

III SIMPÓSIO LUSO-BRASILEIRO DE ENGENHARIA SANITÁRIA E AMBIENTAL
(SILUBESA)

TEMA 5
QUALIDADE DA ÁGUA

INFLUÊNCIA DO ULTRA-SOM NA DESTRUIÇÃO E NA MULTIPLICAÇÃO
DE MICRORGANISMOS

Prof. RUTH DE GOUVÊA DUARTE
Prof. EUGÊNIO FORESTI
Prof. LUIZ ROMARIZ DUARTE
Ecóloga ELOISA POZZI GIANOTTI
São Carlos (SP), Brasil

RESUMO

A saúde e o bem estar humanos são fortemente influenciados pela presença ou ausência de microrganismos no meio ambiente. O controle de microrganismos é sério problema da Engenharia Ambiental e da Medicina. Há certas situações em que há necessidade de se eliminar bactérias, algas e fungos. Mas há outras em que se deseja incrementar as populações ou as comunidades microbianas. A proposta deste trabalho é utilizar um processo físico, o ultra-som, para se fazer o controle. O ultra-som tem demonstrado ser uma forma de energia vibracional que tem demonstrado ser uma acção destrutiva ou estimulante dependendo dos parâmetros empregados, principalmente a intensidade. O ultra-som de alta intensidade foi utilizado para destruir microrganismos e o de baixa intensidade para estimular o incremento com resultados bastante promissores.

NOME : RUTH DE GOUVÊA DUARTE

CARGO: Professor Assistente Doutor

DISCIPLINAS QUE LECIONA: SHS-162 - Ciências do Ambiente

SHS-835 - Problemas de Saúde Pública
para Engenheiros

FORMAÇÃO ACADÊMICA

Graduação: Ciências Físicas e Biológicas pela UFSCar - 1972

Para Graduados: Sanitarista pela FSP-USP - 1974

Pós-graduação: Mestre em Saúde Pública pela FSP-USP - 1977

Doutor em Saúde Pública pela FSP-USP - 1983

Áreas de Trabalho: Saúde Pública, Mercúrio em Peixes, Eutrofi-
zação, Controle de Microrganismos

Escola de Engenharia de São Carlos - Universidade de São Paulo

Departamento de Hidráulica e Saneamento

Av. Dr. Carlos Botelho nº 1465

Caixa Postal: 359

13.560 - São Carlos - SP

"INFLUÊNCIA DO ULTRA-SOM NA DESTRUIÇÃO E
NA MULTIPLICAÇÃO DE MICROORGANISMOS"

Prof^a. Ruth de Gouvêa Duarte
Prof. Eugênio Foresti
Prof. Luiz Romariz Duarte
Ecóloga Eloisa Pozzi Gianotti

RESUMO

A saúde e o bem estar humanos são fortemente influenciados pela presença ou ausência de microrganismos no meio ambiente. O controle de microrganismos é sério problema da Engenharia Ambiental e da Medicina. Há certas situações em que há necessidade de se eliminar bactérias, algas e fungos. Mas há outras em que se deseja incrementar as populações ou as comunidades microbianas.

A proposta deste trabalho é utilizar um processo físico, o ultra-som, para se fazer o controle. O ultra-som tem demonstrado ser uma forma de energia vibracional que tem demonstrado ser uma ação destrutiva ou estimulante dependendo dos parâmetros empregados, principalmente a intensidade. O ultra-som de alta intensidade foi utilizado para destruir microrganismos e o de baixa intensidade para estimular o incremento com resultados bastante promissores.

"ULTRASOUND INFLUENCY IN DESTRUCTION AND
MULTIPLICATION OF MICROORGANISMS"

Prof^a. Ruth de Gouvêa Duarte
Prof. Eugênio foresti
Prof. Luiz Romariz Duarte
Ecóloga Eloisa Pozzi Gianotti

ABSTRACT

The human health and welfare are greatly influenced by the presence or absence of microorganisms in the environment. The microorganism control is a serious problem of Environmental Engineering and Medicine as well.

There are peculiar situations for which there is the necessity to eliminate bacteria, algal and fungal. In another hand there are other situations for which the multiplication of microorganism community is desirable.

The proposal of this work is the utilization of ultrasound as a means to destroy or to stimulate the multiplication of microorganisms depending of a choice of appropriate parameters.

Ultrasound has demonstrated to be a source of vibrational energy very useful to destroy if placed to work in a high intensity level and to stimulate growth of tissues, or microorganisms colony, if it is turned to work with a low level intensity.

The present work shows the first results for the reduction of both coliforms and algal, as well as, the significant increase in number of individuals in algal colony.

"INFLUÊNCIA DO ULTRA-SOM NA DESTRUIÇÃO E NA
MULTIPLICAÇÃO DE MICRORGANISMOS"

Ruth de Gouvêa Duarte*
Eugênio Foresti **
Luiz Romariz Duarte ***
Eloisa Pozzi Gianotti****

1 - INTRODUÇÃO

Em 1848 Louis Pasteur vaticinou "Messieurs, sont les microbes qui auront le dernier mot...". O homem conseguiu colocar a Ciência a serviço da tecnologia e a tecnologia a serviço do próprio homem, mas decorridos quase século e meio da "profecia" de Pasteur, é ainda com os microrganismos que o ser humano trava luta desigual. Algas, fungos e bactérias causam sérios problemas à medicina e à Engenharia Sanitária - isto para não citar os vírus, nossos maiores inimigos. Por outro lado, há microrganismos "aliados" do homem, utilizados na indústria alimentícia, farmacêutica e no tratamento de águas residuárias.

A saúde e o bem estar humanos são influenciados pela presença ou ausência de microrganismos no meio ambiente. "Não há qualquer campo do saber humano - seja na indústria, na agricultura, no preparo de alimentos, em conexão com problemas de habitação ou de vestuário, na conservação da saúde humana ou de animais e no combate às doenças em que o micróbio não desempenhe um papel importante e, às vezes, dominante" (S.A. Wakesman, 1942).

Diversos produtos químicos e alguns processos físicos vêm sendo utilizados para controlar os microrganismos - mais especificamente, para destruir microrganismos que diretamente agredem o homem ou o meio ambiente e, neste caso, muito especialmente para eliminar aqueles que poluem e contaminam as águas. Diversas técnicas que utilizam a Química ou a Física são empregadas para acelerar a proliferação de certos microrganismos no fabrico de manteiga, queijos, leites fermentados, o próprio pão e, ainda, bebidas diversas como cerveja, rhum, whisky, vinhos. E, a nível de Saneamento Básico, as bactérias são importantes no tratamento de efluentes domésticos e industriais - tanto nos processos aeró-

-
- * Professor Assistente Doutor do Departamento de Hidráulica e Saneamento da EESC-USP
** Professor Livre-Docente do Departamento de Hidráulica e Saneamento da EESC-USP
*** Professor Titular e Coordenador da Bioengenharia da EESC-USP
**** Técnica de Apoio ao ensino e à Pesquisa do Departamento de Hidráulica e Saneamento da EESC-USP

bios como e principalmente nos processos anaeróbios.

Classicamente - através de história já um tanto longa - águas residuárias com altas concentrações de orgânicos solúveis e baixas concentrações de sólidos suspensos, têm sido tratadas em Reatores Aeróbios tais como lodos ativados e filtros biológicos, preferidos para o tratamento de resíduos devido à facilidade de operação e pela tolerância às flutuações no processo. Mas por produzirem grandes quantidades de lodo, os reatores aeróbios estão se tornando onerosos face utilização das áreas livres que estão sendo ocupadas por causa do grande desenvolvimento urbano e devido também à crise energética os reatores anaeróbios se tornam muito interessantes.

"A partir desse quadro, o tratamento anaeróbio vem se tornando uma alternativa muito interessante em relação ao aeróbio pois, entre outras vantagens, resulta em mais baixos custos de operação e implantação, além de produzirem biogás que pode ser utilizado para fornecer energia...A digestão anaeróbia vem se constituindo assunto de grande interesse para pesquisadores do mundo todo, inclusive por ser um processo onde há muito por ser esclarecido". (E.Foresti & V.Del Nery, 1987) Atualmente, com o desenvolvimento da tecnologia dos processos biológicos já existem eficientes sistemas anaeróbios para o tratamento de despejos líquidos.

No processo de tratamento anaeróbio, embora haja vantagens (principalmente de ordem econômica), G. Lettinga et alii citam a sensibilidade das bactérias anaeróbias a grande número de compostos e a lenta partida do reator como desvantagens do tratamento anaeróbio.

É importante induzir a multiplicação da população microbiana para favorecer, ou diminuir, o tempo de partida do reator, bem como para garantir a efetiva bioconversão da matéria orgânica, bioconversão que depende de uma população microbiana diversificada e estável a qual "age sintotroficamente, sendo que alguns microrganismos utilizam determinados tipos de substratos e produzem substâncias que constituirão substrato para outros, de tal modo que a degradação da matéria orgânica possa ser realizada satisfatoriamente" (J.G. Zeikus et alii, 1980).

Nossa proposta é, através de um processo físico, interferir nas comunidades microbianas. Mais especificamente: 1) destruir microrganismos com ultra-som de alta intensidade e 2) através de ultra-som de baixa intensidade induzir a sua proliferação.

O ultra-som é uma forma de energia vibracional que tem demonstrado uma ação destrutiva ou estimulante, dependendo dos parâmetros empregados. Por exemplo, uma intensidade ultra-sônica entre 8 e 10 mw/cm² está sendo empregada em estimulação do crescimento ósseo no tratamento de fraturas por L.R.Duarte e colaboradores, pesquisa pioneira com ultra-som, feita na EESC cujo processo foi patenteado no Brasil e nos Estados Unidos da América do Norte. Com base nesse trabalho, o mesmo grupo está utilizando ultra-som de baixa intensidade para tratamento de tecido epitelial lesado por queimaduras de 3º grau.

Por outro lado, uma intensidade alta de ultra-som(1000

w/cm²) podem em 15 segundos, pulverizar cálculos renais.

2 - OBJETIVOS

Utilizando algas e bactérias como indicadores biológicos testar as hipóteses:

2.1 - A alta intensidade do ultra-som pode destruir microrganismos.

2.2 - Ultra-som de baixa intensidade induz a proliferação de microrganismos.

3 - MATERIAL E MÉTODOS

3.1 - Bactérias coliformes da água bruta que entra na Estação de Tratamento de Águas de São Carlos estão sendo utilizadas como indicadores biológicos do efeito destruidor do ultra-som de alta intensidade.

Algas são utilizadas para ensaios do efeito destruidor e multiplicador do ultra-som de alta e de baixa intensidade, respectivamente.

A quantificação dos coliformes do grupo controle e dos grupos ultra-sonizados foram feitos pelas técnicas tradicionais e padronizadas: Tubos Múltiplos e de Contagem em Placa, ambas seguindo o Standard Methods for the Examination of Water and wastewater.

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 Hemacitômetro (Hemacitometer Improved Neubauer - Bright 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 do pigmento com acetona a 90% e posterior leitura no espectrofotômetro a 663 nm e 750 nm, sugerida por GOLTERMAN (1971).

No caso da destruição das células, uma alíquota da cultura (cerca de 90 ml) é ultra-sonizada, é feita a quantificação dos indivíduos e duas novas culturas são preparadas (uma a partir do grupo controle e outra do grupo sonizado) para observação do comportamento reprodutivo dos remanescentes.

Culturas puras de Ankistrodesmus densus, e de Chlorella sp, isoladas ambas de amostras de água doce da Represa do Lobo, São Carlos, SP, estão sendo cultivadas e mantidas no Laboratório de Traçadores e Microanálises, mantidas em meio de cultura CHU-12, meio esse modificado a partir do CHU-10, sugerido por Branco(1978) para indivíduos de ambientes ricos em nutrientes. As culturas são mantidas a 22°C ± 2, sob condição de luminosidade 2.800 lux e

agitação com borbulhamento de ar.

3.2 - Os instrumentos utilizados foram dois aparelhos produtores de ultra-som.

3.2.1 - Para Alta Intensidade

Aparelho construído pela Bioengenharia da EESC, com as seguintes características.

Onda Contínua

Frequência fundamental 21 KH_Z

Intensidade (SAI - Space Average Intensity = 30 w/cm²)

3.2.2 - Para Baixa Intensidade

Aparelho construído pela Bioengenharia (Pat nº8107560).

Onda Pulsada

Frequência fundamental 1,5 MH_Z

Largura de Pulso 200 µs

Frequência de repetição 1 KH_Z

Intensidade (SATA) 15 mw/cm².

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 MH_Z 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 200 µs repetido a cada 1 ms (frequência de repetição do "burst" igual a 1 KH_Z). 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/cm².

3.2.3 - Para Baixa Intensidade

Aparelho especialmente montado por gentileza da THORNTON Impec Eletrônica SA de Vinhedo (SP).

Onda Contínua

Frequência fundamental 21 KH_Z

Intensidade (SAI - Space Average Intensity) 2.35 w/cm²

O instrumento consta essencialmente de um oscilador de rádio-frequência (para 20 KH_Z) 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 sanduiche de cerâmicas piezoelétricas tipo 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/cm²

até 18.79 watts/cm², passando por cinco valores intermediários, através do uso de uma chave no painel. Estamos operando com 2.35 watts/cm² para multiplicação.

4 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

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

Nosso suporte científico apoia-se nos trabalhos "in vivo" com coelhos e com seres humanos. As coisas são muito diferentes "in vitro", com microrganismos. Inclusive as tecnologias de quantificação quer das bactérias, quer das algas, não dão segurança a não ser com amostras muito grandes. Para diminuir as possíveis falhas do processo, é o que nos propomos fazer: trabalhar com grandes amostras para minimizar o erro. Sabemos que estamos diante de um trabalho que requer tempo e paciência, mas aceitamos o desafio face os resultados obtidos que podem ser vistos nas figuras anexas que colocamos como simples exemplos para mostrar que estamos diante de um bom caminho.

Redução de Microrganismos

Figura 1 - Redução de Coliformes com Ultra-Som de Alta Intensidade

Observa-se que em todos os ensaios houve significativa redução do número de indivíduos. Pode-se observar que nos tempos de exposição de 10 e 15 minutos há mudança de inclinação das curvas, e essa diminuição da taxa de redução talvez seja devida ao aumento de temperatura que o próprio processo provoca.

Figura 2 - Redução de Algas

Também para as algas se observa que para o tempo de exposição entre 10 e 15 minutos há mudança de inclinação nas curvas de redução. Mas a redução, em si mesmo, é auto-evidente em todos os casos.

Embora o decréscimo do número de células não seja grande em relação ao grupo controle, cerca de 50%, o resultado foi interessante porque após a sonização, feitas novas "repicagens" para outro meio de cultura, constatou-se morte da cultura, ou seja inviabilidade de reprodução. O grupo controle após "repicagem" produzim outra cultura, sem problemas.

É nosso objetivo verificar o porque com a ajuda de pessoal do ramo. Estamos levantando a hipótese da inviabilidade celular ser fisiológica, uma vez que não parece ocorrer alterações significativas, pelo menos por observação em microscopia ótica comum.

Multiplicação de Microrganismos

Figura 3 - Multiplicações de Algas com Ultra-Som de Baixa Intensidade

Os tempos de aplicação de cinco minutos foram consistentemente positivos para a proliferação de algas. O mesmo não ocorrendo com tempo maior de sonização de 15 minutos; na maioria das vezes levando mesmo à redução em relação ao controle.

Uma provável explicação é que mesmo com uma intensidade de 2.35 w/cm^2 existe, segundo Hill (1970), a possibilidade da existência de cavitação, com evidentes danos para os microrganismos.

Talvez até se possa tentar redução de microrganismos com baixa intensidade em tempos grandes de exposição ou grande frequência de exposição.

Figura 4 - Multiplicação de Algas com Baixa Intensidade

Novamente na Figura 4 se observa melhor desempenho no crescimento com 5 minutos diários de aplicação.

5 - CONCLUSÕES

Fenomenologicamente falando os resultados conseguidos até o presente momento são indicadores de que devemos insistir em testar a nossa hipótese - tema da Influência da Ultra-Som de Baixa Intensidade na Multiplicação de Microrganismos e da Redução com Ultra-Som de alta Intensidade.

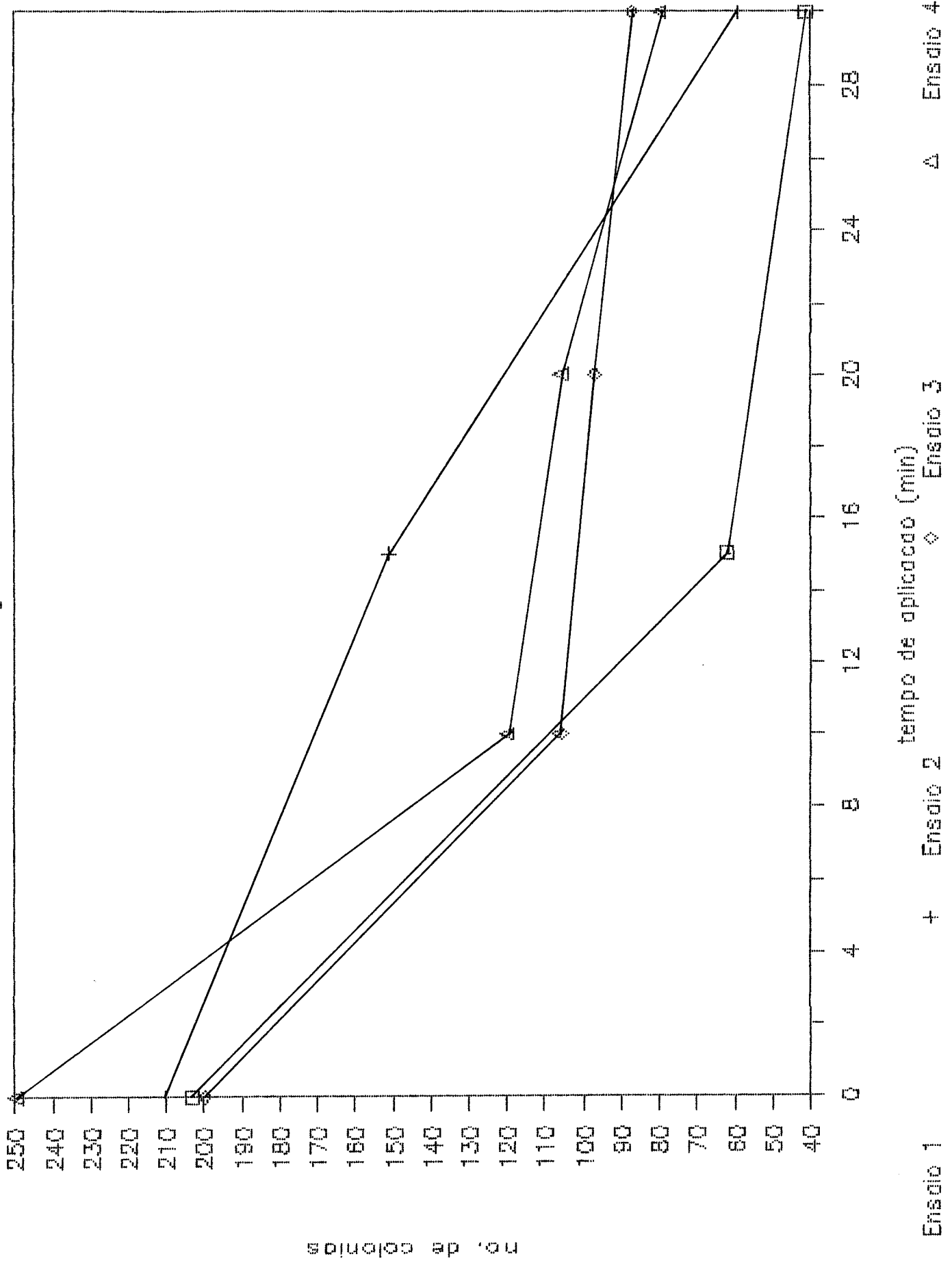
Acreditamos que poderemos chegar a resultados que permitam suporte para pesquisas aplicadas.

6 - BIBLIOGRAFIA

- 1 - DUARTE, L.R. - The Stimulation of Bone Growth by Ultrasound; Archives of Orthopaedic and Traumatic Surgery (1983) 101:153-159
- 2 - DUARTE, L.R. - Estimulação Ultra-sônica do Calo Ósseo, Tese de Livre-Docência, EESC-USP, 1977.
- 3 - FUKADA, E. & YASUDA, I. - On the piezoelectric effect of bone J. Phys. Soc. Jap. (1957) 12:10.
- 4 - FUKADA, E. & YASUDA, I. - Piezoelectric effects in collagen. Jap. J. Appl. Physics., 1964, 3.
- 5 - HILL, G. - Ultrasonic exposure thresholds for changes in cells and tissues. J. Acoust. Soc. am 52:667-672.
- 6 - CARDOSO, A.M. - Estudo sobre Cromossomos Metafásicos de Células de Medula Óssea expostas "in vivo" ao Ultra-Som pulsado usado como Estímulo de Crescimento Ósseo, Tese de Mestrado, 1985

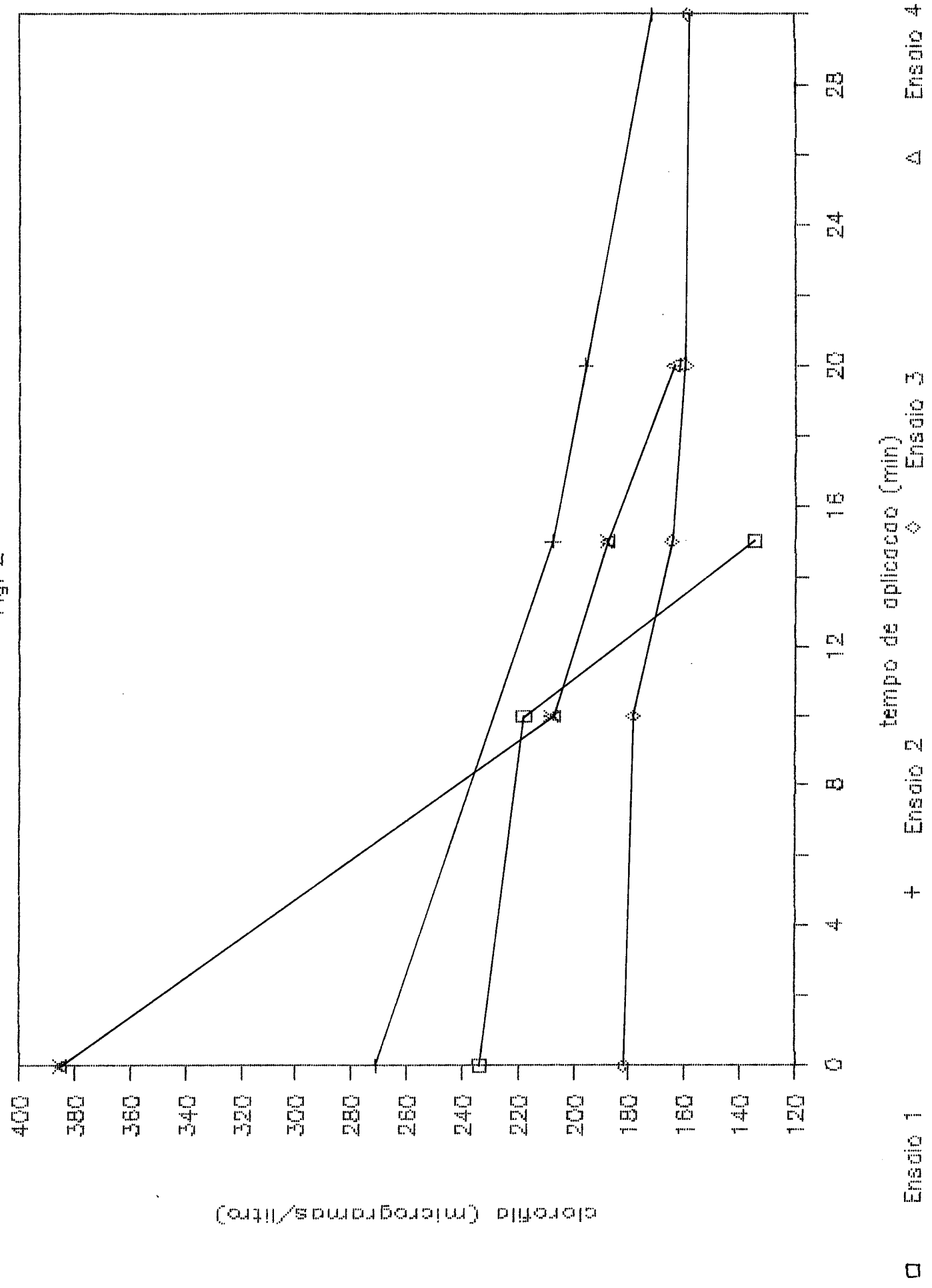
Reducao de Microorganismos (coliformes)

Fig. 1



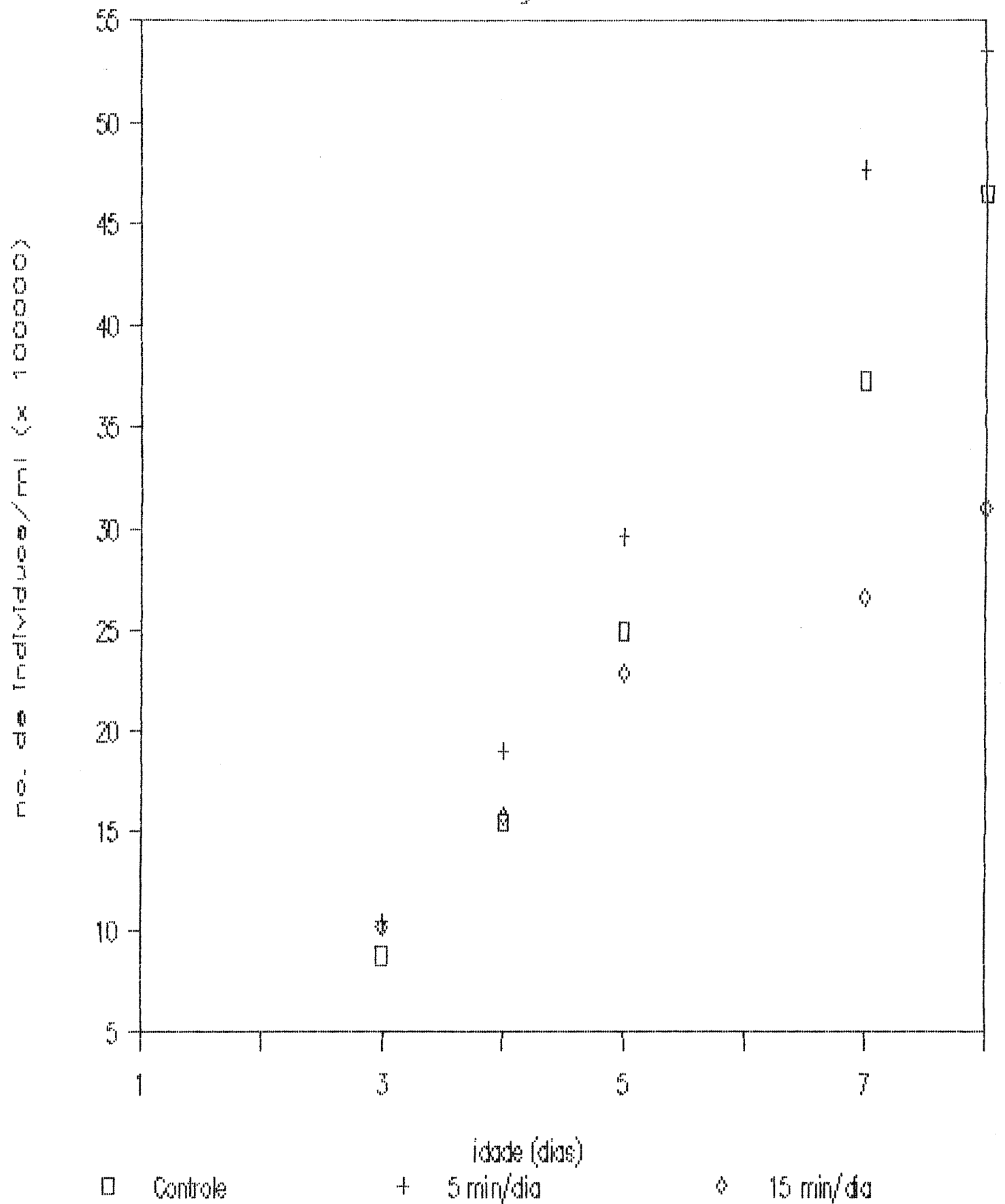
Reducao de Microorganismos (algas)

Fig. 2



Multiplicacao de Algas

Fig. 3



Multiplicação de Algas

Fig. 4

