

## **APLICAÇÃO DE ULTRASOM EM SUSPENSÃO DE ESPOROS DE *Aspergillus niger*.** Elaine Rodrigues da Silva, Dejanira de Franceschi de Angelis, Roberto Naves Domingos. - Microbiologia - Ciências Biológicas - Departamento de Bioquímica e Microbiologia - Instituto de Biociências - Campus de Rio Claro.

Estudos interdisciplinares têm mostrado novas perspectivas de interação entre as áreas de Biologia e da Física. Assim, quando métodos físicos são aplicados aos biosistemas, aspectos novos têm surgido na interpretação dos resultados.

Na Microbiologia a aplicação de ultrassom (US) em compostos orgânicos e em estruturas biológicas tem motivado muitos estudos científicos e, quando utilizados adequadamente, são capazes de inibir ou destruir os microrganismos. Assim, há a possibilidade de descontaminação de água, homogeneização de suspensões, melhor dispersão de partículas assim como de células de microalgas, de esporos, de leveduras, propiciando quantificação mais exata. Outras aplicações em fungos têm conduzido à minimização de contaminantes em cosméticos, extração e ativação de enzimas e desfloculação de leveduras induzida por bactérias.

Domingos (1998), descreveu que os efeitos biológicos do US, ainda que não completamente esclarecidos, estão associados ao efeito da cavitação. A cavitação é a formação de microcavidades ou microbolhas no meio líquido contendo quantidades variáveis de gás, vapor ou ambos. No caso de células biológicas ou macromoléculas em suspensão aquosa, o US pode alterá-las estrutural ou funcionalmente mediante cavitação.

Sinisterra (1992) mostrou que o US a altas intensidades pode romper células ou desnaturar enzimas, mas a baixas intensidades podem modificar o metabolismo celular ou aumentar a transferência de reagentes ou produtos através da parede ou membrana celular.

Bucalon e Palma (1989), encontraram que células de *Saccharomyces cerevisiae* irradiadas a 20 KHz ( $2,5 \text{ W.cm}^{-2}$ ) e depois cultivadas, apresentaram diminuição do volume celular (35%). Os pesquisadores encontraram que a irradiação induz lento desenvolvimento, embora não altere a sua reprodução. Isto sugere que os receptores para o crescimento celular foram afetados pela irradiação. Os mesmos autores descreveram que após sonicação de células de *Saccharomyces cerevisiae* a 20KHz/seg ( $10 \text{ W.cm}^{-2}$ ) estas romperam-se. Os autores encontraram dois grupos de células com diferentes graus de susceptibilidade à desintegração. Um grupo correspondia a células muito resistentes à ruptura sônica (32% a 42% das células totais) e outro grupo mais suscetível à ruptura (58 a 68%). Por meio de análises químicas os autores descobriram que a o citosol influencia na suscetibilidade da parede celular, e que a manose é liberada ao meio, a partir da manoproteína, durante a sonicação. Os autores descreveram modificações ao nível de membrana citoplasmática ativando as enzimas responsáveis pelo transporte ao serem irradiadas por US.

Assim podem ocorrer muitas respostas quando ondas ultrasônicas são aplicadas aos sistemas biológicos e diante da perspectiva de aplicação de ultrassom pretendeu-se utilizar esta metodologia sobre suspensão de esporos de *Aspergillus niger*, um contaminante constante de frutas.

A partir de uma cultura estoque retirou-se esporos de *Aspergillus niger*, inoculando-os em tubos de cultura contendo meio de malte 2 % . Os tubos foram incubados em estufa de 28°C por 48 horas. Durante este período o fungo cresce e ocorre a esporulação. Aos tubos contendo as culturas de *A. niger* esporuladas, acrescentou-se cerca de 5 mL de solução de Tween 80 a 0,1%. Os tubos a seguir foram agitados até o desprendimento dos esporos. Estes foram transferidos para um erlenmeyer. A seguir repetiu-se a operação. As suspensões de esporos reunidas tiveram o volume ajustado com Tween a 0,01% até o volume de 100 mL. Desta suspensão retirou-se uma alíquota para contagem em Câmara de Neubauer. Esta contagem é referenciada como número real de esporos.

A irradiação de US com o equipamento gerador de ultrassom, o desruptor de células Tornton/Unique, sobre a suspensão foi padronizada nos tempos de 3 a 40 minutos, variando nos experimentos. Para cada tempo de irradiação foram retiradas alíquotas de 1 mL com as quais efetuou-se diluições decimais seguida de plaqueamentos em meio para fungos com rosa bengala, um modulador do crescimento e esporulação no meio de cultura . Após incubação de 48 horas a 28°C foram contadas as colônias geradas pelos esporos viáveis. Os resultados foram expressos em Unidades Formadora de Colônias/ mL (UFC/mL).

Durante a execução dos experimentos observou-se que os esporos de *A. niger* têm forte aderência entre si e apresentam baixa viabilidade quando comparada com o número contado em Câmara de Neubauer (T0). Apesar dos esporos estarem suspensos em solução de Tween 80, que exerce o papel de baixador de tensão superficial e propicia a dispersão, após as irradiações iniciais o número dos esporos viáveis aumenta em relação aos iniciais. Este aumento do número de esporos após maior exposição ao ultrassom demonstra que os esporos estão fortemente agregados, e a irradiação ultra-sônica promove sua desagregação.

Pode-se observar diferenças entre os experimentos, em que há diminuição do número de esporos em alguns experimentos e em outros não. Isto talvez seja em razão de graus de resistência. Este nível de resistência pode ser devido ao tempo de maturação. Quando são elaborados experimentos visando a suspensão dos esporos, eventualmente a esporulação ocorre com mais abundância e em menor tempo que em outros experimentos. Assim, supõem-se que existem esporos que possuem graus de resistência maiores, neste caso é natural que necessitem serem irradiados por tempos maiores para que haja uma real diminuição da viabilidade. Mas, em geral, os resultados da aplicação progressiva do ultrassom, apontam para declínio na viabilidade dos esporos após a irradiação embora os esporos apresentem certa resistência a invibialização.

Generalizando-se pode-se considerar que houve diminuição no número de esporos, considerando-se o maior número obtido na contagem de UFC/mL, e o número final de esporos (último tempo de irradiação) (Tabela 1), excetuando-se os experimentos 2, 4, 8, 13 e 17, em que o último tempo de irradiação apresenta o maior número de esporos contados.

Tabela 1. Porcentagem de viabilidade de esporos considerando-se os experimentos 1 a 19 (o maior número obtido na contagem de UFC, e o número final de esporos - último tempo de irradiação) contados como Unidades Formadoras de Colônias/mL.

| Número do Experimento | % viabilidade dos esporos |              |                 |
|-----------------------|---------------------------|--------------|-----------------|
|                       | Tempo de irradiação       | % de aumento | % de diminuição |
| 1                     | 12                        | -            | 55,38           |
| 2                     | 09                        | 46,54        | -               |
| 3                     | 15                        | -            | 46,65           |
| 4                     | 15                        | 38,53        | -               |
| 5                     | 15                        | -            | 64,86           |
| 6                     | 25                        | -            | 25,26           |
| 7                     | 25                        | -            | 14,73           |
| 8                     | 25                        | 27,41        | -               |
| 9                     | 25                        | -            | 38,44           |
| 10                    | 25                        | -            | 14,14           |
| 11                    | 30                        | -            | 27,12           |
| 12                    | 30                        | -            | 44,44           |
| 13                    | 30                        | 20,00        | -               |
| 14                    | 30                        | -            | 9,86            |
| 15                    | 40                        | -            | 20,00           |
| 16                    | 40                        | -            | 10,00           |
| 17                    | 40                        | 21,57        | -               |
| 18                    | 40                        | -            | 33,33           |
| 19                    | 40                        | -            | 6,25            |

Como o US mostrou-se capaz de desagregar os esporos, pode ser que mesmo nos experimentos que não apresentaram diminuição da viabilidade, poderia ocorrer uma diminuição no número de esporos, se o ultrassom fosse aplicado por mais tempo.

As alterações constatadas detectaram, portanto, que a irradiação ultrasônica promove a desagregação de células, propiciando suspensões cada vez mais homogêneas permitindo melhor quantificação.

Assim, a partir destes dados pode-se inferir que o equipamento Tornton/Unique tem potencial baixo para inativar esporos de *A. niger* após irradiação dependendo do nível de resistência dos esporos. Pelos dados obtidos verificou-se que os esporos têm diferentes graus de resistência ao ultrassom e que maiores tempos de exposição à sonicação resultam em maior inviabilidade dos esporos.

Referências:

BUCALON, J. A.; PALMA, M. S. Ultrasound source of modification of physiochemical parameters in cell suspension. **Ultrasonic International Conference**, p. 1214 –1217, 1989.

DOMINGOS, R. N. **Contribuições e usos do ultrassom de alta e média intensidade no preparo de catalizadores e produção ativada de etanol**. 1998. 129f. Tese (Livre Docência em Termodinâmica) - Instituto de Geociências e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 1998.

SINISTERRA, J. V. Application of ultrasound to biotechnology: an overview, **Ultrasonics**, Oxford, n.3, v. 30, p.180-185, 1992.

Bolsa CNPq/PIBIC