

# Especificaciones de AITIM (VI)

## UMBRALES de EFICACIA contra HONGOS BASIDIOMICETOS XYLOFAGOS CULTIVADOS sobre un medio de Gelatina (y 2)

### 6.5. Número y distribución de las probetas (continuación).

e<sub>3</sub> Probetas testigo: estas probetas tratadas exactamente igual que las de ensayo, en número por lo menos de cuatro para cada concentración, se colocan después del secado, acondicionamiento y, en su caso, envejecimiento, en frascos de cultivo en los que no se ha sembrado hongo, a razón de dos por frasco. Las variaciones de masa de estas probetas permiten determinar el coeficiente de corrección (c) de las variaciones de masa de las probetas de ensayo, bajo la influencia de fenómenos no ligados a la actividad xilófaga del hongo ensayado.

### 7. MODO OPERATORIO

#### 7.1. Preparación de las probetas.

##### 7.1.1. Acondicionamiento de las probetas antes del tratamiento.

Colocar las probetas numeradas en la estufa (3.3.3.) y secar-

las hasta masa constante \*, sacarlas a un desecador y dejarlas enfriar.

Antes de la impregnación pesarlas con aproximación de 0,05 gramos para conocer la masa seca inicial  $m_0$ .

#### 7.1.2. Preparación del protector.

Preparar por pesadas una serie de diluciones del protector utilizando para ello el solvente (4.2.2.).

Prever, por lo menos, cinco concentraciones, situadas a ambos lados del umbral de eficacia teórico.

Además, incluir a título de control una dilución correspondiente a la concentración cero (solvente puro) en el ensayo. En caso de un producto para el que se desconoce el umbral de eficacia teórico las concentraciones deben constituir una serie geométrica muy espaciada para el primer ensayo y una serie geométrica u aritmética

(\*) Se considera que la masa es constante, cuando los resultados de dos pesadas sucesivas, efectuadas con intervalo de 24 horas, no difieren más de un 0,1 % de la masa de la probeta.

más estrecha para los ensayos siguientes:

Las soluciones o diluciones deben ser de preparación reciente.

#### 7.1.2.1. Impregnación.

Las operaciones de impregnación deben efectuarse en orden creciente de las concentraciones es decir, empezando por la concentración cero.

El procedimiento descrito a continuación asegura la impregnación completa con el protector, requerida por las probetas:

— Para cada concentración, después de haber determinado, con aproximación de 0,05 gr., la masa de cada probeta de la serie correspondiente, colocar estas probetas anhidras en el recipiente de tratamiento (4.3.4.), de forma que la mayor parte de su superficie quede libre (por ejemplo, apilándolas en cruz). Cargarlas con las pesas (4.3.5.) para impedir que floten al introducir el líquido.

— Colocar cada recipiente en una campana de vacío (4.3.7.) durante 15 minutos a la presión de 7 mbar \*. Transcurrido este tiempo cerrar la conexión con la bomba neumática (4.3.8.), introducir por aspiración la solución del protector en el recipiente. Esta solución debe cubrir completamente las probetas durante todo el tiempo que dure la operación.

— A continuación, dejar entrar el aire, sacar el recipiente de la campana de vacío, taponarlo y dejarlo en reposo durante dos horas, añadiendo, si es necesario, más protector, para mantener las probetas sumergidas. Después del tratamiento de impregnación, sacar las probetas una a una, eliminar el exceso de líquido de la superficie de la probeta, secándolo

(\*) Conviene respetar las medidas reglamentarias de seguridad relacionadas con la manipulación de líquidos inflamables y tóxicos, así como de campana de vacío.

ligeramente con papel de filtro, y pesarlas inmediatamente con aproximación de 0,05 gr., siendo  $m_1$  la masa después de la impregnación. Calcular la cantidad de protector retenido por las probetas a partir de la masa de líquido absorbida ( $m_1 - m_0$ ) y la concentración de la solución\*.

Expresar la cantidad de protector retenido por las probetas, en masa por unidad de volumen de madera.

Expresar las retenciones en masa de producto bajo su forma inicial por unidad de volumen de madera tratada.

En los casos de productos concentrados, la retención se expresa en masa de protector obtenido para el empleo por la dilución prevista.

Si en una serie de probetas impregnadas simultáneamente, la cantidad de protector absorbido por cien probetas varía en más del 15 % en relación a la absorción media de la serie, los resultados de esas probetas no se incluyen en la media. Esas probetas deben reemplazarse por probetas complementarias.

### 7.1.3. *Secado y acondicionamiento de las probetas, después del tratamiento\*\*.*

Después de la impregnación, secar las probetas durante cuatro semanas por lo menos, en el recinto de acondicionamiento (4.3.1.).

Poner las probetas de canto sobre dos barritas de cristal, sin

(\* *Para los productos cuyos constituyentes son absorbidos selectivamente, puede ser necesario efectuar un análisis químico de la solución antes y después de la impregnación; un análisis similar se recomienda igualmente en los casos de concentraciones muy débiles.*

(\*\*) *El secado y acondicionamiento de las probetas depende de la naturaleza del producto a ensayar y del disolvente. Puede ser necesario modificar las condiciones previstas, de lo cual debe hacerse mención en el informe final del ensayo.*

que se toquen, y darlas la vuelta dos veces por semana.

Para evitar los enmohecimientos, colocar en el recipiente una pequeña cápsula con xileno (4.2.3.).

Durante la tercera semana, destapar progresivamente cada día el recipiente, con el fin de obtener un secado regular; a partir del principio de la cuarta semana, dejar el recipiente totalmente abierto.

En el caso de probetas impregnadas con productos no hidrosolubles, mantener el recipiente cerrado durante una semana, entreabierto durante la segunda, y completamente abierto a partir de la tercera semana.

### 7.2. *Exposición a los hongos.*

(A los hongos xilófagos y a los hongos testigos no xilófagos.)

Efectuar la inoculación del medio de cultivo (4.2.1.) en los matraces de cultivo (4.3.9.) en un período de tiempo que no sobrepase los siete días después de la esterilización del medio. Los inóculos deben proceder de cultivos que cuenten menos de cuatro semanas.

Las probetas deben ponerse en contacto con el hongo en el momento en que el micelio de ésta cubra por completo la superficie del medio, lo que corresponde a la fase activa del desarrollo, y en ningún caso se deben sobrepasar las cuatro semanas después de la siembra. Estos hongos deben estar totalmente exentos de contaminaciones de otros organismos.

Introducir entonces asépticamente, en un frasco de cultivo, dos soportes de probetas (4.3.10) previamente esterilizadas, y colocar después sobre cada soporte una probeta también esterilizada según uno de los procedimientos siguientes\*:

(\* *Ver en Anexo B las explicaciones relacionadas con los métodos de esterilización.*

— Irradiación con rayos

— Exposición a los vapores de una sustancia fungicida, como el óxido de propileno.

— Esterilización con vapor de agua.

Colocar, en cada frasco de cultivo con el hongo a ensayar, una probeta ( $e_1$ ) impregnada y una probeta de control ( $e_2$ ) sin impregnar.

Verificar la virulencia de las cepas en los frascos poniendo probetas de control ( $e_2$ ) sin impregnar, sin ir acompañadas de probetas de ensayo ( $e_1$ ).

Como está indicado en el párrafo (5.5), poner probetas-testigo ( $e_3$ ), dos por frasco, en frascos de cultivo en los que no se ha sembrado el hongo.

### 7.3. *Condiciones de cultivo y duración de los ensayos.*

Después de poner en contacto las probetas con el hongo, colocar los frascos de cultivo en el recinto de ensayo (4.3.2.) y dejarlas ahí durante 16 semanas.

### 7.4. *Examen de las probetas.*

Al final del ensayo, sacar las probetas de los frascos y limpiarlas el micelio que llevan adherido. Eliminar todas las probetas en las que el desarrollo normal del hongo a ensayar se haya visto entorpecido por un organismo contaminante. Pesar cada probeta, con aproximación de 0,05 gr. y sea  $m_2$  la masa húmeda al final del ensayo. Después de la estabilización de la masa en la estufa (4.3.3), pesar de nuevo cada probeta, con la misma aproximación, y sea  $m_3$  la masa final seca. Controlar por  $m_3$  y  $m_2$  que la humedad de cada probeta al finalizar el ensayo es superior al 30 %.

#### 7.4.1. *Pérdida de masa ocasionada por el ataque de los hongos.*

Calcular la pérdida de masa de cada probeta por diferencia entre

la masa seca inicial antes de la impregnación ( $m_0$ ) y la masa seca final después de haber estado expuesta al ataque del hongo ( $m_3$ ). A la masa seca final hay que aplicarle una corrección debida a la variación de masa de las probetas no ligada a la actividad xilófaga de los hongos, utilizando el coeficiente de corrección (c) (ver  $e_3$  en 6.5).

Expresar las pérdidas de masa corregidas en porcentaje.

#### 7.4.2. Validez del ensayo.

El ensayo es válido si la probeta testigo sin tratar ( $e_2$ ) sufre una pérdida de masa de por lo menos el 50 % de la pérdida de masa media indicada en Anexo D para la cepa considerada.

### 8. EXPRESION DE LOS RESULTADOS

El umbral de eficacia de un producto está comprendido entre dos valores límites correspondientes:

— Uno, la concentración menor que protege la madera.

— Otro, la concentración inmediatamente inferior en la serie empleada, para la cual la madera comienza a no estar suficientemente protegida.

Expresar el umbral de eficacia por estos valores límites expresados en kilogramo de producto por metro cúbico de madera para cada especie de hongo, y en cada caso indicar igualmente las concentraciones del producto en el disolvente.

La protección aportada a la madera por el producto, para una concentración dada, se considera suficiente, si la pérdida de masa media de las probetas es inferior al 3 %, o si ninguna de las probetas ha experimentado una pérdida de masa superior al 5 %.

### 9. INFORME FINAL

El informe final debe indicar:

a) El número de estas especificaciones.

b) La denominación y tipo del producto a ensayar.

c) El solvente utilizado.

d) La especie de madera empleada.

e) La masa media de las probetas utilizadas.

f) Las especies de hongos utilizados haciendo referencia a los números de las cepas.

g) Las concentraciones del producto estudiadas expresadas en porcentaje en peso.

h) La cantidad de solución, expresada en gramos, absorbida por cada probeta y la cantidad de producto, en kilogramo expresado por metro cúbico, retenido por cada probeta.

i) La duración del acondicionamiento después de la impregnación.

j) En caso de existir, las pruebas de envejecimiento a que se han sometido las probetas, las condiciones y la duración, haciendo referencia a una norma si se ha seguido.

k) Fecha de la puesta en contacto.

l) Fecha del examen final.

m) Para cada probeta la pérdida de masa experimentada, expresada en porcentaje en masa, debida al ataque del hongo.

n) El coeficiente de corrección (c) para cada concentración estudiada.

o) En cada serie de probetas, la pérdida de masa corregida de cada probeta expresada en porcentaje en masa, debido al ataque del hongo y la pérdida media de masa de la serie corregida en las mismas condiciones.

p) Para cada hongo utilizado, las cantidades de producto ensayadas, expresadas en kilogramos por metro cúbico de madera, entre las cuales se sitúa el umbral de eficacia, así como las concentraciones de las soluciones correspondientes en porcentaje en masa.

q) La nota siguiente: «La interpretación de este informe y las conclusiones prácticas que de él se pueden deducir, necesitan un conocimiento profundo de los problemas de la protección de madera, y por esta razón este informe no constituye en sí mismo un certificado de homologación».

El informe final debe mencionar, además, todos los detalles operatorios, facultativos o no, previstos en el método, así como los incidentes eventuales susceptibles de haber actuado sobre los resultados.

## Anexo A

### EJEMPLO DE INFORME FINAL

Número de las especificaciones

Denominación del tipo de producto: Z. solución orgánica.

Solvente utilizado: Xyleno.

Especie de madera utilizada: Pino silvestre (*Pinus sylvestris* Lin).

Masa específica: 0,485 Kg./m.<sup>3</sup>

Especie de hongo utilizado: *Lentinus lepидens*, cepa BAM Ebw. 20.

Concentraciones del producto estudiado; 1,6; 2,5; 4; 6,3 y 10 % (m/m.); y después 2,8; 3,15 %; 3,55 % (m/m.).

Absorción de solución y cantidad de producto retenido: (Ver cuadro adjunto).

Duración del acondicionamiento después de la impregnación: 31 días.

Pruebas de envejecimiento efectuadas: Ninguna.

Fecha de la puesta en contacto: 21-5-74.

Fecha del examen final: 11-10-1974.

Pérdidas de masas brutas: (Ver cuadro adjunto).

Coefficiente de corrección (c): (Ver cuadro adjunto).

Pérdidas de masa corregidas: (Ver cuadro adjunto).

Concentraciones estudiadas	Núm. de las probetas	Absorción de	Retención del producto		Pérdidas de	Coefficiente	Pérdidas de	Pérdidas de
		solución por probeta	Por probeta	Media	masa sin corregir	de corrección	masa corregidas	masa media en serie
% en masa	—	gr.	K/m <sup>3</sup>	K/m <sup>3</sup>	%	%	%	%
Xyleno solo	1	14,3	—	—	19,9	0,2	19,7	23,3
	2	13,9	—	—	23,4		23,2	
	3	12,7	—	—	27,7		27,5	
	4	15,2	—	—	23,0		22,8	
1,6	5	13,5	11,5	11,4	12,6	0,2	12,4	12,8
	6	14,2	12,2		14,9		14,1	
	7	13,0	11,1		9,9		9,7	
	8	12,6	10,7		15,4		15,9	
2,5	9	15,1	20,1	18,5	3,8	0,3	3,5	5,3
	10	13,2	17,6		7,7		7,4	
	11	14,3	19,1		5,8		5,5	
	12	12,8	17,1		5,2		4,9	
4	13	14,5	30,1	29,7	2,1	0,4	1,7	1,9
	14	15,3	32,6		1,3		0,9	
	15	12,5	26,7		2,7		2,3	
	16	13,8	29,5		3,2		2,8	
6,3	17	13,4	45	47,3	1,3	0,6	0,7	0,75
	18	14,2	47,6		1,0		0,4	
	19	13,8	46,2		1,8		1,2	
	20	15,0	50,4		1,3		0,7	
10	21	16,1	85,8	75,7	1,1	0,7	0,4	0,47
	22	14,2	75,7		1,2		0,5	
	23	12,9	68,9		0,9		0,2	
	24	13,6	72,5		1,5		0,8	

NOTA.—El umbral de eficacia buscado se encuentra entre 18,5 y 29,7 kg/m<sup>3</sup> correspondientes a las concentraciones de 2,5 y 4 %. Para obtener una mayor precisión se hace un ensayo com-

plementario sobre una serie de concentraciones entre 2,5 y 4 %. Los resultados se dan en el cuadro siguiente.

# Anexo B

## METODOS DE ESTERILIZACION

### B.1. Esterilización de las Probetas Mediante Rayos $\gamma$

Colocar las probetas paralelamente unas a otras, apoyadas sobre una de las caras laterales grandes, en una bolsa de polietileno, cerrada herméticamente por soldadura térmica.

La hoja de polietileno debe tener un espesor mínimo de 90  $\mu\text{m}$ . Se puede utilizar polietileno en hojas, recubriendo con él las probetas y soldando en tres lados, pero es más práctico utilizar el tubo de polietileno que se vende en rollos: Introducir las probetas en el tubo y soldar en los dos extremos. Este sistema permite aislar las probetas por grupos de dos correspondientes a cada frasco de cultivo.

Enviar las bolsas así preparadas a un centro que disponga de rayos  $\gamma$  donde se someten a la irradiación, de forma que reciban de 1,5 a 1,6 mégard. El tiempo de exposición necesario depende de la intensidad de la fuente. No parecen existir diferencias entre los resultados obtenidos con una fuerte intensidad durante un corto período de tiempo y una intensidad débil aplicada durante un período de tiempo más largo.

Las bolsas así irradiadas se pueden conservar en el laboratorio sin ningún inconveniente durante algunas semanas. Abrir cada bolsa en el momento justo de introducir de forma aséptica las probetas en el frasco de cultivo.

### B.2. Esterilización Mediante Oxido de Etileno.

Colocar las probetas en saquitos de polietileno de alta presión (espesor de 50 a 80  $\mu\text{m}$ ).

Poner las probetas durante 60 minutos, en un aparato apropiado en el cual el óxido de etileno se encuentra en una concentración de 1.200 mg/l bajo una presión de 5,5 bar, siendo la temperatura de 55° C y la humedad relativa de 70 a 80 %.

Concentraciones estudiadas	Núm. de las probetas	Absorción de solución por probeta		Retención del producto		Pérdidas de masa sin corregir	Coeficiente de corrección	Pérdidas de masa corregidas	Pérdidas de masa media en serie
		gr.	K/m <sup>3</sup>	K/m <sup>3</sup>	Media				
2,8	25	13,7	20,5	2,4	20,3	2,1	0,3	2,1	3,25
	26	14,5	21,6	1,7		1,4			
	27	12,9	19,3	5,5		5,2			
	28	13,2	19,8	4,8		4,3			
3,1	29	15,1	25,4	2,2	23,6	1,9	0,3	1,9	1,6
	30	14,6	24,5	2,7		2,4			
	31	13,2	22,2	1,1		0,8			
	32	13,2	22,2	1,6		1,3			
3,55	33	15,0	28,4	1,3	26,5	0,9	0,4	0,9	0,75
	34	13,6	25,7	1,5		1,1			
	35	14,2	26,8	1,2		0,8			
	36	14,3	25,2	0,6		0,2			

**NOTA.**—El umbral de eficacia del producto Z y 3,15 % de concentración. La interpretación de este informe final y las conclusiones prácticas que se pueden deducir de él, necesitan un conocimiento profundo de los problemas de la pro-  
tección de maderas y, por este motivo, este informe no constituye en sí mismo un certificado de homologación para el producto estudiado.

## ESPECIFICACIONES

Después ventilar las probetas durante 10 minutos sometiéndolas a corrientes de aire estéril.

### B.3. Esterilización con Óxido de Propileno.

Colocar las probetas durante 24 horas en un recipiente que contenga 2 ml. de óxido de propileno por litro de volumen del recipiente. Después ventilar las probetas durante 48 horas como mínimo, sometiéndolas a una corriente de aire estéril.

En el caso de *Lentinus lepideus*, que es un hongo especialmente

sensible al óxido de propileno, la experiencia ha demostrado que los cultivos no deben contar con más de 15 días en el momento de la puesta en contacto de las probetas con el hongo.

### B.4. Esterilización Mediante Vapor de Agua.

La víspera de la puesta en contacto, colocar las probetas en cajas Petri, a razón de una serie por caja; colocar estas probetas de forma que no se toquen, para lo cual es conveniente poner entre ellas varillas de cristal o de acero inoxidable.

Cerrar las cajas Petri. Colocarlas en un recipiente en el fondo del cual se produce el vapor de agua, el cual debe circular alrededor de las cajas. Esterilizar durante 10 minutos.

Después de este período, dejar las cajas Petri durante 24 horas en una habitación de condiciones ambientales normales, para después efectuar de nuevo una operación de esterilización durante 10 minutos.

No abrir las cajas Petri hasta el momento de introducir las probetas en los frascos de cultivo.

## Anexo C

Dimensiones en mm

Fig. 1—Matraz Kolle

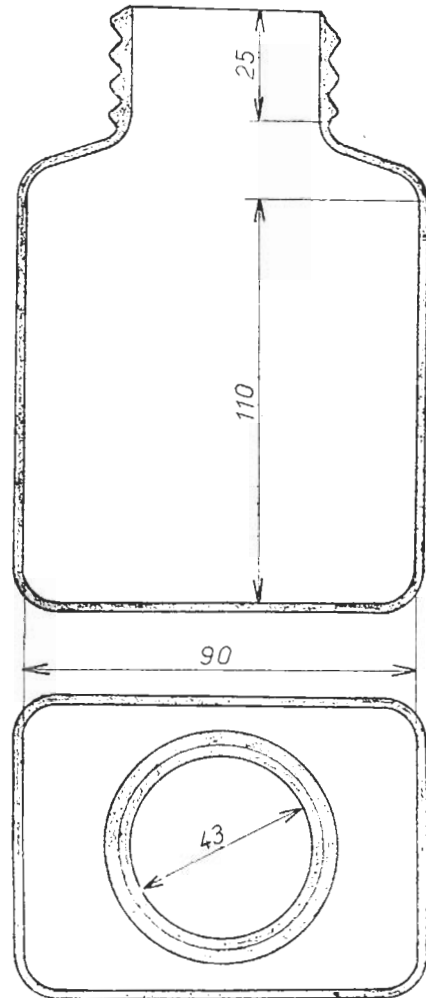
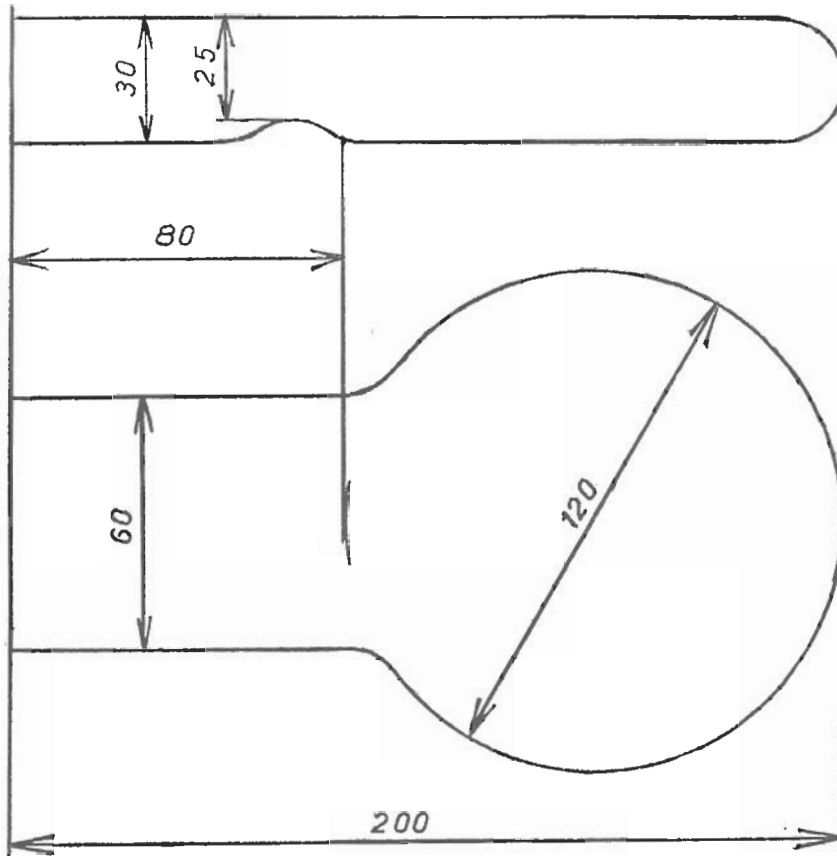


Fig. 2—Otro tipo de recipiente de ensayo

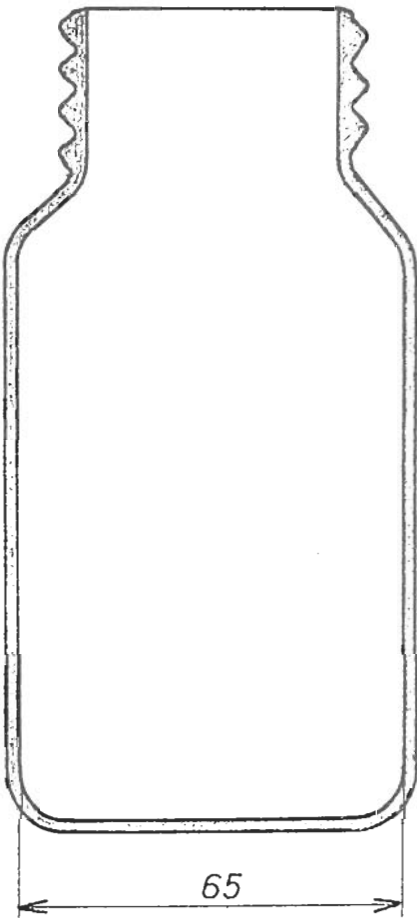


Fig. 2—Otro tipo de recipiente de ensayo

## Anexo D

### LISTA DE HONGOS OBLIGATORIOS

D.1. *Coniophora Cerebella* (Persoon) Duby (Cepa BAM EBW. 15)

Origen.

Actividad. — Pérdida media de masa sobre probetas de albura de pino silvestre (12 semanas),  $44,6 \% \pm 7,1 \%$ .

Mantenimiento. — Cultivo fácil, crecimiento rápido sobre medio nutritivo: agar-malta o agar-malta-peptona.

D.2. *Corilus Versicolor* (Linneus) Quelet (Cepa CTB N 863A).

Origen.

Actividad. — Pérdida media de masa para probetas de haya (12 semanas),  $29,9 \pm 5,7 \%$ .

Mantenimiento. — Cultivo fácil, crecimiento rápido sobre medio nutritivo: agar-malta.

D.3. *Lentinus Lepideus* Fries (Cepa BAM EBW. 20).

Origen.—J. Liese.

Actividad.—Pérdida de masa sobre probetas de albura de pino (12 semanas a  $20^{\circ}C$ ), 25 a 40 %.

Mantenimiento. — Cultivo fácil, crecimiento lento sobre medio nutritivo: agar-malta.

D.4. *Lentinus Degener* Kal Chbrenner Ap. Fries (Cepa 67.02 b)

Origen.

Actividad.—Pérdida media de masa sobre probetas de haya (16 semanas a  $24^{\circ}C$ ):  $31,7 \%$ .

Mantenimiento.

D.5. *Poria Monticola* Murrill (Cepa FPRL núm. 280).

Origen.—J. Liese (Eberswalde), mandada en 1931 al FPRL bajo el nombre de *Poria vaporaria*.

Actividad. — Pérdida media de masa sobre probetas de albura de pino silvestre (12 semanas) del crden del 23 %.

El control de la actividad se hace, por lo menos, tres veces al año en ensayos normalizados (probetas-testigo).

Mantenimiento. — Los cultivos de reserva, sobre medio agar-malta (5 % malta) se conservan en aceite mineral a la temperatura del laboratorio y se repican cada cuatro años.


Los hongos destinados a los ensayos se cultivan sobre el mismo medio y se repican cada tres semanas.

Cada dos años, o a veces a intervalos más cortos, los cultivos se repican sobre madera o sobre serrín, y después de tres a seis meses sobre sustrato se pasan a agar-malta.

D.6. *Lenzites Trabea* (Persoon) Fries (Cepa BAM EBW. 109).

Origen.—Farben industrie.

Actividad.—Pérdida media de masa sobre probetas de albura de



**Industrial de la Madera y Corcho**

trabaja para usted  
poniendo  
la investigación  
técnica al servicio  
de su industria

pino silvestre (12 semanas):  $42,8 \% + 7,5 \%$ .

Mantenimiento.—Cultivo aireado, crece rápidamente sobre medio nutritivo agar-malta.

# Anexo E

## LISTA ACONSEJADA, PERO NO EXHAUSTIVA DE LOS HONGOS FACULTATIVOS

Hongo	Cepa	Tipo de pudrición	Especie de madera	Importancia práctica		Cultivado en Laboratorio	Poder de destrucción de la madera	Umbral de eficacia en relación de Kg/m <sup>3</sup>
				Región donde se encuentra	Frecuencia			
Stereum hirsutum (Wild). Persoon.	C T B 394 A	Blanca	Roble, haya, abedul, olmo, chopo.	Escandinavia.	Madera almacenada o puesta en obra mal protegida.	Medio: agar-malta. Temp. 25° C.	Pérdida de masa sobre abedul, 30-40 % en 12 semanas.	
Lenzites Abietina.	B A M 68	Parda	Abeto.					
Lenzites sepiaria Fr.	C T B 885 B	Parda	Pinos silvestres, picea, frondosas.		Madera almacenada o en obra sometida al sol o lluvia.			
Paxilus panuoides Fries.	C T B 75-03 B	Parda	Resinosas.	Escandinavia.	Madera húmeda en construcción. Apeas minas.	Temp. 28° C. Ph del medio, 3,5 a 4.	Pérdida de masa media sobre albura de pino 23 %.	
Merulius lacrimans	B A M 315	Parda	Resinosas y frondosas.	Escandinavia, Países Bajos.	Parquets insuficientemente aireados.	Medio: agar-malta. Temp. 21-23° C.	Pérdida de masa media sobre albura de pino silvestre en 12 semanas: 25 % Países Bajos. 46,6 % + 7 Suiza. 30-40 % Alemania.	
Merulius himantiodes.	TI 55-77	Parda	Resinosas.	Dinamarca.	Maderas aserradas, poste.	Temp. 27° C.		