

Simpósio Internacional...

MULTIPLICAÇÃO DE MICRORGANISMOS POR EFEITO DE
ULTRA-SOM DE BAIXA INTENSIDADEMULTIPLICATION OF MICROORGANISMS BY
LOW INTENSITY ULTRASOUNDRuth de Gouvêa DUARTE⁽¹⁾Luiz Romariz DUARTE⁽²⁾Eloisa Pozzi GIANOTTI⁽³⁾

RESUMO

Induzir-se a multiplicação de algas Chlorella homosphaera (bio-indicador) por ultra-som com duas intensidades diferentes $2,35 \text{ w/cm}^2$ (SATA), exposições diárias com tempos variando de 5 a 15 minutos, com melhores resultados aos 5 minutos diários com intensidade de 15 mw/cm^2 . Os resultados nos levam a acreditar que ultra-som de baixa intensidade induz a multiplicação de algas Chlorella homosphaera.

Palavras-chaves: estimulação ultrasônica de crescimento; multiplicação de microrganismos; crescimento de população de algas, multiplicação de algas por indução ultrasônica.

ABSTRACT

The multiplication of algae Chlorella homosphaera, as bioindicator, induced by ultrasound has been investigated taking into account, at least, two intensities levels: $2,35 \text{ w/cm}^2$ (SAI) and 15 mw/cm^2 (SATA). Exposure daily times varied from 5 to 15 minutes and the best results were observed when the algae cultures were exposed 5 minutes per day an intensity as low as 15 mw/cm^2 (EU). According to the results it is possible to conclude that low level ultrasound does induce the multiplication of algae Chlorella homosphaera.

Key words: ultrasonic growth stimulation; microorganism multiplication; algae population growth; ultrasonic induction of algae multiplication.

(1) Prof. Dr. do Departamento de Hidráulica e Saneamento da EESC-USP.

(2) Prof. Titular e Coordenador da Bioengenharia - EESC-USP

(3) Técn. Especializado do Depto. de Hidráulica e Saneamento da EESC-USP

0794328

SYSNO 0794328
PROD 002463

ACERVO EESC

MULTIPLICAÇÃO DE MICRORGANISMOS POR EFEITO DE ULTRA-SOM DE BAIXA INTENSIDADE

Ruth de Gouvêa Duarte(*)

Luiz Romariz Duarte (**) |

Eloisa Pozzi Gianotti(***) |

1 - INTRODUÇÃO

A saúde e o bem estar humanos são grandemente influenciados pela presença ou ausência de microrganismos no ambiente. O controle de microrganismos é um sério problema da Engenharia Ambiental e também da medicina.

Nosso propósito é interferir nas atividades microbianas utilizando ultra-som. O ultra-som é uma forma de energia vibracional que tem demonstrado possuir ação deletéria ou estimuladora, dependendo dos parâmetros empregados - muito especialmente da intensidade.

2 - PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

Algas de uma cultura pura de Chlorella homosphaera foram utilizadas como bio-indicadores nos ensaios de estudos do efeito multiplicador do ultra-som de baixa intensidade.

As determinações das quantidades de algas foram feitas através de medidas colorimétricas em porcentagens de transmitância e posterior conversão para absorbância, em espectrofotômetro VARIAN UV Vis, série 634, no comprimento de onda de 750 nm para determinação do número de células (partículas em suspensão). Também se fez, simultaneamente a contagem direta dos indivíduos em célula de Sedgwick-Rafter, em Hemacitômetro (Hemacitometer Improved Neubauer - Brigert Line) em microscópio binocular, marca Carl Zeiss, 320 vezes de aumento.

A determinação da concentração de clorofila foi feita filtrando-se amostras em filtros AP 20 "Millipore", maceração e extração de pigmento com acetona a 90% e posterior leitura no espectrofotômetro s 663 nm r 750nm, técnica sugerida por GOLTERMAN (1971).

A sonização ultra-sônica foi efetuada utilizando-se dois diferentes parelhos de ultra-som:

-Aparelho gentilmente construído e cedido pela Bioengenharia, UE 1, (Patente nº 8107560) com as seguintes características:

- Onda pulsada
- Frequência fundamental 1,5 MHz
- Largura de pulso 200 us
- Frequência de repetição 1 KHz
- Intensidade SATA (space average, time average) = 15 mw/cm².

(*) Prof. Dr. do Departamento de Hidráulica e Saneamento da EESC-USP

(**) Prof. Titular e Coordenador da Bioengenharia - EESC-USP

(***) Técnico Especializado do Departamento de Hidráulica e Saneamento da EESC-USP

O aparelho consta essencialmente de um oscilador tipo Colpitz capaz de operar na faixa de megahertz com uma saída de rádio frequência de 1.5 MHz com uma amplitude de 30 v pico a pico. Esse sinal é interrompido por um conjunto "driver" e gerador de largura de pulso de tal forma que se possa obter um "burst" de RF com duração de 200s repetido a cada 1 ms (frequência de repetição do "burst" igual a 1 KHz). O conjunto eletrônico excita uma cerâmica piezoelétrica PZT-4 de 2 cm de diâmetro (transdutor) especialmente montada para o experimento. A intensidade SATA (space average, time average) foi medida em balança radiométrica seguindo-se procedimento padrão, encontrando-se o valor SATA de 15 mw/cm^2 .

-Aparelho especialmente montado por gentileza da THORNTON Impec Eletrônica S.A. de Vinhedo (SP), com as seguintes características:

- Onda contínua
- Frequência fundamental 21 KHz
- Intensidade SAI (space average intensity) de 2.35 w/cm^2 a 4.22 w/cm^2 .

O instrumento consta essencialmente de um oscilador de rádio-frequência (para 20 KHz) e de um "driver" capaz de operar até um limite máximo de 500 watts de potência elétrica. O acoplamento de impedâncias do oscilador e do transdutor é feito através de transformador capaz de neutralizar as reatâncias indutiva e capacitiva do transdutor. O transdutor é constituído de um sanduíche de cerâmicas piezoelétricas PZT-4, acopladas a um transformador acústico especialmente projetado. A característica mais importante do instrumento está na facilidade de se variar a intensidade - desde 2.35 watts/cm^2 até 18.79 watts/cm^2 passando por cinco valores intermediários, através do uso de uma chave no painel. Operamos com os dois primeiros valores: 2.35 w/cm^2 e 4.22 w/cm^2 .

Para cada um dos dois instrumentos, durante as estimulações foi adicionado um alvo de cerâmica PZT-4 de 2 cm de diâmetro, mergulhado nos meios de cultura, capaz de, ao receber o campo acústico produzido pelos transdutores, produzir cargas elétricas as quais poderiam influenciar os microrganismos circunjacentes.

Para cada lote de culturas sempre se separou um grupo controle e seis outros foram utilizados para a pesquisa sendo sonizados: grupo 1 - controle, grupo 2 - aparelho Thornton com seu próprio transdutor ponto 0 do painel (2.35 w/cm^2); grupo 3 - mesmo aparelho, mesma intensidade com o transdutor PZT; grupo 4 - mesmo aparelho, seu próprio transdutor, ponto 1 (4.32 w/cm^2); grupo 5 - mesmo aparelho, mesma intensidade, mais transdutor de PZT; grupo 5 - unidade experimental BIO UE 1, com seu transdutor e grupo 5 - BIO UE 1 com transdutor de PZT. Após o 7º dia de sonização todas as culturas eram repetidas para se observar seus comportamentos reprodutivos.

3 - RESULTADOS E CONCLUSÕES

As dificuldades encontradas foram enormes. Pequenas variações no tempo de exposição à sonização por exemplo, levaram a diferenças muito grandes nos resultados. Não foi fácil estabelecer uma rotina para o trabalho. Naturalmente, por se tratar de linha de pesquisa completamente nova, sem suporte de literatura, esses percalços eram esperados.

Nosso suporte científico apoiou-se nos trabalhos "in vivo" com coelhos e seres humanos. As coisas são muito diferentes com microrganismos "in vitro".

Os tempos de aplicação de 5 minutos foram considerados consistentemente positivos para a proliferação de algas. Os tempos de 15 minutos eram deletérios à proliferação. Uma provável causa disto seria o fato de, mesmo com intensidade baixa, haver possibilidade da cavitação citada por Hill 1970 com evidentes danos para os microrganismos.

Fenomenologicamente falando, o ultra-som de baixa intensidade induz a multiplicação de algas Chorella homosphaera.

BIBLIOGRAFIA

- CARDOSO, A.M. - Estudo sobre Cromossomos Metafásicos de Células de Medula Óssea Expostas "in vivo" ao Ultra-Som Pulsado Usado como Estimulo de Crescimento Ósseo. Tese de Mestrado, USP, 1985
- DUARTE, L.R. - Estimulação Ultra-Sônica do Calo Ósseo. Tese de Livre-Docência, EESC-USP, 1977.
- FROBISHER, M. - Fundamentals of Bacteriology, London W.B. Saunders, 1962.
- PELCZAR, M.J. et al. - Microbiologia, São Paulo, McGraw-Hill do Brasil, 1978.
- ZEIKUS, J.G. et al. - Microbial Populations en Digester. In: Stafford D.A.; Wheatley, B.I, and Hughes, D.E., Anaerobic Digestion, London Applied Science Publishers, 61-89, 1980.
- DUARTE, L.R. - The Stimulation of Bone Growth by Ultrasound. Archives or Orthopaedic and Traumatic Surgery, 1983 101:153-159.
- FUKADA, E. ; YASUDA, I. - On the Piezoelectric Effect of Bone. J.Phys Soc. Jap., 1957 12:10.
- FUKADA, E. ; YASUDA, I. - Piezoelectric Effects in Collagen. Jap. J. Appl. Physics, 1964, 3.
- HILL, G. - Ultrasonic Exposure Thresholds for Changes in Cells and Tissues J. Acoust. Soc. Am 52:667-672.

TABELA 1 - Ensaio de Estimulação de Cultura de Chlorella homosphaera
 Aplicação de Ultra-Som - Intensidade: 2.35 w/cm^2 (ponto zero)
 15 mw/cm^2

Tempo de Exposição: 10' diários

	1 Controle	2 Ponto 0 (PZT)	3 Ponto 0	4 U.E. (PZT)	5 U.E.
29/08					
30/08	2,770E + 05	2,830E + 05	2,830E + 05	2,420E + 05	3,290E + 05
31/08	3,690E + 05	3,770E + 05	4,070E + 05	3,570E + 05	3,700E + 05
02/09	5,400E + 05	7,700E + 05	6,650E + 05	5,120E + 05	5,210E + 05
06/09	8,730E + 05	1,083E + 06	9,370E + 05	7,890E + 05	9,100E + 05
09/09	1,027E + 06	1,346E + 06	1,159E + 06	1,278E + 06	1,129E + 06
13/09	1,088E + 06	1,710E + 06	1,107E + 06	1,417E + 06	1,244E + 06

TABELA 2 - Repique das Culturas Relativas aos Ensaio de 29/08.

	1 Controle	2 Ponto 0 (PZT)	3 Ponto 0	4 U.E. (PZT)	5 U.E.
16/09					
17/09	1,990E + 05	2,260E + 05	1,490E + 05	2,650E + 05	3,500E + 05
19/09	2,510E + 05	2,580E + 05	1,580E + 05	2,910E + 05	5,170E + 05
20/09	2,660E + 05	1,880E + 05	7,290E + 04	1,990E + 05	6,240E + 05
23/09	2,880E + 05	1,940E + 05	1,080E + 05	2,350E + 05	8,750E + 05
26/09	3,360E + 05	2,040E + 05	1,330E + 05	4,390E + 05	1,000E + 06
29/09	2,430E + 05	8,710E + 04	6,220E + 04	9,240E + 04	1,020E + 06
30/09	1,920E + 05	2,490E + 04	1,770E + 04	3,380E + 04	1,090E + 06

TABELA 3 - Ensaio de Estimulação de Cultura de *Chlorella homosphaera*
 Aplicação de Ultra-Som - Intensidade: $2,35 \text{ w/cm}^2$ (ponto zero)
 15 mw/cm^2 (U.E.)

Ensaio com reposição de meio de cultura, diariamente são retirados 10 ml da cultura e colocados 20 ml de meio de cultura, 200ml de cultura sendo 100 ml em cada Erlenmeyer.

Tempo de Exposição: 10'

	1	2	3	4	5
	Controle	Ponto 0 (PZT)	Ponto 0	U.E. (PZT)	U.E.
19/09					
20/09	2,540E + 05	2,790E + 05	3,150E + 05	3,160E + 05	3,320E + 05
21/09	7,200E + 05	6,260E + 05	5,760E + 05	5,900E + 05	6,040E + 05
22/09	7,270E + 05	6,970E + 05	7,890E + 05	7,710E + 05	6,560E + 05
26/09	1,470E + 06	9,710E + 05	1,160E + 06	1,370E + 06	1,380E + 06
28/09	1,740E + 06	7,110E + 05	7,200E + 05	1,420E + 06	1,430E + 06
03/10	2,430E + 06	4,660E + 05	6,990E + 05	1,430E + 06	1,840E + 06

TABELA 4 - Repique das Culturas Relativas aos Ensaios de 19/09.
 Início do Repique (05/10), Novo Cultivo.

	1	2	3	4	5
	Controle	Ponto 0 (PZT)	Ponto 0	U.E. (PZT)	U.E.
05/10					
07/10	3,820E + 05	1,670E + 05	2,040E + 05	2,260E + 05	2,990E + 05
11/10	4,890E + 05	3,500E + 05	1,970E + 05	3,250E + 05	4,440E + 05
17/10	4,180E + 05	4,550E + 05	1,870E + 05	3,310E + 05	4,340E + 05
18/10	4,300E + 05	5,010E + 05	2,220E + 05	5,190E + 05	5,300E + 05