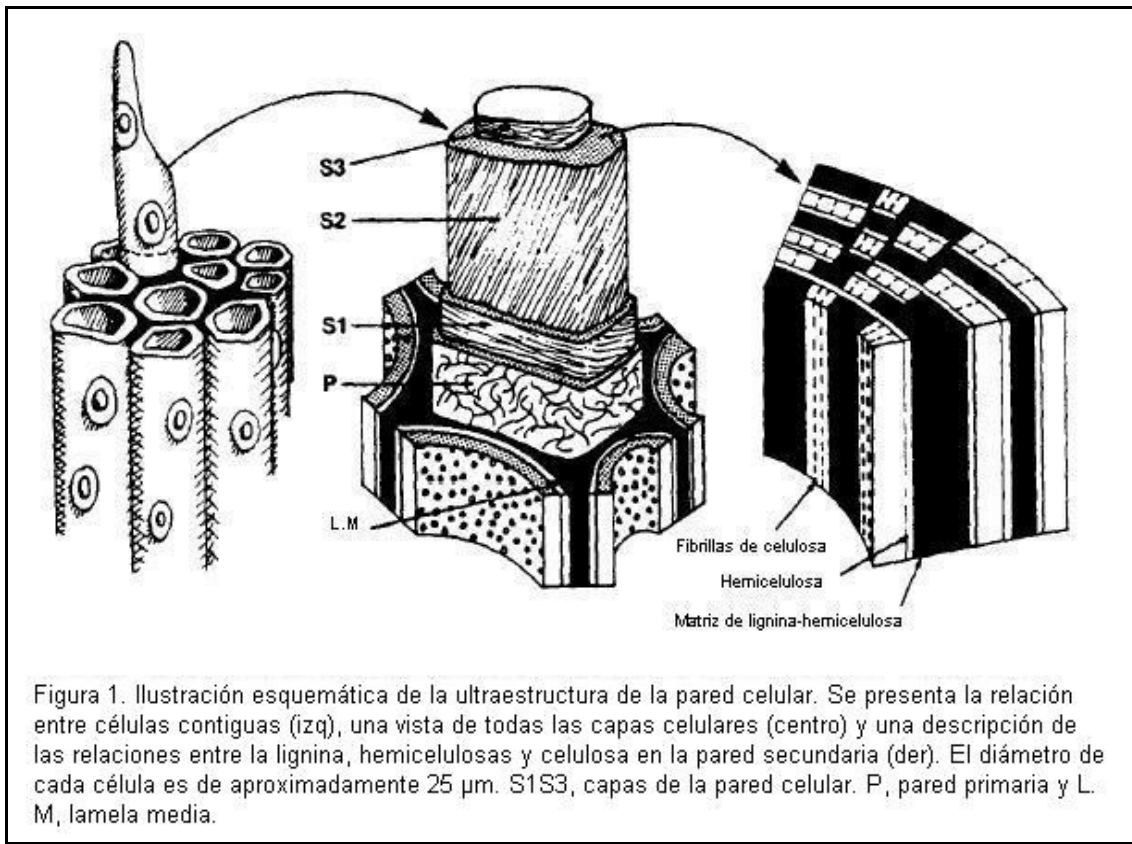
### **2.1 La madera**

#### **2.1.1 La estructura de la madera**

La madera está compuesta por células mayoritariamente elongadas. Están, preferentemente orientadas en posición axial. Se comunican entre sí a través de aberturas llamadas puntuaciones o punteaduras. Estas células, varían en su forma de acuerdo a sus funciones, proveen de resistencia mecánica al árbol y también desarrollan tanto el transporte de líquidos como el almacenamiento de reservas alimenticias (Sjöström, 1993). Su formación no es constante durante el año; las células de la madera de primavera son de paredes delgadas y de lumen amplio. A su vez las células formadas en verano son generalmente más largas y delgadas que las de primavera, pero sus paredes son mas anchas (Gullichsen, 2000).

La madera está conformada principalmente por células con forma ahusada. Las gruesas paredes celulares están compuestas por tres polímeros estructurales (celulosa, hemicelulosa y lignina) y tiene células contiguas unidas entre sí por lignina y pectinas (lamela media) (Kirk y Cullen, 1998). La pared de una célula leñosa adulta se compone de varias capas distintas que difieren unas de otras tanto en su estructura como en su composición química. Una representación común de la organización de la estructura de la pared celular y su ultraestructura, se puede observar en la figura 1.

Figura 1: Esquema de la estructura de la madera. Fuente: Kirk y Cullen, 1998.



### 2.1.1.1 Estructura de la pared celular y polímeros constituyentes

La pared celular está compuesta por capas de microfibrillas: en la pared primaria, las fibrillas se encuentran orientadas al azar dentro de una matriz consistente de xiloglucanos y sustancias pécticas en la superficie de la célula (Kirk y Cullen, 1998). La razón del desorden de esta capa es que, al ser la primera en formarse, permite la expansión de la célula (Fengel y Wegener, 1984). Sjöström (1993) observó que esta pared tiene un espesor de 0,1-0,2  $\mu\text{m}$ . y una composición química de celulosa, hemicelulosas, pectina y proteínas embebidas en una matriz de lignina.

Hacia adentro están las capas de la pared secundaria (el grueso del peso de la madera), en las cuales las microfibrillas de celulosa están organizadas en forma paralela unas de otras en capas. Dentro de la capa (subestructura de organización de las microfibrillas), las microfibrillas forman un espiral en un ángulo con el eje longitudinal de la célula. Tres regiones son identificadas dentro de la pared secundaria: S1, S2 y S3; dentro de ellas las

microfibrillas, paralelas entre sí, tienen diferentes orientaciones con respecto al eje de la célula (Kirk y Cullen, 1998)

En la S1, las fibrillas tienen una pendiente helicoidal que varía entre 50 – 70° con respecto al eje de la célula y su espesor es de 0,2-0,3 µm (Sjöström, 1993).

La mayor parte de la pared es la capa S2, en la cual las microfibrillas están en un ángulo agudo con respecto al eje de la célula; el ángulo disminuye de la madera joven hacia la madera adulta, y prácticamente las fibrillas están paralelas al eje celular (Kirk y Cullen, op cit.). Su espesor varía entre 1 y 5 µm dependiendo si forman parte de madera de primavera o verano respectivamente y se conforma por un número de lamelas variable (30-150) (Sjöström, op cit.).

Las fibrillas de celulosa cercanas al lumen de la célula comprenden la tercera capa (S3) y están orientadas casi en forma perpendicular al eje longitudinal de la célula (Kirk y Cullen, op cit.). Es una delgada capa de 0,1 µm aproximadamente y es muy variable dependiendo de la especie (Sjöström, op cit.). Se presenta en células parenquimáticas (Fengel y Wegener, 1984).

La última capa fibrilar que rodea el lumen es la capa cerosa. Tiene una alta concentración de sustancias no estructurales y le brinda al lumen una apariencia más o menos suave (Fengel y Wegener, op cit.). Se presenta en todas las coníferas y en algunas latifoliadas. Cada especie tiene una capa cerosa característica (Sjöström, op cit.).

Entre las células existe una fina capa llamada lamela media, que une las células entre sí. En principio no contiene celulosa (Fengel y Wegener, op cit.). Tiene un espesor de 0,2-1 µm excepto en las esquinas. En estadios tempranos de crecimiento se compone principalmente de sustancias pécticas, para después tornarse altamente lignificada (Sjöström, op cit.). Otros autores diferencian una lamela media compuesta, que es una zona de la lamela media que se encuentra en estrecha asociación con hemicelulosas, formando una “zona de transición” entre la lamela media y la pared primaria.

### **2.1.1.2 Madera de coníferas**

También se las conoce como gimnospermas debido a que su semilla se encuentra desnuda o no protegida por el ovario de una flor.

En ellas se observa claramente los crecimientos estacionales en forma de anillos; la madera de primavera es más clara que la de verano. Se componen principalmente de traqueidas y de parénquima, aunque también existen células radiales fusiformes, radios celulares y canales resiníferos. Se comunican por puntuaciones areoladas (Gullichsen, 2000).

En coníferas existen fibras de 3 a 7 mm. de longitud y el diámetro difícilmente alcanza a 0,1 mm. (González y Garay, 1998). Estudios recientes en *Sequoia sempervirens*, creciendo en Chile, constatan longitudes aún superiores<sup>1</sup>.

### **2.1.1.3 Madera de latifoliadas**

Las angiospermas tienen por su parte, la semilla protegida dentro de un ovario. Anatómicamente se dice que su madera es porosa debido a la presencia de vasos. Su composición es más variada que la de coníferas. El principal componente sigue siendo la fibra leñosa, pero es mucho más corta que la traqueida de conífera. También contienen elementos de vasos que varían enormemente entre especies. Los finales de estas células son abiertos pero a través de un tejido conectivo llamado placa de perforación. (Gullichsen, op cit.).

Las fibras de las especies latifoliadas corresponden a cerca de un tercio en longitud y la mitad del diámetro de las fibras de coníferas (González y Garay, op cit.).

## **2.1.2 Composición química de la madera**

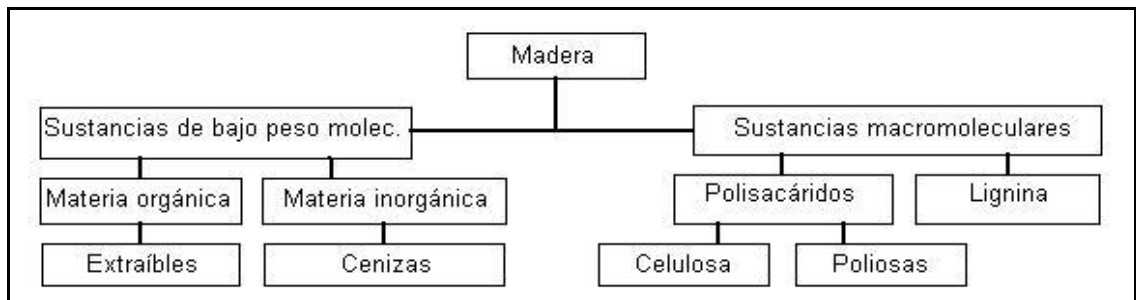
---

<sup>1</sup> Juan Donoso, Ing. Forestal, Universidad de Chile. Ph.D. Universidad de Paris. Comunicación personal.

Anselmo Payen en 1838, fue la primera persona en reconocer la composición natural de la madera (Adler, 1977). Encontró un tratamiento para la madera con ácido nítrico con el que removía parte de la sustancia leñosa dejando a su paso un material fibroso al que llamó celulosa. También notó que el contenido de carbón en la madera era distinto al del material removido. A esta fracción rica en carbón que envolvía a la celulosa en la madera la llamó “la materia incrustante”; mas tarde el concepto de lignina fue acuñado por F. Schulze en 1865. Sjöström (1993) menciona que en 1819 De Candolle ya había introducido el concepto de lignina derivado de la palabra latina *lignum* usada antiguamente para referirse a la madera.

Fengel y Wegener (1984), realizan una separación de los componentes químicos de la pared celular (figura 2). Es así como describen por un lado a los principales componentes macromoleculares de la pared (celulosa, poliosas o hemicelulosas y lignina) y por otro a los componentes de bajo peso molecular (materia orgánica o extraíbles y sustancias minerales o cenizas). Esto obedece a que el primer grupo se presenta en todas las maderas y el segundo está más relacionado a maderas particulares y cuenta con variaciones cuali y cuantitativas. En todo caso, las proporciones y la composición química de la lignina y las poliosas difieren entre coníferas y latifoliadas, mientras que la celulosa es un componente uniforme en todas las maderas. Dentro de los componentes lignocelulósicos, la glucosa y la xilosa son los azúcares más importantes (Cullen y Kersten, 1996).

**Figura 2: Esquema general de los componentes químicos de la madera. Fuente: Fengel y Wegener (1984).**



### **2.1.2.1 Celulosa**



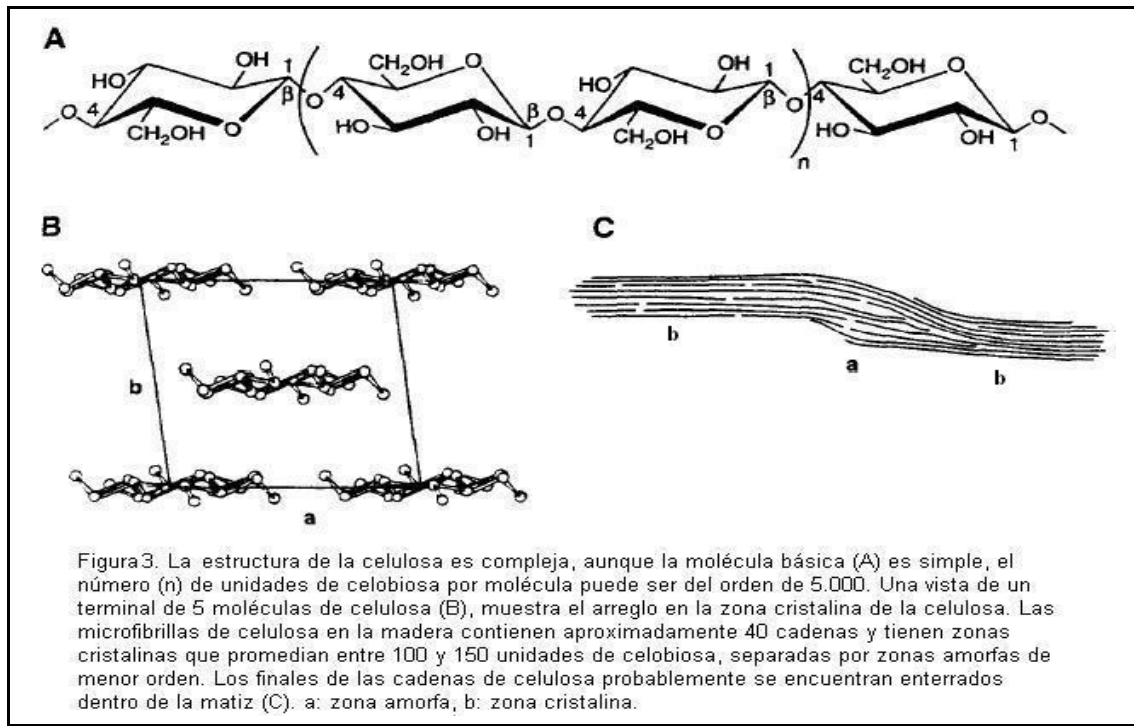
La celulosa es la sustancia natural mas importante producida por los organismos vivos. Se puede estimar que su masa en la biosfera alcanza las  $26,5 \times 10^{10}$  toneladas (Fengel y Wegener, 1984). A su vez es el principal componente de la madera, comprende entre 40-45% de la materia seca de plantas leñosas y se ubica predominantemente en la pared secundaria (Sjöström, 1993).

Su función es ser el principal componente estructural de la pared celular y por extensión del vegetal.

Es un polímero lineal de unidades de anhidrocelobiosa unidas entre si por uniones  $\beta$ -1.4-glicosídicas (Kirk y Cullen, 1998). Una molécula de celulosa cristalina (altamente ordenada) comprende cerca de 10.000 unidades de glucosa (Sjöström, *op cit.*). Fuerzas de Van der Waals y puentes de hidrógeno que interactúan entre y dentro de las moléculas de celulosa, hacen a la estructura natural de la celulosa compleja; las moléculas individuales de celulosa se agrupan en haces conocidos como microfibrillas, las cuales contienen aproximadamente 40 moléculas individuales de celulosa. Dentro de estos manojos la celulosa esta ordenada y por eso aparece cristalina en mediciones de difracción de luz, pero debido a que las fibrillas tienen un largo rango de curvatura en su estado natural y están sujetas a torsiones, en mediciones de difracción se observan zonas de carácter amorfo. Normalmente las celulosas comerciales tienen un grado de cristalinidad cercano al 48% (González y Garay, 1998). Las microfibrillas están arregladas en capas en los planos de la pared celular (Kirk y Cullen, *op cit.*). Grupos de microfibrillas conforman fibrillas y por último fibras de celulosa (Sjöström, *op cit.*).

La figura 3 muestra el esquema de la celulosa y de su arreglo espacial en distintos niveles de organización.

Figura 3: Esquema de la celulosa, y microfibrillas de la madera. Fuente: Kirk y Cullen, 1998.



### 2.1.2.2 Hemicelulosas o poliosas

En un principio se creyó que eran un producto intermedio en la biosíntesis de celulosa. Sin embargo, hoy las hemicelulosas pertenecen a un grupo de polisacáridos heterogéneos que se forman a través de rutas biosintéticas distintas a la de la celulosa. Al igual que la celulosa, la mayoría de las hemicelulosas cumplen la función de soporte en la pared celular (Sjöström, 1993).

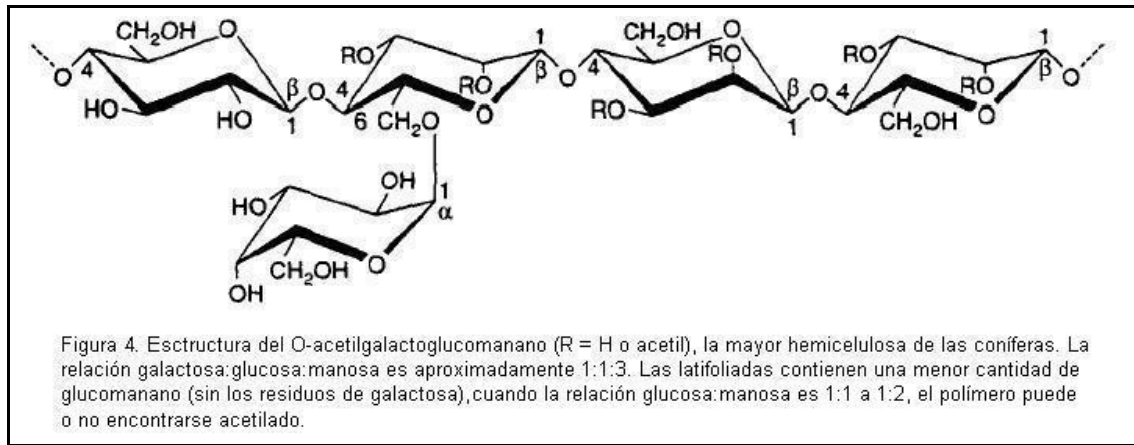
Las hemicelulosas conforman entre el 22% y el 26% del peso de la madera<sup>2</sup>. Como la celulosa, su columna es un polímero lineal de monosacáridos con uniones  $\beta$ -1,4, pero las moléculas de hemicelulosa son mucho más cortas que las de celulosa (del orden de 150 a 200 residuos de azúcar). También, al igual que la celulosa, tienen una estereo-regularidad (figura 4). Sin embargo, difieren de la celulosa en que tiene grupos radicales de azúcares, ácidos de azúcares y acetil ésteres. Esos grupos limitan a las hemicelulosas en no cristalinas o sólo pobremente cristalinas, así es que ellas existen más como un gel que como fibras orientadas (Kirk y Cullen, 1998). Las unidades de azúcar que posee, permiten

<sup>2</sup> Javier González, Ing. Forestal, Universidad de Chile. Comunicación personal.

su descomposición en grupos como pentosas, hexosas, ácidos hexurónicos y deoxyhexosas. La cadena principal de una poliosa puede consistir sólo de una misma unidad (homopolímero) o de dos o más unidades diferentes (heteropolímero). En general se las clasifica según su componente principal en xilanos, mananos y galactanos (Fengel y Wegener, 1984).

Existen diferencias entre las hemicelulosas componentes de coníferas y latifoliadas. Las principales son galactoglucomananos, arabinoglucouronxilanos y arabinogalactanos para las primeras, y glucouronoxilanos y glucomananos para las decíduas (Sjöström, 1993). Como ejemplo, la mayor hemicelulosa en madera de angiospermas (latifoliadas), entre 15% y 30% del peso, es O-acetilglucuronoxilano, y en madera de coníferas la mayor hemicelulosa es la O-acetilgalactoglucomanano, que comprende cerca del 20% del peso de la madera (Kirk y Cullen, 1998).

**Figura 4: Ejemplo de la estructura de las hemicelulosas. Fuente: Kirk y Cullen, 1998.**



Por otra parte, las coníferas contienen menos poliosas que las latifoliadas (Fengel y Wegener, *op cit.*).

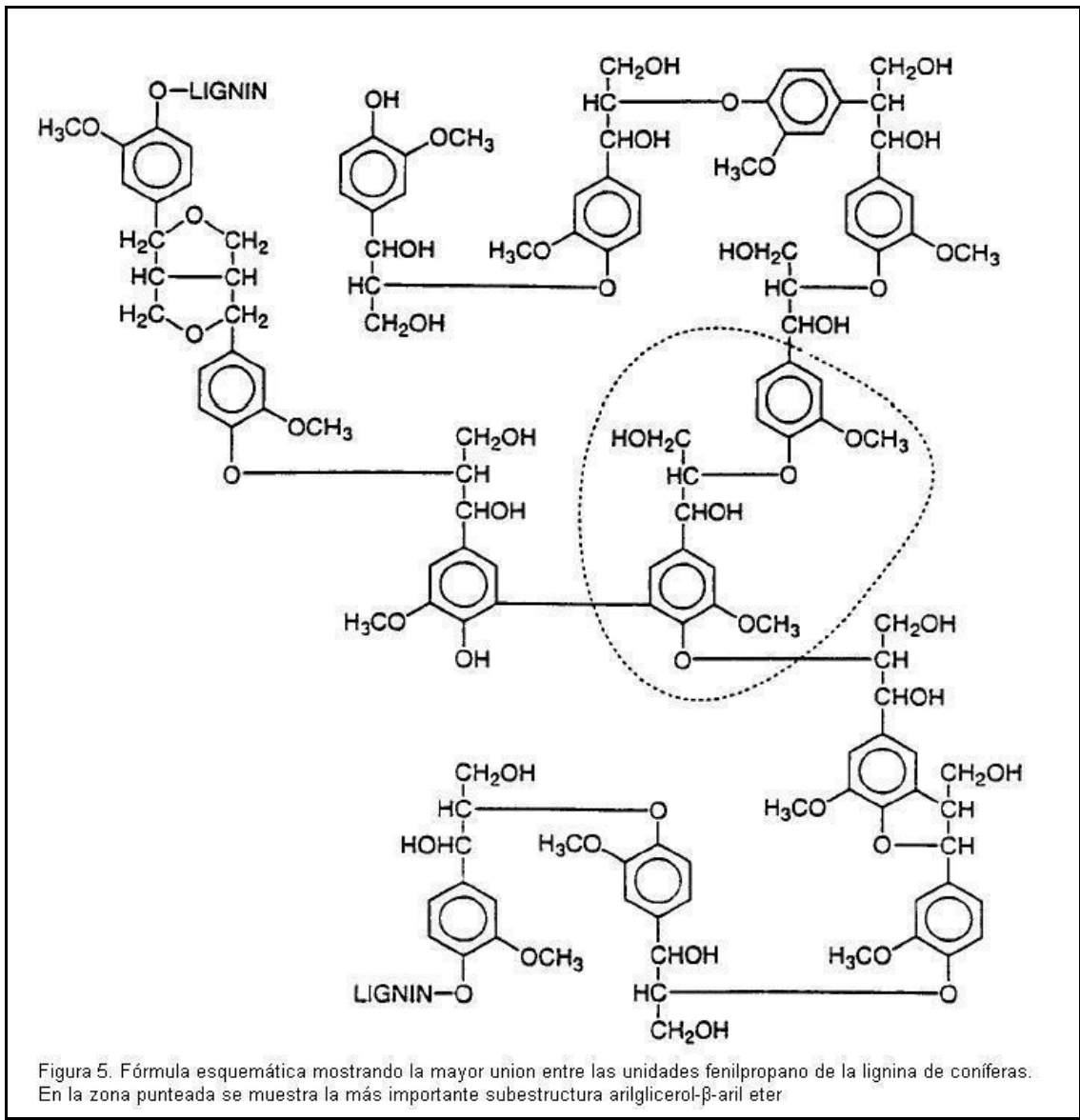
### **2.1.2.3 Lignina**

La lignina es el compuesto aromático más abundante en la tierra y comprende cerca del 15% de toda la biomasa terrestre (Cullen y Kersten, 1996; Fengel y Wegener, 1984; Hammel, 1996). Normalmente los contenidos de lignina varían entre 20 y 40% del peso seco en las plantas leñosas. Aparte de esta variación porcentual, su ubicación tampoco es uniforme en la pared celular y en las diferentes partes del árbol (Fengel y Wegener, op cit.). Higuchi (1990) señala que la lignina se distribuye generalmente con las hemicelulosas en los espacios intercelulares de las microfibrillas en las paredes primaria y secundaria y en la lamela media como componente cementante entre las células y como endurecedor de las paredes celulares del tejido xilemático. Adler (1977) menciona que para un caso de picea negra observó concentraciones de 22,5%, 49,7% y 84,8% (peso/peso) para la pared secundaria, lamela media compuesta y las esquinas de las células respectivamente. Pero hace notar que aunque la pared secundaria es la zona de menor concentración de lignina, es la que en total acumula el 72,1% de toda la lignina al ocupar el 87,4% del volumen del tejido de traqueidas. También existen otras variaciones como las diferencias entre las maderas de verano y primavera o entre madera de compresión o tracción y la madera normal. La composición química de la lignina en estas distintas locaciones generalmente varía. Wardrop (1957) citado por Donaldson (1991), establece que la lignina se deposita primero en las esquinas de la pared primaria, para subsecuentemente repartirse dentro de las esquinas de la lamela media, lamela media compuesta tangencial, lamela media compuesta radial, y por último en la pared secundaria.

Además de la función cementante y endurecedora de la lignina, Srebo et al. (1997) mencionan que este polímero es también una barrera contra el ataque microbiano a la celulosa y hemicelulosa en los tejidos leñosos.

La lignina es una estructura completamente diferente de la celulosa y de la hemicelulosa. Es un polímero ramificado de unidades de fenilpropano unidas entre si por uniones C-C y C-O-C (figura 5). La mayor unión, la subestructura arilglicerol- $\beta$ -aril eter, comprende cerca de la mitad del total de uniones entre unidades (Kirk y Cullen, 1998).

Figura 5: Esquema teórico de la lignina. Fuente: Kirk y Cullen, 1998.



Este compuesto se forma en las paredes celulares de las plantas vasculares mediante una unión oxidativa de varios precursores relacionados de fenilpropano: alcohol coniferil, alcohol sinapil, y alcohol p-hidroxycinamil. Peroxidasas o lacasas en la pared celular de la planta oxidan estos monómeros en un electrón, produciendo radicales fenoxi transitorios y estables a la resonancia que luego se polimerizan en una variedad de configuraciones. Los posibles caminos por los que los precursores puedan unirse, pueden ser retratados de forma simple al dibujar formas convencionales resonantes de radicales fenoxi, para luego unir a los más importantes en diferentes combinaciones de parejas (Hammel, 1997).

En general las ligninas se denominan de dos formas: las guaiacil que derivan del alcohol coniferil, y las guaiacil-siringil que derivan del alcohol coniferil mezclado con cantidades variables de alcohol sinapil (Adler, 1977). La mayoría de las ligninas en coníferas son del tipo guaiacil mientras que las latifoliadas tienen mayor proporción de ligninas tipo guaiacil-siringil (Fengel y Wegener, 1984).

La lignina se asocia en forma covalente con las hemicelulosas en la pared celular por medio de numerosos tipos de uniones. Entre las más importantes están las uniones de éter entre el carbón bencílico de la lignina y la mitad carbohidratada, las uniones éster entre carbón bencílico de la lignina y los residuos de ácidos urónicos, y las uniones lignina-glicosídicas. Esta matriz de lignina y hemicelulosa incrusta y protege a la celulosa de la pared celular vegetal (Jeffries, 1990 citado por Hammel, 1997).

Como se mencionó anteriormente, existen variaciones en los contenidos y tipo de lignina dentro de un mismo individuo. Para el caso de *P. radiata*, Donaldson (1991) investigó su cambio estacional. Al respecto mencionó que aunque el patrón de lignificación permanece constante y que el mayor número de células lignificadas varía alcanzando su máximo en verano. La lamela media está completamente lignificada antes de que comience la lignificación de la pared secundaria. La fase de lignificación es la última etapa en ser completada al final de la estación de crecimiento, en el proceso de diferenciación de una célula. Es así como la madera tardía está sólo parcialmente lignificada al comienzo del invierno.

#### **2.1.2.4 Compuestos de bajo peso molecular**

Su distribución y composición es variable en las distintas estructuras morfológicas del árbol. No participan en las funciones mecánicas y estructurales como los compuestos antes mencionados, pero su presencia es fundamental para llevar adelante los diversos procesos metabólicos que dan vida a un árbol como entregar energía, proteger de ataques de insectos y hongos o formar parte de enzimas. Su naturaleza es diversa y como forma de simplificación para clasificarlos, se los divide en materia orgánica y materia inorgánica (Sjöström, 1993).

Los primeros son también conocidos como extraíbles y entre ellos se pueden mencionar los compuestos aromáticos (fenólicos) como los taninos y flavonoides, los terpenos, los ácidos alifáticos y los alcoholes. La materia inorgánica o ceniza, se compone principalmente por iones metálicos tales como potasio, calcio y magnesio (Fengel y Wegener, 1984). Como masa alcanzan generalmente tan solo el 1% del peso seco del árbol (Sjöström, 1993), pero en algunas especies puede ser muy superior (ej: entre 1,41% y 3,05% en tamarugo) (Donoso *et al.*, 1989). Son importantes en la clasificación taxonómica de las especies y también juegan un rol importante en procesos industriales como el pulpage. Existen otros compuestos en la madera que pertenecen a estos grupos, pero en tan bajas concentraciones que no es relevante mencionarlos.

### **2.1.3 Pinus radiata D. Don.**

El *P. radiata*, también conocido como pino insigne o pino de Monterrey, se planta extensamente en el hemisferio sur, principalmente en Chile, Nueva Zelanda, Australia y Africa del Sur. Los árboles de plantaciones forestales pueden alcanzar alturas de entre 26 y 30 m. a los 20 años (Miller, 1999).

El duramen de los árboles de plantaciones es café claro a café rosáceo mientras que la albura es de colores crema pálidos. Los anillos de crecimiento son generalmente anchos y distinguibles. Son comunes los anillos falsos. La textura de la madera es moderadamente lisa y fina, y el grano no es entrelazado. La madera de plantaciones de pino tiene una densidad entre 320 y 480 kg/m<sup>3</sup> a 12% de contenido de humedad. Se compara su resistencia a *Pinus ponderosa*, pero la ubicación y la tasa de crecimiento pueden causar variaciones considerables en sus propiedades. La madera se seca rápidamente con una pequeña degradación. Las sierras trabajan fácilmente aunque el grano se tiende a rasgar alrededor de los nudos. La madera se clava y pega fácilmente, acepta bien la pintura y tiene una buena terminación. La albura es propensa al ataque de hongos de mancha y vulnerable a insectos taladradores. Sin embargo, el stock de las plantaciones es generalmente albura que puede recibir fácilmente tratamiento de preservantes. El duramen se lo considera como durable sobre el suelo y es moderadamente resistente al tratamiento con preservantes (Miller, *op cit.*).

En relación a sus propiedades físicas, la estabilidad y homogeneidad del pino radiata se incrementan con la edad de los árboles. La contracción volumétrica por efecto del secado es de aproximadamente un 11% para la madera adulta (Serra y Garay, s.a.).

La densidad de la madera, crece continuamente con el aumento de anillos y en forma pronunciada los primeros 20 años, para después tener un aumento más suave (Sepúlveda y Melo, 1996). Además, se observa que también existe un aumento del peso específico desde el centro hacia la periferia (Paz y Melo, 1964; Alert, 2002), variación que alcanzó un 16,5% en la investigación de Alert (*op cit.*) y hasta un 33% en un estudio de Ortiz (1964).

Los productos más importantes producidos a partir de esta especie son celulosa, papel, madera aserrada, rollizos pulpables y aserrables, astillas, tableros de fibras y partículas, revestimientos, laminados, cerchas, muebles, componentes y dentro de otros productos finales (Serra y Garay, *op cit.*).

#### **2.1.4 Eucalyptus globulus Labill.**

Pertenece a la familia de las Mirtáceas, subgénero ***Sympbyomyrtus***. Es originario de Australia y algunas islas cercanas y crece principalmente en la isla de Tasmania y en la costa sureste de Victoria. Se ha plantado extensivamente fuera de Australia debido a su rápido crecimiento (40 m<sup>3</sup>/ha/año y más), fuste recto, capacidad de rebrote vigoroso y a las buenas características de su madera. Está establecido en plantaciones principalmente en España, Portugal, Estados Unidos, India, Sudáfrica, oeste de Australia y Chile.

Puede alcanzar un gran tamaño a edad adulta 45 a 55 m, tiene un tronco derecho y macizo y una copa abierta con hojas alternas, pecioladas, a menudo curvadas y muy aromáticas. La corteza se caracteriza por su desprendimiento en largas tiras. La madera, en tanto, es de color pardo amarillento claro, de textura abierta, con anillos de crecimiento evidentes, grano entrelazado y relativamente durable. (Lyon, s.a.).

Es de alta densidad y al igual que en el pino, estudios en Argentina demuestran que la densidad de la madera aumenta desde la médula hacia el exterior. Igartúa et al. (2001) encontraron un aumento de un 24% en la densidad básica al considerar este sentido de



muestreo. Obtuvieron valores extremos de 487 kg/m<sup>3</sup> para la médula a la altura del DAP y de 637 kg/m<sup>3</sup> al 60% de la altura comercial.

Presenta problemas de aserrío debido fundamentalmente a que desarrolla tensiones internas, que se traducen en colapso y rajaduras.

Los productos que se obtienen a partir de esta especie son pulpa, leña, postes, madera aserrada y chapas. Además, de sus hojas, se pueden obtener aceites esenciales como cineol y eudesmol (Lyon, s.a.).

### 2.1.5 Naturaleza química del pino y eucalipto

En el caso del pino insigne y para un experimento montado en Chile por Mansilla *et al.* (1991), la composición química de la madera se configuró de la siguiente forma: holocelulosa en un 73,8%, celulosa en un 45,6%, lignina en un 27,5% y extraíbles en un 1,8%<sup>3</sup>. Del mismo estudio y para eucalipto, la composición química fue la siguiente: holocelulosa 76,5%, celulosa 43,3%, lignina 20,0% y extraíbles 5,1%. Según Mansilla *et al.* (*op cit.*), estos valores se encuentran en los rangos logrados por otros investigadores con anterioridad. Esto se observa en las siguientes notas: Fengel y Wegener (1984) mencionan que Brasch y Wise en 1956, encontraron los siguientes valores para pino insigne: celulosa en un 45,5% y lignina en un 26,8% y por otra parte Sjöström (1993) también entrega valores para ambas especies; en el caso de la conífera, la lignina observada alcanzó el 27,2% y en la latifoliada llegó al 21,9%. González y Garay (1998) mencionan valores medios de 28% y 21% para la lignina en coníferas y latifoliadas respectivamente, mientras que sobre *P. radiata*, Galvez (2001) determina un 26,34% y Olea (2002) un 29,33%.

Desde el punto de vista industrial, en general y según la especie forestal, el contenido de lignina en la madera destinada a la producción de celulosa varía entre 20 y 30%, siendo mayor el porcentaje en coníferas que en latifoliadas. Es de notar que además del contenido de lignina, cuando se trata de la fabricación de papel, interesan la longitud de la fibra, su diámetro, espesor de pared y la ultraestructura (González y Garay, *op cit.*).

---

<sup>3</sup> Los porcentajes pueden diferir del 100% debido a que no se realizó un análisis completo a la composición química de la madera.

## 2.2 Pulpaje

La producción de pulpa es básicamente un proceso mediante el cual se separan las fibras de la madera (celulosa y hemicelulosas) de otros componentes no deseados como la lignina y los extraíbles. El proceso de pulpaje se divide generalmente en dos sistemas: químico y mecánico, los que producen fibras con características sustancialmente diferentes. La elección del proceso depende de la aplicación final de la pulpa y de la materia prima a utilizar. En muchas operaciones de manufactura de pulpa, se usa una combinación de pulpaje químico y mecánico para obtener papeles de determinadas características.

El pulpaje químico comprende varias formas de procesos, desde el fuertemente alcalino o Kraft, hasta el fuertemente ácido. Industrialmente se usan principalmente solventes inorgánicos y reactivos en soluciones acuosas a elevadas temperaturas y presiones (Gullichsen, 2000). Se incluye el uso de químicos para degradar y disolver la lignina de las paredes celulares de la madera, liberando las fibras de celulosa. El proceso químico tiene una baja tasa de conversión de la materia prima (40%-50%) y requiere un importante tratamiento de desechos y operaciones de reciclado de químicos; sin embargo, las pulpas producidas tienen una alta resistencia (Akhtar *et al.*, 1997a) empleándose principalmente en papeles finos del tipo impresión-escritura (González y Garay, 1998).

Según Gullichsen (*op cit.*), dentro del pulpaje químico el proceso Kraft es el procedimiento dominante debido a:

- ✘ utilizar cualquier tipo de especie leñosa como materia prima
- ✘ ser relativamente insensible a la corteza
- ✘ tener tiempos de cocción relativamente cortos
- ✘ tener problemas menores con la resina
- ✘ ser eficiente en el uso de químicos y energía
- ✘ producir fibras fuertes y flexibles a partir de coníferas, siendo también eficiente con latifoliadas y
- ✘ tener la habilidad para manejar los extraíbles en forma eficiente y por poder obtener productos adicionales de valor

## 2.2.1 Proceso Kraft

En forma resumida el proceso Kraft se explica de la siguiente manera (Gullichsen, 2000):

1. La madera se descorteza, chipea y se seleccionan los chips del tamaño requerido. El espesor es un factor relevante para llevar a cabo un proceso eficiente.
2. Los chips aceptados pasan al digestor donde son tratados con vapor para eliminar la mayor cantidad de aire que posean.
3. El digestor con chips se llena con el licor de cocción (mezcla de licor blanco y licor negro que viene de una cocción anterior) entre 80° - 100° C. La proporción es de 3,5 a 5 toneladas de licor por 1 tonelada de madera.
4. Posteriormente se procede a calentar el digestor a 160°-170° C. Esta etapa dura un tiempo determinado, suficiente para lograr un grado de deslignificación predefinido.
5. Cumplido el tiempo de cocción, el contenido del digestor pasa a un tanque de soplado, donde disminuye violentamente la presión y la temperatura. Este cambio brusco de condiciones, provoca una explosión del material que ayuda a separar las fibras de celulosa.
6. La pulpa del tanque de soplado es luego lavada y tamizada.
7. En seguida, la pulpa se compacta y almacena en forma concentrada para luego recibir otro tipo de tratamientos. Estos pueden ser: blanqueo o pasar directamente a manufactura de papel no blanqueado y/o producción de cartones.

En las etapas antes descritas se reutilizan permanentemente los reactivos. Estos se acumulan en una caldera reductora que cumple dos funciones: reducirlos para ser quemados y obtener dióxido de carbono, agua y producir un fundido inorgánico de carbonato de sodio y sulfito de sodio (para producir licor blanco), y convertir la energía calórica de los gases en energía eléctrica o para reaprovechar el vapor y reinsertarlo en las primeras etapas del proceso. Los gases provenientes de los digestores son evacuados para mantener la presión y temperatura correctas. Luego son condensados para obtener extraíbles volátiles (ej. trementina al sulfato), y también reutilizados como fuente de calor (Gullichsen, *op cit.*).

Las industrias que producen pulpa Kraft ocupan dos métodos de cocción: uno de digestión discontinua (batch o vaciado) en que se carga el digestor para realizar la deslignificación y luego se vacía para volver a repetir el proceso, y otro en que el proceso es continuo. La primera forma de trabajo es menos eficiente en el uso de la energía y reactivos pero es mas flexible con la materia prima (debido a que se pueden cambiar las condiciones en cada carga). Actualmente se ha mejorado el proceso de vaciado y se identifican tres subtipos: el de desplazamiento rápido de calor, el súperbatch, y el enerbatch (Uusitalo y Svedman, 1999). En el caso de los digestores continuos se observan 4 subtipos: el simple hidráulico, el simple de fase vapor/licor, el doble de fase vapor/licor y el doble hidráulico (Maccoccia *et al.*, 2000). Todos apuntan a optimizar la utilización de la energía y los reactivos y a producir pulpa de mejores características.

### **2.2.2 Proceso mecánico**

El pulpaje mecánico implica el uso de fuerza mecánica para separar las fibras de celulosa. Tiene una alta tasa de aprovechamiento (sobre 95%) y produce un papel con alto volumen específico, buena opacidad y de una excelente impresión. No obstante, su operación es muy intensiva en el uso de energía y produce papel de baja resistencia y alta reversión de color (tendencia al amarillo con el tiempo) (Akhtar *et al.*, 1997a). Además, el producto posee una alta cantidad de lignina residual. Debido a su alta tasa de aprovechamiento, algunos investigadores lo consideran como uno de los métodos más apropiados para mejorar la utilización del recurso y disminuir la presión sobre los bosques.

Con respecto al consumo, se estima que las 12,9 millones de hectáreas necesarias para cubrir la producción mundial de fibra serán casi duplicadas (23 millones de ha.) para el año 2010 (Kaldor, 1992 citado por Sabharwal *et al.*, 1994). Tal superficie es requerida para cubrir el incremento medio anual de la capacidad de producción de las empresas de pulpa a nivel mundial. Esta tasa alcanza a un 2% (Sabharwal *et al.*, *op cit.*). En 1996 el mercado de la celulosa y papel se cifró en US\$ 141 billones a nivel mundial, con un consumo de 287 millones de toneladas. Se espera para el 2000 un consumo de 314 millones de toneladas (González y Garay, 1998).

### 2.2.3 Estadísticas forestales nacionales de pulpa y papel

Las siguientes tablas y valores que se presentan a continuación, muestran el estado de la empresa de pulpa y celulosa nacional en el año 2001 (INFOR, 2002).

La balanza chilena en dicho año, tuvo un saldo positivo con exportaciones que llegaron a los US\$ 17.440 millones FOB. La participación de la empresa forestal en este ítem, alcanzó el 13% con US\$ 2.205,6 mill. FOB, después de la minería (44%) y la industria (35%).

La pulpa química es el principal producto de exportación de la empresa forestal con un 40% del total (2.173,2 miles de ton.), valor muy superior al de la remanufactura (24%) que se posiciona como el segundo ítem. Es mas, si se le agrega el 5% proveniente del papel periódico, la participación de las empresas de pulpa, celulosa y papel, se vuelve completamente predominante en el sector forestal.

En cuando al consumo de materia prima, el principal aporte lo realizan las plantaciones de pino con 7.453,5 mil m<sup>3</sup> ssc. y 2.771,1 mil m<sup>3</sup> de astillas. Esto equivale a la mitad del consumo de esta especie al año. Tal cantidad de materia prima se transformó en 2.216,1 ton. de pulpa que en un 98% se comercializó fuera del país. Además absorbe 1.205,3 mil m<sup>3</sup> ssc. y 63,7 mil m<sup>3</sup> de astillas de eucalipto, para producir 451,7 ton. de celulosa de las cuales se exportó un 91%.

En el desglose del tipo de pulpa producida, del total de 2.667,8 mil ton. de celulosa producida, 1.830,4 son del tipo química de fibra larga, 451,7 de química de fibra corta y 385,7 de pulpa mecánica. Además se produjo 276 mil ton. de papel periódico y 600,6 mil ton. de otros papeles y derivados.

La siguiente tabla detalla los productos de la empresa de pulpa y celulosa y sus aportes a la exportación. Se observa la predominancia del pino sobre el eucalipto como materia prima de los productos exportados.

**Tabla 1: Productos de la empresa de pulpa y celulosa y sus aportes a la exportación.**

Producto	Valor FOB	Volumen
----------	-----------	---------

		(US\$ mill.)	(MILES DE TON.)
Pulpa química	Blanqueada y Fluff de pino	554,7	1330,8
	Blanqueada de eucalipto	170,4	410,8
	Cruda de pino	138,1	431,6
Papeles y cartones	Papel periódico	110,5	176
	Otros papeles y derivados	159,6	192,8

Con respecto a los países destino de esta pulpa química (Tabla 1), se puede mencionar a China, Italia, Taiwán, Japón y Bélgica como los principales destinos con 683,4; 190; 116; 104,5 y 103,5 miles de toneladas respectivamente.

En cuanto al mercado de las pulpas químicas, predominan los países del lejano oriente y en menor medida países europeos. Los principales compradores se observan en la siguiente tabla.

**Tabla 2: Principales destinos de la pulpa química exportada.**

Producto	PAÍS					
	China	Italia	Corea del Sur	Bélgica	Japón	Taiwán
(Valores en %. 100%= 2205,6 mill. US\$ FOB = total de exportaciones sector forestal.)						
Pulpa blanqueada	8	3,6	1,8	2,1	1,7	1,3
Pulpa cruda	2,6	----	0,9	0,1	0,2	0,6

La variación del precio de la pulpa y el papel periódico de los últimos 4 años se observa a continuación.

**Tabla 3: Últimos precios de la pulpa y papel (US\$ FOB/TON).**

	Cruda	Blanqueada eucalipto	Blanqueada pino	Papel periódico
1999	348	425	412	442
2000	507	628	624	628
2001	320	415	417	571
2002	338	371	368	524

Al observar lo anterior, se puede cuantificar la importancia de la empresa de pulpa y celulosa para la economía chilena. Es realmente el motor y el termómetro de la industria forestal. Pero también es fácilmente observable, el por qué esta actividad económica se ha visto tan perjudicada en años anteriores con los problemas de las economías extranjeras, en especial de las orientales, y con las fluctuaciones del precio de este *commodity* a nivel mundial. Hay que hacer notar que el panorama chileno en el concierto mundial ha cambiado notablemente después de los tratados alcanzados con la Comunidad Europea, Estados Unidos y Corea del Sur. Por lo tanto, se necesita un mayor análisis para comprender el estado del sector forestal y sus proyecciones a mediano y largo plazo.

#### 2.2.4 Biopulpaje

La producción de pulpa es una de las áreas más promisorias para la incorporación de procesos biológicos. Como se mencionó anteriormente, el biopulpaje se ha definido como el tratamiento de chips de madera con hongos degradadores de lignina previo al pulpaje (Akhtar *et al.*, 1996). Esta definición no se debe considerar en forma estricta ya que existen experiencias positivas al tratar trozas de madera directamente con hongos tanto en el extranjero (ej.: Blanchette *et al.*, 1998), como en el país (Galvez, 2001; Olea, 2002) y otras especies vegetales no leñosas como kenaf, lino, cáñamo y cáscara de coco con enzimas (Micales, 2001). Es mas, Blanchette (*op cit.*) indica que como beneficio extra, se facilita el descortezamiento de las trozas una vez tratadas con hongos.

Se utilizan los HPB debido a su eficiencia en la degradación de la lignina y debido a su especificidad en el ataque que les permite remover el polímero, mientras dejan a las azúcares casi intactas (deslignificación). Debido a estas características, los investigadores buscaron su aplicación en el campo del pulpaje industrial.

Ya en la década de los '50, la empresa privada de E.E.U.U. (Virginia Pulp and Paper Company) realizaba investigación sobre el biopulpaje y en 1972, Kirk y Kringstad demostraron que el pretratamiento sobre chips de álamos con *Rigidoporus ulmarius*, reducía los requerimientos eléctricos en pulpaje mecánico y producía papeles mas fuertes (Akhtar *et al.*, 1998a). El conocimiento al respecto de este tema ha ido en constante aumento desde entonces con importantes aportes del Swedish Products Laboratory de

Estocolmo y del Forest Products Laboratory de Madison, Estados Unidos. Con respecto a la investigación dentro del país, el 67% de las empresas chilenas consideradas en el estudio de González *et al.* (1996), realizan estudios sobre bioblanqueo. Los proyectos FONDEF D21I-1032, D00T-2057 y D02I-1086, desarrollados en el departamento de Ingeniería de la Madera de la Facultad de Ciencias Forestales de la Universidad de Chile, han demostrado importantes beneficios al utilizar esta técnica.

Uno de los principales motivos del auge de la investigación en biopulpaje, es la posible escasez de materia prima a futuro. Debido a esto las miradas se han volcado hacia el pulpaje mecánico, que con su alto rendimiento, es visto como un buen camino para extender estos escasos recursos. Sin embargo, este es un proceso energéticamente intensivo y produce papel de baja resistencia al compararlo con el producido en el pulpaje químico. El biopulpaje, tiene el potencial para sobrellevar estos problemas (Micales, 2001; Akhtar, 1998b). Los hongos alteran la lignina en las paredes celulares de la madera, dando el efecto de “ablandamiento” de los chips. Esto reduce sustancialmente el requerimiento de energía eléctrica para el pulpaje mecánico y conlleva a mejoras en las propiedades mecánicas del papel (Ahktar, 1998d). Otro motor de investigación lo proporciona la búsqueda permanente de las empresas por reducir sus costos y disminuir las emanaciones contaminantes.

Los detalles de qué es lo que realmente da el efecto de biopulpaje es materia de variadas hipótesis. El grupo de Messner *et al.*, (1998), plantea que dos mecanismos están involucrados en el biopulpaje: (1) modificación de la pared celular, probablemente por un agente difusor, y (2) una mejora de la penetración y difusión de los químicos de cocción causados por la acción del hongo sobre el chip. Este punto de vista difiere de lo que resulta más lógico en una primera apreciación y que se refiere a la acción directa que tiene el hongo sobre la cantidad de lignina en la madera. Gómez (1995), concluye en forma similar a los investigadores recién mencionados: no se manifiesta una alta biodegradación de los componentes químicos de la madera, sin embargo se supone que para el caso de la lignina, celulosa y sustancias pécticas, existió un desdoblamiento de las cadenas de moléculas lo que se manifestó en mayores rendimientos. Oriaran *et al.* (1991), también comparten las razones por las que el proceso mejora: la mejor penetración del licor de cocción durante la digestión. Esto puede ser debido la aumento de la porosidad, consecuencia de la remoción de biomasa por las enzimas que mejoran el



acceso del licor al los componentes de la pared celular o por una mejor relación holocelulosa/lignina que entra al digestor. Por su parte, Siika-aho *et al.*, (2001) establecen los siguientes efectos de la utilización de enzimas:

**Tabla 4: Beneficios de la acción de enzimas en los diferentes componentes de la madera**

Componente	Enzima	Modificación fisiomecánica	Beneficio técnico
Celulosa	Celobiohidrolasa	Microfibrilación	Ahorro energía y flexibilidad de fibras Mayor utilización de máquina papelera Mejora prop. de fibra
	Endoglucanasa	Depolimerización	
	Mezcla	Depolimerización	
Xilanos	Endoxilanasas	Depolimerización	Extractibilidad de la lignina
Glucomananos	Endomanasa	Depolimerización	Extractibilidad de la lignina Mayor utilización de máquina papelera Aumento de producción de pulpa y prop. físicas
	Endomanasa	Reducción de estabilidad coloidal	
	Acetil-glucomanano esterasa	Disminución de la solubilidad	
Pectinas	Poligalacturonasa	Depolimerización	Ahorro energía en descortezado. Reducción de demanda cationica en prod. de papel
Lignina	Lacasas, Mn-peroxidasas	Depolimerización, polimerización	Aumento del brillo, polimerización de lignina
Extraíbles	Lipasa	Aumento de la hidrofiliidad	Propiedades físicas Mayor utilización de máquina papelera

Aunque el porqué del beneficio del biopulpaje no esté del todo claro, lo que si se sabe es que la especie fungosa es totalmente determinante para el éxito o fracaso del proceso. Aparte de la especificidad de algunos hongos, se han documentado observaciones más generales. A saber, tanto ascomycetes como basidiomycetes producen pudrición blanca, pero para el pulpaje llamado biosulfito, las reducciones en el número kappa son mucho más dramáticas con basidiomycetes que con ascomycetes. Para basidiomycetes, reducciones del número kappa entre 30% y 50% son comunes; mientras tanto, con ascomycetes se han observado reducciones de entre 7% y 10%. Para el pulpaje denominado bioKraft, las reducciones del número kappa fueron solo un poco mejor para basidiomycetes que para el ascomycete testado *Ophiostoma piliferum* (Messner *et al.*, 1998).

No obstante los avances en este campo de investigación existen algunos problemas que hay que superar y que se están investigando para llevar esta técnica a escala industrial. Dentro de estos se pueden mencionar el lograr un grado de asepsia mínimo de funcionamiento, reducir los costos del inóculo de hongo, mantener un ambiente hospitalario en la pila de chips, y optimizar el proceso económico (Scott *et al.*, 1998). Silva (2002) determinó que la presencia de *Trichoderma viride*, genera problemas para HPB como *Ceriporiopsis subvermispota*, *Pleurotus ostreatus* y *Peniophora gigantea*. Una forma posible de superar el problema de la asepsia, es buscar especies resistentes a la competencia de otros organismos o condiciones que favorezcan el desarrollo del hongo objetivo por sobre el hongo no deseado.

#### **2.2.4.1 Ventajas en el proceso de producción**

La introducción de los hongos a los procesos de producción de pulpa proveniente de vegetales (generalmente leñosos), trae consigo numerosos beneficios para la manufactura del mencionado producto. Claramente son estos beneficios los que han atraído con mayor fuerza tanto al mundo científico como al sector privado, al traducirse principalmente en suculentos beneficios económicos.

Numerosas publicaciones dan cuenta de los beneficios del biopulpaje y del tiempo y recursos que se han visto involucrados en pos de mejorar las faenas de producción.

Las mejoras al proceso se resumen en una reducción los requerimientos de energía eléctrica durante la refinación, en potencialmente incrementar la producción de un molino o digestor al reducir los tiempos de refinación, evitar la acción de hongos de mancha, disminuir los problemas de resinas en molinos y digestores y mejorar las propiedades del papel producido.

En general el punto de referencia para los ítems 2.3.2.1 y 2.3.2.2 es el número kappa. Entonces, las mejoras se explican como una reducción en la energía requerida para producir una pulpa con un determinado número, o de la misma forma al considerar el tiempo como variable a optimizar.

#### 2.2.4.1.1 Reducción en el consumo de energía

El principal logro de las experiencias en torno a este campo de investigación, ha sido el logro de importantes reducciones de energía utilizada para los procesos de pulpage. Cabe recordar que es tal el consumo de energía de estas empresas, y principalmente de las que producen pulpa mecánica, que es normal que en sus instalaciones cuenten con una planta generadora de electricidad. Debido a esto, una reducción de unos pocos puntos porcentuales en el consumo, puede ser muy atractivo para el sector privado y ha permitido que continúe el respaldo de capitales a la investigación.

Para un experimento con trozas de *Pinus resinosa* sometido a un ataque de *Phlebiopsis gigantea*, Blanchette *et al.* (1998) observaron un aumento en la porosidad de la pared celular y una reducción en el consumo de energía (9 a 27% menos) en pulpage mecánico. Akhtar *et al.* (1998c) revelan ahorros energéticos en pulpage mecánico de entre un 27 a un 40% con distintas especies de HPB enriquecidas con licor de maíz sobre chips de álamo. En otro estudio sobre *P. resinosa* tratado por 17 semanas con *P. gigantea* y luego procesado mecánicamente, Behrendt *et al.* (2000) obtuvieron un ahorro de 27%. Por su parte, Fisher *et al.* (1994) probaron *Ceriporiopsis subvermispora* sobre *Pinus taeda* obteniendo un ahorro de 30%. Adamski *et al.* (1987) citado por Messner *et al.* (1998), demostraron que un pretratamiento con *Phellinus pini* y *S. hirsutum* disminuyó el consumo de energía en un pulpage Kraft.

Además de la materia prima tradicional de la celulosa, que son los árboles, existen ciertas plantas no leñosas que representan otra alternativa para la fabricación de pulpa. Este es el caso del kenaf (*Hibiscus cannabinus*), una herbácea que ha sido estudiada por Sabharwal *et al.* (1994). El ahorro producido por la acción de *C. subvermispora* sobre el kenaf alcanzó 37,6%.

Akhtar *et al.* (1996) encontraron que un 0,3% de inóculo de *C. subvermispora* (basado en peso seco) ahorra un 19% de energía y mejora propiedades de resistencia del papel, tales como el índice de rasgado, al compararlo con el método control. Esta cantidad de inóculo es bastante alta. Sin embargo, la cantidad de inóculo puede ser disminuida al 0,0005% o menos al adicionar a la suspensión de micelio, una fuente nutricional barata y comercialmente disponible como el licor de maíz macerado. Estudios subsecuentes han

identificado mejores cepas de este hongo que producen más de un 38% de ahorro en energía y que mejora el índice de rasgado en un 51% al compararlo con el método de control en la presencia del licor de maíz.

En pruebas de pulpaje con bisulfito de sodio, el número kappa de la pulpa de *P. taeda* tratado con dos cepas de *C. subvermispora*, se redujo en un 27%, con una pequeña reducción de la producción. Y en pruebas con pulpaje bajo bisulfito de calcio, las cepas lo redujeron en un 48 y en un 21% pero sin pérdidas de producción (Scott *et al.*, 1995).

#### *2.2.4.1.2 Aumento de la producción*

La reducción en el requerimiento de energía tiene una consecuencia que puede ser de gran importancia para algunos molinos. Algunos de estos que tengan su producción limitada como resultado de su capacidad de refinación, pueden asignar un valor sustancial al efecto de desembotellamiento que el tratamiento fungoso puede proveer. (Akhtar *et al.*, 1998c; Scott y Swaney, 1998).

En pruebas con *P. chrisosporium* sobre *Quercus rubra*, Oriaran *et al.* (1991) lograron aumentar la producción de pulpa hasta en un 5%.

Gómez (1995), en su estudio sobre pino insigne, menciona que existe un aumento del rendimiento total y rendimiento clasificado de pasta cruda Kraft, por efecto de la inoculación de los HPB *P. ostreatus* y *Polystictus versicolor*. González *et al.*, (2002), también trabajando con pino y *P. ostreatus*, logra disminuir el número kappa en el proceso de pulpaje y aumentar la producción en más de un 3% después del blanqueo. Con respecto al crecimiento en el rendimiento de un molino de producción, se han logrado aumentos de 30% en la producción industrial debido a la aplicación del biopulpaje (Akhtar *et al.*, 1997b). Para una cocción con al sulfito ácido de calcio, Scott *et al.* (1996), también alcanzaron producir pulpa con un mismo número kappa que el control pero en menor tiempo.

Para el caso del kenaf, Ahmed *et al.* (1998) obtuvieron aumentos en el rendimiento cercanos al 8% a los que se suma una reducción en el número kappa de entre 5 a 8 puntos, al haber tratado esta herbácea con *C. subvermispora* y *Phlebia subserialis*.

Chen *et al.* (1999), lograron una disminución del tiempo total de pulpaje (Kraft) de un 20%, al tratar chips en paquetes compactados de *Pinus banksiana* con *C. subvermispora*.

Por otra parte, la utilización de xilanasas y celulasas ha aumentado el drenaje de la pulpa en un 20%, lo que permite un aumento de la velocidad de formación del papel. Esto también se observa en el reciclaje, ya que el papel a reutilizar tiene un drenaje mas bajo que la pulpa virgen (Micales, 2001). El aumento del drenaje se debe a que las enzimas convierten los finos y hemicelulosas solubles en azúcares solubles, reduciendo la viscosidad de la solución (Kirk, 1996).

#### *2.2.4.1.3 Control de mancha azul*

Uno de los problemas en el proceso de pulpaje es causado por la mancha azul. La presencia de esta mancha en los chips utilizados para pulpaje mecánico, reduce el brillo de la pulpa y por lo tanto implica un incremento sustancial en la utilización de químicos blanqueadores (Blanchette *et al.*, 1992).

Blanchette *et al.* (1998), inocularon troncos de *P. taeda* con *P. gigantea* y debido a su rápida colonización, evitó la entrada de hongos de mancha azul. Lo mismo ocurrió sobre *P. resinosa* donde (Behrendt y Blanchette, 2001) lograron disminuir la colonización de las trozas por hongos de mancha de un 53% a un 2%.

#### *2.2.4.1.4 Disminución de resinas*

Otro de los problemas de producción son las resinas. También conocidas bajo el concepto anglo *pitch*, representan el mayor problema en las operaciones de producción de pulpa (Blanchette *et al.*, 1992). Causan varios problemas en el pulpaje y en la manufactura del papel, incluyendo tiempos muertos para limpieza, rupturas en la lámina de papel en formación, hoyos en el papel y reducciones en las propiedades de resistencia (Kirk, 1996). Son un término general para los materiales oleofílicos de bajo peso molecular, que son extraídos de chips de madera en solventes orgánicos, neutros y no polares. Estas sustancias resinosas pueden ser triglicéridos, ácidos grasos y resinas ácidas. (Brush *et*

al., 1994). Los triglicéridos son los componentes más problemáticos de las resinas derivadas de la madera (Kirk, *op cit.*).

Opuestamente al problema anterior, un hongo de mancha azul (*O. piliferum*) ha sido reconocido como un beneficio al proceso al degradar grandes cantidades de la resina presente en la madera. Cepas incoloras de esta especie han probado reducir en 40% la fracción de diclorometano de los extraíbles (Blanchette *et al.*, 1992). Este mismo hongo actuando sobre una combinación 1:1 de chips de *P. taeda* y *Pinus virginiana*, redujo los extraíbles en éter en un 22%. Se pudo detectar una disminución de un 60% de triglicéridos y de un 36% de ácidos grasos. Estos últimos, son probablemente la fuente de carbono para el hongo (Brush *et al.*, 1994).

Behrendt *et al.* (2000), inocularon *P. gigantea* sobre *P. resinosa* y obtuvieron una disminución de las resinas de un 59% tras 11 semanas de acción del hongo. Fischer *et al.* (1994) en pruebas de pulpaje al sulfito, encontraron que *C. subvermispota* y *O. piliferum* reducían el contenido de resinas de *P. taeda* entre un 17 y un 27% después de 2 semanas de acción del hongo y de hasta entre 33 y 35% después de un mes de acción. De forma más específica, en Japón las lipasas han sido desarrolladas y actualmente son usadas en forma comercial para el control de resinas en los molinos de pulpaje mecánico. Este tipo de enzimas hidrolizan triglicéridos a ácidos grasos y glicerol (Kirk, *op cit.*).

#### **2.2.4.2 Ventajas en las propiedades del producto final**

El aumento de la flexibilidad de la fibra y de su hinchazón, incrementan el entrelazado de las fibras en la hoja de papel, y por lo tanto, las propiedades mecánicas de la hoja producida (Sachs *et al.*, 1989).

La colonización exitosa de trozas de *P. resinosa* por *P. gigantea*, condujo a un incremento en las propiedades de la hoja de papel producida. Aumentos en el índice de explosión, rasgado y tracción fueron de 17, 20 y 13% respectivamente, después de un

tratamiento de 22 semanas. Pero en forma opuesta, se observó una disminución del brillo del papel (Blanchette *et al.*, 1998).

Metha *et al.* (1992), experimentaron sobre pulpa Kraft cruda de ***Eucalyptus sp.***, con un proceso de bi blanqueo acelerado (72 hrs.), y redujeron el índice kappa en un 55%, mientras que aumentaron el brillo en un 76%.

En otra experiencia Chen *et al.* (1999), notaron que el papel producido a partir de pulpa Kraft de ***P. banksiana*** tratado con ***C. subvermispora***, tuvo mejorías en el índice de explosión, de rasgado y tracción.

También se han notado mejorías en monocotiledóneas. Según Ahmed *et al.* (1998), el tratamiento con HPB sobre fibras de kenaf aumentó el brillo en el blanqueo en un 8% y Sabharawal *et al.* (1994), anotaron grandes mejoras en las propiedades del papel. Es así como los índices de explosión, tracción y rasgado aumentaron en una 65, 58,3 y 56,6% respectivamente.

### **2.2.4.3 Ventajas ambientales**

Como en la mayoría de los procesos productivos que lleva a cabo el ser humano, los desechos de la industria de pulpa y papel tienen efectos adversos para el medioambiente. En el caso de la celulosa, las principales emanaciones son de tipo líquido y gaseoso (malos olores y partículas en suspensión) (González *et al.*, 1996). Pero hay que considerar que los procesos químicos, son mucho más dañinos que los mecánicos y termomecánicos, ya que en ellos se ven involucrados reactivos químicos que de una forma u otra y en mayor o menor cantidad, son vertidos al medio ambiente.

En la industria de celulosa, los principales factores de contaminación provienen de la cocción, lavado y blanqueo (González *et al.*, 1996). Desafortunadamente, los efluentes de las etapas de cloración y extracción alcalina no pueden ser recuperados debido a su alto nivel de cloruro corrosivo. Además, los efluentes contienen grandes cantidades de compuestos orgánicos clorados, los que tienen efectos tóxicos, mutágenos y cancerosos (Akhtar *et al.*, 1997a).

Los procesos de pulpaje liberan al ambiente materiales como azúcares, ligninas de bajo peso molecular y extraíbles de la madera (Eriksson, 1985 citado por Messner *et al.*, 1998). Además, la descarga de subproductos en efluentes hídricos, altera la DBO principalmente a través de productos organoclorados (González *op cit.*).

En este marco, Scott *et al.* (1995), hallaron que los efluentes de un pulpaje con sulfito de ***P. taeda*** redujeron en gran parte su toxicidad al haber tratado la madera con un HPB, mientras que la demanda biológica (DBO) y química de oxígeno (DQO) se mantuvo igual. En otro caso, Akhtar *et al.* (1997a), lograron una DBO un poco menor, pero una DQO mucho mayor, probablemente debido a la liberación de productos relacionados con la lignina. En este caso, la toxicidad disminuyó considerablemente.

Chen *et al.* (1999) encontraron en su estudio, que aunque el brillo del papel producido a partir de pulpa biokraft, no tuvo una variación significativa, el consumo de peróxido de hidrógeno disminuyó. Esto trae beneficios directos para el medioambiente al disminuir la contaminación.

Al referirse a la etapa de blanqueo, también se pueden encontrar casos con resultados positivos para el medioambiente. En forma particular, las xilanasas han demostrado reducir la cantidad de químicos requeridos para el blanqueo. Pero el proceso debe ser limitado debido a que los mejores resultados ocurren cuando la hemicelulosa es depolimerizada pero no removida de las fibras de celulosa (Micales, 2001). Para esta misma etapa, Ahmed *et al.* 1998, encontraron que el tratamiento con hongos sobre kenaf, permitió producir papeles de un brillo superior con un menor gasto en blanqueadores (ClO<sub>2</sub>) y reducir en más de la mitad el consumo de estos mismos, para lograr un mismo nivel de brillo en el papel.

#### **2.2.4.4 Ventajas económicas**

Los beneficios antes expuestos que trae consigo la aplicación del biopulpaje, han tenido una primera aproximación a lo que sería su equivalente económico. Es una primera aproximación, porque no existen en el mundo plantas de pulpaje en funcionamiento bajo este sistema y por ende los análisis corresponden a estimaciones de los beneficios que podrían lograrse.



El biopulpaje reduce los requerimientos de energía eléctrica durante el refinado, incrementa el potencial de producción del molino y mejora la resistencia del papel, lo que tiene un beneficio económico directo (Ahktar *et al.*, 1998d; Scott y Swaney, 1998).

En la investigación de Ahktar *et al.* (1996), una evaluación económica basada en el proceso de pulpaje termomecánico fue llevada a cabo. Los resultados indicaron que una reducción del 25% en la energía para el pulpaje con el tratamiento con hongos podría ahorrar US\$ 21 por tonelada seca de pulpa (US\$ 33 con un 40% de ahorro de energía). El valor capitalizado del ahorro de energía fue estimado en US\$ 250.000 por cada punto porcentual de energía ahorrada, considerando un costo de electricidad de US\$ 0,035/kWh.

Un análisis económico de 600 ton/día de pulpa de un molino termomecánico, indica que basado solamente en ahorros de energía, el proceso es económicamente factible, resultando en ahorros generales cercanos a US\$ 10 por tonelada de pulpa. El incremento de la producción del molino en un 20% alcanza un ahorro adicional sobre US\$ 40 por tonelada de pulpa. El reemplazo de pulpa termomecánica por pulpa Kraft da ahorros adicionales, pero hay que analizar cada molino en forma particular (Ahktar *et al.*, *op cit.*; Scott y Swaney, *op cit.*). En otro análisis realizado por González *et al.*, (2002), la implementación de esta tecnología reportaría beneficios diarios por US\$ 26.000, en molinos de 1000 ton/día de producción.

En el mismo estudio realizado por Ahktar *et al.* (1998d), se observa en el análisis algo muy interesante. El período de retorno de la inversión es de entre 2,66 a 0,49 años, dependiendo del tipo de producción elegida. Para los beneficios futuros y el costo de la inversión, es un período extremadamente corto.

Por otra parte, para ayudar a minimizar los costos del biopulpaje, puede ser factible emparejar las necesidades de la industria del pulpaje con la metodología, y subproductos de otra industria como la de las callampas comestibles. Oriaran *et al.*, (1989) aceptan que como posibilidad para un uso eficiente de la madera en biopulpaje se podría producir un producto de alto valor como el shiitake (*L. edodes*) o el hongo ostra (*P. ostreatus*),

seguido por la extracción de las enzimas remanentes y/o uso de los chips para hacer productos de papel.

Por lo antes expuesto, se puede señalar que el proceso de biopulpaje puede ser tecnológicamente factible, económicamente beneficioso y ambientalmente más amigable que los actuales métodos de producción.

## 2.3 Los hongos

Las estimaciones del número de especies fungosas presentes en el planeta son muy variadas y dependen del autor y la sistemática que este utiliza para su clasificación. Por ejemplo, Lodge (2001) establece que existen por lo menos un millón de especies, y posiblemente alcancen los cinco millones. Sugiere esta estimación debido a que cree que la mayoría de los hongos todavía no han sido descritos (por ejemplo, los que atacan a insectos). Por otro lado, Donoso estima que el número de especies fungosas se acerca a 500.000<sup>4</sup>.

El reino de los hongos tiene tres divisiones principales: **Myxomycota**, **Phycomycota** y **Eumycota**. De esta última división, se desprende el grueso de los hongos más conocidos por la gente como las setas y los mohos. Dentro de esta división se encuentran la subdivisión **Basidiomycotina** y la clase **Hymenomycetes** que concentra a casi todos los hongos de degradación de la madera, *litter* y descomponedores, además de los hongos micorrizicos (Burdsall Jr., 1998). Los micólogos usan la morfología microscópica de las esporas, basidios y de los esporocarpos para identificar al hongo.

Los hongos degradadores de madera también pueden ser separados por su metabolismo. Existen dos grupos principales. Los hongos de pudrición café destruyen y metabolizan sólo la hemicelulosa y celulosa. Pueden modificar la estructura de la lignina, pero realmente no la pueden metabolizar como fuente de carbono. Y los hongos de pudrición blanca que pueden digerir y metabolizar los tres principales componentes de la madera. Un tercer grupo de pudrición es la denominada blanda (destruye capa S2), que podría asimilarse a una variante de pudrición café<sup>5</sup>. Algunos de los hongos de pudrición blanca

<sup>4</sup> Juan Donoso, Ing. Forestal, Universidad de Chile. Ph.D. Universidad de Paris. Comunicación personal.

<sup>5</sup> Juan Donoso, Ing. Forestal, Universidad de Chile. Ph.D. Universidad de Paris. Comunicación personal.

realizan esto en forma secuencial, destruyendo inicialmente la lignina antes de digerir la hemicelulosa y celulosa (Micales, 2001). Debido a esta característica, son apuntados como los organismos de mayor interés industrial en la producción de celulosa y papel.

### **2.3.1 Rol ecológico de los hongos**

Los hongos son los microorganismos más comunes en el ataque de la madera (González y Garay, 1998) y los principales descomponedores de los ecosistemas terrestres (Akhtar *et al.*, 1997a). Degradan la madera desde contenidos de humedad de un 20% en adelante (Libby, 1969) y su ataque se manifiesta generalmente como pudrición que es un reblandecimiento, decoloración y con frecuencia desintegración de los tejidos de un vegetal (Agrios, 1996). Dentro de los organismos descomponedores de la madera, los hongos de pudrición blanca son los únicos hongos capaces de atacar a todos los componentes de la madera (Akhtar *et al.*, *op cit.*; Kim y Singh, 2000; Levin y Agueda, 1998; Micales, *op cit.*) y son los más eficientes dentro de los hongos de pudrición (Gómez-Alarcón *et al.*, 1991; Srebotnik *et al.*, 1997). Poseen un mecanismo altamente eficiente para degradar la lignina, y por lo tanto, juegan un rol esencial en el ciclo del carbono en la tierra (Srebotnik *et al.*, *op cit.*). Cabe mencionar que los hongos son los encargados de degradar la materia orgánica y reinsertar los elementos básicos presentes en grandes moléculas, como el carbono, a la base de las distintas cadenas tróficas. Es así como las condiciones que desfavorecen la ruptura biológica de la lignocelulosa, conducen a suelos con pronunciadas acumulaciones de litter. Por ejemplo, los suelos de bosques de coníferas en el noroeste de Estados Unidos, pueden contener una capa de "litter" de 50 años debido a su bajo pH y a la falta de lluvias en verano, que inhiben la actividad microbiana. En bosques maduros de este tipo, el material leñoso como troncos muertos y ramas, pueden llegar a constituir entre el 50-60% de la capa de *litter* (Hammel, 1997).

### **2.3.2 Los hongos de pudrición blanca**

Los hongos de pudrición pertenecen al grupo de hongos superiores denominados *Basidiomycetes*. Esto significa que ellos producen sus esporas en estructuras llamadas basidios (Micales, 2001). Estos pueden estar dispuestos tanto en láminas como en tubos

(**Agaricales** y/o **Polyporales**); sin embargo hoy en día se les segrega como **Gimnocarpicos** y **Hemi-angiocarpicos**<sup>6</sup>.

Su nombre, HPB, proviene de la observación de la madera que ha sido atacada por estos organismos. Al degradar en una alta proporción la lignina (que da el color café a la madera) presente en los tejidos leñosos, el material residual se vuelve blanquecino a la vista, debido a un aumento relativo de la celulosa (blanca). Los hongos que provocan la pudrición blanca pertenecen principalmente a la subdivisión **Basidimycotina**, clase **Basidiomycetes**, que es la clase más evolucionada dentro de los hongos. Este grupo tiene por característica principal presentar su espermogénesis en estructuras llamadas basidios, dentro de los cuales se producen las basidiosporas (exógenas), generalmente en números pares (2 y 4).

Los HPB son un grupo que consta de cerca de 10.000 especies (Ahktar *et al.*, 1996a) y cada una cuenta con distintas capacidades para degradar lignina y holocelulosa. Debido a la gran diversidad natural de estos microorganismos y a sus características propias, se sabe que los basidiomycetes (tipo de hongo bajo estudio) remueven la lignina de muy variadas formas (Levin y Agueda, 1998). Generalmente se produce un ataque simultáneo tanto a los polisacáridos (holocelulosa) como a la lignina (Eriksson, 1990), pero existen diferencias en la fracción de los componentes de la madera que es atacada dependiendo de la especie fungosa, sustrato y condiciones ambientales.

Existen distintos factores que alteran el ataque de un hongo sobre una especie leñosa. Uno de estos condicionantes del ataque es el sustrato. Muchos hongos presentan una alta especificidad, mientras que otros no (Lodge, 2001). Pero en general se cree que las latifoliadas son más susceptibles al ataque de HPB que las coníferas (Kim y Singh, 2000). Como ejemplo, Levin y Agueda (1998) encontraron diferencias en el patrón de ataque de **Trametes trogii** sobre dos especies con propiedades xylotecnológicas similares como **Salix sp.** y **Populus sp.** Las variaciones de su estudio se observaron tanto en la especificidad del ataque como en los elementos celulares que fueron atacados. Akhtar *et al.* (1996) notan que diferentes cepas de una misma especie, también varían su selectividad hacia la lignina; algunas son selectivas sólo hacia latifoliadas mientras que otras son efectivas tanto en coníferas como en latifoliadas. Esto se podría deber a las

---

<sup>6</sup> Juan Donoso, Ing. Forestal, Universidad de Chile. Ph.D. Universidad de Paris. Comunicación personal.

diferencias en las características de la lignina. Se percataron, igualmente, que la colonización es función de la especie fungosa.

Otro condicionante es la presencia de oxígeno. La madera saturada de agua o en lugares con baja presencia de oxígeno (ej. ambientes acuáticos o madera bajo tierra) no es propensa de ser degradada por estos hongos pero si por bacterias. De hecho, diversos estudios arqueológicos sugieren que en tiempos remotos (con bajo porcentaje de oxígeno atmosférico) los principales degradadores de la madera eran bacterias y hongos de pudrición blanda (Kim y Singh, *op cit.*).

Por otra parte, los hongos tienen una gran variación en cuanto al tipo de degradación. Esta se produce entre especies y entre cepas de una misma especie. Se da el caso de que a veces un mismo hongo, causa degradación simultánea en una parte de la madera y deslignificación en una parte cercana. Los factores responsables de la ocurrencia de uno u otro patrón de degradación no están todavía claros (Kirk y Cullen, 1998). Los efectos en el biopulpaje también pueden ser drásticos. Scott *et al.* (1995), encontraron variaciones en la acción de dos cepas de ***C. subvermispora*** sobre el número kappa. Un caso arrojó una disminución de un 21% mientras que otra una de un 48%.

Los hongos que degradan la lignina enfrentan diversos problemas pero que han sabido salvar eficazmente. Se pueden mencionar entre estos que el polímero es extremadamente grande y altamente ramificado y por lo tanto los mecanismos enzimáticos deben ser extracelulares. Además, como las uniones son del tipo éter estable y carbón-carbón, estos mecanismos deben ser oxidativos más que hidrolíticos. Más aún, en vista de que la lignina consiste en una mezcla de unidades estereoirregulares, los agentes lignolíticos del hongo deben ser mucho menos específicos que los típicos catalizadores biológicos. Finalmente, el hecho de que la lignina es insoluble en el agua, limita su biodisponibilidad a los sistemas lignolíticos y establece a la lignolisis como un proceso lento (Hammel, 1997).

Los hongos lignolíticos no son capaces de usar la lignina como su única fuente de energía y carbón. En lugar de eso, ellos dependen de polisacáridos más digeribles presentes en sustratos lignocelulósicos, y la primera función de la lignolisis es la de exponer estos polisacáridos para que puedan ser rotos por las celulasas y hemicelulasas fúngicas

(Hammel, *op cit.*). Es por esto que muchos experimentos sobre biopulpaje se llevan a cabo con sustratos enriquecidos con azúcares.

### ***2.3.2.1 Características microscópicas de los procesos de pudrición blanca***

Como la mayoría de los hongos, los hongos de pudrición blanca existen primeramente como hebras ramificadas denominadas hifas, usualmente de 1 a 2 micrones de diámetro, que crecen por las puntas. Originadas de esporas o de colonias cercanas, las hifas invaden rápidamente las células leñosas y se ubican a lo largo de las paredes del lumen. Desde esa posición de privilegio, secretan una batería de enzimas y metabolitos que permiten la depolimerización de la celulosa y hemicelulosas y la fragmentación de la lignina (figura 9.6) (Kirk y Cullen, 1998).

Como se mencionó anteriormente, los hongos de pudrición blanca presentan dos patrones principales morfológicos de degradación: una degradación simultánea, en la cual la celulosa, hemicelulosas y lignina son removidos mas o menos en forma simultánea, y una deslignificación, en la cual la lignina y hemicelulosas son removidos antes que la celulosa (Kirk y Cullen, *op cit.*).

En la degradación simultánea, se observa degradación de la lignina a lo largo de los polisacáridos de la pared celular, con canales de erosión bajo las hifas. Las paredes celulares comienzan a adelgazarse, generalmente de una manera no uniforme, con apariciones de perforaciones entre las células a medida que la degradación avanza. Esto concluye con células de paredes cribadas o con canales de erosión o con extensos adelgazamientos de la pared secundaria. La extensión de la degradación varía de una célula a otra, es así como células fuertemente atacadas pueden estar al lado de células relativamente sanas (Levin y Agueda, 1998; Kirk y Cullen, 1998). Estudios micromorfológicos indican que los hongos de pudrición simultánea (lignina y holocelulosa al mismo tiempo), causan un adelgazamiento progresivo de la pared celular procediendo desde la capa S3 de la pared secundaria hacia la lamela media compuesta (Blanchette *et al.*, 1985). En este mismo estudio los investigadores determinaron que en las áreas deslignificadas por los hongos bajo prueba, la lamela media compuesta fue extensivamente degradada produciendo la desfibrilación de las células. En una

investigación de Sachs *et al.* (1989), las hifas del hongo ***Phanerochaete chrisosporium*** después de tres semanas de acción, penetraron a través del lumen, puntuaciones y perforaciones horadadas por el hongo. A su paso, se observó una clara degradación de las paredes del lumen celular, producida por las enzimas secretadas por el hongo y toda la estructura leñosa adoptó una apariencia blanda y laxa en respuesta al ataque. Esta forma de ataque es la que se repite en la mayoría de las investigaciones con hongos de este tipo.

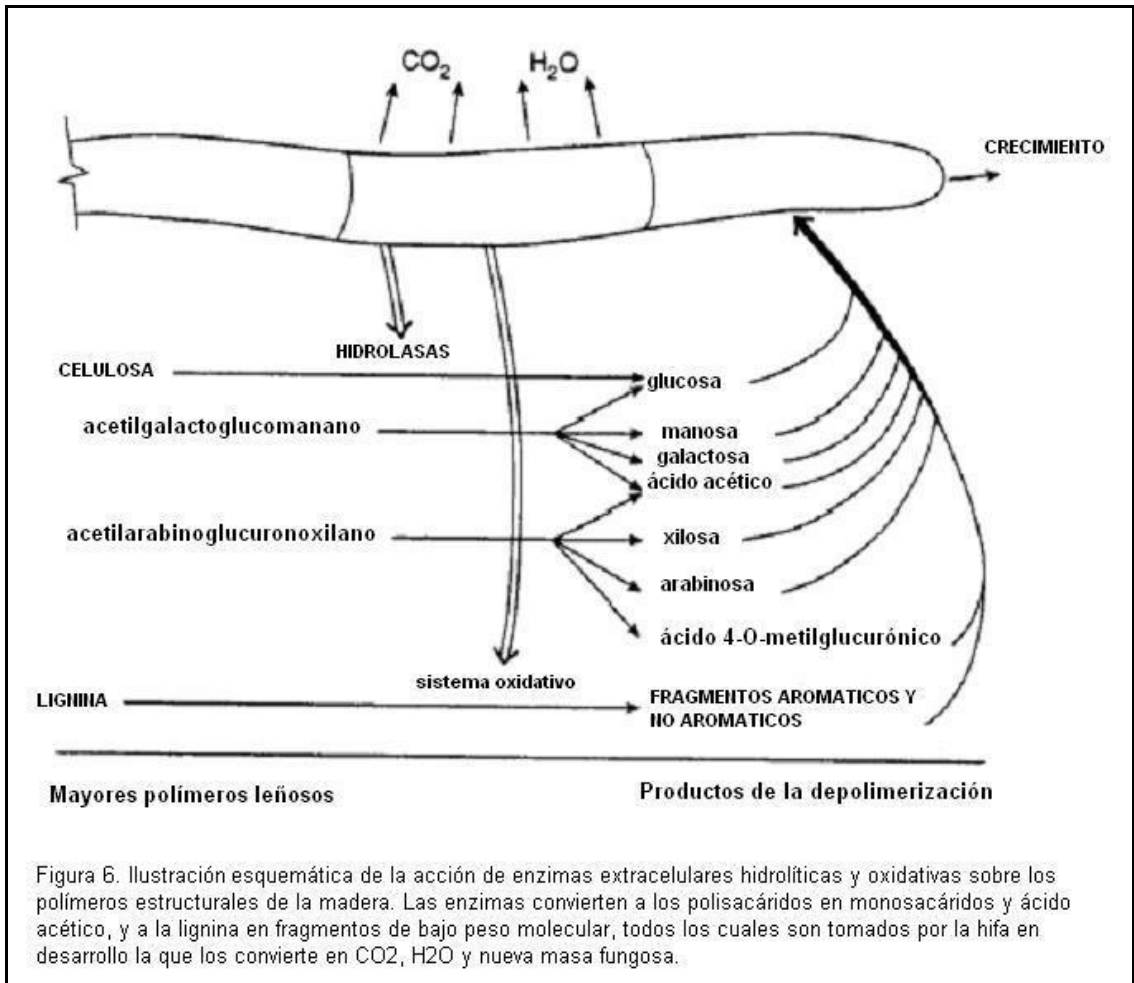
Por otra parte, la deslignificación generalmente progresa profundo en la pared celular. Lo importante es que las células mantienen su morfología. La remoción enzimática selectiva de la matriz lignina-hemicelulosa comenzaría en la superficie del lumen para exponer una mayor superficie de contacto a las enzimas, permitiendo el trabajo de ellas hacia el interior de las paredes (Kirk y Cullen, *op cit.*). Este es el patrón de degradación que se quiere aprovechar para la producción de pulpa.

En ambas formas de degradación la batería enzimática actúa sobre los componentes estructurales de la madera, pero la presencia de hifas en contacto directo con la zona afectada, no es un requisito para que se produzca la degradación (Kim y Singh, 2000).

### **2.3.2.2 Biodegradación**

La habilidad para degradar lignocelulosa eficientemente se cree que esta asociada al hábito de crecimiento del micelio, que permitiría al hongo transportar los nutrientes que escasean, por ejemplo nitrógeno y hierro, en un substrato lignocelulósico pobre en nutrientes y que constituye su fuente de carbón (Hammel, 1997).

Figura 6: Esquema de una hifa, sus enzimas extracelulares y reacciones químicas. Fuente: Kirk y Cullen, 1998.



Como se mencionó anteriormente, los HPB atacan la madera por medio de enzimas que secretan sus hifas. Esta batería enzimática es un complejo sistema de distintas sustancias capaces de degradar por etapas al polímero de lignina y a las fuentes de carbón (azúcares) que necesita para subsistir (Figura 6).

Los HPB en su evolución, han enfrentado las dificultades de degradación de la madera con peroxidadas y oxidasas extracelulares que actúan en forma no específica generando radicales libres de lignina, los cuales son inestables y sufren variadas y espontáneas reacciones de descomposición.

Las enzimas más importantes que actúan directa o indirectamente sobre la lignina son la lignina peroxidasa (LiP), la manganeso peroxidasa (MnP) y la lacasa (figura9.9).



Existe la evidencia de que las tres enzimas pueden actuar con mediadores de bajo peso molecular para posibilitar la oxidación de la lignina (Kirk y Cullen, 1998). Pero su presencia no es absoluta en los hongos de pudrición blanca. Por ejemplo, Cullen y Kersten (1996) y Hammel (1996) mencionan que no se detecta lacasa en la actividad enzimática de *P. chrisosporium*, y Srebotnik *et al.* (1997), establecen que *C. subvermispora* no utiliza Lip en su degradación. Otros autores han detallado las enzimas de algunos de los hongos más importantes para el biopulpaje, y al igual que los autores anteriores, han descubierto que no todos presentan las 3 enzimas antes mencionadas, aunque Orth *et al.* (1993), establecen que las LiP existen en casi todos los hongos lignolíticos, pero que se expresan en forma diferenciada en función de la especie. Entonces existe una variabilidad sustancial en los niveles y tipos de enzimas lignolíticas producidas por los diferentes HPB.

Investigaciones han caracterizado, en cierto grado, varios mecanismos de deslignificación de los HPB, y han demostrado que todos tienen una similitud fundamental: la dependencia de generación de radicales libres de lignina. Esto debido a que su inestabilidad química conduce, subsecuentemente, a una variedad de reacciones degradativas espontáneas (Hammel, 1996).

A continuación se describe la acción de las principales enzimas fúngicas y un esquema de su acción en la figura 7.

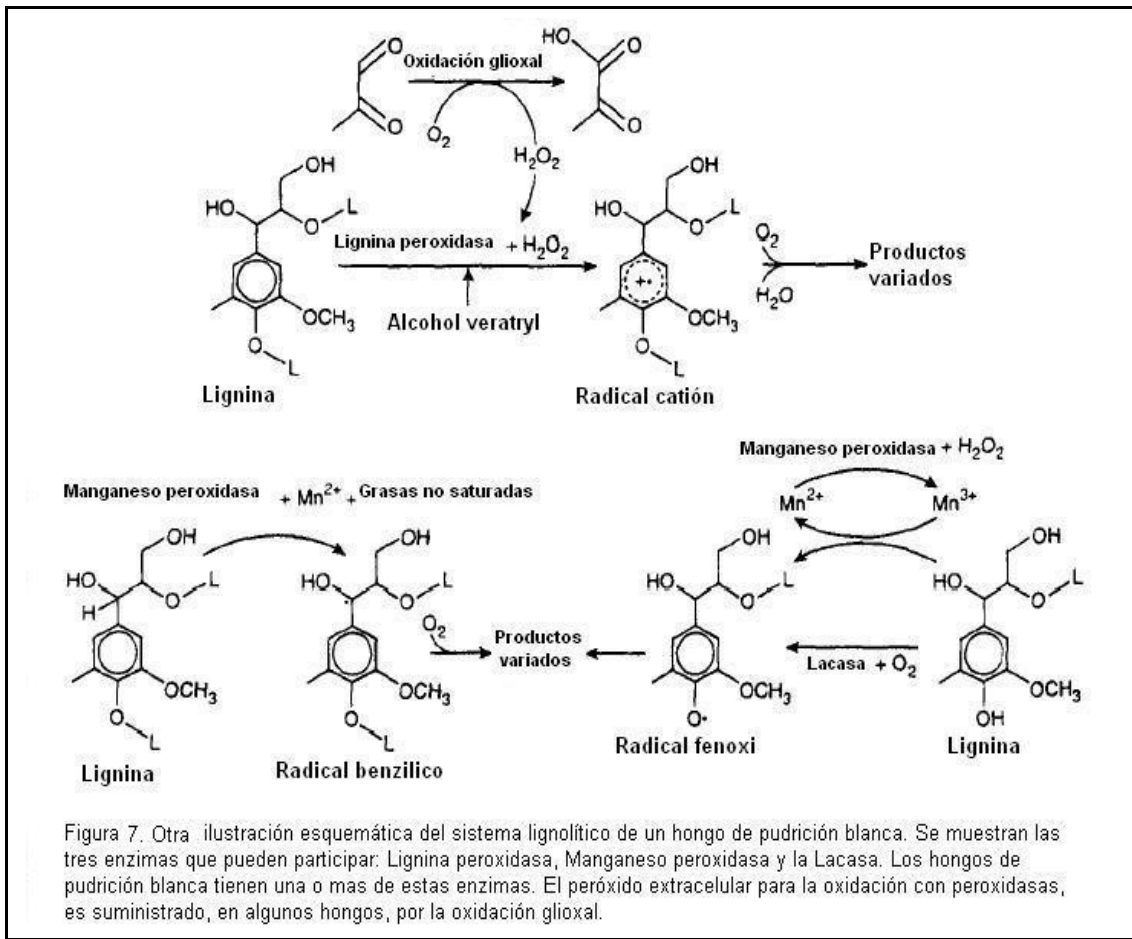
### **2.3.2.3 Lignina peroxidasas**

Las LiP tienen un peso molecular de aproximadamente 40 kilodalton (kDa), son glicosiladas, pH óptimo y operan con el típico ciclo catalítico de las peroxidasas. Así la LiP es oxidada por agua oxigenada a un intermediario llamado compuesto I, que vuelve a su estado de reposo al realizar dos oxidaciones de 1 electrón de sustratos donantes: el

término intermedio deficiente en 1 electrón se denomina compuesto II. Las LiPs son oxidantes más fuertes que las típicas peroxidasas, y consecuentemente, oxidan no solo los sustratos usuales - fenoles y aminas aromáticas - sino que una variedad de otros éteres y aromáticos policíclicos con potenciales de ionización adecuados (Kersten *et al.*, 1990 citado Hammel 1997 y Kirk y Cullen, 1998). Los sustratos aromáticos más simples para las LiP son los bencenos metoxilados y alcoholes bencílicos (Hammel, *op cit.*).

Las LiP son consideradas generalmente las primeras catalizadoras para la descomposición de las estructuras no fenólicas de la lignina (Srebotnik *et al.*, 1997). La oxidación de subestructuras de lignina catalizadas por las LiP comienza con la extracción de un electrón del anillo aromático del sustrato donante; el radical catión aril resultante, reacciona tanto como un radical o como un catión, formando una amplia variedad de fragmentos degradados. Las otras subestructuras de la lignina pueden dar paso a reacciones análogas (Kirk y Cullen, *op cit.*).

Figura 7: Esquema teórico del sistema lignolítico de un HPB. Fuente: Kirk y Cullen, 1998.



Debido a que las enzimas degradadoras de madera, incluyendo las LiP, son muy grandes para entrar por los poros de la pared celular, deben actuar sobre la lignina en las porciones expuestas en la superficie del lumen. Este *modus operandi* de degradación fúngica de la lignina se puede observar en degradaciones simultáneas, pero no es el patrón en el caso de degradadores selectivos. En la forma selectiva, los hongos de pudrición blanca remueven la lignina desde el interior de la pared celular antes que la degradación sea lo suficiente como para penetrarla. Se ha propuesto que la LiP puede actuar indirectamente oxidando sustratos de bajo peso molecular, que vuelven a penetrar la pared celular para luego oxidar el polímero (Harvey *et al.*, 1986 citado por Kirk y Cullen, 1998). El problema de asignarle un rol central a las LiPs es, como se mencionó anteriormente, que no se encuentra en todos los hongos que degradan bien la lignina, incluyendo *C. subvermispora*, que es el hongo para biopulpaje más estudiado.

Descartando este problema, la LiP es el único oxidante fúngico conocido que puede imitar eficientemente, *in vitro*, el clivaje C<sub>a</sub>-C<sub>b</sub> y el clivaje extracelular de anillos aromáticos que son característicos de la lignólisis de los hongos de pudrición blanca (Kirk y Cullen, 1998).

#### **2.3.2.4 Manganese peroxidasas**

Las MnP pueden proveer de oxidantes difusibles de bajo peso molecular (Glenn *et al.*, 1986 y Paszczyński *et al.*, 1986 citados por Kirk y Cullen, *op cit.*). Son un poco más largas que las LiP (50-60 kDa), pero al igual que las LiP, son glicosiladas y tienen un pH óptimo. A semejanza de las LiP, ellas presentan un ciclo catalítico convencional de peroxidasas, pero con Mn(II) como sustrato. El compuesto I de MnP (producto intermedio de la oxidación de 2 electrones por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) puede oxidar sustratos fenólicos o Mn(II), pero el compuesto II de MnP aparentemente es reducido sólo por Mn(II). El Mn(II) debe ser quelado por ácidos orgánicos bidentados como el glicolato o el oxalato, que estabilizan el producto Mn(III) y promueven su liberación de la enzima (Hammel, 1996). El resultante Mn(III) quelado es un oxidante difusible que puede actuar a cierta distancia de la enzima. Sin embargo, no son oxidantes fuertes y no pueden atacar las unidades persistentes no fenólicas de lignina (Hammel, *op cit.*); pueden oxidar un poco estructuras fenólicas, que son cerca del 10% de las unidades que conforman la lignina (Kirk y Cullen, *op cit.*). El Mn(III) se quelosa porque debido a su pequeño tamaño, es capaz de penetrar en la madera sana e iniciar su deslignificación para facilitar el posterior ataque del oxidante más poderoso: las LiP (Hammel, *op cit.*).

Parece poco probable que la reacción MnP-catalizada de unidades fenólicas de la lignina a radicales fenoxi pueda resultar en una depolimerización extensiva. Aun así, hongos de pudrición blanca que no poseen LiP pero tienen MnP, han demostrado poder degradar subestructuras no fenólicas de lignina (Jensen *et al.*, 1996). Este hecho apunta a otros mecanismos lignolíticos. Investigaciones recientes muestran que la producción de oxiradicales difusibles por la MnP puede ocurrir por otro mecanismo en vez de la quelación de Mn(III). En la presencia de Mn(II), la MnP promueve la peroxidación de grasas no saturadas, generando lipoxiradicales intermedios pasajeros: estos han demostrado que oxidan modelos de compuestos de lignina no fenólica. El sistema de peroxidación MnP/graso, depolimeriza tanto ligninas sintéticas fenólicas y fenólicas-

bloqueadas (metiladas), indicando que el sistema puede funcionar depolimerizando lignina en la realidad (Bao *et al.*, 1994 citado por Kirk y Cullen, 1998).

Como se mencionó anteriormente, muchos hongos lignolíticos parecen carecer de LiP, la enzima que generalmente parte las estructuras de lignina no fenólicas, recalcitrantes y más grandes. No obstante, *C. subvermispota* es capaz de degradar estas estructuras. Experimentos demostraron que depolimerizó y mineralizó rápidamente un modelo de lignina que representaba el modelo no fenólico de mayor tamaño. Este reemplazo podría llevarse a cabo cuando las MnP peroxidan ácidos grasos no saturados (Jensen *et al.*, 1996).

### **2.3.2.5 Lacasas**

Las lacasas son oxidasas azul cobre que catalizan las oxidaciones de 1-electrón de fenoles, aminas aromáticas y otras sustancias ricas en electrones. Como los Mn(III) quelados, ellas oxidan las unidades fenólicas de lignina a radicales fenoxi, que pueden llevar a la ruptura de enlaces aril-C $\alpha$  (Kawai *et al.*, 1988 citado por Kirk y Cullen, *op cit.*). Las lacasas catalizan cuatro oxidaciones consecutivas de 1-electrón para luego transferir los electrones a oxígeno molecular, reduciéndolo a agua, y volviendo la enzima a su estado natural. Las lacasas estudiadas de los hongos de pudrición blanca son de entre 60 y 80 kDa, tienen pH óptimo y son glicosiladas (Kirk y Cullen, *op cit.*).

### **2.3.3 Hibridismo**

Se trata de un concepto establecido por Donoso y González (1999) a través del cual, se postula que es factible condicionar la acción de los hongos mediante la alteración y combinación de factores ecológicos agrupados de acuerdo a su naturaleza en: físicos (T°, CH, etc.), químicos (pH, nutrición, etc.) y biológicos (naturaleza de la madera, composición química, etc.).

Este manejo debe considerar el propósito que se persigue de manera tal de determinar el tipo de factor actuante, su intensidad y su combinación óptima considerando, lógicamente, la variable respuesta previamente establecida.

Es así como el hibridismo puede, y de hecho es, altamente necesario para fines de producción de biomasa fungosa (hongos comestibles), producción de enzimas determinadas; antibiosis frente a organismos competidores (Silva, 2002), etc.

### **2.3.4 *Lentinus edodes* (Berk.) Sing.**

Sinónimos: *Lentinula edodes* (Berk.) Earle

Familia: *Polyporaceae*

Orden: *Agaricales*

Clase: *Basidiomycetes*

Phylum: *Basidiomycotina*

Su género se caracteriza por tener esporas blancas, pie (tallo) contiguo céntrico a excéntrico, bordes de agallas generalmente serrados, y una distintiva preferencia por los bosques. Su carne se compone de hifas dimíticas y tiene una alta irregularidad o células entretreídas en la trama de lamelas (Stamets y Chilton, 2000).

Es un hongo de pudrición blanca, comestible y saprófito.

Tiene un sombrero de entre 5 a 25 centímetros de ancho, hemisférico, expandido a convexo y eventualmente plano cuando maduro. Es de color café oscuro a negro en un principio, cambiando a café claro con la edad o al desecarse. El margen del sombrero es liso a irregular, enrollado en un principio, luego curvado, aplanado en la madurez y generalmente ondulado en la vejez. Lamelas blancas, desde el principio, volviéndose serradas o irregulares con la edad y cafés cuando se dañan. Tallo fibroso y de textura correosa con manchas cafés (Stamets y Chilton, op cit.). Según Rambelli (1983) el tallo es pequeño, carnoso y firme. Al rehidratarse reasume sus características morfológicas y las lamelas son decurrentes.

En forma natural se distribuye en el lejano oriente. Es nativo de Japón, Corea y China. No se conocen casos en América del Norte o Europa (Stamets y Chilton, 2000). En el oriente se lo conoce por el nombre vulgar *shiitake* (shii= latifoliada y take= hongo) y crece sobre

madera muerta de árboles de géneros como *Pasania*, *Quercus* y *Fagus* entre otros (García, 1976).

Se considera que este hongo saprófito tiene propiedades hipocolesterólicas y antitumorales (Rambelli, 1983). Estas cualidades sumadas a sus atributos comestibles lo han llevado a ser el segundo hongo mas transado en los mercados internacionales (U.S.D.A. Forest Service, 1993).

### **2.3.5 Stereum hirsutum (Willd.) Fr.**

Sinónimos: *Thelephora hirsuta* Hill., *Auricularia reflexa* Bull.

Familia: **Stereaceae**

Orden: **Aphylophorales**

Clase: **Basidiomycetes**

Phylum: **Basidiomycota**

Su género presenta especies delgadas y coriáceas, extendidos sobre la madera como una costra cuyo borde superior suele doblarse hacia afuera, sobresaliendo en visera o plataforma. Himenio más o menos liso, soportado por una capa gruesa de hifas paralelas. Esporas blancas lisas (García, op cit.).

Al igual que en el caso anterior, este es un hongo de pudrición blanca y saprófito, pero varía en cuanto su carne no se considera comestible.

**S. hirsutum** forma costras delgadas (resupinado reflexo), de contornos redondeados u ondulados y con el borde superior despegado y saliente, formando sombrerillos o viseras de pocos centímetros. Su cara superior es clara o grisácea, erizada de pelillos o pequeños mechones claros, a veces algo zonada; el borde es amarillento. La cara inferior (himenial) es lisa, amarilla o anaranjada, aunque se pone parduzca o grisácea con la edad. Suelen disponerse en grupos confluentes o imbricados (García, op cit.), que pueden medir hasta 5 cm. de anchura (Calonge, 1979). Carne coriácea, elástica, blanquecina (García, op cit.), muy delgada y sin olor ni sabor apreciable (Calonge, op cit. . Esporas claras, lisas, de 4 – 8 x 2.5 – 3.5 micras (García, op cit.).

Calonge (1979) lo describe como saprofítico y cosmopolita. Es muy frecuente todo el año sobre cualquier clase de madera, aunque prefiere la de frondosas cortadas (García, 1976.; Calonge, *op cit.*) y es extremadamente común en madera caída y ramas muertas de varias latifoliadas como roble, abedul y haya entre otras (Cartwright y Findlay, 1950). De hecho se considera que es probablemente la causa más importante de degradación de la albura de **Quercus** que son dejados sobre el suelo después de talados. Esto último sucede aún considerando que la madera es procesada en forma bastante rápida después del volteo (Cartwright y Findlay, *op cit.*). En Chile se presenta regularmente en madera rolliza de **Nothofagus** que ha permanecido durante largo tiempo en el bosque, y raramente en **P. radiata** (Butin y Peredo, 1986).

Según Hood (1992) esta especie esta cercanamente emparentada con **Stereum complicatum** y se presenta en forma natural tanto individualmente como en grandes grupos. Geográficamente, se encuentra ampliamente distribuido tanto en América como en Europa.

Con respecto a la pudrición que causa, Cartwright y Findlay (*op cit.*) describen a la madera de **Quercus** mucho más liviana en peso que la madera normal y más clara de color; blanda, pero sin deshacerse en polvo, porque mantiene cierta estructura fibrosa. La madera degradada es amarillenta a blanca. Bajo ciertas condiciones el hongo es capaz de pasar desde ramas muertas al fuste principal causando pudrición central en porciones de madera en fase de envejecimiento, pero generalmente permanece más o menos confinado a la albura de ramas pequeñas y a troncos caídos. También señalan que para un experimento de 4 meses (durabilidad natural), este hongo provocó una pérdida de peso de 15%.



## 3. MATERIAL Y METODO

### 3.1 Materiales

- ✘ Acido clorhídrico, ácido sulfúrico, hidróxido de sodio, agar-agar, extracto de malta
- ✘ Autoclave
- ✘ Balanzas de precisión (+/- 0,01 gr.)
- ✘ Bomba de vacío/presión
- ✘ Cámaras de cultivo
- ✘ Campana de flujo laminar
- ✘ Cápsulas petri
- ✘ Desecador
- ✘ Equipo menor de laboratorio (asas, pinzas, sacabocados, etc.)
- ✘ Estufas de secado
- ✘ Extractor Soxhlet
- ✘ Medidor de pH
- ✘ Molino de cuchillos Wiley y tamices
- ✘ Lupas
- ✘ Parafilm
- ✘ Vasos de precipitado
- ✘ Cepas de hongos de *Lentinus edodes* y *Stereum hirsutum* obtenidas de la micoteca del Laboratorio de Biodeterioro y Preservación del Departamento de Tecnología de la Madera
- ✘ 216 probetas de *Pinus radiata* y 216 probetas *Eucalyptus globulus* de dimensiones dadas por la norma NF x 41-502 (3x1x0,5 cm).
- ✘ Software STATGRAPHICS Plus for Windows Version 4.1

Las probetas para análisis, fueron obtenidas a partir de material entregado por Forestal Celco y corresponden a la primera troza de ambas especies. Los diámetros de las piezas bordeaban los 35 cm, por lo que se asume presencia de duramen. De las 216 probetas, 108 corresponderán a albura (madera de baja densidad) y 108 a duramen (madera de alta densidad) para cada especie.

**Foto 1: Campana de flujo laminar.**



**Foto 2: Una de las cámaras de clima.**



## 3.2 Método

El trabajo de esta memoria se realizó íntegramente en los laboratorios de Biodeterioro y Preservación y con apoyo del Laboratorio de Química de la Madera, ambos pertenecientes al Departamento de Ingeniería de la Madera de la Facultad de Ciencias Forestales de la Universidad de Chile.

De acuerdo a los objetivos específicos planteados en esta memoria, la metodología se puede separar en dos partes: etapa de obtención de óptimos de crecimiento y etapa de biodeterioro.

### 3.2.1 Etapa de obtención de óptimos de crecimiento de los hongos de ensayo

Para cumplir el objetivo, primeramente se confeccionó el medio de cultivo de agar-malta al 2% y 3% (peso/volumen) respectivamente, con tres pH distintos: 5 - 6 y 7. Esto se logró aplicando al medio de cultivo, ácido clorhídrico o hidróxido de sodio (ambos al 4%), para acidificar o hacer más básico el medio, según correspondiera. Después se dosificaron 10 ml. aproximadamente del medio de cultivo, ya diferenciado por pH, a cada cápsula para luego llevarlas a la autoclave y proceder a la esterilización (20 min a 15lb/pul<sup>2</sup>). Cumplido el paso anterior, comenzó el trabajo en la campana de flujo laminar, en la cual se inocularon las cápsulas con las cepas de hongos (un hongo por cada cápsula y en su centro). Estando las cápsulas listas con el hongo en su medio de prueba, fueron selladas con parafilm y ubicadas en las cámaras de clima. Las cápsulas fueron manipuladas de forma que los hongos se desarrollaron bajo tres temperaturas distintas: 20°, 25°, y 30° Celsius (tabla 5).

**Tabla 5: Resumen de factores y niveles del primer experimento.**

Factor	Hongo	T°	pH	Repeticiones	Total (cáps)
Niveles	2 especies	20°, 25° y 30°	5, 6 y 7	3	54

Las observaciones de crecimiento, se llevaron a cabo diariamente, marcando en la misma cápsula el avance del hongo. Esto es posible ya que las cápsulas son transparentes y el

hongo es fácilmente observable. El hongo realiza generalmente la invasión del medio en forma radial.

El tratamiento que dio las condiciones para la ocupación más rápida de la superficie de la cápsula, para cada hongo por separado, fue considerado el mejor y son esos niveles de pH y T° los que serán usados en el segundo objetivo. Los valores a comparar, son obtenidos de la media obtenida de las 3 repeticiones.

### **3.2.2 Etapa de biodeterioro**

Luego de obtenido los resultados del primer objetivo, se repitieron los primeros pasos hasta el punto en que cada cápsula, se encontró con la superficie del medio de cultivo completamente cubierto de hongo.

Las variables de pH y temperatura con las que se manejó esta fase, fueron las obtenidas en el objetivo anterior (óptimos).

Se confeccionaron las probetas de madera, bajo la norma AFNOR NF x 41-502 correspondientes a las dos especies forestales y a los dos tipos de madera a evaluar (albura y duramen); y a cada una se le determinó el volumen húmedo. Luego se procedió a medir el peso anhidro de cada una de las probetas a usar. Con los datos de las probetas ya listos, se las clasificó según su densidad básica (peso seco/ volumen húmedo); para efectos prácticos se consideró como alta densidad (duramen) a todas las probetas que se encontraron sobre la densidad media observada y de la misma forma se clasificó a las probetas de baja densidad (albura). Esta segmentación por densidades se realizó como forma de representación de la naturaleza biológica de la madera (albura y duramen), puesto que en general se reconoce que la madera de duramen es de mayor densidad que la de albura. Dentro de cada bloque de densidad, se las ordenó de forma aleatoria, y se las llevó al contenido de humedad requerido. Para el caso los contenidos de humedad a probar son 40% y 60%, medidos en base a peso húmedo.

Después de esto, se esterilizaron las probetas (20 min a 15lb/pul<sup>2</sup>). Posteriormente en la campana de flujo laminar, se procedió a la siembra de las probetas en las cápsulas con el

cultivo de hongos. El número de probetas usadas fue de 3 por cápsula y distribuidas sobre una *U* de vidrio (Fotos 3 y 4). Por último se colocaron en la cámara de clima, dejándolas ahí el tiempo que el tratamiento especificaba y a la temperatura óptima, previamente establecida.

**Foto 3: Cápsula cubierta de micelio.**



**Foto 4: Ubicación de las probetas de madera.**



El número total de probetas fue 432 que corresponde al factorial de la siguiente tabla.

**Tabla 6: Resumen de factores y niveles del segundo experimento.**

Factor	Hongo	Sp. forestal	Nat. biológica	CH	Tiempo	Repeticiones	Total (caps)
Niveles	2	2	2	2	3	3	144

Transcurrido los tiempos de prueba de 15, 30 y 45 días, se retiraron las probetas para someterlas a mediciones de peso seco y así cuantificar la pérdida de masa para estimar el biodeterioro. Dicha pérdida o variación de peso se expresó en forma de porcentaje.

Luego de ser obtenidos y tabulados los resultados, se efectuó un análisis de varianza (ANDEVA) factorial (2x3) para determinar diferencias significativas entre resultados de los tratamientos efectuados. En los casos en que existieron diferencias, se procedió a realizar la prueba de comparación múltiple de medias de Duncan, para identificar los tratamientos que realmente tuvieron diferencias estadísticas.

Se ocupó el siguiente modelo estadístico para el análisis de varianza.

$$y_{ijk} = \mu + \alpha_i + \beta_j + (\alpha\beta)_{ij} + \varepsilon_{ijk}$$

con  $i = 1, \dots, a$ ;  $j = 1, \dots, b$ ;  $k = 1, \dots, n$

donde:

$$\sum \alpha_i = \sum \beta_j = \sum \sum (\alpha\beta)_{ij} = 0$$

$\mu$ : media global

$\alpha_i$ : efecto del  $i$ -ésimo nivel del factor  $\alpha$

$\beta_j$ : efecto del  $j$ -ésimo nivel del factor  $\beta$

$(\alpha\beta)_{ij}$ : efecto de interacción para el  $i$ -ésimo nivel del factor  $\alpha$  y el  $j$ -ésimo nivel del factor  $\beta$

$\varepsilon_{ijk}$ : efecto del  $k$ -ésimo error aleatorio en el tratamiento  $ij$

### 3.2.3 Etapa de determinación de lignina en madera biodegradada

Se efectuaron determinaciones químicas para contar con una aproximación de la capacidad lignívora de estos hongos. Las observaciones se efectuaron sobre las muestras extremos del objetivo anterior. Esto es, sobre las repeticiones que tuvieron mayor y menor pérdida de peso, para las dos especies forestales con sus respectivas densidades y los dos hongos en cuestión, además de testigos para realizar la comparación. No se efectuó un análisis estadístico.

Como paso previo, las muestras de madera a analizar, fueron molidas y tamizadas hasta lograr la granulometría adecuada (0,18 a 0,25 mm.). Posteriormente el aserrín de madera fue tratado para retirar los extraíbles mediante sucesivos lavados con hexano, etanol y agua. La lixiviación se efectuó con extractores soxhlet durante un tiempo de 4 horas por cada solvente.

La metodología utilizada para la determinación química, es la descrita por la norma ASTM D 1106-56, que regula la obtención de la lignina Klason de una muestra de madera mediante la utilización de ácido sulfúrico a una concentración del 72%.

## 4. RESULTADOS Y DISCUSION

## 4.1 Óptimos de crecimiento

Completado los tiempos propuestos de evaluación, se obtuvieron los siguientes resultados para cada especie fungosa por separado, en relación a los dos factores ecológicos evaluados.

### 4.1.1 *Stereum hirsutum*

En el ensayo realizado para establecer los óptimos de crecimiento modificando los niveles de los factores ambientales ( $T^{\circ}$  y pH), se observa que en el caso de *S. hirsutum* (Tabla 7), la combinación de éstos que favorece un crecimiento más rápido es  $T^{\circ}= 25^{\circ}$  C y pH 6. Bajo éste régimen, el micelio crece y ocupa toda la superficie de la cápsula en tan solo una semana. De forma opuesta, un pH 7 y  $T^{\circ}= 30^{\circ}$  C, dan las peores condiciones de crecimiento.

Tabla 7: Tiempo de colonización de cápsula por hongo *S. hirsutum* bajo distintos niveles de pH y  $T^{\circ}$ .

Temperatura	20			25			30		
pH	5	6	7	5	6	7	5	6	7
Media de días	10	9	9,33	8	7	8	19	15	26,5

La media de crecimiento del tratamiento que dio el crecimiento más rápido alcanza los 12,8 mm/día. Esta tasa de crecimiento es menor a la observada por Cartwright y Findlay (1950), que constataron un máximo de 20 mm/día a  $25^{\circ}$  C sobre el mismo medio de cultivo sin indicar el pH. La diferencia en las tasas de crecimiento se puede deber a la procedencia del micelio o cepa, que como se mencionó anteriormente tiene un importante efecto sobre el comportamiento del hongo, y a su manejo en la micoteca.

La temperatura óptima concuerda con la obtenida por Silva (2002), que también obtuvo  $25^{\circ}$  C y obviamente con la de los autores recién mencionados en el párrafo anterior.

Con respecto al pH, Silva (2002) obtuvo un valor óptimo de 5,5, que es levemente inferior al establecido en este estudio. Existe una congruencia entre estos valores en vista de que en esta experiencia, a diferencia de la de Silva, no se trabajó con intervalos menores de pH.

En general, la mayoría de los tratamientos ensayados con esta especie culminaron (ocupación total de la cápsula) como máximo a los 10 días, mientras que todos los ensayos a 30° C tuvieron un desarrollo más lento, dándose el caso de que en algunas repeticiones el micelio detuvo casi totalmente su crecimiento y no alcanzó a llenar la cápsula al cabo de 6 semanas. En estos casos se podría pronosticar que el avance del hongo se detendría completamente, considerando que el medio de cultivo tenía una importante reducción (visual) del contenido humedad, factor que a esa altura de la experiencia es completamente determinante, pese a mantener selladas las cápsulas.

Con respecto a la relevancia de los factores utilizados, se puede apreciar que existe una mayor influencia de la temperatura que del pH sobre el crecimiento del micelio (en los niveles evaluados). El tratamiento que ocupó los niveles óptimos, superó tan sólo en un día al tratamiento  $T^{\circ}= 25^{\circ} \text{ C}$  y pH 5 y al tratamiento con la misma temperatura pero con pH 7. A su vez todos pertenecen al nivel de 25° C. A temperatura mayor, el hongo disminuyó fuertemente su crecimiento y es probable que el crecimiento se hubiese detenido si es que se hubiese extendido el tiempo de prueba. Según Cartwright y Findlay (1950) este hongo crece hasta con temperaturas de 37° C, pero al observar el desarrollo de esta cepa en particular, bajo los niveles de temperatura probados, se puede inferir que difícilmente este hongo podría llegar a soportar semejantes valores medios de  $T^{\circ}$ . Si se lo considera como un valor máximo y no prolongado en el tiempo, es probable que 37° C sea su límite de tolerancia. Por el contrario en el caso del pH, la variación, en los niveles evaluados, no modificó en forma sustantiva el crecimiento del hongo, excepto en la combinación  $T^{\circ}= 30^{\circ} \text{ C}$  y pH 7.

#### **4.1.2 *Lentinus edodes***

En el caso de *L. edodes*, el tratamiento que tuvo la combinación de factores ambientales bajo los cuales el hongo creció más rápido, fue el que combinó una temperatura de 25° C y un pH 5. Con estas condiciones el tiempo medio que requirió el micelio para llenar la



cápsula fue de 21,3 días (Tabla 8). Este tratamiento tuvo una media de crecimiento que llegó a los 4,23 mm/día.

**Tabla 8: Tiempo de colonización de cápsula por hongo *S. hirsutum* bajo distintos niveles de pH y T°.**

Temperatura	20			25			30		
pH	5	6	7	5	6	7	5	6	7
Media de días	27,3	28	25,3	<b>21,3</b>	25,3	25,3	---	---	---

Existen variadas publicaciones en medios escritos y electrónicos que hablan del cultivo del *shiitake*, debido a las ya mencionadas cualidades comestibles, y no hay un consenso en un valor óptimo de T°. Es por eso que existen también variadas recomendaciones sobre sus condiciones óptimas de crecimiento. En general se recomiendan temperaturas en rangos bastante amplios. Por ejemplo Stamets y Chilton (1983) recomiendan temperaturas entre 21° C y 27° C para el crecimiento del micelio y Leatham (1982) temperaturas entre 15° C y 28° C. Esta variación, seguramente obedece a que se trabaja con distintas cepas u orígenes, lo que produce una alta variabilidad en los resultados y posteriores recomendaciones.

En este caso, el período de crecimiento se prolongó como máximo hasta los 31 días y la mayoría ya había ocupado todo el espacio disponible a los 26 días. En este marco, el crecimiento del tratamiento con T°= 25° C y pH 5, superó con creces los rendimientos del hongo bajo las otras condiciones.

Si en el caso del hongo anterior la temperatura se consideró como el factor de mayor relevancia, acá se puede apreciar que es totalmente determinante. Es notable como al nivel de temperatura de 30° C el hongo simplemente no se desarrolló, mientras que el crecimiento del micelio bajo el nivel medio de temperatura, fue superior al del nivel más bajo de temperatura.

También de forma similar a *S. hirsutum*, las variaciones en los niveles de pH produjeron una escasa variación en el tiempo requerido para la ocupación total y no se observa una preferencia del hongo hacia un medio más ácido o más básico. No obstante, se aprecia que *S. hirsutum* logra las mayores velocidades de crecimiento con un pH 6.

Es probable que con niveles más extremos de pH y T°, si se aprecien diferencias en el desarrollo micelar en ambas especies fungosas.

Bajo las condiciones anteriormente descritas, se pudo apreciar que el HPB *S. hirsutum* tiene una tasa de crecimiento en sus primeros estadios de desarrollo que aproximadamente triplica a la del hongo *L. edodes*.

## 4.2 Pérdida de peso

En esta etapa de determinación de pérdidas de peso y ponderación de los tratamientos en estudio, se realizaron 8 análisis de varianza (ANDEVA) con los valores porcentuales obtenidos del pesaje de todas las probetas tratadas. Los sustratos sobre los cuales los hongos fueron aplicados son 4, correspondientes a los distintos tipos de madera: duramen de pino, albura de pino, duramen de eucalipto y albura de eucalipto. Por lo tanto, considerando las 2 especies fungosas, tenemos 8 experimentos distintos y cada uno con sus fuentes de variación (factores).

En lo referente al análisis estadístico, se debe considerar que el nivel de significación utilizado tanto para el ANDEVA como para la prueba de comparaciones múltiples de Duncan es  $p < 0,05$ . Además, en la eventualidad de que la interacción entre los factores sea significativa, el análisis posterior se centrará sólo sobre este caso (la interacción), puesto que el análisis sobre los factores en forma individual (cuando además existe una interacción entre ellos), tiene otras interpretaciones no útiles en esta investigación. Cuando se hable de efecto o no efecto de algún factor, se debe entender que dicha aseveración tiene significancia estadística.

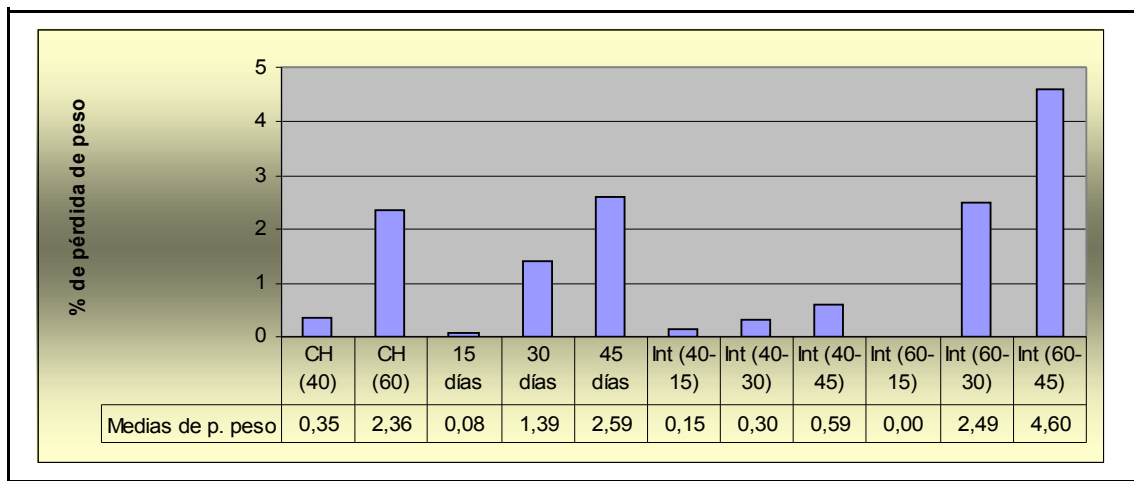
Los valores se expresarán como porcentajes medios de pérdida de peso. Las tablas que resumen los análisis de varianza y las pruebas de Duncan, se pueden consultar en las secciones de apéndice 1 y 2.

Las densidades básicas medias observadas fueron de  $0,650 \text{ gr/cm}^3$  y  $0,452 \text{ gr/cm}^3$ , para *E. globulus* y *P. radiata* respectivamente. Los valores límites para la latifoliada fueron  $0,558 \text{ gr/cm}^3$  y  $0,773 \text{ gr/cm}^3$  mientras que para la conífera alcanzaron  $0,324 \text{ gr/cm}^3$  en su límite inferior y  $0,565 \text{ gr/cm}^3$  en su cota superior.

## 4.2.1 Duramen de pino tratado con *L. edodes*

El duramen de pino tiene una densidad básica superior a 0,452 gr/cm<sup>3</sup>. En esta experiencia, se puede observar que los factores evaluados modifican la magnitud del ataque del hongo a la madera, tanto en forma individual o aislada (CH y Tpo), como cuando interactúan entre sí (CH x Tpo).

Gráfico 1: Porcentaje de pérdida de peso medio en duramen de pino con *L. edodes*.

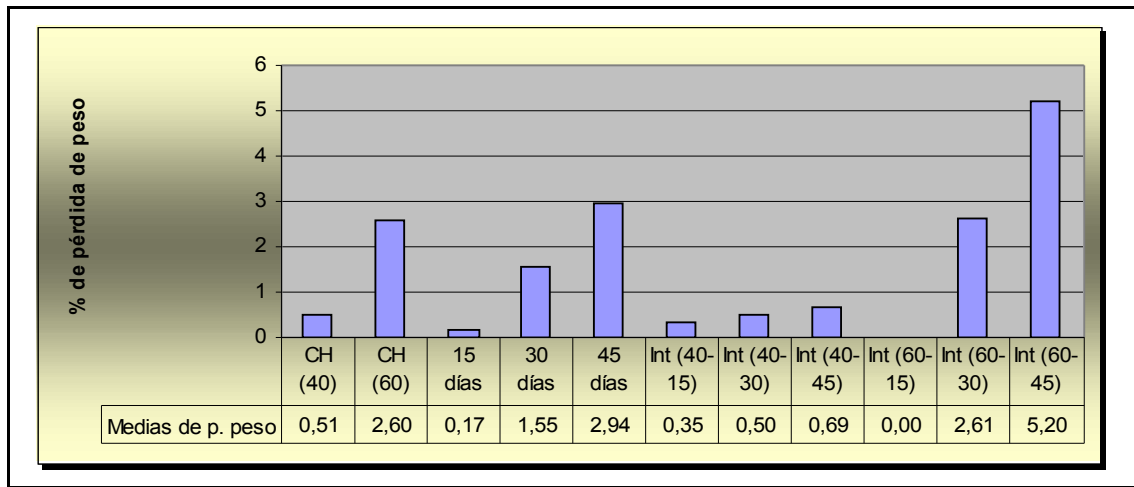


Al observar el test de Duncan (Apéndice 8.2, tabla 18), se observa que sólo los tratamientos 60-45 y 60-30, son distintos al resto de las otras medias de la interacción y a su vez distintos entre sí. Para este caso, se observó un porcentaje de pérdida de peso medio de 1,35%, aunque el valor máximo llegó a los 4,60%, en el tratamiento de 45 días y 60% de CH (Gráfico 1).

## 4.2.2 Albura de pino tratada con *L. edodes*

La albura de pino tiene una densidad básica menor a 0,452 gr/cm<sup>3</sup>. Se repite el caso anterior, y los dos factores estudiados en forma independiente, además de su interacción, arrojan diferencias estadísticas. El tratamiento que dio la mayor pérdida de peso, fue el que tuvo las probetas con un contenido de humedad de 60% y que se extendió por 45 días (Gráfico 2).

**Gráfico 2: Porcentaje de pérdida de peso medio en albura de pino con *L. edodes*.**

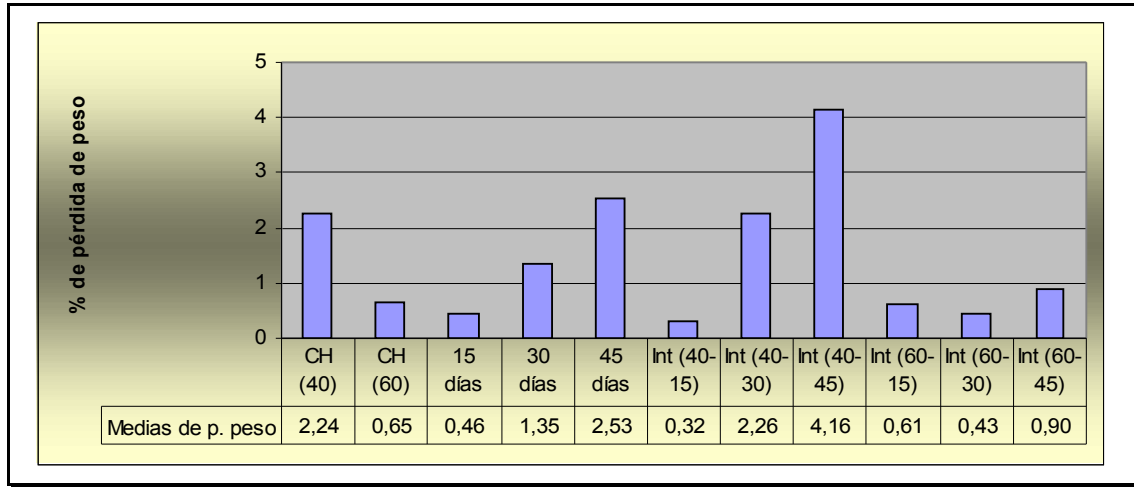


Bajo la prueba Duncan (Apéndice 8.2, tabla 19), se observa que también son los mismos tratamientos los que se diferencian del resto de las medias (60-45 y 60-30), y que a su vez mantienen una diferencia entre sí. La pérdida de peso media para este experimento es de 1,56% y la combinación de 45 días y 60% de CH, estableció la mayor diferencia.

#### **4.2.3 Duramen de pino tratado con *S. hirsutum***

La madera de alta densidad de pino que fue tratada con el HPB *S. hirsutum*, mantiene el comportamiento anterior y las variables de contenido de humedad y tiempo de tratamiento, interactúan entre sí sobre la variable dependiente. En este caso, el tratamiento que arrojó la mayor pérdida de peso (4,16%) es el de 45 días de tratamiento pero que comenzó con un CH de 40%. Este tratamiento tiene diferencias estadísticas con todos los otros tratamientos y aquel de 40-30 se diferenció de los tres tratamientos que menos degradaron la madera (Apéndice 8.2, tabla 20). A saber, este tratamiento tuvo una disminución de peso media de 2,26%, y también comenzó con un CH de 40%.

**Gráfico 3: Porcentaje de pérdida de peso medio en duramen de pino con *S. hirsutum*.**

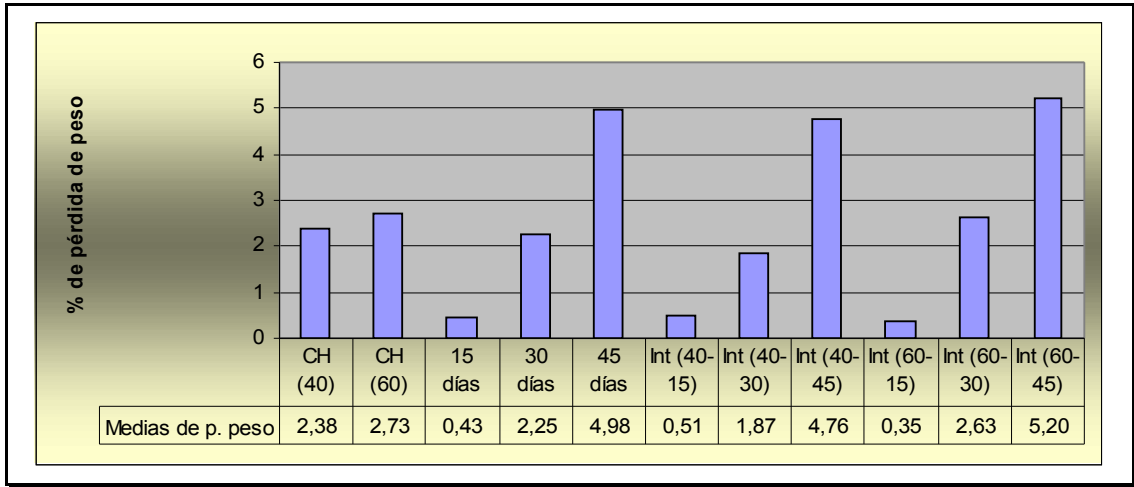


Este caso se diferencia de todos los demás en que es el único en que la biodegradación se vio favorecida con un contenido de humedad menor. Se puede observar en el gráfico 3, que la media para el contenido de humedad de 40% es muy superior a la del CH= 60%.

#### **4.2.4 Albura de pino tratada con *S. hirsutum***

En este caso, se destaca el hecho que las variables no interactúan entre sí. Eso sí, al considerar a los factores en forma individual, todos los niveles evaluados consignaron diferencias estadísticas entre sí. Esto significa que los dos niveles de CH se diferenciaron, particularmente en el factor tiempo. De hecho, en este factor las tres medias difieren estadísticamente entre sí (Apéndice 8.2, tabla 21). La variación de peso observada para el tratamiento de 45 días, fue de  $9,83 \times 10^{-2}$  gr. o en forma equivalente un 4,98%. Cabe notar que, aunque la interacción no arrojó diferencias estadísticas, el tratamiento que en mayor medida alteró el peso de la madera, fue el tratamiento de 45 días y 60% de CH (Gráfico 4).

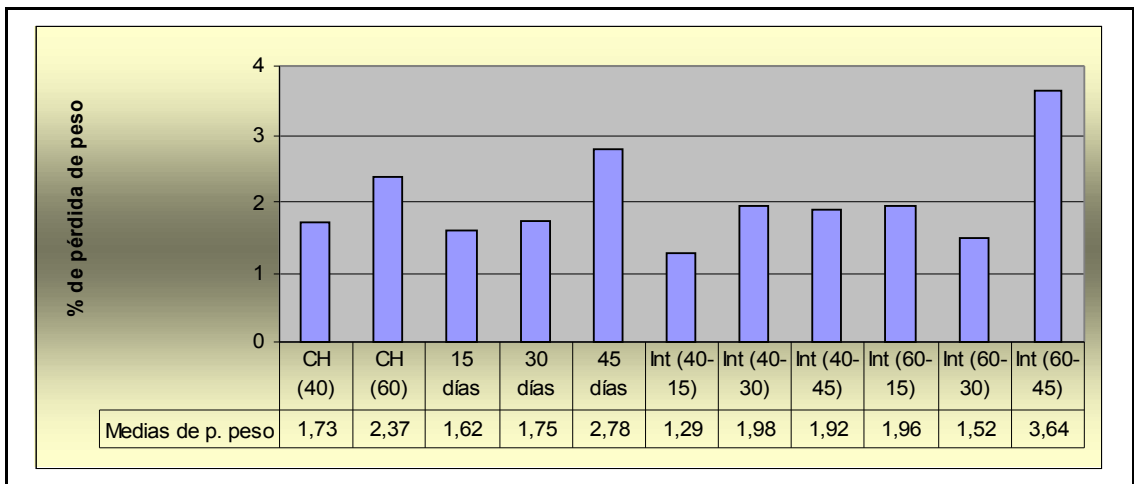
Gráfico 4: Porcentaje de pérdida de peso medio en albura de pino con *S. hirsutum*.



#### 4.2.5 Duramen de eucalipto tratado con *L. edodes*

El duramen de eucalipto tiene una densidad básica superior a 0,650 gr/cm<sup>3</sup>. En el análisis estadístico aplicado a la madera de eucalipto de alta densidad, sometida a la acción del hongo *L. edodes*, se concluyó que las variables evaluadas tienen un comportamiento aditivo entre si, o lo que es lo mismo, no interactúan. Al igual que en el caso anterior, se procedió a observar la diferencia entre los niveles de los factores en forma individual. Los niveles de CH, mantuvieron una diferencia, y en el caso del tiempo, la media del tratamiento de 45 días, fue la que se diferenció del resto de las medias (Apéndice 8.2, tabla 22).

Gráfico 5: Porcentaje de pérdida de peso medio en duramen de eucalipto con *L. edodes*.

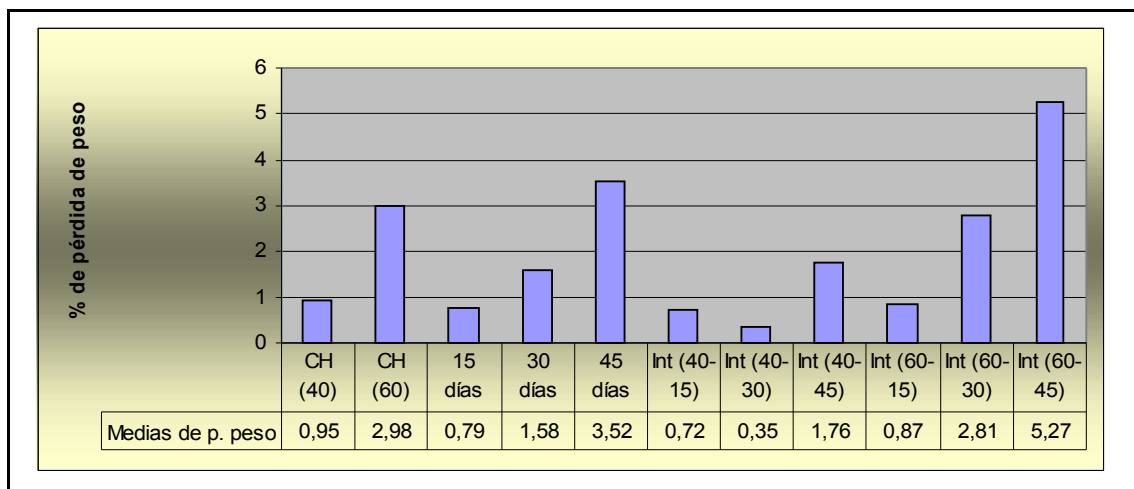


No obstante la aditividad entre los factores estudiados, el tratamiento de CH= 60% y T= 45 (Gráfico 5), fue el que arrojó la mayor diferencia porcentual de peso (3,64%). Es notable en este caso, que la influencia del tiempo disminuya sobre la variable respuesta. Obsérvese que las columnas 7, 8 y 9 del gráfico 5, comprenden toda la amplitud de valores del factor tiempo, y aunque incluye un valor diferente de CH, es notoria la existencia de una mínima diferencia entre los valores de madera biodegradada.

#### 4.2.6 Albura de eucalipto tratada con *L. edodes*

La albura de eucalipto tiene una densidad básica menor a 0,650 gr/cm<sup>3</sup>. Como en casos anteriores, se aprecia una interacción positiva entre las variables probadas y también se repiten los tratamientos de mayor influencia. Para este caso en particular, el tratamiento 60-45 superó a todos los demás (manteniendo diferencia estadística con el resto) y lo secundó el tratamiento 60-30 que sólo se igualó estadísticamente al tratamiento 40-45 (Apéndice 8.2, tabla 23).

Gráfico 6: Porcentaje de pérdida de peso medio en albura de eucalipto con *L. edodes*.

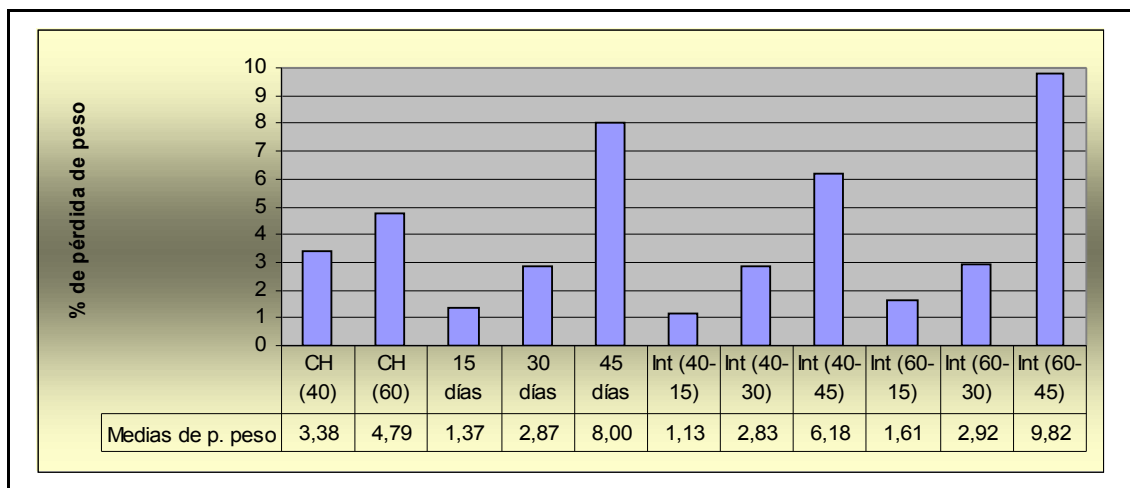


La media de 5,27% del tratamiento 60-45 (Gráfico 6), equivale en la realidad a una disminución de masa de 0,143 gr. como promedio, y la pérdida de peso media total del hongo *L. edodes* sobre la albura de eucalipto fue de 1,97%. Este es el valor medio observado más pequeño, de todas las pruebas en que se utilizó esta latifoliada como sustrato de crecimiento.

#### 4.2.7 Duramen de eucalipto tratado con *S. hirsutum*

Este es el único caso en que las variables no interactuaron y en que el único factor que generó diferencias estadísticas fue el tiempo (Apéndice 8.1, tabla 16). El tercer nivel, el que corresponde a una duración de 45 días, se diferenció de los otros dos niveles bajo prueba y el porcentaje de 8,00% corresponde a una reducción media de masa de 0,245 gr. Del mismo modo el tiempo de prueba de 30 días también se diferenció del T= 15 (Apéndice 8.2, tabla 24).

Gráfico 7: Porcentaje de pérdida de peso medio en duramen de eucalipto con *S. hirsutum*.



Este experimento arrojó los valores medios porcentuales más altos de pérdida de peso de todos los experimentos realizados. Se puede observar en el gráfico 7, que la media de la variable T=45 días tiene un 8,00%, y esto se ve reflejado en que el tratamiento que comprende la interacción 60-45, alcanza una disminución de 9,82%. Este valor casi triplica al mayor tratamiento observado en eucalipto de alta densidad, pero con *L. edodes*.

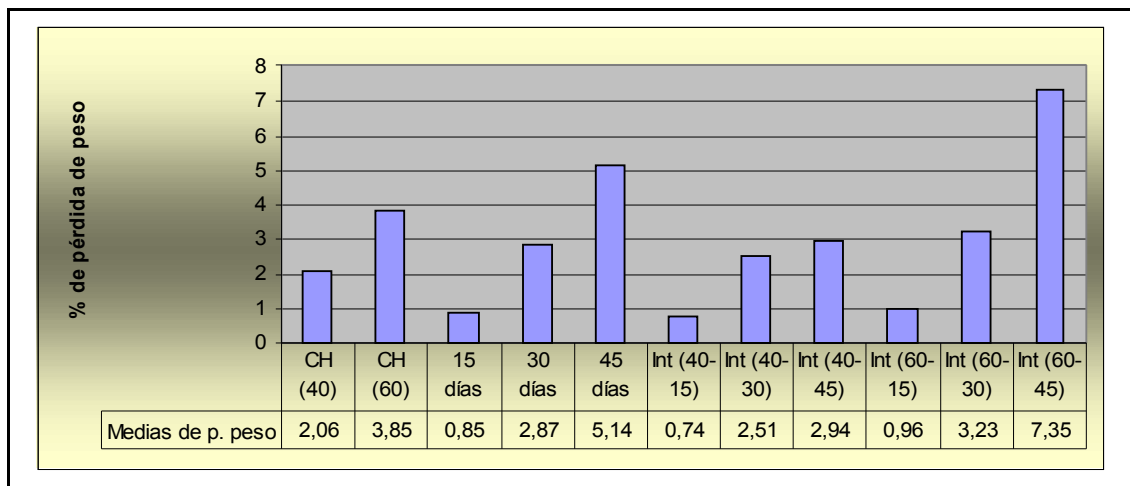
#### 4.2.8 Albura de eucalipto tratada con *S. hirsutum*

Por último, se vuelve a observar la interacción positiva entre los factores sobre la madera de eucalipto de baja densidad, y se vuelven a repetir los niveles de mayor influencia dentro de los estadísticamente diferentes: 60-45 contra todas las medias y 60-30 contra las 2 menores (Apéndice 8.2, tabla 25).



Este caso también se destaca por el alto porcentaje de madera degradada en la interacción 60-45, que es de 7,35%, y que es un poco inferior al caso anterior, en que sólo varía la densidad de la madera (Gráfico 8).

**Gráfico 8: Porcentaje de pérdida de peso medio en albura de eucalipto con *S. hirsutum*.**



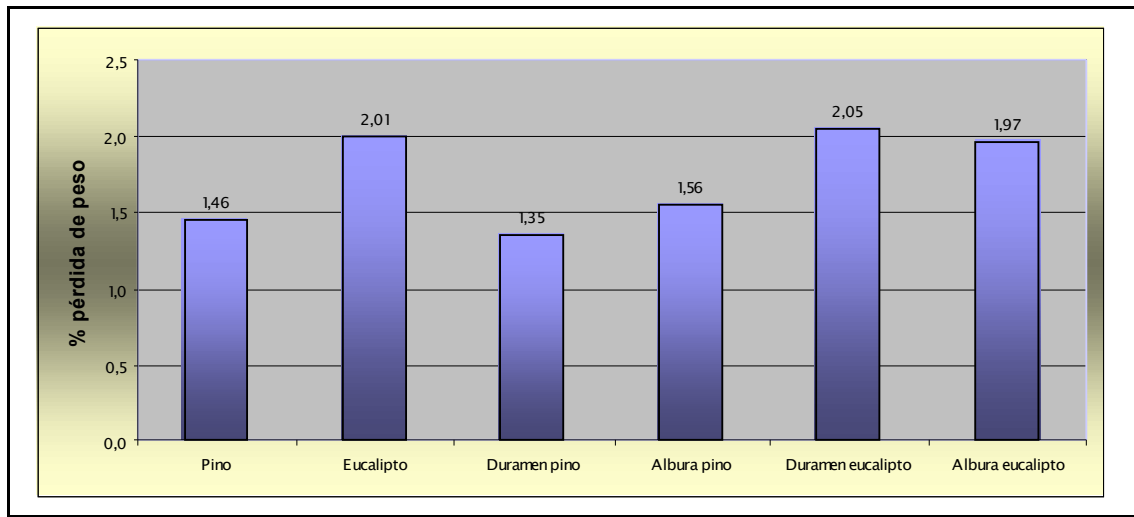
En general se puede observar que los dos HPB probados en esta memoria, modificaron el peso de ambos sustratos evidenciando una biodegradación. No siempre los factores interactuaron en forma positiva, pero si se aumenta la amplitud de los niveles de los factores evaluados, es probable que siempre exista una interacción entre ellos.

#### 4.2.9 Análisis del biodeterioro

Al observar el gráfico 9, se puede apreciar que la especie fungosa *L. edodes* realiza una mayor biodegradación en la madera de eucalipto que en la conífera, comportamiento esperado al considerar su hábitat natural de desarrollo y que también fue observado por Oriaran *et al.*, (1989). Cuando se considera también la influencia de la madera de albura o de duramen, se puede observar un comportamiento disímil entre las dos especies sustrato. Se podría esperar una mayor pérdida de peso en la madera de albura (debido a su menor densidad), como sucede con el pino, pero en la madera de eucalipto se da lo contrario. En todo caso, las diferencias entre las maderas de eucalipto es casi nula y esta

supuesta incongruencia en los resultados se podría deber a errores propios del experimento (presencia de anillos de crecimiento y mediciones y paralaje, entre otros).

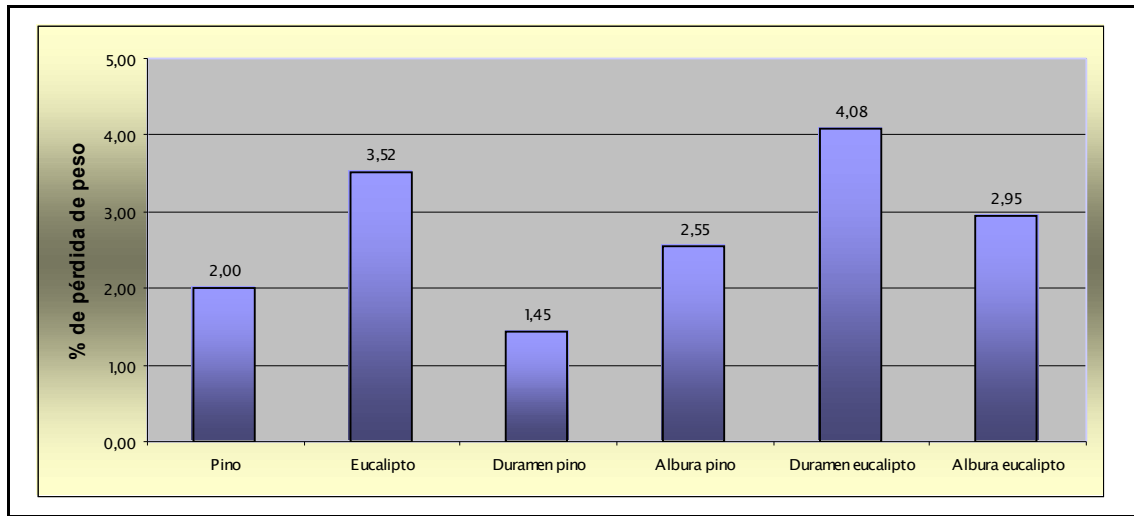
**Gráfico 9: Porcentajes medios de pérdida de peso para *L. edodes* en los distintos sustratos.**



Si se observa el comportamiento de *S. hirsutum* (Gráfico 10), se aprecia fácilmente que presenta fuertes diferencias en el biodeterioro pero sin un patrón fijo en relación al tipo de madera, ya que cuando actuó sobre pino degradó un 76% más en el caso de la madera de albura en comparación a la de duramen, y a la inversa cuando lo hizo sobre eucalipto, la madera de duramen tuvo un 38% más de pérdida de peso que la madera de albura.

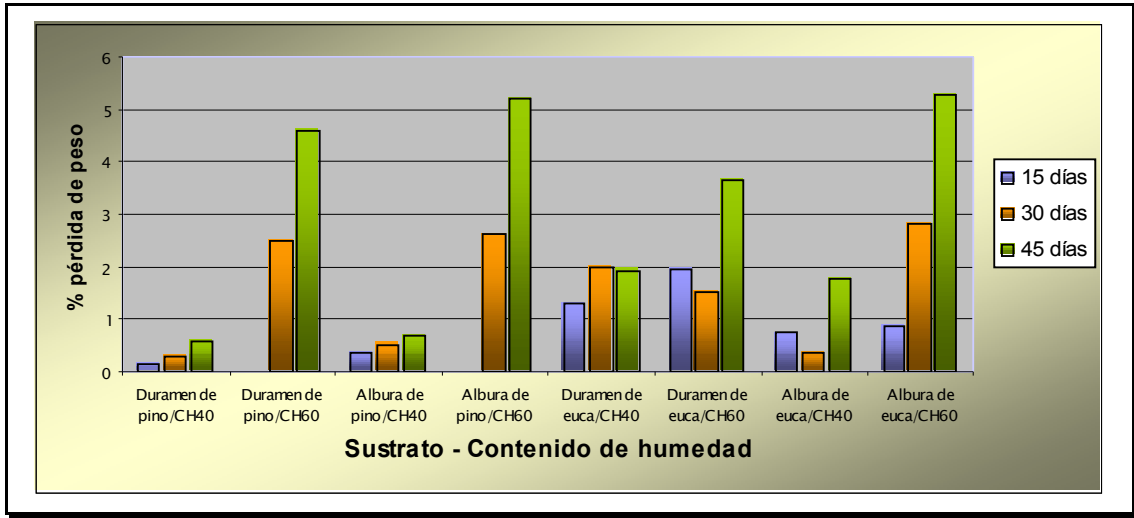
Los hongos se movilizan a través de los espacios naturales de la madera (lúmen celular) y a través de espacios creados por la degradación que ellos mismos provocan. Por lo tanto, se podría esperar que en la madera de albura hubiese mayor degradación, ya que el hongo tendría una mayor facilidad de movimiento. Además, la presencia de parénquima en esta madera, con sustancias de fácil absorción para el hongo, permite una colonización más rápida y con un mayor beneficio energético para el hongo. Se suma a esto que la madera duraminizada, tiene una mayor acumulación de extraíbles (Sjöström, 1993), entre otros, que le otorgan una mayor durabilidad natural. Estas suposiciones se confirman sólo para el pino como sustrato, ya que en el caso del eucalipto sucede lo contrario, especialmente con el HPB *S. hirsutum*. Es por esto que cabe la posibilidad de que el material considerado como duramen de eucalipto no sea en realidad duramen, es decir, la densidad no sería un buen factor de disgregación entre albura y duramen.

Gráfico 10: Porcentajes medios de pérdida de peso para *S. hirsutum* en los distintos sustratos.



Al analizar la influencia de los factores tiempo y contenido de humedad (Gráficos 11, 12, 13 y 14), se puede observar que en general existe un aumento del biodeterioro cuando los niveles de los mencionados factores aumentan. Es así como el tratamiento de 45 días y 60% de contenido de humedad inicial, es en casi todos los casos la combinación de factores que dio una mayor biodegradación. Esta situación se dio para ambas especies de HPB a excepción del caso de *S. hirsutum* sobre duramen de pino (Gráfico 3). En ese experimento el biodeterioro fue superior transcurridos 45 días de tratamiento pero con un contenido de humedad de 40%. Con respecto a la variable tiempo, se confirma lo observado por Oriaran *et al.* (1989) en *L. edodes*, Levin y Agueda (1998) en *T. trogii* y lo que sucede en forma natural, en cuanto a que a mayor cantidad de tiempo de acción del hongo, es mayor la biodegradación sufrida por la madera en los primeros meses de deterioro. Es frecuente encontrar un comportamiento exponencial en la curva de degradación, en este caso sucede lo mismo. En el período entre 15 y 30 días, *L. edodes* aumentó la biodegradación a una tasa diaria de 0,06%, mientras que en el período 30-45 días, aumentó a una tasa de 0,092%. Considerando los mismos períodos de análisis, *S. hirsutum*, sufrió un aumento en su tasa diaria de pérdida de peso medio de 0,1% a 0,18%. Si consideramos una tasa media de crecimiento, *L. edodes* y *S. hirsutum* lograron 0,076% y 0,14% respectivamente.

**Gráfico 11: Porcentajes medios de pérdida de peso para *L. edodes* en los distintos tiempos.**



Al considerar los efectos de las dos especies de HPB sobre la madera, en general se da el caso para un mismo contenido de humedad, el biodeterioro aumenta cuando aumenta el nivel del factor tiempo. Sucede lo mismo cuando aumenta el contenido de humedad dentro de un mismo tiempo, o sea, generalmente existe un aumento del biodeterioro, pero no es una condición que se cumpla en todos los casos.

**Gráfico 12: Porcentajes medios de pérdida de peso para *S. hirsutum* en los distintos tiempos.**

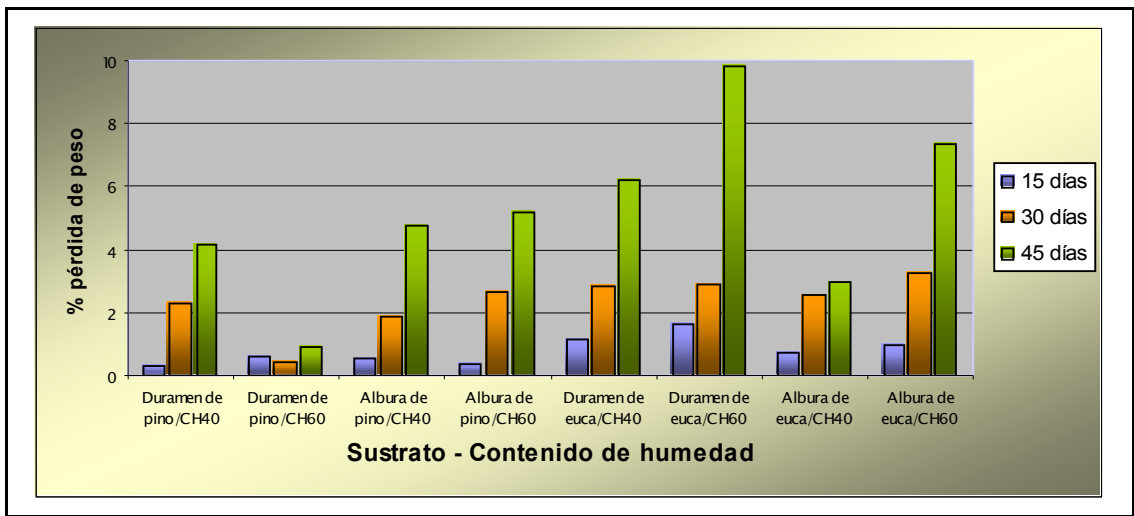
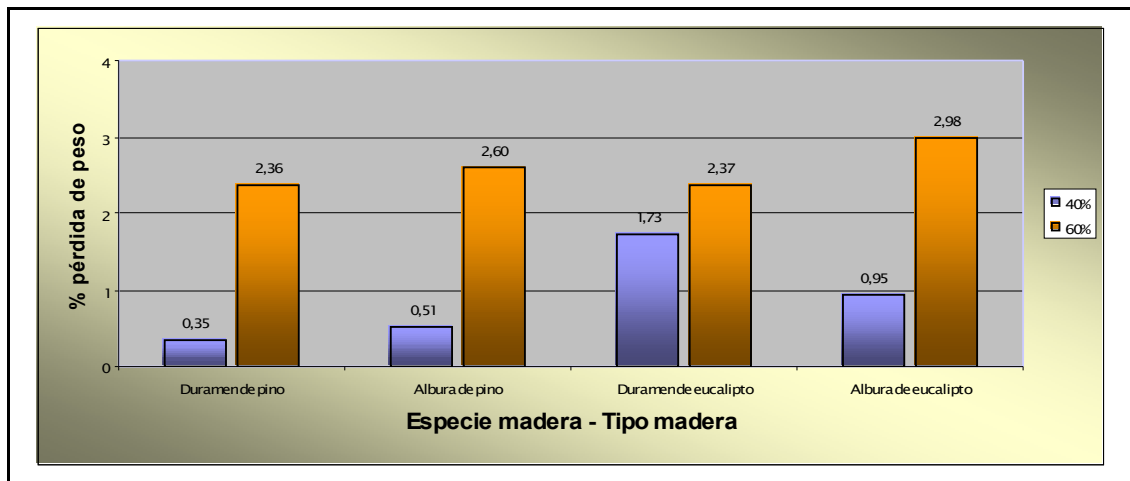
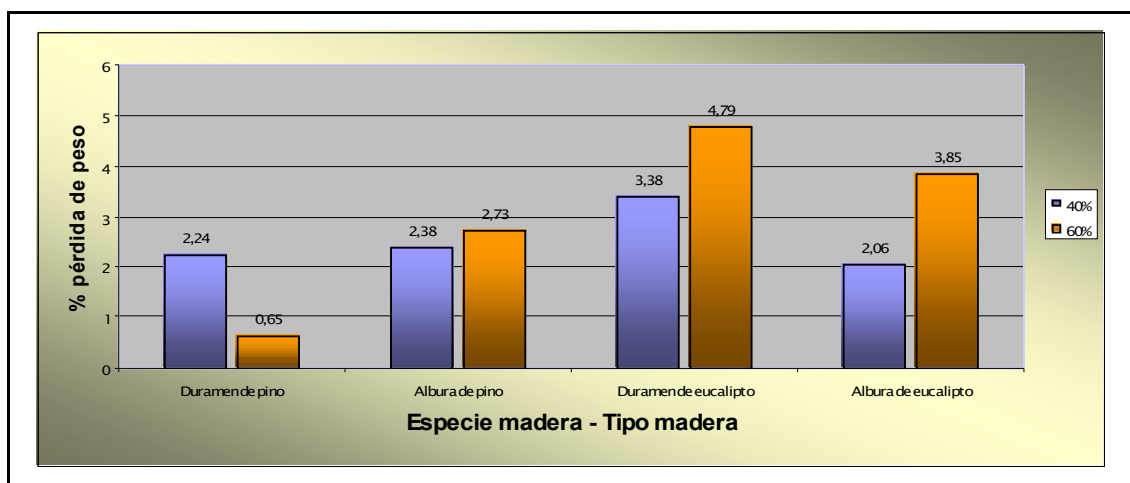


Gráfico 13: Porcentajes medios de pérdida de peso para *L. edodes* con distintos contenidos de humedad.



Al observar el efecto del aumento del contenido de humedad (Gráficos 13 y 14), se aprecia que el hongo *L. edodes* tuvo un comportamiento bastante definido y con un mayor biodeterioro en 60% de CH. En cambio, *S. hirsutum* tuvo un comportamiento un poco menos marcado y hasta opuesto cuando degradó duramen de pino.

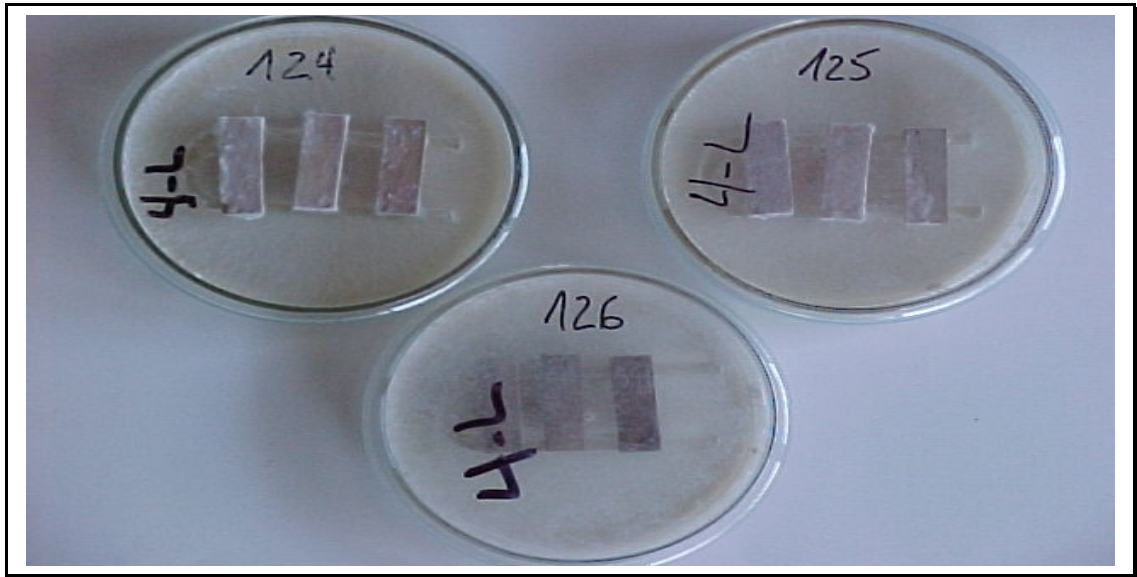
Gráfico 14: Porcentajes medios de pérdida de peso para *S. hirsutum* con distintos contenidos de humedad.



Los valores máximos de degradación del hongo *S. hirsutum* son 9,82% y 7,35% en el caso de duramen y albura de eucalipto respectivamente y 5,2% y 4,12% en el caso de la albura y el duramen de pino respectivamente. Para el hongo *L. edodes* se estableció una pérdida de peso máxima de 5,27% para la albura de la latifoliada y de 3,64% para el

duramen, mientras que en pino produjo un 5,2% de pérdida de peso en la albura y un 4,6% en el duramen. Estos valores son muy semejantes al 5% obtenido con *C. subvermispora* sobre madera de pino por Akhtar *et al.* (1992c) citado por Fisher *et al.*, (1994). Existe una preferencia notoria por la madera de eucalipto en el caso de *S. hirsutum*, no así *L. edodes*, que se comportó de forma similar en ambas especies forestales. Se puede apreciar en la foto 4 el estado visual en que queda el ensayo experimental, al final del tiempo de prueba.

Foto 4: Vista del tratamiento de duramen de pino con *L. edodes*, al cabo de 45 días y 60% de CH inicial.



### 4.3 Análisis químico

Las determinaciones de lignina se realizaron sobre las maderas que obtuvieron los valores extremos (mayor y menor degradación) en el objetivo anterior. Es por esto que existen dos mediciones para cada especie atacada con un hongo en particular. Las identificaciones se modificarán y quedarán de la siguiente forma:

- P4> = Albura de pino atacada por **L. edodes** con tratamiento 60-45
- P4< = Duramen de pino atacado por **L. edodes** con tratamiento 40-15
- P5> = Albura de pino atacada por **S. hirsutum** con tratamiento 60-45
- P5< = Duramen de pino atacado por **S. hirsutum** con tratamiento 40-15
- E4> = Albura de eucalipto atacada por **L. edodes** con tratamiento 60-45
- E4< = Albura de eucalipto atacada por **L. edodes** con tratamiento 40-30
- E5> = Duramen de eucalipto atacada por **S. hirsutum** con tratamiento 60-45
- E5< = Albura de eucalipto atacada por **S. hirsutum** con tratamiento 40-15
- TPD = Testigo de duramen de pino
- TPA = Testigo de albura de pino
- TED = Testigo de duramen de eucalipto
- TEA = Testigo de albura de eucalipto

El análisis del contenido de lignina se realizó sobre muestras libres de los extraíbles de la madera. La siguiente tabla muestra el efecto de los hongos tanto sobre esta fracción de la madera como también sobre la lignina. Las variaciones se expresan en relación a los testigos. Los resultados sobre la lignina son una media calculada a partir de 3 repeticiones.

**Tabla 9: Contenido y variación de extraíbles y lignina en las muestras observadas.**

	% de	% de	% de Lignina	% de
--	------	------	--------------	------

	Extraíbles	variación		variación
P4>	5,85	173,36	24,58	- 0,24
P4<	4,78	151,58	24,41	- 0,49
P5>	6,71	213,55	24,03	- 2,48
P5<	3,67	93,16	24,35	- 0,69
E4>	4,75	51,76	18,56	- 18,81
E4<	2,47	- 21,09	16,86	- 26,25
E5>	7,83	150,16	16,98	- 25,72
E5<	4,17	33,23	18,13	- 20,69
TPD	1,9	---	24,52	---
TPA	2,14	---	24,64	---
TED	6,39	---	19,04	---
TEA	3,13	---	22,86	---

### 4.3.1 Contenido de extraíbles

Los valores de los extraíbles obtenidos de las muestras testigo de pino son entre un 5% y un 19% superiores al 1,8% observado por Mansilla *et al.* (1991) y mucho mayores al 1,5% que presenta Fengel y Wegener (1984), pero los testigos de eucalipto tienen una mayor diferencia entre sí y también con respecto a lo presentado en el estudio de Mansilla *et al.* (op. cit.) (5,1%). Esto posiblemente puede deberse a la influencia del muestreo ya que al no contar con una cantidad mayor de material (repeticiones), los errores de este tipo aumentan su influencia sobre el total. Se puede apreciar en la tabla 9, que la cantidad de extraíbles que presenta el pino, son mayores tanto en las muestras tratadas con *L. edodes* como con *S. hirsutum*. Para la madera de alta densidad, P4< tiene un poco más de 2,5 veces la cantidad de extraíbles del testigo, mientras que P5< tiene un poco menos que el doble de estos elementos. En el caso de la madera de pino de baja densidad los valores son aún mayores. La muestra P4> tiene 2,73 veces la cantidad de extraíbles del testigo y P5> tuvo más del triple de extraíbles que el testigo. En los casos de las maderas de eucalipto tratadas con los HPB, las cantidades de los extraíbles, en comparación con los testigos, variaron entre 0,79 y 2,5 veces.

Desde el punto de vista de la especie fungosa, *S. hirsutum* superó levemente a *L. edodes* en el aumento de la cantidad de extraíbles presentes en las muestras de madera después del biodeterioro. En ambos casos se puede apreciar una concordancia entre la cantidad de extraíbles presente en las maderas y la cantidad de masa perdida por la acción fúngica. O sea que para ambas especies leñosas, e independientemente del HPB que las atacó, se observa una proporcionalidad directa entre la severidad del ataque o cantidad de biodeterioro y la cantidad de extraíbles. Esta relación se repite en otras



investigaciones sobre biopulpaje como en Oriaran *et al.* (1989), y según este autor, podría atribuirse a la actividad oxidativa de fenoles y a otros productos derivados de la degradación. Olea (2002) nota un aumento en los contenidos de extraíbles al aumentar los tiempos de acción fúngica y Gómez (1995) también detecta aumentos de esta fracción de la madera.

### 4.3.2 Contenido de lignina

Ahora, al observar la cantidad de lignina de las muestras testigo (Tabla 9), para el pino se aprecia un valor levemente inferior a lo mencionado por otros autores (Mansilla *et al.*, 1991; Fengel y Wegener, 1984; Sjöström, 1993) que dan valores en torno al 27%, mientras que en el caso del eucalipto, los valores están cercanos al rango observado por Mansilla *et al.* (*op cit.*) y Sjöström (*op cit.*) que determinaron valores de 20% y 21,9% respectivamente.

Al contrastar las maderas de pino con sus respectivos testigos, se aprecia que los valores no fueron modificados en gran forma y la mayor variación la alcanzó la muestra P5> con un 2,48% de disminución frente a las demás muestras que no alcanzaron a llegar al 1%. Pero en el caso de la madera eucalipto se puede apreciar que todos los tratamientos tuvieron efectos mucho mayores que en el caso del pino, superando el 26% de reducción de lignina en el tratamiento E4<.

Una situación especial se da al comparar los casos P4 y E4. En ambas especies atacadas por *L. edodes*, se nota que el tratamiento más agresivo en la etapa de biodeterioro tuvo una reducción de lignina muy inferior en comparación al menos agresivo. Esto no sucede con *S. hirsutum* que mantuvo una relación proporcional con la pérdida de biomasa.

En Cartwright y Findlay (1950), Campbell determinó que *S. hirsutum* redujo el contenido de lignina del aserrín de *Quercus sp.*, en un 26,98% desde 21,5% a 15,7%, después de ser tratado durante 13 meses, y Oriaran *et al.* (1989) observaron que sobre chips pulpables de *Quercus rubra*, *L. edodes* redujo el contenido de lignina en un 1,31% después de 1 mes de tratamiento mientras que sobre los chips de *Picea glauca* la reducción alcanzó a un 3%. En una escala similar de tiempo (40 días) con respecto a la presente memoria, Olea (2002) obtiene como máximo un 7,77% de reducción de lignina al

tratar trozas de pino con el hongo 24P, y Galvez (2001) ocupando el mismo sustrato, pero con los hongos *P. ostreatus* y *C. subvermispora*, no encontró variaciones significativas. En este punto, es probable que el aumento del tiempo de biopulpaje, aumente la cantidad de lignina degradada, y por lo tanto, sean alternativa real para un futuro proceso industrial.

Ambas especies fungosas utilizadas en esta memoria, han sido descritas como hongos que en forma natural se encuentran sobre latifoliadas como las del género *Quercus*, y esto se puede apreciar en la tabla 6 donde las reducciones de lignina son mucho mayores en eucalipto que en pino. Sobre la conífera degradaron como máximo un 2,48% de la lignina, mientras que en la latifoliada el tratamiento que arrojó la menor variación de lignina superó el 18%. Esta selectividad, característica de estos hongos, puede ser aprovechada en el proyecto FONDEF D02I-1086, de la Universidad de Chile, que actualmente esta investigando el biopulpaje en madera de eucalipto.

## 5. CONCLUSIONES

✘ Tanto *S. hirsutum* como *L. edodes* se ven afectados en su desarrollo por los niveles de pH y T° del medio de cultivo. Para ambas especies, la influencia de la temperatura es mayor que la influencia del pH en relación al crecimiento. Para la primera especie los

valores óptimos de crecimiento son T= 25° C y pH 6, mientras que para la segunda especie son T= 25° C y pH 5.

✘Las dos HPB bajo prueba son capaces de provocar un biodeterioro, evidenciado por una pérdida de peso de la madera de ***P. radiata*** y de ***E. globulus***. Este deterioro es mayor en la latifoliada en comparación con la conífera.

✘Los porcentajes máximos de biodegradación de ***L. edodes*** y ***S. hirsutum*** sobre madera de eucalipto son 5,27% y 9,82% respectivamente y sobre madera de pino es de 5,2% para ambas especies, para este ensayo de 45 días de exposición.

✘Las maderas de albura y duramen son biodegradadas en forma similar por el HPB ***L. edodes***. Mientras que en el caso de ***S. hirsutum***, se aprecian fuertes diferencias entre el tipo de madera utilizada como sustrato. En ambas especies de HPB, existe una leve tendencia a degradar más el duramen en el caso del eucalipto, y la albura en el caso del pino.

✘De acuerdo a lo observado y concluido en el punto anterior, es probable que la densidad no sea una buena variable predictora de duramen y albura en eucalipto.

✘En relación al tiempo del tratamiento, en ambas especies fungosas se da que mientras mayor es el tiempo de duración, mayor es la biodegradación.

✘El mismo comportamiento del punto anterior se manifiesta en relación al contenido de humedad inicial del sustrato, en que a mayor CH, mayor biodegradación.

✘Los HPB bajo prueba alteran la composición química de la madera tanto en la cantidad de extraíbles como en la cantidad de lignina. ***S. hirsutum***, redujo la cantidad de lignina en la albura de pino en un 2,48% mientras que en duramen lo hizo en un 0,69%. La mayor reducción sobre eucalipto es de 25,72%. Por su parte, ***L. edodes*** redujo la lignina de pino en 0,24% y 0,49% para la albura y duramen respectivamente, y sobre la albura de eucalipto alcanzó a degradar como máximo 26,25%.

## **6. RECOMENDACIONES**

En virtud de los resultados arrojados por esta investigación, el memorante recomienda profundizar el estudio de ambos HPB para los objetivos de biopulpaje, y en especial utilizando la madera de eucalipto como sustrato.

También se recomienda aumentar la escala de tiempo de prueba y la determinación en profundidad de los efectos químicos del biopulpaje sobre esta especie.

Por último, es necesario llevar a cabo pruebas de pulpaje, para determinar cuales son los efectos que estos tratamientos tienen sobre los productos de celulosa y papel que se confeccionan a partir de esta materia prima.

## **7. BIBLIOGRAFIA**

ADLER, E. 1977. Lignin chemistry — past, present and future. *Wood Science and Technology*, 11:169-218.

AGRIOS, G. 1996. Fitopatología. Ed. Limusa. Bogotá. Colombia. 838 p.

AHMED, A.; SCOTT, G.; AKHTAR, M. y MYERS, G. 1998. BioKraft pulping of Kenaf and its blechability. En: 1998 TAPPI proceedings north american nonwood fiber symposium. Atlanta, Georgia. USDA Forest Service and USDA Biobased Products Coordintarion Council. pp. 231-238.

ALERT, C. 2002. Influencia de los esquemas de manejo en el peso específico y largo de fibra en madera de Pinus radiata (D. Don). Memoria de Ingeniero Forestal. Universidad de Chile. Santiago, Chile. 66p.

AKHTAR, M.; KIRK, T. K. y BLANCHETTE, R. A. 1996. Biopulping: An overview of consortia research. En: PROCEEDINGS OF the 6th International Conference on Biotechnology in the Pulp and Paper Industry: Advances in Applied and Fundamental Research. pp. 187-192.

AKHTAR, M.; BLANCHETTE, A. y KIRK, T. 1997a. Fungal delignification and biomechanical pulping of wood. En: SCHEPER, T. (Ed.). Advances in biochemical engineering/biotechnology, Vol. 57. Springer-Verlag. Berlin. Alemania. pp. 159-195.

AKHTAR, M.; SCOTT, G.; LENTZ, M.; HORN, E.; SWANEY, R.; KIRK, T. y SHIPLEY, D. 1997b. Meeting biological and engineering challenges during scale-up of biopulping. En: 1997 BIOLOGICAL Sciences Symposium. October 19-23, 1997. San Francisco Marriott. San Francisco, CA. E.E.U.U. TAPPI. pp. 35-39.

AKHTAR, M.; BLANCHETTE, R.; MYERS, G. y KIRK T. 1998a. An overview of biomechanical pulping research. En: YOUNG, R. y AKHTAR, M. (Eds.). Environmentally friendly technologies for the pulp and paper industry. John Wiley & Sons, Inc. pp. 309-340.

AKHTAR, M.; LENTZ, M.; SWANEY, R.; SCOTT, G.; HORN, E. y KIRK, T. 1998b. Biopulping: technology learned from the nature that gives back to nature. En: TECHNOLOGY TRANSFER Society: proceedings of the 1998 annual summit. Chicago, Illinois. pp. 149-157.

AKHTAR, M.; SCOTT, G.; SWANEY, R. y KIRK, T. 1998c. Overview of biomechanical and biochemical pulping research. En: ERIKSSON, K. y CAVACO-PAULO, A. (Eds.). Enzyme applications in fiber processing. Ed. American Chemical Society, Washington, DC. E.E.U.U. pp. 15-26. (ACS symposium series).

BEHRENDT, C.; BLANCHETTE, R.; AKHTAR, M.; ENEBAK, S.; IVERSON, S. y WILLIAMS, D. 2000. Biomechanical pulping with *Phlebiopsis gigantea* reduced energy consumption and increased paper strength. TAPPI Journal, 83(9): 65.

BEHRENDT, C. y BLANCHETTE, R. 2001. Biological control of blur stain in pulpwood: mechanisms of control used by *Phebiopsis gigantea*. Holzforschung, 55 (3): 238-245.

BLANCHETTE, R.; OTJEN, L.; EFFLAND, M. y ESLYN, W. 1985. Changes in structural and chemical components of wood delignified by fungi. Wood Science and Technology, 19: 35-46.

BLANCHETTE, R.; FARREL, R.; BURNES, T.; WENDLER, P. ; ZIMMERMAN, W.; BRUSH, T. y SNYDER, R. 1992. Biological control of pitch in pulp and paper production by *Ophiostoma piliferum*. Tappi Journal, 75(12): 102-106.

BLANCHETTE, R.; BEHRENDT, C.; WILLIAMS, D. y IVERSON, S. 1998. A new approach to effective biopulping: treating logs with *Phlebiopsis gigantea*. En: 7<sup>th</sup> INTERNATIONAL conference on biotechnology in the pulp and paper industry. Hyatt Regency Hotel. Vancouver, BC Canada. pp. s.p. (oral presentatios Vol. A)

BRUSH, T.; FARREL, R. y HO, C. 1994. Biodegradation of wood extractives from southern yellow pine by *Ophiostoma piliferum*. Tappi Journal, 77(1): 155-159.

BURDSALL JR., H. 1998. Taxonomy of Industrially Important White-Rot Fungi. En: Environmentally Friendly Technologies for the Pulp and Paper Industry, edited by Raymond A. Young and Masood Akhtar ISBN 0-471-15770-8 © 1998 John Wiley & Sons, Inc.

BUTIN, H. y PEREDO, H. 1986. Hongos parásitos en coníferas de América del Sur, con especial referencia a Chile. Bibliotheca Mycológica. Ed. J. Cramer. Berlin. Stuttgart. 100p.

CALONGE, F. 1979. Setas (Hongos) Guía ilustrada. Ed. Mundi-Prensa. Madrid, España. 315p.

CARTWRIGHT, K. y FINDLAY, W. 1950. Decay of Timber and its Prevention. Ed. Chemical Publishing Co. Inc. N.Y. U.S.A. 294p.

CULLEN, D. y KERSTEN, P.J. 1996. Enzymology and molecular biology of lignin degradation. En: BRAMBL, R. y MARZLUF, G.A. (Eds.). The mycota III: biochemistry and molecular biology. Springer-Verlag. Berlin. Alemania. pp. 295-312.

CHEN, Y.; SCHMIDT, E. y OLSEN, K. 1999. A biopulping fungus in compression-baled, nonsterile green pine chips enhancing Kraft and refiner pulping. Wood and Fiber Science, 31(4): 376-384.

DONALDSON, L. 1991. Seasonal changes in lignin distribution during tracheid development in *Pinus radiata* D. Don. Wood Science and Technology, 25: 15-24.

DONOSO, J.; ROSENDE, R.; ULLOA, I. y CUEVAS, E. 1989. Estudio de mortalidad de árboles en la pampa del tamarugal. Documento de trabajo N° 26. Proyecto CONAF/PNUD/FAO-CHI/83/017. Santiago de Chile. 74p.

DONOSO, J. y GONZALEZ, J. 1999. Influence of ecological factors in the behavior of white decay fungi. En: 53rd APPITA Annual Conference. Rotorua, New Zeland. 1: 75-78.

ERIKSSON, K. E. 1990. Biotechnology in the pulp and paper industry. Wood Science and Technology, 24: 79-101.

FENGEL, D. y WEGENER, G. 1984. Wood: chemistry, ultrastructure, reactions. Walter de Gruyter & Co. Berlin. Alemania. 613 p.



FISCHER, K.; AKHTAR, M.; BLANCHETTE, R.; BURNES, T.; MESSNER, K. y KIRK, T. 1994. Reduction of resin content in wood chips during experimental biological pulping processes. *Holzforschung*, 48(4): 285-290.

GALVEZ, N. 2001. Composición química de la madera de *Pinus radiata* D. Don alterada por hongos de pudrición blanca. Memoria de Ingeniero Forestal. Facultad de Ciencias Forestales, Universidad de Chile. Santiago. 67p.

GARCIA, M. 1976. Hongos de la Madera. Ed. Gráficas Agenjo S.A. Madrid. España. 243p.

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 pulpaje Kraft. Tesis de Magister en Ciencias Forestales. Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales. Universidad de Chile. Santiago. 83p.

GOMEZ-ALARCON, G.; FIGUERAS, M. y SAIZ-JIMENEZ. 1991. Degradation of pine kraft lignin by *Corioliopsis gallica* growing on a fibre-glass support. *Wood Science and Technology*, 25: 91-97.

GONZALEZ, J.; DE LA MAZA, C. y ALEXANDROFF, M. 1996. Coeficientes de contaminación generados por la industria forestal en Chile. En: ACTAS VII reunión de investigación y desarrollo de productos forestales. Parque Ferial Fisa. Santiago. Programa bosque nativo, D.T.I., U. de Chile, Manufacturera de Fibropaneles Trupan S.A. 472p.

GONZALEZ, J.; DONOSO, J.; ALLISON, B. y VALENZUELA, C. 2002. Biotechnologies for Kraft pulp production: results of experiences in Chile and future perspectives. *ATIP* 55(5): 14-17.

GONZALEZ, J. y GARAY, R. 1998. Documento técnico Chile Forestal N° 119. Santiago. Chile.

GULLICHSEN, J. 2000. Fiber line operations. En: GULLICHSEN, J. y FOGELHOLM, C. (Eds.). Chemical pulping. Helsinki University of Technology. Helsinki. Finland. pp. 17-243. Colección Papermaking Science and Technology. Vol. 6A.

HAMMEL, K.E. 1996. Extracellular free radical biochemistry of lignolytic fungi. *New Journal of Chemistry*, 20(2): 195-198.

HAMMEL, K.E. 1997. Fungal degradation of lignin. En: CADISCH, G. y GILLER, K. (Eds.). CAB INTERNATIONAL driven by nature: plant litter quality and decomposition. pp. 33-45.

HIGUCHI, T. 1990. Lignin biochemistry: Biosynthesis and biodegradation. *Wood Science and Technology*, 24: 23-63.

HOOD, I. 1992. An illustrated guide to fungi on wood in New Zealand. Ed. Auckland University Press. Auckland. New Zealand. 424 p.

IGARTÚA, D.; RIVERA, S.; MONTERUBBIANESI, M.; MONTEOLIVA, S.; FARINA, S.; CARRANZA, S. y VILLEGAS, M. 2001. Calidad del leño en *Eucalyptus globulus ssp. globulus*. [en línea] <http://www.e-campo.com/sections/news/print.php/uuid.514C707E%2D8A1E%2D4D7D%2DB0AD96440647DD05> [consulta: 15 de Diciembre de 2003]

INFOR. 2002. Estadísticas forestales 2001. Boletín estadístico N° 84.

JENSEN JR., K.; BAO, W.; KAWAI, S., SREBOTNIK, E. y HAMMEL, K. 1996. Manganese-dependent cleavage of nonphenolic lignin structures by *Ceriporiopsis subvermispora* in the absence of lignin peroxidase. *Applied and Environmental Microbiology*, 62(10): 3679-3686.

KIM, Y. y SINGH, A. 2000. Micromorphological characteristics of wood biodegradation in wet environments: a review. *IAWA Journal*, 21(2): 135-155.

KIRK, T.K. 1996. Technical overview of the forest biotechnology research in the U.S. En: SREBOTNIK, E. y MESSNER, K. (Eds.). Biotechnology in the pulp and paper industry. Recent advances in applied and fundamental research. Proceedings of the sixth international conference on biotechnology in the pulp and paper industry. Facultas-Universitätsverlag. Vienna, Austria. pp. 3-8.

KIRK, T.K y CULLEN, D. 1998. Enzymology and molecular genetics of wood degradation by white-rot fungi. En: YOUNG, R. y AKHTAR, M. (Eds.). Environmentally friendly technologies for the pulp and paper industry. John Wiley & Sons, Inc. pp. 273-307.

LEATHAM, G. 1982. Cultivation of shiitake, the Japanese forest mushroom, on logs: a potential industry for the United States. *Forest Product Journal* 32(8): 29-35.

LEVIN, L. y AGUEDA, M. 1998. Anatomical study of the decay caused by the white-rot fungus *Trametes Troglia* (Aphylophorales) in wood of *Salix* and *Populus*. *IAWA Journal*, 19(2): 169-180.

LIBBY, E. 1969. *Ciencia y Tecnología Sobre Pulpa y Papel*. Compañía Editorial Continental S.A. D.F. México. 514 p.

LODGE, D.J. 2001. Diversidad mundial y regional de hongos. En: HERNANDEZ, H.; GARCIA, A.; ALVAREZ, F. y ULLOA, M. (comps). *Enfoques contemporáneos para el estudio de la biodiversidad*. 1ª ed. Instituto de Biología, UNAM. México. pp. 291-304

LYON, A. s.a. Fichas técnicas. [enlínea] <[http://www.fundch.cl/ft/forestal/fo\\_eucalyptus.cfm](http://www.fundch.cl/ft/forestal/fo_eucalyptus.cfm)> [consulta: 05 Agosto 2003]

MICALES, J. 2001. Enzymes associated with wood decay and their potential uses in industry. En: FIFTH ANNUAL symposium on industrial and fermentation microbiology; April 27, 2001. La Crosse, WI. Department of microbiology of University of Wisconsin-La Crosse and College of Science and Allied Health. E.E.U.U. 9p.

MANSILLA, H; GARCIA, R; TAPIA, J; DURAN, H. y URZUA, S. 1991. Chemical characterization of Chilean hardwoods. *Wood Science and Technology*, 25: 145-149.

MARCOCCIA, B.; PROUGH, J.; ENGSTRÖM, J. y GULLICHSEN, J. 2000. Continuous cooking applications. En: GULLICHSEN, J. y FOGELHOLM, C. (Eds.). *Chemical pulping*. Helsinki University of Technology. Helsinki. Finland. pp. 512-570. Colección *Papermaking Science and Technology*. Vol. 6A.

MESSNER, K.; KOLLER, K.; WALL, M.; AKHTAR, M. y SCOTT, G. 1998. Fungal treatment of wood chips for chemical pulping. En: YOUNG, R. y AKHTAR, M. (Eds.). *Environmentally friendly technologies for the pulp and paper industry*. John Wiley & Sons, Inc. pp. 385-419.

METHA, V.; GUPTA, J. y JAUHARI, M. 1992. Biobleaching eucalyptus Kraft pulp with *Phanerochaete chrysosporium* and its effect on paper properties. *TAPPI Journal*, 75(8): 151-152.

MILLER, R. 1999. Characteristics and availability of commercially important woods. En: FOREST PRODUCTS LABORATORY. *Wood handbook—Wood as an engineering material*. Department of Agriculture, Forest Service, Forest Products Laboratory. Madison, WI, E.E.U.U. Chapter 1.

MONTGOMERY, D. 1991. *Diseño y análisis de experimentos*. Grupo Editorial Iberoamérica, SA de C.V. México, D.F. 589p.

OLEA, F. 2002. Composición química de la madera de *Pinus radiata* D. Don alterada por hongos de pudrición blanca. Memoria de Ingeniero Forestal. Facultad de Cs. Forestales, U. de Chile. Santiago. 60p.

ORIANAN, T.; LABOSKY JR., P. y ROYSE, D. 1989. Lignin degradation capabilities of *Pleurotus ostreatus*, *Lentinula edodes* and *Phanerochaete chrysosporium*. *Wood and Fiber Science*, 21(2): 183-192.

ORIAN, T.; LABOSKY, P. y BLAKENHORN, P. 1991. Kraft pulp and papermaking properties of *Phanerochaete chrysosporium* degraded red oak. Wood and Fiber Science, 23(3): 316-327.

ORTH, A.; ROYSE, D. y TIEN, M. 1993. Ubiquity of lignin-degrading peroxidases among various wood-degrading fungi. [en línea] <<http://aem.asm.org/cgi/content/abstract/59/12/4017>> [consulta: 15 de Agosto de 2003].

ORTIZ, M. 1964. Variaciones del largo de traqueidas y peso específico en pino insignis (*Pinus radiata* D. Don). En: ACTAS DE la reunión sobre investigaciones en productos forestales. Concepción. Chile. (INFOR Informe Técnico N° 2).

PAZ, J. y MELO, R. 1964. Contribución al análisis de las variaciones del largo de fibras y peso específico en pino insignis (*Pinus radiata* D. Don). En: ACTAS DE la reunión sobre investigaciones en productos forestales. Concepción. Chile. (INFOR Informe Técnico N° 2).

RAMBELLI, A. 1983. Manual on mushroom cultivation. FAO. Roma. 65 p.

SABHARWAL, H.; AKHTAR, M.; BLANCHETTE, R. y YOUNG, R. 1994. Biomechanical pulping of kenaf. TAPPI Journal, 77(12): 105-112.

SACHS, I.; LEATHAM, G. y MYERS, G. 1989. Biomechanical pulping on aspen chips by *Phanerochaete chrysosporium*: fungal growth pattern and effects on wood cell walls. Wood and Fiber Science, 21(4): 331-341.

SCOTT, G.; LENTZ, M.; AKHTAR, M.; SYKES, M. y ABUBAKR, S. 1995. Environmental aspects of biosulfite pulping. En: PROCEEDINGS OF 1995 international environmental conference; 1995 May 7-10; Atlanta, GA. TAPPI PRESS: 1155-1161. Book 2.

SCOTT, G.; AKHTAR, M.; LENTZ, M.; SYKES, M. y ABUBAKR, S. 1996. Biosulfite pulping using *Cesiporiopsis subvermisporea*. En: SREBOTNIK, E. y MESSNER, R. (Eds.). Biotechnology in the pulp and paper industry. Recent advances in applied and

fundamental research. Proceedings of the sixth international conference on biotechnology in the pulp and paper industry. Facultas-Universitätsverlag. Vienna, Austria. pp. 217-220.

SCOTT, G. y SWANEY, R. 1998. New technology for papermaking: biopulping economics. TAPPI Journal, 81(12): 153-157.

SCOTT, G.; AKHTAR, M.; LENTZ, J. y SWANEY, R. 1998. Engineering, scale-up and economic aspects of fungal pretreatment of wood chips. En: YOUNG, R. y AKHTAR, M. (Eds.). Environmentally friendly technologies for the pulp and paper industry. John Wiley & Sons, Inc. pp. 341-383.

SEPULVEDA, M. y MELO, S. 1996. Propiedades físicas de la madera de pino radiata de 52 años. En: ACTAS VII reunión de investigación y desarrollo de productos forestales. Parque Ferial Fisa. Santiago. Programa bosque nativo, D.T.I., U. de Chile, Manufacturera de Fibropaneles Trupan S.A. 472p.

SERRA, M. y GARAY, R. s.a. Fichas técnicas. [en línea] <[http://www.fundch.cl/ft/forestal/fo\\_pinoradiata.cfm](http://www.fundch.cl/ft/forestal/fo_pinoradiata.cfm)> [consulta: 05 Agosto 2003]

SIIKA-AHO, M.; PERE, J.; SUURNÄKKI, A.; TENKANEN, M.; BUCHERT, J y VIIKARI, L. 2001. Applications of enzymes in pulp and paper industry. En: 7<sup>th</sup> BRAZILIAN symposium on the chemistry of the lignins and other wood componentes, Belo Horizonte, MG, Sept. 2-5, 2001. Federal University of Viçosa. SIF. 438p.

SILVA, R. 2002. Antibiosis entre hongos lignívoros y hongos antagónicos para efecto del biopulpaje de madera de *Pinus radiata*. Memoria de Ingeniero Forestal. Universidad de Chile. Santiago, Chile 120p.

SJÖSTRÖM, E. 1993. Wood Chemistry: fundamentals and applications. 2<sup>a</sup> ed. Academic Press, Inc. California. U.S.A. 292 p.

SREBOTNIK, E.; JENSEN, Jr., K.; MAIJALA, P. y HAMMEL, K. 1997. Ligninolytic activities of the biopulping fungus *Ceriporiopsis subvermispota* in solid state cultures. En:

PROCEEDINGS OF the 1997 biological sciences symposium: October 19-23, 1997. San Francisco Marriott. San Francisco. U.S.A. pp. 493-496.

STAMETS, P. y CHILTON, J.S. 1993. The mushroom cultivator. Ed. Agarikon Press. Olympia, WA. U.S.A. 415p.

U.S.D.A. Forest Service. 1993. Income opportunities in special forest products; self-help suggestions for rural entrepreneurs. Agriculture information bulletin nº 666. 206p.

UUSITALO, P. y SVEDMAN, M. 1999. Batch cooking applications. En: GULLICHSEN, J. y FOGELHOLM, C. (Eds.). Chemical pulping. Helsinki University of Technology. Helsinki. Finland. pp. 492-511. Colección Papermaking Science and Technology. Vol. 6A.

## **8. APENDICE**

## 8.1 Tablas de ANDEVA

**Tabla 10: Duramen de pino tratado con *L. edodes***

Analysis of Variance for P.peso					
Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
Model	50,2741	5	10,0548	22,77	0,0000
Residual	5,29949	12	0,441624		
-----					
Total (Corr.)	55,5736	17			
Type III Sums of Squares					
Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
CH	18,2296	1	18,2296	41,28	0,0000
Tpo	19,0034	2	9,5017	21,52	0,0001
CH*Tpo	13,0411	2	6,52055	14,76	0,0006
Residual	5,29949	12	0,441624		
-----					
Total (corrected)	55,5736	17			

**Tabla 11: Albura de pino tratada con *L. edodes***

Analysis of Variance for P.peso					
Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
Model	60,428	5	12,0856	25,56	0,0000
Residual	5,67441	12	0,472867		
-----					
Total (Corr.)	66,1024	17			
Type III Sums of Squares					
Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
CH	19,6943	1	19,6943	41,65	0,0000
Tpo	22,9941	2	11,4971	24,31	0,0001
CH*Tpo	17,7396	2	8,86978	18,76	0,0002
Residual	5,67441	12	0,472867		
-----					
Total (corrected)	66,1024	17			
All F-ratios are based on the residual mean square error.					

**Tabla 12: Duramen de pino tratado con *S. hirsutum***

Analysis of Variance for P.peso					
Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
-----					



Model	33,951	5	6,79019	9,67	0,0007
Residual	8,42708	12	0,702257		
-----					
Total (Corr.)	42,378	17			
Type III Sums of Squares					
-----					
Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
-----					
CH	11,499	1	11,499	16,37	0,0016
Tpo	12,9141	2	6,45703	9,19	0,0038
CH*Tpo	9,53786	2	4,76893	6,79	0,0107
Residual	8,42708	12	0,702257		
-----					
Total (corrected)	42,378	17			
All F-ratios are based on the residual mean square error.					

**Tabla 13: Albura de pino tratada con *S. hirsutum***

Analysis of Variance for P.peso					
-----					
Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
-----					
Model	64,1011	5	12,8202	11,62	0,0003
Residual	13,2391	12	1,10326		
-----					
Total (Corr.)	77,3402	17			
Type III Sums of Squares					
-----					
Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
-----					
CH	0,540211	1	0,540211	0,49	0,4974
Tpo	62,9087	2	31,4543	28,51	0,0000
CH*Tpo	0,652144	2	0,326072	0,30	0,7494
Residual	13,2391	12	1,10326		
-----					
Total (corrected)	77,3402	17			
All F-ratios are based on the residual mean square error.					

**Tabla 14: Duramen de eucalipto tratado con *L. edodes***

Analysis of Variance for P.peso					
-----					
Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
-----					
Model	10,2801	5	2,05602	3,33	0,0407
Residual	7,40803	12	0,617335		
-----					
Total (Corr.)	17,6881	17			
Type III Sums of Squares					
-----					
Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
-----					
CH	1,86026	1	1,86026	3,01	0,1082
Tpo	4,85204	2	2,42602	3,93	0,0487
CH*Tpo	3,5678	2	1,7839	2,89	0,0945
Residual	7,40803	12	0,617335		
-----					
Total (corrected)	17,6881	17			
All F-ratios are based on the residual mean square error.					

**Tabla 15: Albura de eucalipto tratada con *L. edodes***

Analysis of Variance for P.peso					
-----					
Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
-----					

Model	51,1442	5	10,2288	16,29	0,0001
Residual	7,53552	12	0,62796		
-----					
Total (Corr.)	58,6798	17			
Type III Sums of Squares					
-----					
Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
-----					
CH	18,6878	1	18,6878	29,76	0,0001
Tpo	23,578	2	11,789	18,77	0,0002
CH*Tpo	8,87836	2	4,43918	7,07	0,0094
Residual	7,53552	12	0,62796		
-----					
Total (corrected)	58,6798	17			
All F-ratios are based on the residual mean square error.					

**Tabla 16: Duramen de eucalipto tratado con *S. hirsutum***

Analysis of Variance for P.peso					
-----					
Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
-----					
Model	165,297	5	33,0595	5,81	0,0059
Residual	68,2471	12	5,68726		
-----					
Total (Corr.)	233,544	17			
Type III Sums of Squares					
-----					
Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
-----					
CH	8,90561	1	8,90561	1,57	0,2347
Tpo	145,006	2	72,5032	12,75	0,0011
CH*Tpo	11,3853	2	5,69266	1,00	0,3962
Residual	68,2471	12	5,68726		
-----					
Total (corrected)	233,544	17			
All F-ratios are based on the residual mean square error.					

**Tabla 17: Albura de eucalipto tratada con *S. hirsutum***

Analysis of Variance for P.peso					
-----					
Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
-----					
Model	85,2288	5	17,0458	13,01	0,0002
Residual	15,7194	12	1,30995		
-----					
Total (Corr.)	100,948	17			
Type III Sums of Squares					
-----					
Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
-----					
CH	14,2988	1	14,2988	10,92	0,0063
Tpo	55,2197	2	27,6098	21,08	0,0001
CH*Tpo	15,7103	2	7,85515	6,00	0,0157
Residual	15,7194	12	1,30995		
-----					
Total (corrected)	100,948	17			
All F-ratios are based on the residual mean square error.					

## 8.2 Tablas de comparación de medias de Duncan

El símbolo (\*) en la resta, indica diferencia estadística entre la pareja de medias comparadas.

**Tabla 18: Duramen de pino tratado con *L. edodes* (Interacción)**

	60-45	60-30	40-45	40-30	40-15
60-15	4,5954*	2,4877*	0,5900	0,3014	0,1536
40-15	4,4418*	2,3341*	0,4364	0,1478	0,0000
40-30	4,2939*	2,1863*	0,2885	0,0000	
40-45	4,0054*	1,8978*	0,0000		
60-30	2,1077*	0,0000			
60-45	0,0000				

**Tabla 19: Albura de pino tratada con *L. edodes* (Interacción)**

	60-45	60-30	40-45	40-30	40-15
60-15	5,2001*	2,6102*	0,6859	0,4994	0,3490
40-15	4,8511*	2,2612*	0,3369	0,1503	0,0000
40-30	4,7008*	2,1108*	0,1865	0,0000	
40-45	4,5143*	1,9243*	0,0000		
60-30	2,5899*	0,0000			
60-45	0,0000				

**Tabla 20: Duramen de pino tratado con *S.hirsutum* (Interacción)**

	40-45	40-30	60-45	60-15	60-30
40-15	3,8394*	1,9429*	0,5840	0,2884	0,1142
60-30	3,7253*	1,8287*	0,4699	0,1742	0,0000
60-15	3,5511*	1,6545*	0,2957	0,0000	
60-45	3,2554*	1,3588	0,0000		
40-30	1,8966*	0,0000			
40-45	0,0000				

**Tabla 21: Albura de pino tratada con *S.hirsutum* (Tiempo)**

	45	30	15
15	27,2891*	10,8782*	0,0000
30	16,4109*	0,0000	
45	0,0000		

**Tabla 22: Duramen de eucalipto tratado con *L. edodes* (Tiempo)**

	45	30	15
15	6,9432*	0,7306	0,0000
30	6,2126*	0,0000	
45	0,0000		

**Tabla 23: Albura de eucalipto tratada con *L. edodes* (Interacción)**

	60-45	60-30	40-45	60-15	40-15
40-30	4,9191*	2,4582*	1,4100	0,5136	0,3672
40-15	4,5519*	2,0910*	1,0428	0,1463	0,0000

60-15	4,4055*	1,9446*	0,8965	0,0000
40-45	3,5090*	1,0482	0,0000	
60-30	2,4609*	0,0000		
60-45	0,0000			

**Tabla 24: Duramen de eucalipto tratado con *S. hirsutum* (Tiempo)**

	45	30	15
15	39,7789*	9,0136*	0,0000
30	30,7653*	0,0000	
45	0,0000		

**Tabla 25: Albura de eucalipto tratada con *S. hirsutum* (Interacción)**

	60-45	60-30	40-45	40-30	60-15
40-15	6,6037*	2,4873*	2,1941	1,7713	0,2221
60-15	6,3816*	2,2653*	1,9720	1,5492	0,0000
40-30	4,8324*	0,7161	0,4228	0,0000	
40-45	4,4096*	0,2932	0,0000		
60-30	4,1163*	0,0000			
60-45	0,0000				

## INDICE

1. INTRODUCCION.....	1
2. REVISION BIBLIOGRAFICA.....	4
2.1 La madera.....	4
2.1.1 La estructura de la madera.....	4
2.1.1.1 Estructura de la pared celular y polímeros constituyentes.....	5
2.1.1.2 Madera de coníferas.....	7
2.1.1.3 Madera de latifoliadas.....	7
2.1.2 Composición química de la madera.....	7
2.1.2.1 Celulosa.....	8
2.1.2.2 Hemicelulosas o poliosas.....	10
2.1.2.3 Lignina.....	12
2.1.2.4 Compuestos de bajo peso molecular.....	14
2.1.3 Pinus radiata D. Don.....	15
2.1.4 Eucalyptus globulus Labill.....	16
2.1.5 Naturaleza química del pino y eucalipto.....	17
2.2 Pulpaje.....	18
2.2.1 Proceso Kraft.....	19
2.2.2 Proceso mecánico.....	20
2.2.3 Estadísticas forestales nacionales de pulpa y papel.....	21
2.2.4 Biopulpaje.....	23
2.2.4.1 Ventajas en el proceso de producción.....	26
2.2.4.1.1 Reducción en el consumo de energía.....	27
2.2.4.1.2 Aumento de la producción.....	28
2.2.4.1.3 Control de mancha azul.....	29
2.2.4.1.4 Disminución de resinas.....	29
2.2.4.2 Ventajas en las propiedades del producto final.....	30
2.2.4.3 Ventajas ambientales.....	31
2.2.4.4 Ventajas económicas.....	32
2.3 Los hongos.....	34
2.3.1 Rol ecológico de los hongos.....	35
2.3.2 Los hongos de pudrición blanca.....	35
2.3.2.1 Características microscópicas de los procesos de pudrición blanca.....	38
2.3.2.2 Biodegradación.....	39
2.3.2.3 Lignina peroxidasas.....	41
2.3.2.4 Manganeso peroxidasas.....	44
2.3.2.5 Lacasas.....	45
2.3.3 Hibridismo.....	45
2.3.4 Lentinus edodes (Berk.) Sing.....	46
2.3.5 Stereum hirsutum (Willd.) Fr.....	47
3. MATERIAL Y METODO.....	49
3.1 Materiales.....	49
3.2 Método.....	51
3.2.1 Etapa de obtención de óptimos de crecimiento de los hongos de ensayo.....	51
3.2.2 Etapa de biodeterioro.....	52
3.2.3 Etapa de determinación de lignina en madera biodegradada.....	54
4. RESULTADOS Y DISCUSION.....	54
4.1 Óptimos de crecimiento.....	55

4.1.1 Stereum hirsutum.....	55
4.1.2 Lentinus edodes.....	56
4.2 Pérdida de peso.....	58
4.2.1 Duramen de pino tratado con L. edodes.....	59
4.2.2 Albura de pino tratada con L. edodes.....	59
4.2.3 Duramen de pino tratado con S. hirsutum.....	60
4.2.4 Albura de pino tratada con S. hirsutum.....	61
4.2.5 Duramen de eucalipto tratado con L. edodes.....	62
4.2.6 Albura de eucalipto tratada con L. edodes.....	63
4.2.7 Duramen de eucalipto tratado con S. hirsutum.....	64
4.2.8 Albura de eucalipto tratada con S. hirsutum.....	64
4.2.9 Análisis del biodeterioro.....	65
4.3 Análisis químico.....	70
4.3.1 Contenido de extraíbles.....	72
4.3.2 Contenido de lignina.....	73
5. Conclusiones.....	74
6. Recomendaciones.....	76
7. Bibliografía.....	77
8. Apendice.....	87
8.1 Tablas de ANDEVA.....	88
8.2 Tablas de comparación de medias de Duncan.....	90

# **ESCUELA DE CIENCIAS FORESTALES**

DEPARTAMENTO DE INGENIERIA DE LA MADERA

## **Determinación de factores ambientales para el crecimiento de dos hongos (*Lentinus edodes* y *Stereum hirsutum*) y su acción biodegradante sobre la madera de *Pinus radiata* y *Eucalyptus globulus***

Memoria para optar al Título  
Profesional de Ingeniero Forestal

**JUAN MANUEL RUIZ KUNSTMANN**

Profesor Guía: Ing. Forestal, Ph. D, Sr. Juan Donoso Gutierrez

**SANTIAGO - CHILE  
2004  
UNIVERSIDAD DE CHILE  
FACULTAD DE CIENCIAS FORESTALES**

**ESCUELA DE CIENCIAS FORESTALES  
DEPARTAMENTO DE INGENIERIA DE LA MADERA**

**Determinación de factores ambientales para el crecimiento de dos hongos  
(*Lentinus esdodes* y *Stereum hirsutum*) y su acción biodegradante sobre la  
madera de *Pinus radiata* y *Eucalyptus globulus***

Memoria para optar al Título  
Profesional de Ingeniero Forestal

**Juan Manuel Ruiz Kunstmann**

Calificaciones:	Nota	Firma
Prof. Guía Sr. Juan Donoso G.	7,0	.....
Prof. Consejero Sr. Javier González M.	7,0	.....
Prof. Consejero Sr. René Carmona C.	6,5	.....

SANTIAGO-CHILE

2004



A mis viejos y  
a mi

## **AGRADECIMIENTOS**

Primero que nada, agradezco a mis padres. Porque ellos me han dado el cariño, las enseñanzas y el ambiente ideal para llegar a ser una persona íntegra y capaz. Porque pese a mis incontables “numeritos” conté y siempre podré contar, con un apoyo incondicional en todo momento. Y porque tienen un aguante digno de un Iron Man. Agradezco a mi hermana y a mis abuelos, porque también siempre estuvieron dispuestos a ayudarme y por las palabras de apoyo que a uno lo reaniman.

Agradezco a mi profesor guía, don Juan Donoso G., por haberme acogido de la forma que lo hizo, por darme su confianza, por enseñar de esa forma amena y cercana y por compartir esa visión de vida tan particular que tiene. Junto a él, agradezco también a su familia, que recibió a este extraño como un amigo de siempre.

También agradezco a mis profesores consejeros, don Javier González M. y don René Carmona C., por haberme brindado su ayuda y conocimiento siempre que lo busqué.

Agradezco en forma muy especial a don Luis Frías V. Porque sin él difícilmente podría haber llegado a puerto. Porque su mano está siempre abierta, porque encontré a una gran persona y a un gran amigo y porque siempre que quiera tirar una carne a la parrilla, sabré a quién debo llamar sin pensarlo 2 veces. Grande Lucho!

A Muriel Espinosa E. por el tiempo y la ayuda oportuna en el área química.

A mis amigos Tuta y Flaca por tener la oreja y el consejo siempre a disposición (aparte de las ganas de carretear).

También agradezco a los compañeros que me ayudaron en el desarrollo de esta memoria: Andrés Holzillo y Krusty Frêne. Y a todos los otros que me acompañaron en la carrera y que de alguna u otra forma permitieron que esté donde estoy ahora: Fede (el que me vendió la pomada), Cokito (plántula), Galvez, el Gringo, Chico Sour, Ingrid, Homero (Panchodio, senil), Magua (Aguante!), Pastor, Garcilaceo (juvenil), Cototo, Peña, Rulo, Larra, Chicken, Orate, Tronco, Globach, Marcelo Ape Raqueta y a todas las nadis de mi fun club desde Arica a Punta Arenas.

## RESUMEN

Como un aporte al biopulpaje, se evaluó bajo el concepto de hibridismo, el efecto de modificar la T° y el pH del medio de cultivo agar-malta, sobre el crecimiento de hongos de pudrición blanca (HPB): ***Stereum hirsutum*** y ***Lentinus edodes***. Se establecieron tres temperaturas: 20°, 25° y 30° Celcius y tres pH: 5, 6 y 7. ***S. hirsutum*** presenta el mayor incremento en biomasa a 25° C y pH 6; en tanto que ***L. edodes*** lo logra con la combinación de 25° C y pH 5. La segunda variable respuesta que fue determinada, la constituyó la pérdida de peso de maderas de distinta naturaleza biológica. En este caso, se combinó la mejor alternativa de T° y pH que se estableció para cada uno de los hongos, en madera de albura y duramen de dos especies forestales (***Pinus radiata*** y ***Eucalyptus globulus***), bajo tres tiempos de exposición a cada uno de los hongos: 15, 30 y 45 días, y dos contenidos de humedad inicial de la madera: 40% y 60%. Las mayores disminuciones de peso se obtuvieron con ***E. globulus*** y fueron de 5,27% en el caso de ***L. edodes*** y de 9,82% en el caso de ***S. hirsutum***. La madera de ***P. radiata*** fue degradada en un 5,2% por las 2 especies de hongos. Estos máximos de degradación se obtuvieron siempre en albura de ambas especies con un 60% de contenido de humedad y después de 45 días de tratamiento. La excepción fue ***S. hirsutum*** sobre ***E. globulus***, que provocó una mayor pérdida de peso en duramen. Por último, se realizó una evaluación del contenido de lignina residual de las muestras de madera que más y menos alteración sufrieron en el proceso de biodegradación. La pérdida de lignina más notable en ***P. radiata*** fue de 2,48% caso ***S. hirsutum*** y de 0,49% para ***L. edodes***, mientras que en el caso de ***E. globulus***, ***S. hirsutum*** provocó una reducción de este compuesto de 25,72% y ***L. edodes*** una de 26,25%. En general, la metodología se demuestra adecuada para este tipo de estudios y se recomienda la continuación de esta línea de trabajo.

Palabras clave: biopulpaje, biodegradación, hongos de pudrición blanca, hibridismo.

## SUMMARY

As a biopulping contribution, in the frame of the hibridism, the effect of modifying T° and pH of the agar-malt culture medium, over the white rot fungi (WRP): ***Stereum hirsutum*** y ***Lentinus edodes*** growth, was evaluated. Three temperatures: 20°, 25° and 30° Celcius, and 3 pH levels: 5, 6 and 7, were established. 25° C and pH 6 proved to be the optimum combination for the higher increase of ***S. hirsutum*** biomass, while 25° C and pH 5 were the best conditions for the ***L. edodes*** fungus. The loss of weight in wood of different biological nature, determined the second response variable. In this case, the best combination of T° and pH for each fungus, was established. The loss of weight (biodegradation) of sapwood and heartwood of ***Pinus radiata*** and ***Eucalyptus globulus*** due to these fungus was also evaluated. Three testing times: 15, 30 and 45 days, and 2 initial moisture contents: 40% and 60% were tested. The mayor loose of weight in ***E. globulus*** were 5,27% with ***L. edodes***, and 9,82% in the case of ***S. hirsutum***. ***P. radiata*** was degradated 5,2% by both white rot fungi. These maximum of degradation were always obtained from the sapwood of both species with a 60% of moisture content and after 45 days of treatment. The only exception was ***S. hirsutum*** over ***E. globulus*** which generated a mayor loss of weight over heartwood. Finally, an evaluation of the residual lignin content of the samples with more and less alteration of biodegradation process was performed. The most remarkable reductions were of 2,48% in the case of ***L. edodes*** and 0,49% with ***S. hirsutum***) over ***P. radiata***. And in the case of ***E. globulus***, ***S hirsutum*** caused 25,72% of loss of weight, while in the case of ***L. edodes***, the loss of weight was of 26,25%, meanwhile, ***S hirsutum*** caused a 25,72% and ***L edodes*** a 26,25% of reduction of this compound in the ***E. globulus*** wood. In general, for this kind of study the methodology used, proved to be suitable and the application of this line of work is recommended.

Key words: biopulping, biodegradation, white rot fungi, hibridism.