



Facultad de Ingeniería

Escuela de Construcción Civil

Aislación e identificación de hongos de pudrición de maderas de alta durabilidad natural utilizadas en viviendas de la comuna de Achao, Chiloé

por

Daniela Ortiz Gajardo

Memoria para optar al Título de Ingeniero Constructor y al Grado de Licenciado en Ciencias de la Construcción

Prof. Guía: Rodrigo Ortiz Mansilla

Noviembre, 2014

Dedico esta memoria de título a mi familia y seres queridos que siempre me apoyaron de una u otra manera a lo largo de estos años de carrera, gracias por su cariño incondicional.

Agradezco a mi familia, mi sauski, a los amigos que han estado y continúan a mi lado, por todo el apoyo y enseñanzas que hicieron posible este camino, gracias Profesor Rodrigo y su Hermano Manuel, por todo el apoyo y paciencia brindada en esta memoria.

Índice General

Dedicatoria	2
Agradecimientos	3
Índice General	4
Índice de Tablas	6
Índice de Figuras	7
Resumen.....	9
Abstract.....	10
CAPITULO I Antecedentes Generales.....	11
1.1 Introducción	12
1.2 Objetivos de la investigación	15
1.2.1 Objetivo general	15
1.2.2 Objetivos específicos.....	15
1.3 Alcances	16
1.4 Estructura de la investigación	17
1.5 Comuna de Achao, Archipiélago de Chiloé	18
Antecedentes Generales	18
1.6 Clima en Chiloé	19
CAPITULO II Biodeterioro de la madera	20
2.1 Biodegradabilidad de la madera.....	21
2.1.1 Generalidades.....	21
2.1.2 Durabilidad natural	22
2.1.3 Principales maderas de alta durabilidad natural en Chiloé	22
2.1.4 Composición de la madera.....	23
2.1.5 Macro estructura de la madera.....	23
2.1.6 Micro estructura.....	25
2.2 Reino Fungi: Los hongos	26
2.2.1 Biología de los hongos.....	26
2.2.2 Clasificación general de los hongos.....	26

2.2.3 Tipos de hongos degradadores de madera	28
CAPITULO III MATERIALES Y MÉTODOS	30
3.1 Generalidades.....	31
3.2Material	31
3.2.1 Madera	31
3.3 Equipos	32
3.4 Materiales de laboratorio	33
3.5Método	34
3.5.1 Tratamientos	34
3.5.2Extracción de muestras	35
3.5.3 Medios de cultivo Sólido	36
3.5.4 Esterilización	36
3.5.5 Inoculación de muestras en el medio de cultivo sólido	36
3.5.6 Inoculación en medio de cultivo líquido y tubo de ensayo.....	38
3.5.7 Filtrado y secado del hongo de pudrición	41
3.5.8 Extracción DNA	43
3.5.9 Amplificación	48
3.5.10 Secuenciación de los productos de PCR	50
CAPITULO IV ANÁLISIS DE RESULTADOS.....	52
4.1 Identificación de hongos de pudrición.....	53
4.2 Tipos de hongos identificados	55
4.3 Efecto que provocan los hongos identificados en la biodegradabilidad de la madera de la zona	68
4.3.1 Ubicación hongos identificados.....	69
CAPITULO V CONCLUSIÓN.....	74
5.1 Conclusión.....	75
BIBLIOGRAFÍA	77
Bibliografía.....	78

Índice de Tablas

Tabla 3.1	Tabla de registro de avances según etapas.....	51
Tabla 4.1	Tabla identificación de hongos de pudrición.....	54
Tabla 4.2	Clasificación <i>Ceriporopsis</i> sp.....	55
Tabla 4.3	Clasificación <i>Ceriporopsis subvermispora</i>	55
Tabla 4.4	Clasificación <i>Hyphodontia rádula</i>	56
Tabla 4.5	Clasificación <i>Bjerkandera adusta</i>	57
Tabla 4.6	Clasificación <i>Fomitiporella caryophylli</i>	58
Tabla 4.7	Clasificación <i>Phlebia</i> sp.....	59
Tabla 4.8	Clasificación <i>Peniophora cinerea</i>	60
Tabla 4.9	Clasificación <i>Peniophora incarnate</i>	60
Tabla 4.10	Clasificación <i>Phanerochaete</i> sp.....	61
Tabla 4.11	Clasificación <i>Phanerochaete sordida</i>	61
Tabla 4.12	Clasificación <i>trametes versicolor</i>	62
Tabla 4.13	Clasificación <i>Aurantiopileus mayanensis</i>	63
Tabla 4.14	Clasificación <i>Lentinellus pulvinulus</i>	64
Tabla 4.15	Clasificación <i>Stereum rugosum</i>	65
Tabla 4.16	Clasificación <i>Fomitiporella caryophylli</i>	66
Tabla 4.17	Clasificación <i>Junghuhnia nitida</i>	67
Tabla 4.18	Hongos identificados.....	70

Índice de Figuras

Figura 1.1	Antecedentes meteorológicos de Chiloé.....	19
Figura 2.1	Macro estructura de la madera.....	24
Figura 3.1	Trozo tipo utilizado en el estudio.....	31
Figura 3.2	Autoclave.....	31
Figura 3.3	Estufa de secado.....	31
Figura 3.4	Cámara de flujo laminar.....	33
Figura 3.5	Balanza analítica.....	34
Figura 3.6	Placa Petri.....	34
Figura 3.7	Matraz.....	34
Figura 3.8	Asa de platino.....	34
Figura 3.9	Plano ubicación zona estudio.....	35
Figura 3.10	Placa petri con trozos de madera y medio de cultivo malta agar.....	37
Figura 3.11	Placa petri con trozos de madera y medio de cultivo basidio.....	37
Figura 3.12	Placa petri separada con dos nuevos crecimientos.....	38
Figura 3.13	Placa petri separada con cuatro nuevos crecimientos.....	38
Figura 3.14	Inoculación muestra desde el medio solido aislado al líquido.....	39
Figura 3.15	Placa petri con hongo asilado inoculado a frasco y tubo.....	39
Figura 3.16	Frascos con medio líquido que no presentaron crecimiento.....	40
Figura 3.17	Gráfica resumen del crecimiento logrado en muestras con problemas.....	41
Figura 3.18	Hongo desarrollado en pleno proceso de filtración.....	41
Figura 3.19	Hongo filtrado en nueva placa petri, listo para secar.....	42
Figura 3.20	Hongo deshidratado.....	43
Figura 3.21	Hongo raspado.....	43
Figura 3.22	Hongo en tubo eppendorf.....	43
Figura 3.23	Materiales necesarios para la extracción.....	43
Figura 3.24	Micropipeta usada.....	44
Figura 3.25	Incorporación buffer de extracción.....	44
Figura 3.26	Vortex.....	45
Figura 3.27	Máquina de termoregulado.....	45
Figura 3.28	Eppendorf calentado a 70°C.....	45
Figura 3.29	Cloroformo para la extracción.....	45
Figura 3.30	Eppendorf con la mezcla de fenoles.....	45
Figura 3.31	Maquina centrifuga.....	46
Figura 3.32	Presencia solida del DNA.....	47
Figura 3.33	Termoblock.....	47
Figura 3.34	Incorporación de agua MQ.....	47
Figura 3.35	Presencia DNA por transiluminador.....	48
Figura 3.36	Termociclador.....	48
Figura 3.37	Tubos de PCR.....	49
Figura 4.1	Ceriporopsis sp sobre madera.....	55
Figura 4.2	Hyphodontia presente en madera.....	56
Figura 4.3	Presencia pudrición de Bjerkandera adusta.....	57
Figura 4.4	Pudrición de un hongo Fomitiporella caryophylli.....	58
Figura 4.5	Pudrición de un hongo de tipo Phlebia sp.....	59

Figura 4.6	Pudrición provocada por el género <i>peniophora</i>	60
Figura 4.7	<i>Phanerochaete</i> sórdida en madera natural.....	61
Figura 4.8	<i>Trametes versicolor</i> creciendo en una placa petri.....	62
Figura 4.9	Madera afectada por <i>Aurantiopileus mayanensis</i>	63
Figura 4.10	Crecimiento en madera de <i>Lentinellus</i>	64
Figura 4.11	Presencia de <i>stereum rugosum</i>	65
Figura 4.12	Crecimiento en forma de costras del hongo <i>Fomitiporella</i>	66
Figura 4.13	Presencia de hongo <i>Junghuhnia nitida</i>	67
Figura 4.14	Satélite de Achao con puntos ubicación muestras.....	68

Resumen

La pudrición es considerada uno de los tipos de enfermedades más comunes en la madera y también una de los más importantes ya que puede provocar considerables fallas en la madera. Tal es su gravedad que puede llegar a causar un deterioro progresivo de la resistencia de la madera y de sus paredes celulares, y también puede interrumpir el flujo de savia en la albura cuando las células mueren o reaccionan al avance de la pudrición.

Siendo la madera uno de los elementos de uso más importante en el rubro de la construcción y en la vida diaria de los seres humanos, es importante conocer los factores que la pueden afectar, ya que esta puede ser atacada por los hongos de pudrición en sus diferentes estados, ya sea madera viva afectando sus raíces, troncos o ramas, o a maderas ya en uso. Para prevenir su deterioro es importante conocer los factores que pueden provocar la presencia de hongos de pudrición, las maneras de detectarlos ante su letal ataque o cómo actuar si ya nos encontramos en presencia de ellos.

La zona en estudio correspondió a la Comuna de Achao, perteneciente al Archipiélago de Chiloé, lugar donde predomina el uso de la madera como materia prima, y lamentablemente el grado de humedad que posee es elevado, factores que unidos no son una buena combinación para la conservación de la madera.

Las muestras obtenidas de Achao fueron sometidas a protocolos de incubación, biología molecular y microscopia óptica para llegar encontrar e identificar las especies de hongos de pudrición presentes en las maderas extraídas.

Con lo cual se pudo identificar una serie de diferentes especies de hongos de pudrición que tienen presencia hoy en esta zona. Los que están provocando daños considerables a las edificaciones, daños que si no se tratan con un método de prevención a tiempo, pueden provocar daños irreversibles en la madera.

Palabras claves: Madera, Hongos, Pudrición, Basidiomicete, Biodeterioro.

Abstract

The rot is considered one of the most common types of diseases in wood and one of the most important because it can cause considerable flaws in the wood.

Such is the severity that is likely to cause a progressive deterioration of the strength of wood and their cell walls, and may also disrupt the flow of sap in the sapwood when cells die or react to the progress of decay.

Being one of the wood use elements most important in the field of construction and daily life of human, it is important to know the factors that can affect, as this can be attacked by decay fungi in their different states, either living wood affecting its roots, trunks or branches, or wood already in use. To prevent deterioration is important to know the factors that may cause the presence of decay fungi, ways to detect them before their lethal attack or act as if we are already in their presence.

The study area corresponded to the Commune Achao belonging to the Chiloé Archipelago, where the predominant use of wood as raw material, and unfortunately the moisture it holds is high, factors that together are not a good combination for wood preservation.

The samples were subjected Achao incubation protocols, molecular biology and optics to reach find and identify species of decay fungi present in the timber from microscopy.

Thereby it was possible to identify a number of different species of decay fungi that are present today in this area. Those causing considerable damage to buildings, damage if not treated with a method of preventing in time, can cause irreversible damage to the wood.

Keywords: Wood, Rot, Fungi, basidiomycete, Biodeterioration.

CAPITULO I

Antecedentes Generales

1.1 Introducción

La madera es considerada una de las principales materias primas, ya que es usada como combustible, para la fabricación de papel, mobiliario, construcción de viviendas y una gran variedad de utensilios para diversos usos. Siendo apreciada como uno de los recursos naturales más abundantes del planeta, así también como una de las más explotadas por el hombre (Yang, 2005).

El poseer una estructura lignocelulósica, es decir que está conformada de hemicelulosa, celulosa y lignina (Barrios et al, 2007), le permite tener grandes propiedades mecánicas, como la resistencia a la tensión, tracción y compresión paralela a la fibra, y resistencia a la flexión, lo clasifican como un material resistente así también con características de material orgánico, biodegradable, y conjuntamente ser un recurso natural renovable (Jasalavic et al. 2000).

Este material ha proporcionado al ser humano materia prima para la creación de herramientas, combustibles, fabricación de medios de transporte, medicinas, elementos estructurales, entre otras, pero principalmente es conocido su uso como elemento básico en la construcción de viviendas donde las maderas de alta durabilidad natural son de gran utilidad en zonas de condiciones ambientales extremas (Mora et al. 2006).

El uso de maderas de alta durabilidad natural, se debe a la mayor vida útil en servicio que estas poseen, ahorrando costos adicionales de adquisición e instalación en la sustitución de maderas defectuosas. Por lo que su uso se supone en situaciones de alto riesgo de biodegradación, como lo sería en construcciones a la intemperie y en contacto directo con el suelo (F. Wolf, 1985).

Sin embargo, la madera es susceptible a la degradación por acción de distintos factores, esta se produce por dos tipos de agentes de degradación, los agentes abióticos y los agentes bióticos (Blanchette et al. 2005).

En tiempos antiguos se llegó a asumir que la pudrición era la que causaba la presencia de los hongos, pero estudios demostraron que toda pudrición de la madera provocando cualquier consecuencia sobre esta, es causada por los hongos y no al revés (Robert Hartig, 1874).

La humedad ayuda de manera directa en el desarrollo de diversos microorganismos, como sucede en el Archipiélago de Chiloé, donde su clima es templado y altamente lluvioso, y las nevadas son poco frecuentes. Por lo que la madera está en riesgo constante, ya que se encuentra en contacto directo con el agua y el suelo.

Según Christopher J. Luley (2005) no todos los hongos degradan la madera de la misma forma. Los tres tipos básicos de pudrición son: blanca, café y pudrición blanda. Pueden generalmente ser diferenciados en campo. Algunos hongos xilófagos (comedores de madera) pueden llevar a cabo más de un tipo de ataque a un mismo huésped. Hay también tipos diferentes de pudrición blanca y café, las cuales dejan un modelo característico de pudrición en la madera, como son las bolsas de pudrición, las pudriciones fibrosas o las pudriciones cúbicas.

En general, el hongo causante de pudrición blanca va destruyendo la lignina, de la pared celular, dejando la celulosa, por lo que reduce la resistencia a la compresión. La madera afectada presenta un aspecto fibroso, poca densidad y color blanco de la celulosa cubriendo la madera (Wilcox 1978).

Mientras que en la pudrición café el hongo va comiendo la celulosa e hidratos de carbono, dejando toda la lignina, como consecuencia de la disminución del volumen aparecen fendas (grietas) en la dirección de las fibras y a lo largo de los anillos de crecimiento, produciendo la degradación en trozos cúbicos.

La pudrición blanda produce madera de color gris mate a pardo, con textura en forma de pequeños cubos. Sólo aparece en madera empapada en agua.

La pudrición café y blanda, disminuyen la capacidad de pandeo de la madera. Una pérdida significativa de esta resistencia ya ocurre incluso antes de que la pudrición sea detectada en la madera (Wilcox 1978).

En particular los hongos causan grandes pérdidas económicas a nivel mundial por disminuir la durabilidad de las estructuras de madera.

Por estas razones la madera debe ser protegida a través de algún tipo de tratamiento. Ni siquiera las maderas naturalmente durables son totalmente inmunes al deterioro al ser expuestas por períodos suficientemente largos de tiempo en ambientes de riesgo.

Butin y Peredo (1986) y Furci (2008), han indicado que Chile, es un país relativamente rico en términos de flora fúngica. Sin embargo, solo alrededor de 3.300 especies de hongos en Chile son conocidas, por lo que son necesarios estudios adicionales para tener una visión más completa de estos.

En etapas de daño avanzado por estos microorganismos, la madera no conserva virtualmente ninguna resistencia, se forman los saquillos de pudrición, o la madera se disuelve literalmente. La detección del daño en la etapa inicial o incipiente es la más difícil, pero también la parte más importante de la inspección. A este punto, el daño puede ser controlado para prevenir deterioros más severos a la estructura.

Aquí la importancia de conocer los distintos tipos de hongos de pudrición que afectan estas maderas, ya que el tipo de microorganismo variará de acuerdo al tipo de madera y la particular exposición que haya sufrido ésta.

Por este motivo, aparece la necesidad de identificar los distintos tipos de hongos, debido a que la resistencia al deterioro de la madera posee una serie de factores que la hacen variar, como la zona en que se está limitando la investigación, los agentes involucrados, el tipo de madera en análisis, entre otros.

Por esto es necesario conocer los tipos de hongos de pudrición que atacan estas maderas en este caso las maderas de alta durabilidad natural provenientes de edificaciones de la comuna de Achao, las que no han sido sometidas a estudio, buscando conocer efectos que estos producen en la madera, para lograr así tener un posible tratamiento o mantención de éstas y así lograr conservar mejor las construcciones habitacionales de ésta zona del Archipiélago de Chiloé.

1.2 Objetivos de la investigación

1.2.1 Objetivo general

- Identificar y aislar hongos de pudrición en maderas de alta durabilidad natural de edificaciones de la comuna de Achao.

1.2.2 Objetivos específicos

- Identificar los microorganismos aislados de las maderas de alta durabilidad natural obtenidas de Achao.
- Analizar el efecto que provocan los hongos identificados en la biodegradabilidad de la madera.

1.3 Alcances

- Esta investigación se desarrollo solo con muestras de maderas de alta durabilidad natural.
- Las maderas utilizadas fueron obtenidas de edificaciones ubicadas solo en la comuna de Achao, Chiloé.

1.4 Estructura de la investigación

La metodología que se implementará en esta investigación se compone de las siguientes etapas.

- Estudio bibliográfico

Se seleccionó la información más relevante necesaria para llevar a cabo la investigación. Como antecedentes generales sobre la comuna de Achao, Archipiélago de Chiloé. Conceptos básicos de la madera, tanto en su macro como micro estructura, y también sus propiedades básicas, como lo son sus características físicas, químicas, mecánicas y anatómicas. Poniendo énfasis directamente en el efecto que provocan los hongos en la biodegradabilidad de la madera, la cual está afectada por diversos agentes que la ponen en riesgo.

- Extracción de muestras

En esta etapa se estudió el criterio utilizado para realizar la recolección de las muestras de maderas de alta durabilidad de las construcciones existentes en la comuna de Achao, y posteriormente mantenerlas en condiciones óptimas para realizar su análisis.

- Trabajo de muestras

La preparación de muestras consiste en la etapa en que se deben seguir los procedimientos y protocolos establecidos, donde se deben obtener las condiciones requeridas que permitirán posteriormente lograr los resultados y análisis necesarios.

- Análisis de resultados

Mediante los ensayos realizados se obtuvieron los resultados, los que mediante biología molecular y microscopía óptica, permiten mostrar y analizar los resultados obtenidos de la investigación.

- Conclusiones

Una vez obtenidos los resultados, con la identificación de cada microorganismo, se puede concluir la procedencia e información particular de cada microorganismo, asociándolo a la ubicación que poseía este en la comuna de Achao.

1. 5 Comuna de Achao, Archipiélago de Chiloé

Antecedentes Generales

Achao se encuentra en el Archipiélago de Chiloé, X Región de Los Lagos de Chile. Corresponde a la capital de la comuna de Quinchao, ubicada en la isla del mismo nombre. Se caracteriza por estar edificado sobre un sector plano, rodeado por cerros y una playa arenosa. Mientras que por el frente se pueden encontrar las islas de Llingua y Linlín. La superficie comunal alcanza los 160 kilómetros cuadrados y en ella se encuentran 9.088 habitantes, muchos de los cuales viven en sectores rurales.

Su geografía se caracteriza por los suaves lomajes que la recorren, donde se pueden ir encontrando poco a poco sus tranquilos poblados con sus características casas de madera de vivos colores, las que son recubiertas por tejuelas de madera, y construidas sobre pilotes, que cuando la marea sube, parecen flotar, (Patorelli 2012).

Uno de los aspectos sobresalientes de la construcción desarrollada en el Archipiélago de Chiloé es el amplio uso de madera. Razón que explica el renombre dado a las construcciones Chilotas, las que son conocidas como parte de la Cultura de madera. Las principales construcciones son casas revestidas de tejuelas, palafitos, casonas de la época gloriosa del Ciprés, e iglesias. Estas últimas son uno de los puntos de mayor atracción en Achao, ya que 3 existentes en esta comuna, fueron declaradas Monumento Nacional y Patrimonio de la Humanidad por la Unesco en el año 2000.

La forma más básica que existe para edificar cualquier recinto en Chiloé, comienza con un gran esqueleto de madera como se puede observar que se hace hasta la actualidad. Luego de las bases, se utilizan vigas maestras en el piso y se sitúan los tijerales o vigas del techo, ajustados a lo que serán posteriormente las paredes.

Se pueden encontrar las típicas viviendas de Chiloé, las que por lo general están construidas en madera. Muros y techos de tejas de alerce, puertas, ventanas, escaleras, todo es madera en sí, como por ejemplo mañío, alerce, raulí, coigüe y roble.

1.6 Clima en Chiloé

Chiloé se conoce por poseer un clima lluvioso y húmedo. A través de la siguiente tabla se puede observar cuál es su situación meteorológica a lo largo de todo el año.

Clima Isla de Chiloé												
	ene	feb	mar	abr	may	jun	jul	ago	sep	oct	nov	dic
Humedad relativa (%)	78	79	83	88	88	90	88	85	84	81	79	78
Horas de sol	7	7	5	4	3	2	3	3	4	5	6	7
Cantidad de lluvia (mm)	103	96	136	164	238	239	247	216	156	127	125	120
Días de lluvia	19	15	16	19	20	24	23	21	23	18	18	19

Figura 1.1

Antecedentes meteorológicos de Chiloé

(Dirección Meteorológica de Chile, Dirección general de aeronáutica civil, 2013)

Por lo que en una comuna donde la cantidad de lluvia mensual es tan alta, como podemos desprender de la tabla de antecedentes meteorológicos, los que en comparación a otras zonas más secas como en el norte del país, convierte a Achao en una zona vulnerable al ataque de microorganismos como los hongos, los que actúan principalmente en zonas húmedas, donde tienen todas las condiciones óptimas para propagarse y vivir, atacando a su principal materia prima, que es la madera, degradándola y deteriorándola exterior como interiormente.

CAPITULO II

Biodeterioro de la madera

2.1 Biodegradabilidad de la madera

La madera es conocida por ser un material ortótropo, es decir, que sus propiedades están en tres direcciones perpendiculares diferentes (axial, radial y circunferencial). Es encontrado principalmente como contenido del tronco del árbol. Los árboles se caracterizan por tener troncos que crecen cada año, formando anillos, los que están compuestos por fibras de celulosa unidas con lignina.

Una vez cortada y seca, la madera se utiliza para distintos fines y en distintas áreas:

- Fabricación de pulpa o pasta, materia prima para hacer papel.
- Alimentar el fuego, en este caso se denomina leña y es una de las formas más simples de biomasa.
- Menaje: vajillas, cuberterías.
- Ingeniería, construcción y carpintería.
- Medicina.
- Medios de transporte: barcos, carruajes.

2.1.1 Generalidades

Una de las características intrínsecas de la madera es ser un material biodegradable, lo que puede ser una ventaja o desventaja desde distintos puntos de vista.

La madera posee la propiedad de no ser un material homogéneo, sino que por el contrario está formado por un conjunto de células especializadas en tejidos que llevan a cabo las funciones fundamentales del vegetal. Esta heterogeneidad de la madera se puede reflejar en sus propiedades físicas y mecánicas.

El proceso de degradación de la madera es llevada a cabo por diferentes tipos de organismos vivos, siendo los de mayor influencia hongos, insectos, horadores marinos y las bacterias. Estos agentes bióticos realizan un efecto destructivo en el material, ya sea para alimentarse o para habitar.

En la destrucción de la madera, se establece una sucesión que es iniciada generalmente por bacterias, seguida por hongo de mancha y de pudrición blanda, y que culmina con la acción de hongos de pudrición blanca y café, llegando a provocar la destrucción total de la madera. (Del Pozo y Parra, 1984).

2.1.2 Durabilidad natural

En la NCh 799/1, la durabilidad natural se define como la capacidad de la madera de resistir el ataque de los diferentes agentes biológicos de destrucción, sin ningún tratamiento de preservación.

La resistencia natural que posee la madera frente al ataque de hongos es muy importante desde el punto de vista económico y tecnológico. Su conocimiento permite una mejor utilización de la madera en diferentes tipos de servicios, además de entregar nuevas posibilidades de uso, lo que permite diferentes alternativas para su comercialización. (Gómez et al., 1969).

La durabilidad de la madera o resistencia natural que opone a la pudrición, es una propiedad en extremo variable. Es así como ciertas clases de madera son notables por su resistencia al ataque de hongos, mientras que otras son conocidas por su facilidad para deteriorarse. Pero aún dentro de una especie determinada de madera, puede haber una notable diversidad de resistencia a la pudrición en piezas tomadas de distintas como también de una misma zona.

Parece ser que la densidad de la madera, o su peso específico, podría servir como criterio de durabilidad, puesto que este depende fundamentalmente de la cantidad de madera (pared celular) existente en una pieza dada. Ahora bien, en muchas especies la densidad no presenta correlación con la resistencia a la pudrición, ya que esta propiedad está influida principalmente por la toxicidad de los extraíbles existente en la madera.

Mientras que el clima influye directamente en la duración de la madera no tratada, pues un clima húmedo y cálido favorece la pudrición de la madera expuesta a la intemperie en mayor medida que un clima seco. (Hunt y Garrat, 1962)

2.1.3 Principales maderas de alta durabilidad natural en Chiloé

Los principales tipos de madera que están presente en Chiloé, corresponden a:

- **Alerce:** Su madera es liviana y de excelente calidad, se emplea en carpintería para la confección de muebles finos, instrumentos musicales, puertas, ventanas, persianas, vigas a la vista entre otros. En la industria de tableros, se utiliza en chapas decorativas y es muy cotizada para revestimientos interiores y exteriores. Su fácil rajado a favor de la fibra, permite la elaboración de tejuelas para techos y exteriores
- **Ciprés:** Este tipo de madera es dura y resistente a la humedad. Se la suele utilizar para la construcción de cajas, y las mejores selecciones de ella pueden utilizarse

también en tablas decorativas, pilotes, como también en las vigas, los pilares y como madera de revestimiento interno.

- **Coigüe:** Su madera es dura y resistente, de color blanco amarillento. Es de buena calidad para la construcción, carpintería, puertas, closet, muebles en general, pisos, parquets, cubiertas de mesa, gradas de escalera, puentes. Se utiliza mayormente para la construcción y también para la leña.
- **Maño:** Sus principales usos son en vigas, muebles, pisos, revestimientos exteriores como interiores, puertas, ventanas, entre otros.
- **Roble:** Tiene buenas características de resistencia y durabilidad, siendo empleada en la construcción de barcos puentes, postes, durmientes, edificaciones, exteriores, etc.

2.1.4 Composición de la madera

La madera se compone de tres sustancias que conforman su pared celular, donde se pueden encontrar las principales macromoléculas; celulosa, hemicelulosa y lignina, que se encuentran presente en todas las maderas. También la conforman las sustancias extraíbles, que son las de baja masa molar y se encuentran en menor cantidad, y las sustancias minerales.

La celulosa (40-50%) es un polímero de glucosa, y constituye las paredes de las fibras, es decir produce resistencia a la tracción. La lignina (20-30%) es un polímero tridimensional, y tiene por función unir las fibras de celulosa, posee capacidad aglutinante. Y la hemicelulosa (20-30%) es un polisacárido que forma parte de la matriz que aglutina las fibras, no constituye fibras por sí misma.

La proporción y composición química de la lignina y la hemicelulosa difiere entre las maderas coníferas y las latifolias, mientras que la celulosa posee una composición uniforme en todas las maderas (Browning, B.L., 1967, Fengel, D., 1984).

2.1.5 Macro estructura de la madera

La madera posee un crecimiento de adentro hacia afuera, (el exterior es más joven que el núcleo).

La macro estructura de la madera (Figura 2.1) está constituida por la corteza exterior, que es la capa protectora de la madera y está formada por tejido muerto y seco.

La corteza interior es húmeda y blanda, debe llevar el alimento a todas las partes en crecimiento del árbol.

La parte exterior es la albura, contiene algunas células vivas que almacenan alimento y conducen la savia. El duramen es la región interna del tronco, y está compuesta por células muertas, proporciona resistencia.

Las fibras son el conjunto de células de sostén orientadas en la dirección del eje.

Los radios corresponden a un conjunto de células de nutrición, orientadas perpendiculares al eje.

La capa de cambium está entre la corteza y el tronco, contiene células nuevas en crecimiento, y es la fuente de las células de la corteza y la madera.

Los anillos de crecimiento son estructuras anulares respecto al eje debidas al crecimiento del árbol.

Mientras que la médula es el tejido blando situado en el centro del árbol, alrededor del cual tiene lugar el primer crecimiento de la madera, la médula se encuentra a todo lo largo de la longitud del árbol.

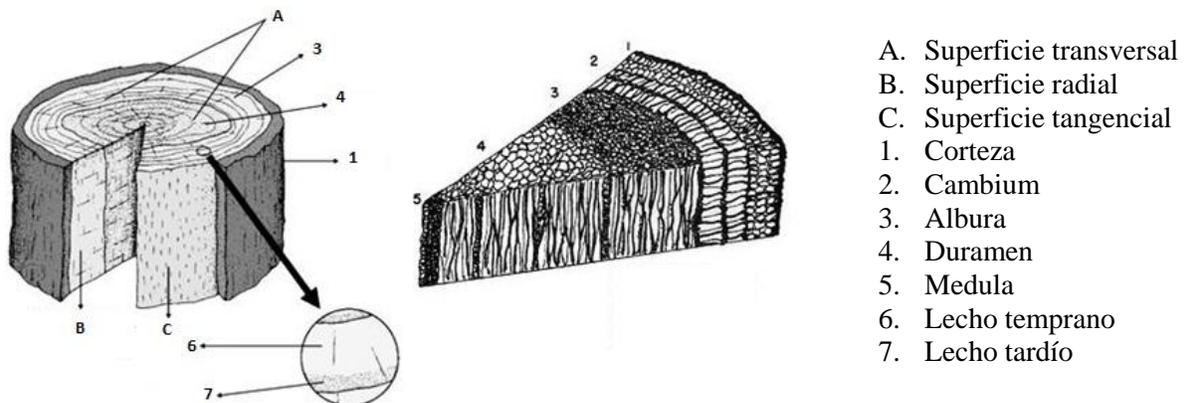


Figura 2.1
Macro estructura de la madera
García et al. (2004) La madera y su anatomía

2.1.6 Micro estructura

Los tejidos vegetales de la madera consisten en diferentes tipos de células, diferenciadas al poco tiempo de su formación para cumplir tres tipos de funciones: conducción, almacenaje y sostén.

Toda célula de conducción de líquidos se caracteriza por poseer una gran parte de su pared perforada para comunicarse con la siguiente. Mientras que toda célula de almacenamiento es de forma “isodiamétrica”, es decir, sus tres dimensiones son semejantes. Además son de pequeño tamaño. Las células del tejido de sostén poseen gran dimensión longitudinal en comparación a las otras dos, para darle resistencia y flexibilidad al tronco.

Las maderas se pueden clasificar en coníferas y latifoliadas. Se diferencian debido a que para las latifoliadas existen tres tipos de tejidos para cada una de las tres funciones, mientras que en la de coníferas que es una rama primitiva de los vegetales, las funciones de conducción y sostén las realizan las mismas células que se denominan traqueidas. Estas traqueidas tienen las características de ambos tejidos: son largas y poseen muchos orificios en la pared para conducir líquidos.

2.2 Reino Fungi: Los hongos

Los hongos son un grupo de seres vivos diferentes a las plantas y los animales, razón por la cual se clasifican en un reino aparte llamado Fungi. La ciencia encargada de estudiarlas se conoce como la Micología (Mykes=Hongo y Logos=Estudio).

Poseen gran capacidad de adaptación y pueden desarrollarse sobre cualquier medio o superficie, tanto en los bosques como en las ciudades. Su reproducción es por medio de esporas, las cuales son dispersadas principalmente por el viento y el agua (Butin 1986).

2.2.1 Biología de los hongos

Los hongos son organismos multicelulares, que se alimentan mediante absorción, no son capaces de sintetizar sus propios alimentos. Estos microorganismos no forman tejidos, por lo que sus células se agrupan formando un cuerpo filamentosos muy ramificado. Este conjunto de filamentos de un hongo se llama micelio, y cada filamento se denomina hifa.

Los hongos son organismos sin clorofila, por lo que no pueden realizar la función de fotosíntesis. La materia orgánica con la que se alimentan la obtienen de los componentes estructurales de la madera, siendo esta atacada y degradada. Sus componentes son: la celulosa, hemicelulosa y lignina.

De acuerdo al tipo de nutrición que poseen, estos organismos desprovistos de clorofila, poseen 3 regímenes de vida:

- a) Los hongos saprobios son quienes pueden descomponer residuos orgánicos para alimentarse.
- b) Los hongos parásitos que extraen las sustancias orgánicas que necesitan de un hospedador, al que llegan a debilitar y a la larga lo matan.
- c) Hongos simbióticos, también extraen las sustancias orgánicas de un hospedador, pero que en contrapartida le entregan ciertas ventajas. Tienen la necesidad de fusionarse con las raíces de plantas vasculares.

2.2.2 Clasificación general de los hongos

De acuerdo con el diccionario de hongos (Hawksworth et al, 1995), este reino tiene aproximadamente 103 órdenes, 484 familias, 4.979 géneros y unas 80.000 especies. Se puede dividir en cinco grupos o filos.

A. Ascomicetes

Es el grupo más numeroso con aproximadamente 28.500 especies. Estos hongos poseen formas muy variadas, como de copa, botón, disco, entre otras. El nombre de esta clase de hongos se debe al hecho de que sus esporas (ascosporas) se forman dentro de estructuras en forma de pequeños sacos llamados ascos. Entre los ascomicetes más primitivos se incluyen las levaduras usadas en panificación y en la elaboración de bebidas alcohólicas. Las trufas y las criadillas de tierra son ascomicetes que viven bajo tierra. Los representantes de este grupo prácticamente se encuentran poblando todo tipo de hábitat, y pueden presentar cualquier tipo de forma de nutrición, ya sea saprobios, parásitos o simbioses.

B. Basidiomicetes

Se caracterizan por la presencia de una célula fértil en su ciclo de vida, llamada basidio, que produce exógenamente 4 basidiosporas aproximadamente. Entre sus formas, contienen a las clásicas setas y hongos con sombrero, también incluye los que tienen aspecto polvoriento o como manchas. También aquí se encuentran organismos que pueden habitar los más variados ambientes y vivir como saprófitos, parásitos y simbioses.

C. Deuteromicetes

Son hongos imperfectos que no tienen, o no se conoce su fase formadora de ascas, es decir, no tienen o no se conoce en ellas la fase sexual de reproducción. Sus formas conocidas son semejantes a las formas conidiales de hongos de los filos Ascomycota, en su mayoría, y Basidiomycota que se reproducen asexualmente por haber perdido su capacidad de reproducirse sexualmente o por ser ésta desconocida. Se encuentran principalmente en el suelo y por lo tanto atacan a maderas en servicio enterradas o cercanas al suelo.

D. Chytridiomicetes

Los quitridios son los más primitivos hongos y son mayormente saprofitos (degradando quitina y queratina). Muchos quitridios son acuáticos (la mayoría de agua dulce), aunque algunos pueden crecer también sobre materia orgánica en descomposición u organismos vivos como gusanos, insectos, plantas y otros hongos. En este caso, las esporas, llamadas zoosporas, poseen flagelos (filamento móvil adherido a la espora) que les permiten moverse en medios líquidos.

E. Zygomycetes

Entre los Zygomycetes quizá los más conocidos sean algunos representantes del orden Mucorales como Mucor o Rhizopus. Se caracterizan por formar zigosporas con gruesas paredes, de origen sexual y esporangiosporas de origen asexual. Estos hongos pueden

desarrollarse sobre materia orgánica en descomposición, aunque también se pueden encontrar en el tracto digestivo de algunas especies, como los insectos.

2.2.3 Tipos de hongos degradadores de madera

Los hongos degradadores de la madera se separan en 3 grupos dependiendo del tipo de ataque:

A. Hongos de moho(Ascomycetes y Deuteromycetes)

Son conocidos como mohos de la humedad, producen coloraciones viscosas, no son considerados organismos manchadores debido a que su crecimiento es superficial y no decoloran el tejido de la madera, poseen una apariencia polvorienta. Estos hongos no son capaces de degradar lignina ni celulosa, por lo tanto no afectan las propiedades mecánicas de la madera.

B. Hongos cromógenos (Ascomycetes y Deuteromycetes)

Se caracterizan porque se alimentan del contenido celular de las células vivas de la madera y no producen degradaciones ni afectan a las propiedades físico-mecánicas de la madera. El único efecto importante que produce es un cambio de coloración debido a que tienen hifas pigmentadas.

C. Hongos de pudrición

Estos hongos se alimentan de la pared celular de la madera, llegando a provocar la destrucción completa de ésta. Las hifas producen enzimas que disuelven los nutrientes de la madera con los que se alimentan. El micelio de estos hongos al penetrar en la madera ataca en primer lugar a la hemicelulosa y posteriormente a la celulosa y la lignina. Su efecto es la pérdida de densidad y resistencia, acompañados de un cambio de coloración, aumentos en el contenido de humedad de la madera, y variación de su conductividad eléctrica y térmica.

En las fases iniciales no es fácil de reconocer porque las hifas permanecen ocultas en su interior. Según va desarrollándose la pudrición se va acentuando el cambio de color y la madera comienza a perder peso. En la fase final del proceso se llega a la destrucción total de la estructura de la madera con la pérdida completa de sus propiedades mecánicas.

La clasificación de las pudriciones se basa en las alteraciones de color de la madera en su fase inicial de pudrición.

D. Hongos de pudrición blanca (Basidiomycetes)

Se caracterizan porque el hongo se alimenta principalmente de lignina, donde el ataque es superior tanto en intensidad como en rapidez con respecto al grado de

alimentación sobre de celulosa y hemicelulosa. La madera atacada toma un color blancuzco. Generalmente afectan más a las maderas frondosas que a las coníferas, ya que estas tienen mayor contenido de lignina. A veces se denomina pudrición corrosiva o deslignificante.

E. Hongos de pudrición café (Basidiomycetes)

Este hongo se alimenta principalmente de celulosa y hemicelulosa, donde como consecuencia del ataque queda un residuo pardo oscuro. Es capaz de atacar maderas con escaso o nulo contenido de humedad. Se produce por el desarrollo de las hifas, éstas penetran en la madera causando la degradación de algunos o todos los componentes de la pared celular. La estructura de las fibras de la madera es destruida de tal forma que la madera se contrae y se agrieta, mostrando una apariencia cúbica semejante a ladrillos. Es la más grave y peligrosa, por lo que también se le llama pudrición destructiva. Corresponden a hongos basidiomicetos que afectan a la celulosa y dejan a la lignina sin daño.

Cuando los hongos atacan la madera e invaden sus células para obtener alimento metabolizando los constituyentes de estas, la madera sufre una serie de cambios en sus propiedades que afectan su uso posterior. Estos cambios varían según la clase de hongo y el tiempo en que ocurre la pudrición (Rayner y Boddy, 1988).

Por ejemplo con los hongos que causan la pudrición café se observa primero una pérdida grande de la fuerza de la madera y un cambio en los componentes de la pared celular, antes de notarse cambios en el peso. En el caso de la pudrición blanca, la pérdida de fuerza es proporcional a la pérdida de peso y no ocurren cambios apreciables en los componentes de la pared (Saldarriaga 2001).

Se ha demostrado que la madera que ha perdido sólo el 1% de su peso a causa de su descomposición generalmente pierde un 50% de su fuerza (Richards 1954). Las enzimas degradadoras de carbohidratos de los hongos de la pudrición café difieren de los hongos de la pudrición blanca en que son multifuncionales y no poseen especificidad (Alexopoulos et al. 1996). De otro lado, los hongos de la pudrición café reducen rápida y drásticamente la fuerza en fases tempranas del proceso, mientras los hongos de la pudrición blanca causan un decrecimiento más lento y progresivo (Jasalavich et al. 2000).

F. Hongos de pudrición blanda (Basidiomycetes, Ascomycota y Deuteromycota)

Son producidas por hongos inferiores, cuyas hifas se desarrollan en el interior de la pared celular de las células de la madera y atacan principalmente la celulosa y la hemicelulosa en el sentido longitudinal de la fibra. La madera atacada tiene un aspecto final blando y esponjoso. Se produce cuando existen altas condiciones de humedad, tanto en el ambiente como en la madera.

CAPITULO III

MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Generalidades

La metodología y materiales necesarios para realizar la identificación de hongos de pudrición asociados a maderas de las viviendas de la comuna de Achao, se establecerán y expondrán través de este capítulo.

3.2 Material

3.2.1 Madera

Las muestras utilizadas en este estudio fueron obtenidas de diversas edificaciones de uso habitacional, las que poseían distinto estado de mantención.

Las maderas de las muestras a ensayar corresponden a especies como el Alerce, Ciprés, Coigüe, Mañío y Roble. Las que poseen una forma rectangular, con dimensión de 20 por 8 cm. con un espesor de 12 cms. en promedio aproximadamente, (Figura 3.1).



Figura 3.1

Muestra de madera utilizado en el estudio. Tamaño similar para todas las muestras recolectadas, las que fueron guardadas en bolsas plásticas para su uso, como también para conservarlas luego de ser utilizadas.

Elaboración propia

3.3 Equipos

- 3.3.1 Autoclave:** Recipiente de presión metálico, de paredes gruesas con un cierre hermético, que permite trabajar a alta presión y así realizar una esterilización con vapor de agua, (Figura 3.2).
- 3.3.2 Balanza analítica:** Tipo de balanza que se caracteriza por dar datos exactos y muy específicos respecto del peso de un objeto o elemento particular, (Figura 3.5)
- 3.3.2 Cámara de flujo laminar:** Recinto que emplea un ventilador para forzar el paso de aire a través de un filtro y proporcionar aire limpio en la zona de trabajo, (Figura 3.4).
- 3.3.3 Microscopio óptico:** Instrumento que permite observar objetos que no se pueden ver a simple vista.
- 3.3.4 Lupa Trinocular:** Instrumento óptico que consta de un lente convergente, que consigue la imagen ampliada de un objeto.
- 3.3.5 Estufa de secado:** Equipo que se utiliza para secar y esterilizar recipientes de vidrio y metal en el laboratorio, (Figura 3.3)
- 3.3.6 Peachimetro:** Sensor utilizado para medir el pH de una disolución.
- 3.3.7 Agitador Magnético:** Barra magnética o imán, utilizado para revolver una mezcla líquida o disolución.



Figura 3.2: Autoclave
Elaboración propia



Figura 3.3: Estufa de secado
Elaboración propia



Figura 3.4
Cámara de flujo laminar
Elaboración propia



Figura 3.5
Balanza analítica
Elaboración propia

3.4 Materiales de laboratorio

- 3.4.2 Agar
- 3.4.3 Extracto de malta
- 3.4.4 Placas Petri, (Figura 5.6)
- 3.4.5 Parafilm
- 3.4.6 Vasos precipitados
- 3.4.7 Tubos Eppendorf
- 3.4.8 Alcohol
- 3.4.9 Pinzas
- 3.4.10 Papel aluminio
- 3.4.11 Matraz, (Figura 5.7)
- 3.4.12 Tubos de ensayo
- 3.4.13 Papel absorbente
- 3.4.14 Dosificador
- 3.4.15 Agua destilada
- 3.4.16 Mortero Porcelana
- 3.4.17 Asa de platino para la inoculación, (Figura 5.8)
- 3.4.18 Instrumentos de corte para las muestras
- 3.4.19 Saca bocado



Figura 3.6: Placas Petri
Elaboración propia



Figura 3.7: Matraz
Elaboración propia



Figura 3.8: Asa de platino
Elaboración propia

3.5 Método

3.5.1 Tratamientos

La metodología empleada en este estudio, se enfoca al análisis de la incidencia que provocan los hongos en el biodeterioro de la madera.

Los que se retiraron de su hábitat desarrollado en la madera de las viviendas de la zona de Achao, e inoculados en dos nuevos medios de cultivo, ya que al ser especies desconocidas, no se tienen conocimientos sobre las características que debe tener su medio de crecimiento, por lo que se sembró cada muestra en dos tipos de medios. Los que son del tipo:

1. Malta Agar
2. Medio selectivo para hongos basidiomicetes.

Con el fin de obtener el organismo de manera individual y poder lograr su identificación.

3.5.2 Extracción de muestras

Las muestras fueron extraídas de viviendas ubicadas en la comuna de Achao, Chiloé. Las cuales fueron trasladadas al Laboratorio de Biodeterioro y Biodegradabilidad de la Universidad de Valparaíso. Las que de acuerdo a su ubicación original antes de la extracción, se pudieron dividir en 30 grupos de muestras a estudiar.

Estas muestras, fueron obtenidas de manera aleatoria de las distintas edificaciones del tipo habitacional que se encontraban ubicadas en la comuna, por lo que para ser incorporadas al estudio, se consideró a las que presentaban un considerable deterioro a simple vista.

Estas muestras luego de ser extraídas, son separadas en bolsas plásticas individuales y estériles, las que deben ser mantenidas con una temperatura de 4°C hasta que comiencen a ser trabajadas.

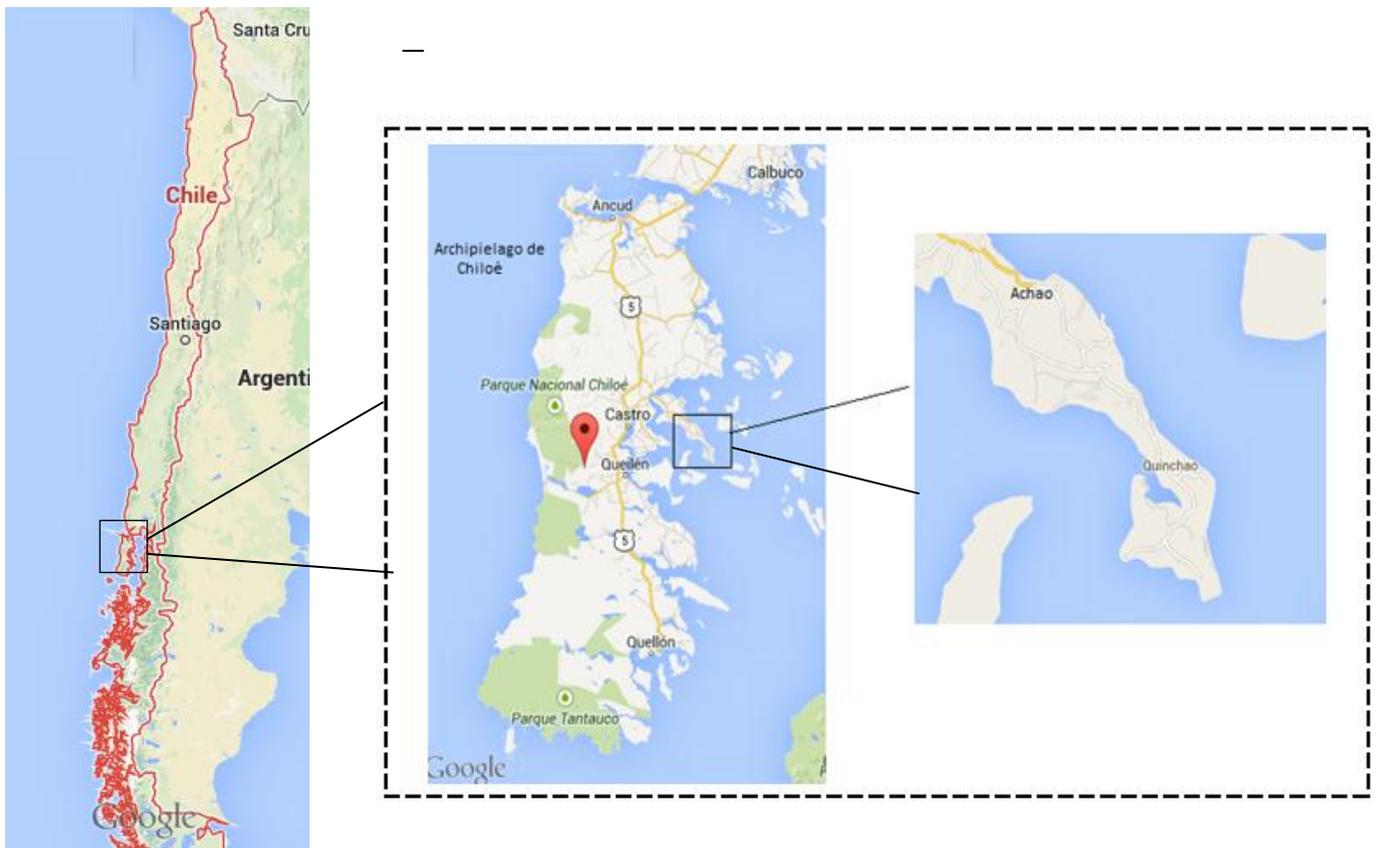


Figura 3.9: Plano ubicación zona en estudio. Chiloé Región de los Lagos. 42° y 43° de Latitud y 75° y 73° de Longitud Sur.

Fuente: <http://www.gobernacionchiloe.gov.cl/geografia.html>

3.5.3 Medios de cultivo Sólido

Para llevar a cabo el crecimiento fúngico, se realizaron 2 medios de cultivo que permitieron crear una condición de desarrollo similar a la natural.

1. Medio Malta Agar
2. Medio basidiomicetes:

El medio malta agar como su nombre lo dice es una combinación de malta y agar, los que estarán en una concentración de 15 gr. de Agar 10 gr. de extracto de Malta diluidos en 1000 cc de agua destilada, los que se incorporaron en un matraz para que se obtenga una mezcla homogénea.

Mientras que el medio selectivo para hongos basidiomicetes, fue preparado con 15 gr de agar, 15 gr de extracto de malta, 2 gr de extracto de levadura y 0,06 gr de benlate, el sulfato de estreptomycin 0,01 gr y ácido láctico 2,5 gr, se agregaron a la suspensión ya obtenida después de ser esterilizada.

3.5.4 Esterilización

Para esterilizar medios de cultivo, dosificador y las placas petri, estos son llevados a un autoclave, donde la esterilización se realizó a una presión de vapor saturado de 121°C, por aproximadamente 25-30 minutos, temperatura a la que se obtienen estos desinfectados.

Una vez que trascurrieron los 25-30 minutos, se sacan los instrumentos del autoclave y se dejen enfriar para poder trabajar con ellos. Pero hay que ser cuidadoso con los periodos, ya que si este tiempo de enfriar se sobrepasa, el medio de cultivo puede solidificarse en el matraz, por lo que el traspaso se debe hacer a tiempo a cada placa petri para que en ellas si se produzca la solidificación.

Una vez preparado y esterilizado el medio de cultivo, con el dosificador se incorporaron 15 ml. aproximadamente de la solución en cada placa petri, las que se dejaron enfriar hasta la solidificación.

3.5.5 Inoculación de muestras en el medio de cultivo sólido

Las 30 muestras se llevaron al siguiente procedimiento; donde en primer lugar se debieron llevar a una cápsula petri, donde el hongo desconocido se podría desarrollar. Cortando con un cortaplumas y sacando con una pinza, 3 pequeños trozos de madera por

cada muestra y ubicándolos en cada extremo de la placa, formando los vértices de un triángulo.



Figura 3.10: Cápsula petri con trozos de madera y medio de cultivo malta agar. Elaboración propia



Figura 3.11: Cápsula petri con trozos de madera y medio de cultivo Basidio. Elaboración propia

Esta etapa nos entregó la fecha de inoculación que llevará cada muestra en la tabla resumen, ya que cada incubación se desarrollaría en tiempos continuos, afectando proporcionalmente así sus tiempos de crecimiento.

El crecimiento del micelio varía entre 3 y 10 días (este tiempo es variable dependiendo del tipo de hongo) se comenzó a observar un evidente crecimiento fúngico en las placas, donde éstas deben ser observadas mediante el microscopio óptico y la lupa trinocular, y corroborar los distintos hongos que estén creciendo en una misma placa. Inoculando cada nuevo trozo de medio de cultivo con el hongo mediante un asa y situándolo en una nueva placa individual, con el fin de obtener el crecimiento de un solo microorganismo. Durante el transcurso de estos periodos es necesario realizar controles en forma periódica, para detectar y controlar posibles contaminaciones. En tal situación se debe eliminar y realizar todo el procedimiento nuevamente.

Los resultados fueron buenos, ya que todas crecieron y aproximadamente solo un 5% presentó contaminación, lo que pudo deberse a contaminación del ambiente o por contaminación bacteriológica proveniente de las mismas maderas, estas muestras debieron ser eliminadas y repetidas.

A medida que cada muestra presenta un considerable crecimiento fúngico, se deben analizar los 3 trozos de madera inoculados para realizar la separación de cada uno de estos en placas individuales, y así llevar a cabo la aislación de cada uno. Ver Figura 3.12 y Figura 3.13.

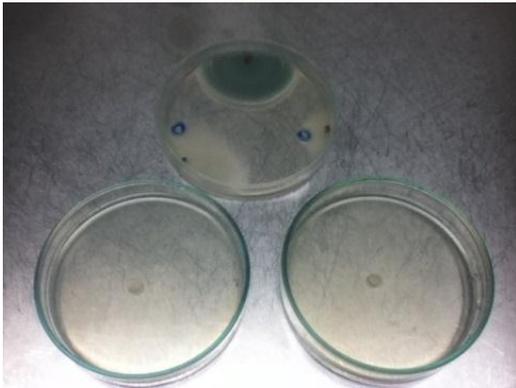


Figura 3.12: Placa petri original arriba, separada en dos nuevos crecimientos
Elaboración propia

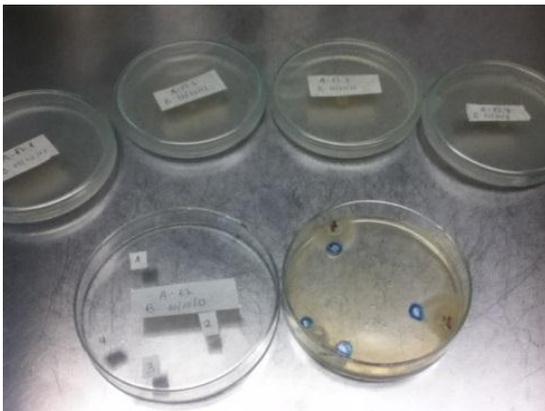


Figura 3.13: Placa Petri original abajo separada en cuatro nuevos crecimientos.
Elaboración propia

3.5.6 Inoculación en medio de cultivo líquido y tubo de ensayo

Una vez que se concluye que existe un crecimiento individual por cada placa, estas están listas para ser trasladadas. De donde se obtiene una primera muestra para los tubos de ensayo, esto se realiza para tener una cepa de respaldo del micelio aislado, por lo que se

deben esperar alrededor de 7 días para que este crezca lo suficiente en el tubo, y luego ser almacenados en un cooler a 4°C para mantener su crecimiento detenido.

Una segunda muestra del hongo individual se debe inocular en un frasco de medio líquido. Frascos que deben permanecer a temperatura ambiente por mínimo 5 días para permitir crecimiento del hongo en este nuevo medio.

Dosificación:

- Medio de cultivo líquido: 10 gr extracto de malta y 1000 cc agua destilada.
- Medio para tubos de ensayo: 15 gr agar, 10 gr extracto de malta y 1000 cc agua destilada.



Figura 3.14: Inoculación muestra desde el medio solido aislado (derecha), al medio líquido (izquierda).

Elaboración propia



Figura 3.15: Placa petri con hongo aislado en el centro, inoculado a frasco con medio líquido y tubo de ensayo con medio sólido.

Elaboración propia

Esperado el tiempo necesario para que el microorganismo creciera de manera considerable en el medio líquido, se puede proceder a la siguiente etapa, la filtración. En un inicio todas las muestras comenzaron a crecer de manera notoria y correcta. Pero en las últimas 15 muestras se empezó a observar algo nuevo. Estas no presentaron crecimiento.



Figura 3.16: Frascos con medio líquido, que no presentaron ningún crecimiento fúngico.
Elaboración propia

Fueron eliminadas y vueltas a inocular en un nuevo medio líquido, pero tampoco crecieron, una tercera vez fue repetido el proceso, pero ahora manteniéndolas en el tiempo de crecimiento en un ambiente más templado, donde una vez más no se observaron cambios.

Como no se estaban registrando diferencias, estudiando sobre el desarrollo de los hongos, a quienes los afecta directamente el pH en el cuál se están desarrollando (Wild, 1992), por lo que mediante un Peachimetro, se pudo ver con que pH se encontraban el medio de cultivo líquido, este fue de 6, por lo que se debió llevar al optimo necesario para que un hongo crezca, 5,4 aproximadamente. Así una vez que se obtuvo el nuevo medio de cultivo con pH regulado, 5,4. Se realizó una nueva inoculación de las muestras en cuestión. Transcurrido el tiempo de desarrollo, se comenzó a observar un crecimiento notable del microorganismo en 6 de las placas, mientras que un mínimo crecimiento en las demás placas en cuestión, aún sin ser el apropiado para el proceso de filtración.

Estas 6 muestras entregaron un considerable crecimiento fúngico, por lo que el número de muestras en problemas se reducía a 9 frascos.

Analizando la situación de una manera simple, al no existir crecimiento de cualquier tipo de organismo puede ser asociado directamente con el tipo de alimentación que se está proporcionando. Por lo que se obtiene una nueva opción para lograr llevar al crecimiento a estos hongos. Es la incorporación de dos sustancias, la levadura y la glucosa. Las cuáles serán incorporadas a los componentes del medio de cultivo líquido, y así se obtendrán dos nuevos medios líquidos, cada uno con una de las nuevas sustancias en cuestión.

Dosificación:

- Medio de cultivo líquido más levadura: 10 gr extracto de malta y 1000 cc agua destilada más 1 gr de levadura.
- Medio de cultivo líquido más glucosa: 10 gr extracto de malta y 1000 cc agua destilada más 1 gr de glucosa.

Una vez hecha la mezcla, se realizó la inoculación de las muestras, y transcurrido el tiempo de espera para observar su crecimiento, se presentó crecimiento notorio en las muestras y útil para lo requerido, obteniendo una respuesta positiva a la intervención de la sustancia, si bien cada placa fue sometida a crecer en ambos medios nuevos creados, no se registró crecimiento de todas en los dos tipos. En la figura 3.17, se puede observar el resultado final del crecimiento obtenido de acuerdo a los factores desarrollados.

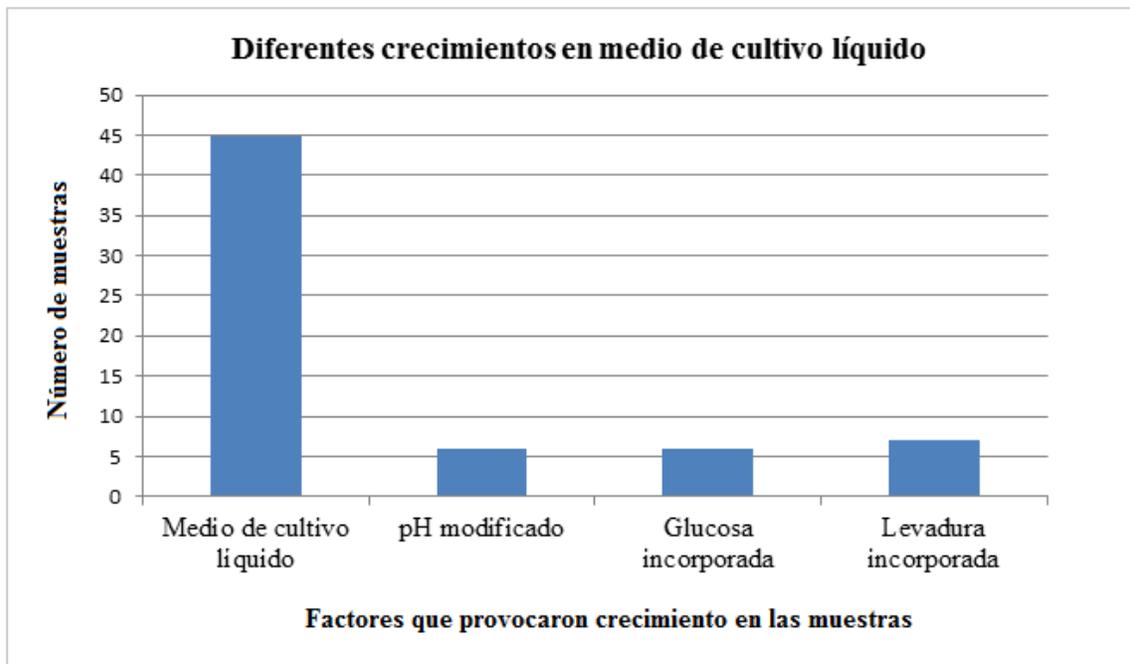


Figura 3.17: Resumen del crecimiento logrado en muestras con problemas del medio de cultivo líquido

3.5.7 Filtrado y secado del hongo de pudrición

Cuando se obtuvo el crecimiento fúngico del hongo en el frasco con medio de cultivo líquido, se puede realizar el paso de filtrado y secado. Donde se debe obtener el hongo seco, trasladarlo a una nueva capsula petri para ser llevado a la estufa de secado,

quien se encargará de deshidratarlo, y así poder obtener un micelio que permitirá obtener la información necesaria para ser identificado. Este se debe mantener por 48 horas a una temperatura de 37°C.



Figura 3.18: Hongo desarrollado en pleno proceso de filtración. Elaboración propia



Figura 3.19: Hongo filtrado en nueva placa petri, listo para ser secado.
Elaboración propia

Una vez que se ha deshidratado completamente en la estufa de secado, este debe ser raspado, se puede hacer con un bisturí o un saca bocado, para luego ser incorporado a un tubo eppendorf que es donde se guardará la información final del hongo estudiado, que permitirá realizar su identificación.



Figura 3.20: Hongo deshidratado
Elaboración propia



Figura 3.21: Hongo raspado
Elaboración propia



Figura 3.22: Hongo
en tubo eppendorf
Elaboración propia

3.5.8 Extracción DNA

La extracción del DNA es el paso a ejecutar luego de la aislación de los microorganismos. Donde la técnica de extracción consiste en homogeneizar las células y separar los núcleos, de los cuales se obtiene el DNA.

Esto se realiza a través de detergentes y fenoles, (Figura 3.23) los que están encargados de romper la pared del núcleo, que es donde se encuentra el material genético. Además consiste en separar el DNA de materiales contaminantes, como el RNA y las proteínas. Donde los fenoles y las soluciones salinas son los encargados de separar todo lo que es contaminante y así dejar el DNA libre.

Existe una variedad de buffer de extracción y precipitación que se utilizan, donde el buffer de extracción es el encargado de romper la pared celular y la membrana plasmática, para así poder acceder al núcleo. Mientras que el buffer de precipitación es quién separa el DNA de contaminantes. Los buffer de extracción y de precipitación están hechos de detergentes y sales.

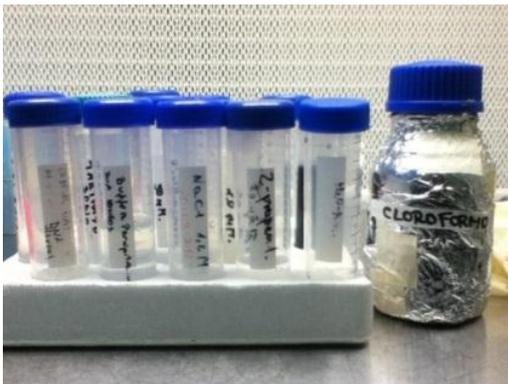


Figura 3.23: Imagen con los materiales
necesarios para la extracción

Elaboración propia

A la muestra obtenida del microorganismo en el tubo Eppendorf, se le incorporan 500 ul (microlitros) de buffer de extracción con una micropipeta (Figura 3.24 y 3.25), mezcla a la que se le aplica vortex (Figura 3.26) por un par de segundos, para lograr homogeneizar lo más posible. Para luego calentarla a 70°C por 30 minutos en máquina de termo regulado. Con lo que se debe obtener la ruptura de la pared celular y el núcleo. Con una mezcla de DNA, proteínas y aminoácidos, (Figura 3.30).



Figura 3.24: Micropipeta usada

Elaboración propia

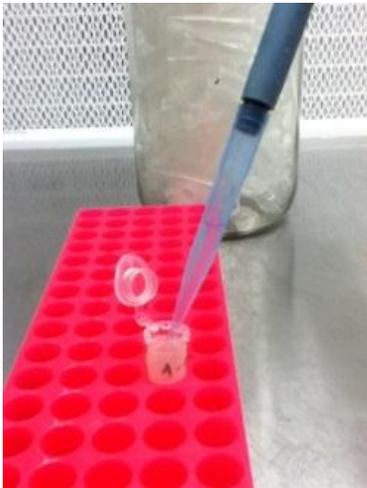


Figura 3.25: Incorporación 500 ul de buffer de extracción al eppendorf.

Elaboración propia



Figura 3.26: Vortex,
dispositivo simple para mezclar
Elaboración propia



Figura 3.27: Maquina de
termo regulado
Elaboración propia



Figura 3.28: Eppendorf
calentado a 70°C en termoregulado
Elaboración propia

Luego del baño maría se le agregan 480 ul de cloroformo, y 20 ul de isopropanol, que corresponden a los fenoles, (Figura 3.29). Los que son desnaturizadores activos de proteínas, ya que suprimen la solubilidad de las proteínas, provocando que estas precipiten al fondo del tubo eppendorf dejando el DNA en el extremo superior, (Figura 3.30).



Figura 3.29 Cloroformo, que se incorporará al eppendorf
Elaboración propia



Figura 3.30: Eppendorf con la mezcla de fenoles.
Elaboración propia

Lo que se debe centrifugar a 13.000 rpm durante 8 minutos. Una vez centrifugado, se traspara la fase superior a otro eppendorf, la que corresponde a una mezcla de aminoácidos y DNA, (Figura 3.31)



Figura 3.31: Maquina centrifuga

Elaboración propia

Como segunda etapa, esta agregar el buffer de precipitación, del cual se agregan 800 ul, solución al que se le debe aplicar vortex por un par de segundos, para luego ser centrifugado por 8 minutos a 13.000 rpm. Este precipitado permite liberar el DNA de contaminantes, ya que este se está haciendo precipitar.

Se obtiene la precipitación del DNA, quedando este en la parte inferior del tubo Eppendorf, permitiendo así retirar todo el líquido presente en la parte superior. Luego nuevamente se deben agregar 350 ul de cloruro de sodio y 350 ul de solución de cloroformo con isopropanol. Se llevan al vortex y a la centrifuga, donde el DNA sube considerablemente.

Quedando así 2 fases, donde la superior será utilizada, pasándola a un nuevo tubo eppendorf. A este eppendorf se le agregan 240 ul de isopropanol (alcohol), y se deja incubar por 1 hora aproximadamente a -20°C . Luego de la incubación, se centrifuga por 20 minutos a -4°C , para que precipite de manera sólida el DNA, (Figura 3.32).

Nuevamente se le debe retirar el líquido y se le agregan 350 ul de alcohol al 75% de frio. Donde se vuelve a centrifugar por 5 minutos a 13.000 rpm, para así eliminar algún aminoácido aun existente.



Figura 3.32: Presencia solida del DNA, luego de pasar por todos los procesos.

Elaboración propia

El DNA queda en el fondo del tubo, pero este puede continuar húmedo, por lo que se debe secar a 60°C por 2 a 3 minutos en un termoblock, (Figura 3.33). Donde luego queda seco el DNA, al que se le agregan 50 ulMQ (miliqu) de agua, es decir, agua desmineralizada, quedando así el DNA disuelto, (Figura 3.34). El DNA extraído se almacenó a -20°C.

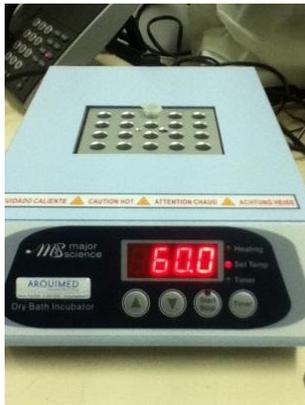


Figura 3.33: Termoblock

Elaboración propia



Figura 3.34: Incorporación de agua MQ al eppendorf con la muestra de DNA.

Elaboración propia

Para ver si tenemos DNA en la muestra, preparamos un gel de agarosa (la agarosa es un polisacárido extraído de algas marinas), 2 gramos en 200 ml de agua destilada con bromuro de etidio (marcador de ácidos nucleicos), el cual a través de una electroforesis (la que corresponde a una técnica para la separación de moléculas según la movilidad de estas, nos permite observar la Banda de DNA en un Transiluminador UV, (Figura 3.35)



Figura 3.35: Presencia de ADN en las muestras trabajadas. En esta imagen se ven 9 muestras que están siendo analizadas por el transiluminador UV.

3.5.9 Amplificación

Una vez comprobada la presencia de DNA, realizamos la reacción en cadena de la polimerasa, PCR, la que corresponde a una técnica de biología molecular desarrollada en 1986 por Kary Mullis, cuyo objetivo es obtener un gran número de copias de un fragmento de ADN particular, partiendo de un mínimo; en teoría basta partir de una única copia de ese fragmento original.

Esta técnica sirve para amplificar un fragmento de ADN; donde su utilidad es que tras la amplificación resulta mucho más fácil identificar con una muy alta probabilidad. A través de esta técnica podemos lograr identificar las especies de hongos que logramos aislar de la madera. El PCR se realiza con una serie de diferentes reactivos más un equipo llamado termociclador, el cual nos permite calentar y enfriar los tubos de reacción para controlar la temperatura necesaria para cada etapa de la reacción, (Figura 3.36)



Figura 3.36: Termociclador. Aparato en el que se efectúa el PCR convencional

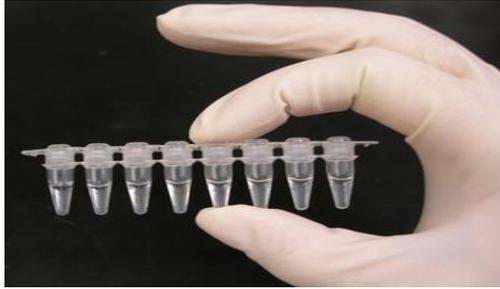


Figura 3.37: Tubos de PCR utilizados en la amplificación

El proceso de PCR por lo general consiste en una serie de 20 a 35 cambios repetidos de temperatura, llamados ciclos; cada ciclo suele consistir en 2-3 pasos a diferentes temperaturas. El PCR común se realiza con ciclos que tienen tres pasos de temperatura. Los pasos de ciclos a menudo están precedidos por un choque térmico (llamado "hold") a alta temperatura ($> 90\text{ }^{\circ}\text{C}$), y seguido por otro hold al final del proceso para la extensión de producto final o el breve almacenaje. Las temperaturas usadas y el tiempo aplicado en cada ciclo dependen de gran variedad de parámetros. Éstos incluyen la enzima usada para la síntesis de ADN, la concentración de iones divalentes, de los dNTP en la reacción, y la temperatura de unión de los cebadores, así como la longitud del ADN que se desea amplificar.

A. Inicio

Este paso consiste en llevar la muestra hasta una temperatura de $94\text{-}96\text{ }^{\circ}\text{C}$ que se mantiene durante 1-9 minutos.

B. Desnaturalización

En primer lugar, se desnaturalizo el ADN (se separan las dos cadenas de las cuales está constituido). Este paso puede realizarse de diferentes modos, pero se usó el calentamiento ($94\text{-}95\text{ }^{\circ}\text{C}$) de la muestra, siendo esta la forma más habitual.

C. Alineamiento o unión del cebador

A continuación se producirá la hibridación del cebador (el que corresponde a una cadena de ácido nucleico o de una molécula relacionada que sirve como punto de partida para la replicación del ADN.) es decir, el cebador se unirá a su secuencia complementaria en el ADN molde. Para ello es necesario bajar la temperatura a $40\text{-}68\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 20-40 segundos, permitiendo así el alineamiento. Los puentes de Hidrogeno estables entre las cadenas de ADN (unión ADN-ADN) sólo se forman cuando la secuencia del cebador es muy similar a la secuencia del ADN molde. La polimerasa une el híbrido de la cadena

molde y el cebador, y empieza a sintetizar ADN. Los cebadores actuarán como límites de la región de la molécula que va a ser amplificada.

D. Extensión o elongación de la cadena

Actúa la ADN polimerasa (enzimas polimerasas), tomando el ADN molde para sintetizar la cadena complementaria y partiendo del cebador como soporte inicial necesario para la síntesis del nuevo ADN. La polimerasa sintetiza una nueva hebra de ADN complementaria a la hebra molde añadiendo los dNTP complementarios en dirección 5'→3', uniendo el grupo 5'-fosfato de los dNTP con el grupo 3'-hidroxilo del final de la hebra de ADN creciente (la cual se extiende). La temperatura para este paso depende del ADN polimerasa que usemos. Para la polimerasa Taq, la temperatura de máxima actividad está en 70-80 °C (comúnmente 72 °C). El tiempo de extensión depende tanto del ADN polimerasa usada como de la longitud del fragmento de ADN que se va a amplificar.

E. Elongación final

Etapla única que se lleva a cabo a una temperatura de 70-74°C durante 5-15 minutos tras el último ciclo de PCR. Con ella se asegura que cualquier ADN de cadena simple restante sea totalmente amplificado.

3.5.10 Secuenciación de los productos de PCR

El protocolo consideró la secuenciación de las hebras sentido y anti sentido. La secuenciación se realizó en el Laboratorio de Biología molecular del Departamento de Ciencias Biomédicas de la Universidad de Valparaíso, mediante la utilización de un secuenciador automático, mientras que la visualización de las secuencias nucleotídicas se efectuó mediante el programa Sequence Scanner.

3.5.11 Identificación preliminar de Hongos de pudrición

La identificación preliminar de los hongos se determinó sometiendo, las secuencias consenso, previa alineación de las hebras sentido y anti sentido, a la base de datos del Centro Nacional para la información Biotecnológica (NCBI), mediante el programa informático de alineamiento de secuencias BLAST. Donde mediante las bases nitrogenadas que se obtuvo de cada muestra identificada, el programa computacional las asocia a una especie particular, entregando la información completa para la identificación de todas las muestras, como por ejemplo su clase, especie, familia, genero, otorgando también el porcentaje de identidad que posee cada muestra.

Finalmente se tiene la tabla resumen 3.1 con las muestras desglosadas de acuerdo a los distintos crecimientos que se obtuvieron de las placas. Donde MA, se refiere a las muestras

que crecieron en medio del tipo Malta Agar, y B a las que crecieron en el medio Basidiomicetes. Especificadas las que se desarrollaron en la Levadura y Glucosa. Cada una con la fecha en que se obtuvo el micelio seco en el tubo Eppendorf listo para pasar a la etapa de Identificación. Con el registro final de la realización correcta de la extracción del DNA y el PCR.

Tabla 3.1: Tabla de registro de avances según etapas

Nº	Muestra	Tubo	Eppendorf	Tipo de Medio	Fecha	EXT-DNA	PCR
1	A-1	ok	ok	MA	12-07-2013	ok	ok
2	A-2	ok	ok	MA	08-07-2013	ok	ok
3	A-3	ok	ok	MA glucosa	07-11-2013	ok	ok
4	A-4	ok	ok	MA levadura	07-11-2013	ok	ok
5	A-5	ok	ok	B	11-11-2013	ok	ok
6	A-6	ok	ok	MA	18-11-2013	ok	ok
7	A-7	ok	ok	B glucosa	23-01-2014	ok	Ok
8	A-8	ok	ok	B levadura	23-01-2014	ok	Ok
9	A-9	ok	ok	MA	25-11-2014	ok	Ok
10	A-10	ok	ok	B	25-11-2014	ok	Ok
11	A-11	ok	ok	MA	25-11-2014	ok	Ok
12	A-12	ok	ok	B	25-11-2014	ok	Ok
13	A-13	ok	ok	B	25-11-2014	ok	Ok
14	A-14	ok	ok	B	28-11-2014	ok	ok
15	A-15	ok	ok	MA	28-11-2014	ok	ok
16	A-16	ok	ok	MA glucosa	23-01-2014	ok	ok
17	A-17	ok	ok	B	28-11-2014	ok	ok
18	A-18	ok	ok	B	28-11-2014	ok	ok
19	A-19	ok	ok	MA levadura	23-01-2014	ok	ok
20	A-20	ok	ok	MA	02-12-2013	ok	ok
21	A-21	ok	ok	B	02-12-2013	ok	ok
22	A-22	ok	ok	MA levadura	27-01-2014	ok	ok
23	A-23	ok	ok	MA	02-12-2013	ok	ok
24	A-24	ok	ok	B	05-12-2013	ok	ok
25	A-25	ok	ok	MA	05-12-2013	ok	ok
26	A-26	ok	ok	MA	05-12-2013	ok	ok
27	A-27	ok	ok	B	05-12-2013	ok	ok
28	A-28	ok	ok	MA	12-12-2013	ok	ok
29	A-29	ok	ok	B	12-12-2013	ok	ok
30	A-30	ok	ok	MA	12-12-2013	ok	ok

CAPITULO IV

ANÁLISIS DE RESULTADOS

4.1 Identificación de hongos de pudrición

Se lograron identificar 14 especies de hongos de pudrición del phylum Basidiomycota, clase Agaricomycetes distribuidos en 12 géneros, 4 órdenes y 6 familias de las muestras obtenidas de las edificaciones de la comuna de Achao, Archipiélago de Chiloé.

De las cuales un 100% de las muestras identificadas corresponden a la división Basidiomycetes.

El tipo de pudrición Basidiomycetes es uno de los grupos más diversos de hongos, formado por más de 20.000 especies, los que forman aproximadamente el 30% de los hongos conocidos. (Astumatura DB, 2014).

Esta división puede estar relacionada con la pudrición blanca, café y blanda, las que pueden afectar cualquiera de los componentes de la pared celular de la madera afectando en diferentes proporciones la celulosa, hemicelulosa, y lignina.

En la fase inicial es muy difícil de distinguir el tipo de pudrición, porque las hifas (filamento que constituye la unidad estructural y fundamental de los hongos) permanecen ocultas, pero según va desarrollándose la pudrición, va acentuando el cambio de color y si esta llega a la fase final del proceso de pudrición, se puede llegar a la destrucción total de la estructura de la madera con la pérdida completa de sus propiedades.

Provocando también en diferentes casos la pérdida de la densidad y resistencia, acompañados de un cambio de coloración, aumentos en el contenido de humedad de la madera, y variación de su conductividad eléctrica y térmica, (Clausen 2003).

Tabla 4.1

Tabla identificación de hongos de pudrición de las maderas extraídas

Muestras	División	Especia identificada	% identidad
A-1	Basidiomicete	Ceriporiopsissp.	99
A-2	Basidiomicete	Hyphodontiaradula	99
A-3	Basidiomicete	Bjerkandera adusta	99
A-4	Basidiomicete	Ceriporiopsissp.	99
A-5	Basidiomicete	Fomitiporellacaryophylli	94
A-6	Basidiomicete	Phlebiasp.	100
A-7	Basidiomicete	Peniophoracinerea	99
A-8	Basidiomicete	Phanerochaetesordida	99
A-9	Basidiomicete	Trametesversicolor	99
A-10	Basidiomicete	Bjerkandera adusta	99
A-11	Basidiomicete	Ceriporiopsissubvermispora	99
A-12	Basidiomicete	Phlebiasp.	100
A-13	Basidiomicete	Aurantiopileusmayanensis	96
A-14	Basidiomicete	Phanerochaetesordida	98
A-15	Basidiomicete	Bjerkandera adusta	98
A-16	Basidiomicete	Phanerochaetesordida	98
A-17	Basidiomicete	Aurantiopileusmayanensis	96
A-18	Basidiomicete	Phlebiasp.	99
A-19	Basidiomicete	Phanerochaetesp.	97
A-20	Basidiomicete	Lentinelluspulvinulus	98
A-21	Basidiomicete	Stereumrugosum	95
A-22	Basidiomicete	Ceriporiopsissp.	98
A-23	Basidiomicete	Phanerochaetesordida	100
A-24	Basidiomicete	Bjerkandera adusta	97
A-25	Basidiomicete	Aurantiopileusmayanensis	98
A-26	Basidiomicete	Fomitiporellacaryophylli	91
A-27	Basidiomicete	Ceriporiopsissp.	98
A-28	Basidiomicete	Junghuhnianitida	97
A-29	Basidiomicete	Ceriporiopsissubvermispora	99
A-30	Basidiomicete	Peniophoraincarnata	91

4.2 Tipos de hongos identificados

4.2.1 Ceriporiopsis sp.

Corresponde a un hongo de pudrición blanca, donde todos los componentes de la madera son modificados de alguna manera. Pero posee una elevada selectividad hacia la lignina comparada con los otros componentes.

Fuente: Faculty of Paper Science and Engineering, State University of New York, College of Environmental Science and Forestry, One Forestry Drive, Syracuse, NY 13210, USA

4.2.1.1 Clasificación de las variedades de Ceriporiopsis obtenidas

Tabla 4.2: Clasificación Ceriporopsis sp.

Reino	División	Clase	Genero	Familia	Orden
Fungi	Basidiomicete	Agaricomycete	Ceriporiopsis	Meruliaceae	Russulales

Tabla 4.3: Clasificación Ceriporopsis subvermispora

Reino	División	Clase	Genero	Familia	Orden	Especie
Fungi	Basidiomicete	Agaricomycete	Ceriporiopsis	Meruliaceae	Russulales	Subvermispora



Figura 4.1: Ceriporopsis sp sobre Madera

Fuente:

<http://www.commanster.eu/commanster/Mushrooms/Polypore/SuPolypore/Ceriporiopsis.html>

4.2.2 *Hyphodontia radula*.

Corresponde a un hongo de pudrición blanca. La mayoría corresponde a hongos saprobios o parásitos.

Fuente: Faculty of Paper Science and Engineering, State University of New York, College of Environmental Science and Forestry, One Forestry Drive, Syracuse, NY 13210, USA

Tabla 4.4: Clasificación *Hyphodontia radula*.

Reino	División	Clase	Genero	Familia	Orden	Especie
Fungi	Basidiomicete	Agaricomycete	Hyphodontia	Corticaceae	Corticiales	Radula



Figura 4.2: *Hyphodontia* presente en madera.

Fuente: http://mushroomobserver.org/name/show_name/29493

4.2.3 Bjerkandera adusta

Esta corresponde a una seta bastante habitual que produce pudrición blanca, se puede encontrar en cualquier época del año, indefectiblemente adherida a los troncos o ramas de los árboles.

Tabla 4.5: Clasificación Bjerkandera adusta

Reino	División	Clase	Genero	Familia	Orden	Especie
Fungi	Basidiomicete	Agaricomycete	Bjerkandera	Meruliaceae	Russulales	Adusta



Figura 4.3: Presencia de pudrición de Bjerkandera adusta

Fuente: http://www.mushroomexpert.com/bjerkandera_adusta.html

4.2.4 *Fomitiporella caryophylli*

Es un hongo descomponedor de la madera que forma podredumbre blanca. Los ejemplares han sido hallados sobre madera degradada también puede encontrarse sobre madera muerta, a lo largo de todo el año. Especie muy poco referenciada bibliográficamente, por lo que se deduce que se trata de una especie muy poco frecuente.

Tabla 4.6: Clasificación *Fomitiporella caryophylli*

Reino	División	Clase	Genero	Familia	Orden	Especie
Fungi	Basidiomicete	Agaricomycete	Fomitiporella	Hymenochaetaceae	Hymenochaetales	Caryophylli



Figura 4.4: Pudrición de un hongo *Fomitiporella caryophylli*

Fuente: <http://mycoportal.org/portal/taxa/index.php?taxon=6896&taxauthid=1&cl=Utah>

4.2.5 Phlebia sp.

Phlebia es un género de hongos que tiene una amplia distribución y contiene alrededor de 50 especies. Las especies de Phlebia causan la pudrición blanca.

Tabla 4.7: Clasificación Phlebia sp.

Reino	División	Clase	Genero	Familia	Orden
Fungi	Basidiomicete	Agaricomycete	Phlebia	Corticiaceaea	Corticiales



Figura 4.5: Pudrición de un hongo del tipo Phlebia sp.

Fuente: http://mushroomobserver.org/name/show_name/29846

4.2.6 Peniophora

Peniophora es una especie de hongo de pudrición de la madera que produce cuerpos fructíferos que varían en apariencia en función de si está el medio mojado o seco. Convierten la superficie atacada a una forma crujiente y de color rosa. Esta especie puede encontrarse durante todo el año. Aunque crece principalmente en la madera muerta, especialmente el roble, también es capaz de crecer en la madera todavía viva.

4.2.6.1 Clasificación de las variedades de Peniophora obtenidas

Tabla 4.8: Clasificación Peniophora cinerea

Reino	División	Clase	Genero	Familia	Orden	Especie
Fungi	Basidiomicete	Agaricomycete	Peniophora	Peniophoraceae	Russulales	Cinerea

Tabla 4.9: Clasificación Peniophora incarnate

Reino	División	Clase	Genero	Familia	Orden	Especie
Fungi	Basidiomicete	Agaricomycete	Peniophora	Peniophoraceae	Russulales	Incarnate



Figura 4.6: Pudrición provocada por el género Peniophora

Fuente: <http://www.rogersmushrooms.com/gallery/DisplayBlock~bid~6578~gid~~source~gallerydefault.asp>

4.2.7 Phanerochaete sp.

Phanerochaete es un hongo de pudrición blanca el cual se posa sobre la madera, su aspecto es similar a una costra, posee color crema con manchas ocráceas. Además este hongo ha demostrado un gran potencial como degradador de compuestos químicos recalcitrantes.

4.2.7.1 Clasificación de las variedades de Phanerochaete obtenidas

Tabla 4.10: Clasificación Phanerochaete sp

Reino	División	Clase	Genero	Familia	Orden
Fungi	Basidiomicete	Agaricomycete	Phanerochaete	Corticaceaea	Corticiales

Tabla 4.11: Clasificación Phanerochaete sordida

Reino	División	Clase	Genero	Familia	Orden	Especia
Fungi	Basidiomicete	Agaricomycete	Phanerochaete	Corticaceaea	Corticiales	Sordida



Figura 4.7: Phanerochaete sordida en madera natural

Fuente: http://www.micologia.net/gallery2/main.php?g2_itemId=60853

4.2.8 *Trametes versicolor*

Trametes versicolor es una seta muy común, que fructifica sobre madera de árboles latifoliados, coníferas, e incluso sobre algunos frutales, provocando en el árbol una podredumbre blanca. Es un hongo muy frecuente y extendido que puede hacer acto de aparición en cualquier época del año si las condiciones ambientales son adecuadas.

Tabla 4.12: Clasificación *Trametes versicolor*

Reino	División	Clase	Genero	Familia	Orden	Especie
Fungi	Basidiomicete	Agaricomycete	<i>Trametes</i>	Coriolaceae	Polyporales	<i>Versicolor</i>



Figura 4.8: *Trametes versicolor* creciendo en una placa petri.

Fuente: <https://fungalenomics.concordia.ca/fungi/Tver.php>

4.2.9 *Aurantiopileus mayanensis*

Son un grupo de hongos con algo más de 200 especies. Son organismos saprófitos que se alimentan de madera generalmente en descomposición, aunque pueden atacar a la madera de árboles vivos. Sus cuerpos fructíferos no suelen tener formas muy elaboradas y suelen ser de textura blanda o gelatinosa, apareciendo generalmente sobre la madera o muy cerca de ella. Este hongo se da mucho en bordes de ríos y lagos.

Tabla 4.13: Clasificación *Aurantiopileus mayanensis*

Reino	División	Clase	Genero	Familia	Orden	Especie
Fungi	Basidiomicete	Agaricomycete	<i>Aurantiopileus</i>	Corticaceae	Corticiales	<i>Mayanensis</i>



Figura 4.9: Madera afectada por *Aurantiopileus mayanensis*.

Fuente: <http://www.taxateca.com/ordenauculariales.html>

4.2.10 Lentinellus pulvinulus

Lentinellus es un género de la pudrición blanca, deterioran la madera de forma laminada, caracterizado además por tener esporas rugosas y paredes en laminillas con los bordes dentados.

Tabla 4.14: Clasificación Lentinellus pulvinulus

Reino	División	Clase	Genero	Familia	Orden	Especie
Fungi	Basidiomicete	Agaricomycete	Lentinellus	Auriscalpiaceae	Polyporales	Pulvinulus



Figura 4.10: Crecimiento en madera de Lentinellus

Fuente: <http://www.inaturalist.org/taxa/Lentinellus>

4.2.11 *Stereum rugosum*

Las especies de este género habitan en todo tipo de madera muerta o en hojas, ramas y troncos, se dice que son hongos saprofitos.

Tabla 4.15: Clasificación *Stereum rugosum*

Reino	División	Clase	Genero	Familia	Orden	Especie
Fungi	Basidiomicete	Agaricomycete	<i>Stereum</i>	Stereaceae	Russulales	<i>Rugosum</i>



Figura 4.11: Presencia de *Stereum rugosum*

Fuente:

<http://www.rogersmushrooms.com/gallery/DisplayBlock~bid~6792~gid~~source~gallerydefault.asp>

4.2.12 *Fomitiporella caryophylli*

Es un hongo descomponedor de la madera que forma pudrición blanca. Este forma costras de dimensiones variables adheridas a la madera. Forman cuerpos fructíferos de color ocre, estos adoptan la forma propia de la madera que les sirve de sustrato. Es bastante habitual que posean un margen o zona de crecimiento de color más oscuro, pardo, siendo la zona central de mayor grosor, y los márgenes más finos. Se trata de una especie que puede encontrarse también sobre madera muerta, a lo largo del todo el año.

Tabla 4.16: Clasificación *Fomitiporella caryophylli*

Reino	División	Clase	Genero	Familia	Orden	Especie
Fungi	Basidiomicete	Agaricomycete	Fomitiporella	Hymenochaetaceae	Hymenochaetales	Caryophylli



Figura 4.12: Crecimiento en forma de costras del hongo *Fomitiporella caryophylli*

Fuente: <http://www.taxateca.com/claseagaricomycetes.html>

4.2.13 *Junghuhnia nitida*

Son hongos saprofitos (es decir, se alimentan de tejidos muertos o en descomposición). Generalmente suelen crecer sobre troncos de árboles vivos, muertos o moribundos, donde se alimentan de su madera, favoreciendo la muerte del árbol. Sus cuerpos fructíferos suelen crecer directamente sobre el tronco, poseyendo una forma aplanada y una dureza y rigidez notable. El grupo tiene una distribución mundial. Posee cierta importancia económica ya que contiene especies patógenas de árboles madereros o frutales.

Tabla 4.17: Clasificación *Junghuhnia nitida*

Reino	División	Clase	Genero	Familia	Orden	Especie
Fungi	Basidiomicete	Agaricomycete	<i>Junghuhnia</i>	No definida	Polyporales	Nitida



Figura 4.13: Presencia de hongo *Junghuhnia nitida*

Fuente: <http://www.taxateca.com/ordenpolyporales.html>

4.3 Efecto que provocan los hongos identificados en la biodegradabilidad de la madera de la zona

Una vez que obtenida la identificación de los hongos aislados de la comuna de Achao, se puede asociar sus características, con respecto al daño que pueden llegar a producir en la biodegradabilidad de la madera viva o muerta de la zona.

De la identificación de estos, se obtuvo que un 100% de las muestras correspondieran a la división basidiomicetes. Estos son de manera abrumadora la causa más común de la pudrición de la madera.

Los tres tipos básicos de pudrición existentes, que son la pudrición blanca, café y blanda, pueden ser producidos por las especies de la división basidiomicetes. Estas pudriciones constituyen formas de ataque enzimático en la madera. Este ataque debilita la madera degradando la celulosa y la lignina de las paredes celulares y sustrayendo la lignina entre células, (Wilcox, 1978).

Como cada pudrición corresponde al ataque a uno de los componentes de la madera, cuando se trata de la pudrición café y blanda que se alimentan en mayor grado de la celulosa y hemicelulosa, producen problemas en la resistencia al pandeo de las estructuras, superficies que adquieren una apariencia cúbica con grietas perpendiculares a la dirección de la fibra, dejando la madera de color café. Mientras que la pudrición blanda, cuando el grado de humedad es elevado, la deja con una consistencia blanda. Debido a la pérdida de densidad que se produce en la madera y el aumento de su humedad. Con respecto al ataque producido por hongos de pudrición café. Clausen y Kartal, señalan que este tipo de daño resulta ser el más destructivo y mayoritario, debido a que puede causar rápidamente fallas estructurales.

Problemas en la resistencia al pandeo de estructuras sometidas a una compresión, provoca la inestabilidad de estos elementos, fenómeno que se evidencia a través de una deformación transversal, donde si dicha deformación se incrementa hasta superar la resistencia de la estructura de madera, se producirá un quiebre o derrumbe en la edificación.

Cuando se trata del ataque de hongos de pudrición blanca, una de las más comunes, donde se degrada en mayor dimensión la lignina de las paredes celulares de la madera, hecho que afecta directamente a la resistencia a la compresión de la madera. El hongo causante de la pudrición blanca remueve la lignina antes o al mismo tiempo que remueve el componente de celulosa de la madera. Ya que la lignina es marrón o de color oscuro, su degradación deja la madera de un blanco pálido o decolorado. Esta madera posee una apariencia fibrosa, esponjosa y de poca densidad.

El esfuerzo máximo que puede soportar un elemento bajo una carga de aplastamiento, se vería perjudicado en maderas de edificaciones afectadas por hongos de pudrición blanca.

Aunque los elementos estructurales construidos para ser utilizados en edificaciones estén fabricados atendiendo a la orientación correcta de las fibras, es decir, que la fuerza aplicada quede de manera paralela a las fibras de la madera, donde esta va a poseer el máximo de resistencia a la compresión posible, si esta madera posee el ataque de hongos de pudrición, toda propiedad mecánica de interés en el comportamiento estructural de la madera se verá vulnerada y anulada por la presencia de estos.

4.3.1 Ubicación hongos identificados

Cada muestra obtenida posee una ubicación geográfica específica en el mapa de Achao, mediante el cual se permitirá tener el emplazamiento que posee cada uno de los hongos identificados. Permitiendo conocer la ubicación que tiene cada hongo identificado dentro de la comuna de Achao. En la figura 4.14 se observa la ubicación de cada una de las treinta muestras analizadas en este estudio.

➤ Satélite Comuna de Achao



Figura 4.14: Satélite de Achao con los puntos de ubicación de donde se obtuvo cada muestra a analizar.

Tabla 4.18: Hongos identificados

Muestras	División	Especia identificada	Tipo de madera	Tipo pudrición
A-1	Basidiomicete	Ceriporiopsissp.	Coigue	Blanca
A-2	Basidiomicete	Hyphodontiaradula	Maño	Blanca
A-3	Basidiomicete	Bjerkandera adusta	Roble	Blanca
A-4	Basidiomicete	Ceriporiopsissp.	Roble	Blanca
A-5	Basidiomicete	Fomitiporellacaryophylli	Alerce	Blanca
A-6	Basidiomicete	Phlebiasp.	Maño	Blanca
A-7	Basidiomicete	Peniophoracinerea	Roble	Café
A-8	Basidiomicete	Phanerochaetesordida	Coigue	Blanca
A-9	Basidiomicete	Trametesversicolor	Ciprés	Blanca
A-10	Basidiomicete	Bjerkandera adusta	Alerce	Blanca
A-11	Basidiomicete	Ceriporiopsissubvermispora	Maño	Blanca
A-12	Basidiomicete	Phlebiasp.	Coigue	Blanca
A-13	Basidiomicete	Aurantiopileusmayanensis	Maño	Café
A-14	Basidiomicete	Phanerochaetesordida	Roble	Blanca
A-15	Basidiomicete	Bjerkandera adusta	Ciprés	Blanca
A-16	Basidiomicete	Phanerochaetesordida	Coigue	Blanca
A-17	Basidiomicete	Aurantiopileusmayanensis	Alerce	Café
A-18	Basidiomicete	Phlebiasp.	Maño	Blanca
A-19	Basidiomicete	Phanerochaetesp.	Roble	Blanca
A-20	Basidiomicete	Lentinelluspulvinulus	Ciprés	Blanca
A-21	Basidiomicete	Stereumrugosum	Alerce	Café
A-22	Basidiomicete	Ceriporiopsissp.	Roble	Blanca
A-23	Basidiomicete	Phanerochaetesordida	Coigue	Blanca
A-24	Basidiomicete	Bjerkandera adusta	Maño	Blanca
A-25	Basidiomicete	Aurantiopileusmayanensis	Ciprés	Café
A-26	Basidiomicete	Fomitiporellacaryophylli	Roble	Blanca
A-27	Basidiomicete	Ceriporiopsissp.	Coigue	Blanca
A-28	Basidiomicete	Junghuhnianitida	Ciprés	Café
A-29	Basidiomicete	Ceriporiopsissubvermispora	Alerce	Blanca
A-30	Basidiomicete	Peniophoraincarnata	Roble	Café

Con esta información recopilada se puede observar la distribución que tiene cada uno de los hongos identificados, asociándolos al daño que están provocando, junto al tipo de madera al que estaban asociados en la zona de estudio.

Por lo que conociendo su identidad se puede ver formas de prevención de estos, lo que se puede realizar conociendo las condiciones óptimas que necesitan los hongos para crecer y evitando que se produzcan estas.

Por lo que los hongos que atacan a la madera, para su crecimiento requieren la combinación adecuada de comida (alimento), humedad (agua) y temperatura (media).

Los hongos actúan cuando la madera se encuentra expuesta a altos contenidos de humedad; por ejemplo madera en contacto con el suelo (como postes, durmientes y columnas) o cuando las condiciones permiten en el tiempo de lluvias la humidificación excesiva como en cabezas de vigas, zapatas y arrastres.

Una madera será más sensible a la acción de los hongos cuanto mayor sea su grado de humedad. Diversos estudios han demostrado que la madera con un 20% de humedad está expuesta al ataque de hongos, y con un 30% de humedad, estos se encuentran en un ambiente óptimo donde desarrollarse.

El factor crítico para que se desarrolle un problema de daños por pudrición de madera no es la ausencia del hongo, sino la falta de condiciones que favorezcan su desarrollo, por lo que algunas medidas de tratamiento y prevención son:

Existe la protección química, que se usa principalmente en aquellas piezas de madera utilizadas en el exterior o que van a estar expuestas a condiciones climáticas adversas. Consiste en la aplicación de sustancias químicas para prolongar la vida útil de la madera al hacerla resistente al ataque de hongos. Los preservadores eliminan el factor alimento para los agentes destructivos de la madera. A medida que la técnica de preservación se ha ido perfeccionando, la madera ha adquirido mayores posibilidades de uso. Actualmente se le puede emplear en condiciones muy severas, como es el contacto directo con el suelo, sumergidas en el agua en los difíciles climas tropicales. En consecuencia, la madera preservada se considera hoy en día como un material de larga duración

Cuando la madera está en contacto con la humedad del suelo, esta humedad puede ascender por los muros a través de capilaridad. Entre los métodos que existen para eliminar o disminuir la humedad por capilaridad, se encuentran el de zanja, pozos drenantes, sistema eléctrico, barreras físicas, barreras químicas, sifones atmosféricos y revestimientos difusores.

4.4 Hongos de pudrición café

1. Como detectarlos

En un primer estado solo se puede identificar su presencia con una observación minuciosa del cambio de tonalidad (más oscura) y textura más rugosa. Una vez que se ha completado el proceso es muy fácil identificar la pudrición café, ya que presentará un color superficial más oscuro con tonos parduzcos. La madera también se ve agrietada formando pequeños paralelepípedos o cubos.

2. Prevención

Para prevenir la aparición de esta patología de la madera se recomienda el uso de maderas tratadas con productos fungicidas específicos. Sin embargo, el modo naturales actuar contra la elevada humedad de la madera evitando su contacto con otros materiales de obra y no exponiéndola a ambientes húmedos.

3. Cómo actuar ante el ataque de hongos de pudrición café

El primer paso es estabilizar la humedad de la madera reparando filtraciones accidentales o de capilaridad. Los sistemas de secado forzado con aire caliente directo pueden tener efectos indeseables por deformación de la madera por lo que es preferible la ventilación natural siempre que sea posible. En las zonas afectadas conviene eliminar los restos de madera degradada. El uso de fungicidas sistémicos acelerará la desaparición del hongo, pero hay que tener en cuenta que puede afectar a la tonalidad de la madera y hay que considerar los posibles efectos nocivos que provoque. (Browning, 1967).

4.5 Hongos de pudrición blanca

1. Cómo detectarlos

Una vez que esta ha atacado, se puede detectar observando la madera ya que esta toma un color blancuzco y un aspecto fibroso, por lo que a veces se la llama “pudrición fibrosa”. En las etapas avanzadas de la pudrición, la madera infectada tiene una textura suave distinta, y las fibras individuales se pueden desprender de la madera, ya que la pudrición blanca ataca los tres componentes de la pared celular de la madera, causando pérdida en el peso de hasta el 97 por ciento.

2. Prevención

Cuando la madera se humedece, los hongos infestan la madera. El proceso se convierte en un círculo vicioso, ya que los hongos aumentan la permeabilidad de la madera, lo que permite que la humedad penetre y estimula más el crecimiento de los hongos.

Por lo tanto para evitar esta pudrición es importante mantener la madera seca. Por lo que hay que, asegurarse de construir con madera tratada adecuadamente. También es importante mantener la madera sin tocar el suelo debido a su humedad. Se requiere una ventilación adecuada. La madera también puede ser tratada con tratamiento anti-hongos.

También la aplicación de fungicida es preventiva puesto que se realiza en ausencia de síntomas, ya que éstos no son visibles al momento del tratamiento. En zonas de riesgo se podría requerir 2 tratamientos fungicidas, especialmente en variedades e híbridos de largo periodo de floración

3. Cómo actuar ante el ataque de hongos de pudrición blanca

El factor crítico para que se desarrolle un problema de daños por pudrición de madera, no es la ausencia del hongo, sino la falta de condiciones que favorecen su desarrollo. Por lo que el primer paso en el control de hongos que causan pudrición de la madera, es una inspección detallada de la estructura para localizar señales de problemas de humedad. Estas áreas deben ser revisadas para prevenir la presencia o daños de hongos.

Antes de que el hongo pueda colonizar la madera, requiere de cuatro condiciones presentes: Suministro de oxígeno, temperatura adecuada, suministro de humedad adecuada, sustrato como fuente de alimento. La eliminación de algunos de estos requerimientos puede prevenir el ataque a la madera, siendo el más usado el riego por aspersión, mediante el cual se satura la madera, impidiendo la presencia de oxígeno, (Browning, 1967).

CAPITULO V
CONCLUSIÓN

5.1 Conclusión

Como resultado de este trabajo se aislaron e identificaron, con un alto porcentaje de similitud de nucleótidos treinta cultivos puros del filo Basidiomicete. Lo que permite conocer los principales agente que están produciendo el deterioro de las maderas que conforman ciertas edificaciones de la zona vulnerable.

En esta investigación se lograron identificar catorce especies de hongos de pudrición del phylum basidiomicete, clase Agaricomycetes distribuidos en doce géneros, cuatro órdenes y seis familias. En las que se registra la existencia de los dos tipos más comunes y peligrosos de pudrición, la blanca y café; de las cuales un 24% corresponden a pudrición café y el 76% restantes a pudrición blanca.

De los resultados obtenidos se determinó que la mayoría de las muestras, entregan porcentajes de identidad cercanos al 100%, lo que se interpreta con un alto porcentaje de similitud de nucleótidos (>97%). Sin embargo, el porcentaje de similitud inferior a 96% asociados a una especie como por ejemplo la *Aurantiopileus mayanensis* es baja, lo que determina que si bien existe alguna relación a nivel de género lo más probable es que se trate de una especie diferente por lo que es necesario realizar más estudios para la identificación de una especie ya conocida, o bien, es una especie nunca antes descrita en la literatura.

Si bien cuando se comienza una investigación de identidad fúngica, se pueden obtener como no obtener resultados; ya sea porque no existe presencia de hongos en las muestras o por mala ejecución de las herramientas de identificación. Pero se ha demostrado con éxito la identificación realizada a través del método de análisis de secuencia de ADN para la identificación de microorganismos asociados con la degradación de los productos de madera en servicio planteada también por Blanchette et al. (2005).

Es de gran importancia conocer cuáles son los microorganismos asociados y los procesos degradativos desarrollados en las diversas edificaciones y estructuras de Achao que son construidas en madera, ya que estas son atacadas por hongos de pudrición, provocando daños de tipo estético y estructural.

La identificación de hongos nos ha ayudado a determinar donde pudiera estar localizada la descomposición. Por ejemplo, la pudrición del *Junghuhnia nítida* generalmente se encuentra en los troncos y no suele penetrar sustancialmente en las raíces del árbol. Yendo más lejos, los árboles con pudrición de sus troncos por este hongo, pueden mostrar síntomas sustanciales de degradación en zonas expuestas a la vista de los interesados.

Por otro lado la identificación del cuerpo fructífero puede también ayudar a determinar el modo de ataque. *Trametes versicolor* produce una pudrición blanca en especies de árboles como las coníferas y los latifolios, reconociendo el tipo de descomposición presente en la madera.

De acuerdo con Guillén (2008), el aislamiento y determinación de nuevos hongos de podredumbre blanca y café es sumamente importante debido a sus potenciales posibilidades biotecnológicas. Estos autores añaden que han sido pocos los estudios realizados en Chile sobre la diversidad de los hongos que pudren la madera. Lazo (1995), indicó que la zona más rica de la diversidad fúngica es probable el sur de Chile, ya que hay abundantes lluvias y variados tipos de especies de árboles de alta durabilidad natural. La investigación presentada demuestra que se encontraron un número considerable de diversos hongos de pudrición dentro de un área relativamente pequeña. Por lo que se necesitan estudios adicionales para obtener más información sobre todos los diferentes hongos involucrados en descomposición de la madera.

BIBLIOGRAFÍA

Bibliografía

- Remacha GeteAndres (1988). Degradación de la madera por los organismos xilófagos vegetales. Universidad Politécnica de Madrid.
- Barrios, E Contreras, W Sosa y Owen (2007). Análisis cualitativo de los principales impactos ambientales en el ciclo de vida de la madera laminada encolada de pino Caribe del sur de los estados Anzoategui y Monagas. Revista Forestal Venezolana.
- Blanchette, R. Jurgens, J. Held, B. Arenz, B. Smith, (2005). Decay of historic and archeological wooden structures: degradation processes and molecular characterization of wood destroying fungi. International Academy of wood science meeting.
- Browning, B.L., (1967) Methods of wood chemistry, Intersci, Public. N.Y., London, vol. 2.
- Butin H, Peredo H (1986). Hongos parásitos en coníferas de América del Sur con especial referencia a Chile. Stuttgart, Berlín.
- Christopher J. Luley. (2005) Wood Decay Fungi Common to Urban Trees in Northeast and Central United States.
- Cladera, A., Etxeberria, M., Schiess, I., Pérez, A. (2000).Revista Construpedia. publicación: Tecnologías y Materiales de Construcción Para el Desarrollo.
- Clausen, C., Kartal, S. (2003). Accelerated detection of brown-rot decay: Comparison of soil block test, chemical analysis, mechanical properties, and immunodetection. Forest Product Journal: 90-94.
- Consejo de Monumentos Nacionales (2003). Postulación de las iglesias de Chiloé para su inclusión en la lista del patrimonio mundial ante la UNESCO. Santiago de Chile: Consejo de Monumentos Nacionales.
- Del Pozo, C. y Parra, P. (1984). Durabilidad natural. Análisis de algunos factores establecidos en la norma americana (ASTM) y en la norma británica (BS). Tesis Universidad de Chile.
- F. Wolf, F. Perales, (1985). Durabilidad natural de la madera de algunas especies del matorral del noreste de Mexico.
- Fengel, D., Wegener, G, (1984). "Wood Chemistry, Ultrastructure Reaction".
- Furci G (2008) Diversidad de especies Hongos. In: Ocho libros (ed) Biodiversidad de Chile: Patrimonio y Desafíos, Chile.
- Gómez, M.; Echenique, R.; Salinas, R. (1969). Índices de laboratorio sobre resistencia de la madera a la pudrición en once especies forestales mexicanas. Boletín Técnico. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales.
- Gutiérrez, Ramón (2007). «Las misiones circulares de los jesuitas en Chiloé: Apuntes para una historia singular de la evangelización».
- Hunt, G. y Garrat, G, (1962). Preservación de la madera. Salvat editores, S.A. Barcelona, Madrid.

- Jaslavich, C. Ostrofsky, A. Jellison, (2000). Detection and identification of decay fungi in spruce wood by restriction fragment length polymorphism analysis of amplified genes encoding RNA. Applied and environmental microbiology.
- Mora, N. Encinas, O. Molina, Y. Vielma, (2006). Durabilidad de maderas tratadas con CCA y CCB en suelos de jubidiana y san juan de lagunillas, Estado Merida, Venezuela. Rev. For. Lat. 39.
- Pastorelli, Giuliano (2012) "Plataforma en Viaje: Iglesias de Chiloé" Plataforma Arquitectura.
- Peredo H (1987) Fitoparasitos en Nothofagus chilenos.
- Hartig Robert (1878), texto. signos de descomposición de la madera.
- Yang, Dian Quing (2009). Isolation of wood-inhabiting fungi from Canadian hardwood logs. Can. J. Microiol.
- WILCOX, W.W, (1978). Review of literature on the effects of early stages of decay on wood strength. Wood and Fiber 9.
- Wild A. (1992). La población microbiana del suelo. In Condiciones del suelo y desarrollo de las plantas según Russell. Madrid, España. Ediciones Mundi-Prensa. p. 471-494.