

EXTRAÍBLES DE CORTEZAS CHILENAS: EFECTO SOBRE LA LUMINISCENCIA DE BACTERIAS

EFFECT OF CHILEAN BARK EXTRACTS ON BACTERIAL LUMINESCENCE

Hernán Poblete¹, Edmone Roffae², Helmut Miertzsch³

RESUMEN

Se determinó la disminución de la bioluminiscencia de bacterias como indicador de la actividad biológica de extractos de corteza. Se analizaron cuatro cortezas nativas chilenas. La reducción de la bioluminiscencia fue diferente dependiendo de la especie de corteza.

El aumento del tiempo de un tratamiento térmico de la corteza (24, 48, 72 y 144 horas con 103°C) produjo una reducción de la actividad biológica de los extractos. El estudio indica que los terpenos podrían ser responsables del efecto señalado.

Palabras clave: Bioluminiscencia bacterial, extractos de corteza, cortezas chilenas.

ABSTRACT

Bioluminescence decrease of bacteria as a biological activity indicator for bark water extracts was determinate. Four Chilean barks were tested. A different reduction on bioluminescence depending on bark species was observed.

Increasing time of thermal treatment of bark (24, 48, 72 and 144 hours with 103°C) produced a reduction of the biological activity of extracts. The study indicates that the terpenes could be responsible for the described effect.

Key words: Bacterial bioluminescence, bark extracts, Chilean barks.

INTRODUCCION

La corteza se diferencia de la madera tanto en su estructura como en su composición química. La corteza presenta una serie de compuestos solubles en agua, denominados extraíbles, que son diferentes en cantidad y tipo a los de la madera. En muchos de los procesos de transformación de la madera los extraíbles de la corteza pueden llegar a las aguas residuales o servidas. El efecto de estos extraíbles se puede dar como un aumento de la falencia química y biológica de oxígeno en las aguas residuales y también como un aumento de la toxicidad de las aguas. Este efecto de los extraíbles se hace notar en los índices DBO y DQO, demanda biológica y demanda química de oxígeno (Springer y Peterson 1991, Parsons 1996).

¹ Inst. Tecnología de Productos Forestales. Universidad Austral de Chile. Casilla 567 Valdivia, Chile. hernanpoblete@uach.cl

² Inst. für Holzbiologie und Holztechnologie. Universität Göttingen. eroffae1@gwdg.de

³ Fraunhofer Arbeitsgruppe für Holzforschung, WKI. helmut.miertzsch@wki.fhg.de

Autor para correspondencia: hernanpoblete@uach.cl

Recibido: 25 de mayo de 2006. Aceptado: 12 de octubre 2006.

En la literatura se encuentran estudios sobre el efecto del tipo de corteza y del grado de descortezado sobre la demanda química y biológica de oxígeno en las aguas residuales. Estos trabajos están relacionados con la industria de la celulosa y no se conocen estudios que relacionen la bioluminiscencia con la toxicidad de los extraíbles de la corteza (Parsons 1996).

Para la determinación de la actividad biológica de aguas servidas existe un método descrito por la norma alemana DIN 38412, y que se basa en el empleo de bacterias luminiscentes. En el año 1993 se patentó este método como una tecnología específica para determinar la entrega de sustancias biológicamente activas por parte de productos a base de madera (Fraunhofer-Gesellschaft zur Förderung der angewandten Forschung 1993).

Esta metodología se basa en que las bacterias luminiscentes, de la familia *Vibrionaceae*, tienen la propiedad de irradiar luz. Esta luz, llamada también luz fría, se genera por el metabolismo de la bacteria. Los compuestos que alteran el metabolismo del organismo pueden hacer disminuir la intensidad de la luz fría. El efecto anterior se da de tal forma que se generan relaciones cuantitativas entre la intensidad de la bioluminiscencia y la toxicidad del medio en que se encuentren las bacterias.

La estrecha relación existente entre la bioluminiscencia y la actividad metabólica de las bacterias permite cuantificar la toxicidad o el perjuicio al metabolismo bacterial, a través de la variación o pérdida de la luminiscencia.

Mücke *et al.* (1998) emplearon esta tecnología para determinar la toxicidad de diferentes productos empleados en la construcción. Para ello se ubicaron muestras en una cámara con intercambio de aire controlado y lavando el aire en agua. Finalmente se controló la toxicidad de las emanaciones por medio de la luminiscencia de bacterias. Otras variantes del método de las bacterias luminiscentes han sido aplicadas para la determinación de la toxicidad en el aire de oficinas (Brügemann-Priesshoff *et al.* 2002).

En el caso del presente trabajo se trató de adaptar el método para examinar el grado de pérdida de la luminiscencia en relación a la concentración de extraíbles de diferentes cortezas nativas chilenas.

METODO

Para la determinación de la actividad biológica de los extractos de corteza se tomaron muestras de corteza fresca de las especies latifoliadas nativas chilenas coigüe (*Nothofagus dombeyi*), tepa (*Laurelia philippiana*), canelo (*Drimys winteri*) y arrayán (*Myrceugenella apiculata*). Las muestras se molieron en un molino Retsch con malla 0,5 mm y se mezclaron en una proporción de 1:10 con agua fría. La mezcla se agitó por 24 horas. Los extractos obtenidos de esta forma se filtraron con un filtro de vidrio G3.

El ensayo con las bacterias luminiscentes se llevó a cabo de acuerdo con la norma DIN 38412 Teil 32. Según lo planteado, el ensayo se basó en la determinación del efecto sobre la luminiscencia de las bacterias que tienen los extractos diluidos a diferentes concentraciones. La relación bacterias/extracto se realizó de acuerdo con la norma citada. Para la determinación de la actividad biológica se empleó un equipo de la firma Dr. Lange, el que mide la inhibición de la bioluminiscencia de bacterias provocada por la acción de sustancias tóxicas.

Debido a que las bacterias empleadas (familia: *Vibrionaceae*) corresponden a organismos que viven en el mar, a la muestra de extracto (2 ml) se le agregó una solución de NaCl al 2%. Posteriormente se preparó una serie de diluciones partiendo del extracto base, cuya concentración era de 1:10. Este

extracto se diluyó a concentraciones de 1:100; 1:500; y 1:1000. Paralelamente las bacterias se trataron con una muestra testigo (sin extracto) y la luminiscencia obtenida se registró como 100 %.

Luego de preparar las diferentes diluciones de los extractos de corteza, se mezclaron con la preparación de bacterias y después de un reposo de 30 minutos se midió la luminiscencia residual.

La incubación de las bacterias con las diferentes diluciones de extractos se llevó a cabo a una temperatura controlada de 15 °C. Como medida de la actividad biológica de los extractos se tomó la reducción de la bioluminiscencia que ocurrió luego de los 30 minutos de tratamiento. Paralelamente se midieron como testigo muestras de las bacterias en soluciones de NaCl al 2%.

Las mediciones se realizaron con tres repeticiones.

RESULTADOS

Los resultados del ensayo descrito anteriormente, para las diferentes especies de corteza, se presentan en la Tabla 1.

Tabla 1: Efecto de los extractos de corteza sobre la luminiscencia remanente de las bacterias
Effect of bark extracts on the remaining luminescence of bacteria

Corteza	Remanente de luminiscencia (%) para cada dilución		
	1:100	1:500	1:1000
Arrayán	76,00	86,06	95,92
Canelo	0,05	20,52	42,82
Coigüe	69,01	83,99	84,54
Tepa	30,22	76,38	82,47

Los valores presentados en la tabla 1 muestran claramente como un aumento de la concentración de extractos provoca una disminución de la luminiscencia. Se puede apreciar además, que los extractos en agua fría de la corteza de canelo son los que tienen un efecto más importante sobre la bioluminiscencia de las bacterias.

Los extraíbles de la corteza de tepa, en solución 1:100, también muestran una fuerte influencia sobre el metabolismo de las bacterias. Sin embargo, luego de una dilución a 1:500 se determinó una disminución importante de la capacidad de los extraíbles para reducir la luminiscencia.

La corteza de coigüe tiene un efecto sobre las bacterias relativamente importante en el primer grado de dilución (1:100). Con diluciones mayores se reduce la pérdida de bioluminiscencia.

En comparación a las otras especies, la corteza de arrayán tiene un efecto menor sobre las bacterias empleadas en el ensayo. Para poder determinar con mayor precisión la efectividad de los extraíbles de arrayán se probó una dilución de 1:10. Con esta preparación se midió una disminución de la bioluminiscencia de 100 % a 40,8 %.

Debido a que la actividad biológica de los extractos es importante para la utilización de la corteza, y a que en los diferentes procesos de utilización es frecuente e indispensable el aplicar temperatura, se realizó un tratamiento térmico a 103 °C de una muestra de corteza de tepa determinándose el efecto de este tratamiento sobre la bioluminiscencia (Figura 1).

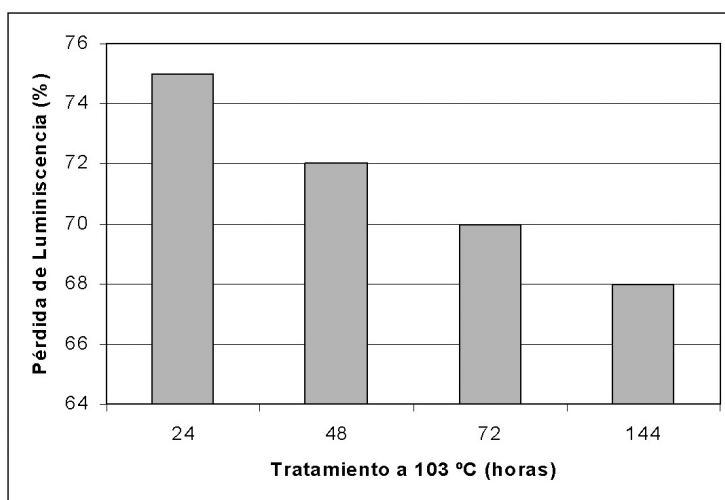


Figura 1: Efecto del tiempo de un tratamiento térmico con 103 °C sobre la actividad biológica de los extractos en agua fría de la corteza de tepa
Effect of thermal treatment duration with 103 °C on the biological activity of water extracts of tepa bark.

En la Figura 1 se observa que en la medida que el tratamiento térmico se prolonga se provoca una disminución en la pérdida de bioluminiscencia. Lo anterior permite concluir que algunos compuestos volátiles de la corteza serían responsables de la reducción de la actividad metabólica de las bacterias.

Considerando que entre las sustancias tóxicas volátiles más importantes se encuentran los terpenos, en un ensayo adicional se buscó comparar los valores de bioluminiscencia residual con la superficie de los picos registrados por cromatografía de gases para monoterpenos. Los resultados se presentan en la Tabla 2.

Tabla 2: Comparación de la luminiscencia residual con la superficie de los picos para monoterpenos en una determinación con cromatografía de gases.

Comparison between remaining luminescence and peak area of monoterpenes in bark extractives (Gas chromatographic analysis)

Propiedad	Especie			
	Arrayán	Canelo	Coigüe	Tepa
Luminiscencia residual (%)	76	0,05	69,01	30,22
Superficie de picos para monoterpenos	23.499	1.536.846	55.969	71.737
Superficie total*	38.415	1.788.337	81.409	685.153

*: Terpenos + compuestos no identificados
(Terpene + not identified compounds)

Los resultados presentados en la Tabla 2 muestran claramente que las cantidades de terpenos contenidas por los diferentes tipos de corteza estudiados, parecen tener una relación directa con los valores de luminiscencia residual. Es posible que los monoterpenos sean, a lo menos parcialmente, responsables de la actividad biológica de los extractos.

CONCLUSIONES

Los resultados permiten aseverar que la determinación de la reducción de bioluminiscencia en bacterias es una técnica que permite determinar el grado de actividad biológica de extractos en agua fría de corteza.

El grado de reducción de la bioluminiscencia está directamente relacionado con el tipo o especie de corteza empleada.

El grado de actividad biológica de los extractos parece estar directamente relacionado con algunas sustancias accesorias volátiles de la corteza. Entre ellas, los terpenos parecen ser gravitantes en la reacción.

BIBLIOGRAFÍA

Brüggemann-Priesshoff, H.; Gehrke, T.; Pfaumbaum, W.; Nies, E. 2002. Beurteilung der Toxizität lufttragende Stoffe am Arbeitsplatz mittels Leuchtbakterientest. *Gefahrstoffe-Reinhaltung der Luft* 62 (5): 191-196

DIN 38412. 1992. German standard methods for the examination of water, waste water and sludge; bio-assays (group L). Alemania: Beuth Verlag GmbH. p. 8

Fraunhofer-Gesellschaft Zur Förderung Der Angewandten Forschung e.V. 1993. Verfahren zur Bestimmung der Abgabe von biologisch aktiven Stoffen aus Holzwerkstoffen. Deutschland: Patentschrift, DE 41 19 079 C 2. 1993- Oktober-21.

Mücke, W.; Blum, M.; Hunstein, R. 1998. Emissionen aus Bauprodukten und Erfassung ihrer Toxizität mit dem Leuchtbakterien-Test. *Zent. Bl. Hyg. Umweltmed* 201(4-5): 377-386.

Parsons, B. W. 1996. Wastewater treatment seminar, Concepción, Chile, May 16-17, p. 40.

Springer, A. M.; Peterson, R.C. 1991. Control ambiental. In: CASEY, J.P. *Pulpa y papel, química y tecnología química*. Mexico: Ed. Limusa, vol.2, p. 457-678.