

EFEITO DA IRRADIAÇÃO ULTRASÔNICA EM MICROALGAS

Selenastrum capricornutum* E *Chlorella sorokiniana

Cecília Shizue Oki

Dissertação apresentada ao Instituto de
Biotecnologia do Campus de Rio Claro,
Universidade Estadual Paulista, como
parte dos requisitos para obtenção do
título de Mestre em Ciências Biológicas
(Área de Microbiologia Aplicada)

RIO CLARO

Estado de São Paulo – Brasil

Maio de 2003

EFEITO DA IRRADIAÇÃO ULTRASÔNICA EM MICROALGAS

Selenastrum capricornutum* E *Chlorella sorokiniana

Cecília Shizue Oki

Orientador: Prof. Dr. Antonio Carlos Simões Pião

Co-orientadora: Profa. Dra. Dejanira de F. de Angelis

Co-orientador: Prof. Dr. Roberto Naves Domingos

RIO CLARO

Estado de São Paulo – Brasil

Maior de 2003

589.3 Oki, Cecília Shizue
O41 e Efeito da irradiação ultra-sônica em microalgas
Selenastrum capricornutum e Chlorella sorokiniana / Cecília
Shizue Oki. – Rio Claro : [s.n.], 2003
58 f. : il., gráfs., tabs.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista,
Instituto de Biociências de Rio Claro
Orientador: Antonio Carlos Simões Pião
Co-orientador: Roberto Naves Domingos
Co-orientador: Dejanira de Franceschi de Angelis

1. Microalgas. 2. Florações. 3. Controle. 4. Cavitação. 5.
ultra-som. I. Título

Ficha Catalográfica elaborada pela STATI – Biblioteca da UNESP
Campus de Rio Claro/SP

“De todos os homens que conheço o mais sensato é o meu alfaiate. Cada vez que vou a ele toma novamente as minhas medidas. Quanto aos outros, tomam a medida apenas uma vez e pensam que seu julgamento é sempre do meu tamanho.”
(George Bernard Shan)

AGRADECIMENTOS

À Profa. Dra. Dejanira de Franceschi de Angelis pela orientação, compreensão e amizade.

Ao Prof. Dr. Antonio Carlos Simões Pião pela oportunidade.

Ao Prof. Dr. Roberto Naves Domingos, pela co-orientação neste trabalho, apoio com o ultra-som e amizade

Ao Prof. Dr. Dario Antonio Donatti do Departamento de Física – Instituto de Geociências pela assistência com o ultra-som.

Aos técnicos Inês, Maria Luiza, Luis, Beto, Fátima, Carmem, Ronaldo e secretária Ângela , “Nega” e “Zito” pela colaboração e boa vontade.

À Isabel Cristina pelos biscoitos, chá e palavras amigas nos intervalos.

À Heloisa pelos papéis assinados e boa vontade em servir.

À todos os funcionários da biblioteca pelo serviço prestado com simpatia e pela amizade.

Aos meus pais pela oportunidade e incentivo para a realização deste trabalho e principalmente a possibilidade de me fazer enxergar a importância de ter conhecimentos sejam acadêmicos ou culturais para uma formação consciente e madura da vida.

À minha vó, tios e primos que mesmo a grande distância torcem para mim.

As brincadeiras, papos, filmes e discussões com Sérgio, Marcelo, Carlos, Naira, Soraia e Milena.

Ao meu “amor” Jairo pelas alegrias e suspiros em minha vida.

Aos novos amigos que fiz durante este trajeto: Kleiber, Fabiana, Arthur, Eduardo, poetas e artistas Sandra Bretas, Thiago, Ernani, Seichi, Sandra, Rosely, Andressa e todos aqueles que direta ou indiretamente ajudaram a fortalecer meu caráter e crescimento pessoal.

A CAPES pela bolsa concedida.

SUMÁRIO

	Página
1. INTRODUÇÃO.....	01
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	03
2.1. Definição de microalgas.....	03
2.2. Classificação.....	04
2.3. Ecologia das algas.....	04
2.4. Morfologia das algas verdes.....	05
2.4.1. Parede celular das algas verdes.....	06
2.5. Metabolismo fisiológico das algas verdes.....	07
2.6. Biologia de <i>Selenastrum capricornutum</i>	07
2.7. Biologia da <i>Chlorella sorokiniana</i>	08
2.8. Aspectos econômicos.....	09
2.9. Controle de algas.....	10
2.10. Remoção de compostos inorgânicos.....	10
2.11. Som e onda sonora.....	11
2.12. Aplicações do ultra-som.....	12
2.13. Efeitos biológicos do ultra-som.....	13
2.14. Pesquisas realizadas com aplicação do ultra-som em microrganismos.....	14
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	17
3.1. Material.....	17
3.1.1. Microalgas.....	17
3.1.2. Meio de manutenção de microalgas.....	18
3.1.3. Outros materiais.....	19
3.2. Métodos.....	19
3.2.1. Método de preparo do meio.....	19
3.2.2. Método de manutenção.....	20
3.2.3. Método de cultivo do inoculo.....	20
3.2.4. Método de avaliação de crescimento.....	21
3.2.5. Utilização do ultra-som.....	21
3.2.6. Análise dos resultados com ultra-som.....	24
3.2.7. Avaliação estatística.....	25
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	26
4.1. Escolha de <i>Selenastrum capricornutum</i> e <i>Chlorella sorokiniana</i>	26
4.2. Resultados da aplicação do ultra-som em <i>Selenastrum capricornutum</i> em diferentes tempos.....	28
4.2.1. Aplicação do ultra-som sobre <i>Selenastrum capricornutum</i> variando-se a amplitude.....	31
4.2.2. Aplicação do ultra-som sobre <i>Selenastrum capricornutum</i> variando-se o pH do meio.....	32
4.3. Resultados da aplicação do ultra-som em <i>Chlorella sorokiniana</i> em diferentes tempos.....	34
4.3.1. Aplicação do ultra-som sobre <i>Chlorella sorokiniana</i> variando-se o diâmetro da sonda.....	36

4.3.2. Aplicação do ultra-som sobre <i>Chlorella sorokiniana</i> variando-se o pH do meio.....	38
5. CONCLUSÕES.....	41
6. Propostas de continuidade de pesquisa.....	42
7. RESUMO.....	43
8. ABSTRACT.....	44
8. REFERÊNCIAS.....	45

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1 - Esquema representando cavitação, crescimento e colapso de bolhas provocado por ondas ultra-sônicas (NEIS, 2002).....	13
Figura 2 - Gerador de ondas ultra-sônicas: a-Processador de alta intensidade, b-Guia de onda e c-Capela de proteção acústica...	22
Figura 3 - Células de <i>Selenastrum capricornutum</i> observadas no microscópio óptico em Câmara de Neubauer, aumento 400x...	26
Figura 4 - Células de <i>Chlorella sorokiniana</i> observadas no microscópio óptico em Câmara de Neubauer, aumento 400x.....	26
Figura 5 - Representação gráfica da diminuição do número de células de <i>Selenastrum capricornutum</i> após irradiação ultra-sônica de 20 KHz, sonda de 9 mm de diâmetro e amplitude 80% nos tempos: 0; 1; 2; 3; 4; 5; 6; 7; 8; 9 e 10 minutos no experimento 1 com duas repetições	28
Figura 6 - Representação gráfica da diminuição do número de células de <i>Selenastrum capricornutum</i> após irradiação ultra-sônica de 20 KHz, sonda de 9 mm de diâmetro e amplitude 80% nos tempos 0; 2; 4; 6; 8 e 10 minutos no experimento 2 com duas repetições.....	29
Figura 7 - Representação gráfica da diminuição do número de células de <i>Selenastrum capricornutum</i> em meio com pH 5,6 após irradiação ultra-sônica de 20 KHz, sonda de 9 mm de diâmetro e amplitude 80% nos tempos: 0; 5; 10; e 15 minutos no experimento 3 com duas repetições.....	32
Figura 8 - Representação gráfica comparativa do número de células de <i>Selenastrum capricornutum</i> após irradiação ultra-sônica de 20 KHz, sonda de 9 mm de diâmetro e amplitude 80% em meio com pH 5,6 e 7 nos tempos: 0; 5; 10 e 15 minutos.....	33
Figura 9 - Representação gráfica do número de células de <i>Chlorella sorokiniana</i> após irradiação ultra-sônica de 20 KHz, sonda de 9 mm de diâmetro e amplitude 80% nos tempos: 0; 2; 4; 6; 8 e 10 minutos no experimento 1 com duas repetições.....	34

Figura 10 - Representação gráfica do número de células de <i>Chlorella sorokiniana</i> após irradiação ultra-sônica de 20 KHz, com sondas de 9 e 30 mm de diâmetro e amplitude 80% nos tempos: 0; 0,5; 5 e 10 minutos nos experimentos 2 e 3	36
Figura 11 - Representação gráfica do número de células de <i>Chlorella sorokiniana</i> após irradiação ultra-sônica de 20 KHz, sonda de 9 mm de diâmetro e amplitude 80% nos tempos: 0; 5; 10 e 15 minutos no experimento 2 com duas repetições	37
Figura 12 - Representação gráfica comparativa do número de células de <i>Chlorella sorokiniana</i> após irradiação ultra-sônica de 20 KHz, sonda de 9 mm de diâmetro; amplitude 80% em meio com pH 5,6 e 7 nos tempos: 0; 5; 10 e 15 minutos.....	38

LISTA DE TABELAS

Página

Tabela 1	Protocolo experimental da aplicação do ultra-som em cultura de <i>Selenastrum capricornutum</i> em frequência 20 KHz, sonda de 9mm de diâmetro variando-se a amplitude.....	23
Tabela 2	Protocolo experimental da aplicação do ultra-som em cultura de <i>Chlorella sorokiniana</i> em frequência 20 KHz, sonda de 9mm de diâmetro variando-se o diâmetro da sonda.....	23
Tabela 3	Protocolo experimental da aplicação do ultra-som em cultura de <i>Selenastrum capricornutum</i> e <i>Chlorella sorokiniana</i> em frequência 20 KHz, sonda de 9mm de diâmetro e amplitude de 80% modificando o pH do meio de cultura.....	24
Tabela 4 -	Quantificação microscópica em Câmara de Neubauer do número de células de <i>Selenastrum capricornutum</i> após irradiação ultra-sônica de frequência 20 KHz, sonda de 9 mm de diâmetro e amplitude 80% nos tempos 0; 1; 2; 3; 4; 5; 6; 7; 8; 9 e 10 minutos no experimento 1 com duas repetições.....	27
Tabela 5 -	Quantificação microscópica em Câmara de Neubauer do número de células de <i>Selenastrum capricornutum</i> após irradiação ultra-sônica de frequência 20 KHz, sonda de 9 mm de diâmetro e amplitude 80% nos tempos 0; 2; 4; 6; 8 e 10 minutos no experimento 2 com duas repetições.....	28
Tabela 6 -	Quantificação microscópica em Câmara de Neubauer do número de células de <i>Selenastrum capricornutum</i> após irradiação ultra-sônica de frequência 20 KHz, sonda de 9 mm de diâmetro e amplitude 80% nos tempos 0; 0,5; 1; 10; 12; 15 minutos no experimento 3 com uma repetição.....	29
Tabela 7 -	Quantificação microscópica em Câmara de Neubauer do número de células de <i>Selenastrum capricornutum</i> após irradiação ultra-sônica de frequência 20 KHz, sonda de 9 mm de diâmetro e amplitude 40 e 80% nos tempos 0; 1 e 2 minutos no experimento 4 e 5 com uma repetição cada.....	31

Tabela 8 - Quantificação microscópica em Câmara de Neubauer do número de células de <i>Chlorella sorokiniana</i> e porcentagem de destruição após irradiação ultra-sônica de frequência 20 KHz, sonda de 9 mm de diâmetro e amplitude 40 e 80% nos tempos 0; 4; 6; 8 e 10 minutos no experimento 1 com duas repetições.....	34
Tabela 9 - Quantificação microscópica em Câmara de Neubauer do número de células de <i>Chlorella sorokiniana</i> após irradiação ultra-sônica de frequência 20 KHz, sondas de 9 e 30 mm de diâmetro e amplitude 80% nos tempos 0; 0,5; 5 e 10 minutos nos experimentos 2 e 3 com uma repetição cada.....	36

1 - INTRODUÇÃO

A aplicabilidade de ondas ultra-sônicas é encontrada em diversos campos: na medicina em diagnóstico e terapia, em indústrias na área de soldagem, corte de material, atomização, limpeza de jóias, descontaminação de instrumentos médicos e equipamentos alimentícios, dispersão de pigmentos e preservação do meio líquido entre outros (MASON, 2000). Recentemente a utilização do ultra-som se estende também no tratamento de água para abastecimento humano juntamente com os processos tradicionais (NEIS, 2000).

Existem pesquisas sobre a eficiência da sonicação no controle, extração ou ativação de substâncias em bactérias e fungos, mas ainda não foram encontradas em microalgas, que assim como outros microrganismos são indesejáveis na água para consumo humano. As microalgas podem proliferar rapidamente formando as “florações” causadoras de gosto e odor repelentes em águas de abastecimento ou ainda podem proteger bactérias, inclusive patogênicas, que são por elas veiculadas, por exemplo, algas que possuem mucilagem como *Chlorella*, *Closterium*, *Cosmarium* e certas espécies de *Gomphosphaeria*. Além disso, algumas microalgas encontradas em ambientes eutróficos produzem toxinas, podendo provocar a morte de organismos que as consumirem.

No tratamento convencional o filtro não chega a remover 90% das algas presentes na água, desse modo microrganismos passam pelo tratamento acumulando-se no fundo de reservatórios de distribuição, no interior das canalizações ou nos reservatórios domiciliares (BRANCO, 1986).

No combate as florações de microalgas encontram-se diferentes respostas para cada espécie, algumas são sensíveis outras resistentes a determinado tipo de algicida, desta forma a *Chlorella* apesar de ser sensível ao sulfato de cobre, é resistente ao cloro e a outros algicidas. Considerando que o acréscimo destas substâncias passa a ser também contaminantes (no caso da cloração há formação de compostos cancerígenos, os trihalometanos) busca-se alternativas eficientes e menos poluidoras no tratamento da água.

A escolha das algas verdes *Selenastrum capricornutum* e *Chlorella sorokiniana* justifica-se pela facilidade do manuseio em laboratório como o seu cultivo e também por já estarem anteriormente no local onde foi realizado o projeto sendo utilizados em outros trabalhos.

O objetivo deste trabalho foi verificar os efeitos da irradiação ultra-sônica em microalgas para que posteriormente possa servir de referência em trabalhos de controle das florações ou na extração de substâncias de interesse das células.

2 - REVISÃO DA LITERATURA

2.1 – Definição de microalgas

Considerando a divisão de Woese, 1978, citado por Raven, Evert e Eichhorn (2002), no qual os seres vivos são divididos em 3 domínios, as microalgas e demais algas pertencem ao domínio Eucarya que inclui todos organismos eucariontes, principal característica que distancia das bactérias, seres procariontes.

Segundo Raven, Evert e Eichhorn (2002) encontram-se microalgas solitárias, coloniais ou filamentosas. Podem ter flagelo ou não, alguns grupos o flagelo aparece somente em células reprodutivas.

Em observação ao microscópico óptico as microalgas são maiores que as bactérias e geralmente encontradas na cor verde devido presença do pigmento clorofila ao contrário das bactérias vistas em tons amarelado, vermelho e branco. Contudo, nem todas microalgas são fotossintéticas, algumas realizam fagocitose e/ou absorção ou os três tipos de nutrição, assim como existem bactérias realizadoras de fotossíntese que possuem bacterioclorofila.

Diferencia-se dos fungos pela ausência de clorofila e fotossíntese neste grupo e das briófitas por estas possuírem envoltório de células estéreis nos órgãos de reprodução*.

* Explicação fornecida por Bicudo no XIV Congresso da Sociedade Botânica de São Paulo, 2 a 5 set. 2002

2.2 – Classificação

Grahan e Wilcox (2000) consideram a existência de 11 filos segundo a classificação de Hoek, *et al* (1995), baseando-se na evidência molecular: Cyanophyta e Prochlorophyta, procariontes autotróficos, e 9 filos eucariontes.

Segundo Raven, Evert e Eichhorn (2002), o Reino Protista divide-se em Protistas heterotróficos e Protistas fotossintetizantes (“algas”), que por sua vez inclui os Filos: Euglenophyta (euglenóides), Cryptophyta (criptomônodos), Rhodophyta (algas vermelhas), Dinophyta (dinoflagelados), Haptophyta (haptofias), Bacillariophyta (diatomáceas), Chrysophyta (crisofitas), Phaeophyta (algas pardas) e Chlorophyta (algas verdes). Os critérios considerados para esta divisão foram: o tipo de pigmento (clorofilas, carotenóides e ficobilinas), produtos armazenados (amido, óleo, proteínas, etc), o componente da parede celular e ausência, número e caracterização do flagelo.

Lee (1980) descreve os gêneros *Selenastrum* e *Chlorella* pertencentes a ordem *Chlorococcales* indicando que produzem células filhas com o mesmo formato das células parentais (autósporos). Nesta ordem as algas são de água doce encontradas em lagos eutrofizados com alta quantidade de nitrato e fosfato e formam a maioria das células do fitoplâncton.

2.3 – Ecologia das algas

“O fitoplâncton é constituído pelas algas planctônicas e cianobactérias que são o início da cadeia alimentar para organismos heterotróficos que vivem nos oceanos e nos corpos de água doce” (RAVEN; EVERT; EICHHORN, 2002).

Segundo Pickett-Heaps (1975) as algas constituem fonte primária de alimento no mar no qual dependem outras vidas marinhas e estima-se que o fitoplâncton fixa aproximadamente 10^{10} toneladas de carbono por ano, mais que o fixado pelas plantas terrestres.

Microrganismos catalisam numerosos processos químicos na água, e de acordo com Manahan (1994) as algas podem aumentar consideravelmente o pH pela produção de CaCO_3 .

Gee (1991) cita que em águas de litorais tropicais pobres em nutrientes encontram-se muitos invertebrados que abrigam simbioses fotossintéticas. As simbioses de algas verdes são muitas vezes denominadas de “zooclorela”. Em água doce a maioria das algas associadas e interagindo com invertebrados envolvem o gênero *Chlorella*. Os hospedeiros mais conhecidos destas algas são as hidras, mas também são encontrados em esponjas, platelmintos, moluscos bivalves e protozoários.

De acordo com Tortora, Funke e Case (2000), associação bem conhecida de alga com outro microrganismo é aquela formadora dos líquens, no qual o fungo obtém carboidratos da alga e fornece nutriente mineral que absorve do ar ou da chuva e ambiente físico adequado para a mesma. A capacidade dos líquens em cessar a fotossíntese por determinado período, “vida suspensa”, permite que sobrevivam em ambientes inóspitos. Desgastam rochas formando solo, servem de alimento a vertebrados e invertebrados e armazenam produtos tóxicos podendo ser utilizados como indicadores de poluição.

De acordo com Importância das ... (2003), o manguezal abriga em média cerca de 200 mil microalgas em cada centímetro quadrado de raiz de mangue e segundo estudo da Universidade Rural de Pernambuco (UFRPE) a abundância dessas algas é a principal razão para alta produtividade desse ecossistema.

2.4 - Morfologia das algas verdes

Mauseth (1988) descreve as células das clorofíceas ou algas verdes como células semelhantes à de outros vegetais acreditando serem precursoras destas últimas. Possuem os componentes: parede celular composta de celulose, hemicelulose, proteínas e substâncias pécticas; membranas que envolvem o protoplasma e a maioria das organelas, semipermeável a determinados íons e moléculas e portadoras de enzimas importantes para o metabolismo; mitocôndrias responsáveis pela respiração aeróbia; núcleo onde se aloja a informação genética;

vacúolo responsável pela absorção de água para dentro da célula; plastídeos que se diferenciam em cloroplastos que participam da fotossíntese e amiloplastos reservando amido.

As clorofíceas, segundo Raven, Evert e Eichhorn (2002), assemelham-se às plantas por possuírem clorofila *a* e *b* e armazenarem amido dentro dos plastídeos. Algumas algas verdes possuem parede celular rígida, composta de celulose, hemicelulose e substâncias péticas. A estrutura microscópica da célula reprodutora flagelada é semelhante ao anterozóide das plantas. Outras características como a produção de fitocromo em dois gêneros de algas verdes, indica a relação estreita entre estes dois grupos, por estes motivos estas microalgas são consideradas precursoras das plantas.

2.4.1 – Parede celular de algas verdes

Voet, Voet e Pratt (2002) descrevem a estrutura da parede celular constituída por celulose altamente coesiva, a fibra de celulose ligada por pontes de hidrogênio confere força excepcional, tomando-as insolúveis em água, apesar de sua hidrofilicidade. Quando essas fibras estão embebidas em uma matriz contendo outros polissacarídeos e lignina pode suportar grandes pressões, pois a matriz distribui a pressão igualmente entre os elementos que reforçam a celulose.

As algas verdes têm parede de celulose que lhes confere razoável resistência. Angelis (2001)* verificou que estas algas são digeridas diferentemente quando empregadas para alimentar *Daphnia similis*. Este microcrustáceo quando se alimenta de *S. capricornutum* consegue digerir o alimento. Por outro lado, quando as *Daphnias* são alimentadas com *Chl. sorokiniana* seu trato gástrico fica totalmente congestionado e intumescido indicando sua indigestibilidade. Microscopicamente as células de *Chorella* ingeridas não se rompem de tal forma que podem ser visíveis, pois as estruturas das *Daphnia* são transparentes se examinadas ao microscópio. Além disso, a criação de *Daphnia* não tem sucesso se forem alimentadas continuamente com *Chl. sorokiniana*.

* dados não publicados IB- UNESP, RC

2.5 – Metabolismo fisiológico das algas verdes

Segundo Moore (1976), a fotossíntese é altamente eficiente: a reação $\text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O} \rightarrow (\text{CH}_2\text{O}) + \text{O}_2$ é endotérmica com cerca de 4,8 eV (aproximadamente 4 vezes mais que um quantum de luz vermelha, 680 nm), com rendimento de 8 quanta por unidade de reação.

De acordo com Pinto-Coelho (2002), várias algas tais como diatomáceas (Chrysophyta), algas verdes (Chlorophyta), algas marrons (Chryptophyta), euglenas (Euglenophyta), podem realizar fotossíntese. Mais da metade da produção anual global de carbono da biosfera terrestre deve-se a tais microrganismos fotossintetizantes.

A teoria da endossimbiose na qual descreve a evolução de células eucarióticas (captura pelos organismos procarióticos de pequenas células que se tornariam organelas) não é recente conforme Hoek van den *et al* (1997), data de 1195 e autoria de Mereschkowsky, é ainda hoje considerada. As algas eucarióticas originariam de seres procarióticos.

2.6 – Biologia da *Selenastrum capricornutum*

Reinsch, 1867 citado por Bicudo e Bicudo (1994) afirma que o gênero *Selenastrum* caracteriza-se por apresentar células em forma de meia lua em grupos de quatro, agregadas pela sua margem convexa, constituindo freqüentemente colônias múltiplas. São conhecidas atualmente cerca de 6 a 8 espécies distribuídas pelo mundo.

Segundo Joly (1963) a célula de *S. capricornutum* contém um único cloroplasto que ocupa todo o citoplasma. A reprodução assexuada se faz pela formação de 4, 8 ou 16 autósporos em cada célula. Estes permanecem mais ou menos reunidos após a libertação, constituindo posteriormente as colônias. A *Selenastrum capricornutum* é encontrada freqüentemente no plâncton de lagoas e represas, especialmente se a coleta é feita em ambiente de plantas aquáticas próximas da superfície.

De acordo com Alexopoulos e Bold (1967), as algas do gênero *Selenastrum* que pertencem ao grupo das Clorófitas ou algas verdes, são caracterizadas pela presença das

clorofilas *a* e *b*, são armazenadoras de amido e óleos formando colônias ou vivem isoladas. Reprodução pode ser sexuada ou assexuada.

Branco (1971) cita que a microalga *Selenastrum* é bastante semelhante a *Kirchneriella*, mas a colônia desta última não possui matriz gelatinosa e as células são em geral mais finas e menos curvas. As *Selenastrum* são algas de superfície, típicas de lagoas pequenas e de águas paradas.

2.7 - Biologia da *Chlorella sorokiniana*

Segundo Bicudo e Bicudo (1994) a *Chlorella sorokiniana* são células solitárias, geralmente esféricas ou elípticas possuindo apenas um cloroplasto, raramente 2. O plasto tem a forma de uma banda com os bordos lisos, preenchendo a maior parte da célula. Ausência de pirenóide. Reproduzem-se por meio de autósporos. O gênero descrito por Beijerinck, 1890, inclui cerca de 30 espécies.

Pickett-Heaps (1975), descreve como células muito pequenas e de estrutura bastante simples, contendo cloroplasto em forma de xícara e um diminuto núcleo. O Golgi é bastante notável e cada célula pode conter uma única mitocôndria altamente desenvolvida. Nunca se observou produção de células móveis (zoósporos) durante a reprodução vegetativa. Ao invés disso as células filhas são réplicas pequenas das células parentais móveis. As algas Chlorococcales apresentam reprodução vegetativa como sendo resultado da divisão celular formando pequenos números de autósporos (entre 2 e 16). Por apresentar núcleo pequeno e rápida divisão celular o estágio mitose é de difícil visualização.

Branco (1971) observa que a colônia de *Chlorella* diferencia-se das células de *Chlorococcum* por serem todas do mesmo tamanho com forma esférica, não comprimida. As células *Chlorella* confundem-se também com *Golenkinia* e *Microctinium*, estas, entretanto possuem espinhos geralmente visíveis ao microscópio. Assemelham-se ainda a *Chlamydomonas* e *Carteria* quando não se vê os flagelos ou movimentos destes. Diferem do gênero *Phytoconis* pelo fato deste reproduzir-se por simples divisão celular.

2.8 – Aspectos econômicos

Round (1973) cita que entre os principais produtos comercializados derivados de algas estão: o ágar utilizado como meio de cultura de microrganismos e outros processos industriais e a carragenina que em presença de potássio gelifica-se ambos utilizados nas indústrias: alimentícia, têxtil, farmacêutica, de couro e de cerveja.

Branco (1971) descreve que as algas constituem um dos mais importantes fatores que causam sabor e odor nas águas de abastecimento. Este fenômeno é causado pelos ácidos graxos presentes nas células. “a medida que a célula envelhece aumenta sua quantidade de lipídios e diminui quantidade de compostos nitrogenados, assim as algas mais velhas tendem a apresentar sabor e odor mais pronunciados”.

Clesceri, Greenberg e Eaton (1998) realizam os bioensaios utilizando entre outros organismos, a *Selenastrum capricornutum* como bioindicador ou servindo de alimento para o microcrustáceo *Daphnia* que também é utilizado como a mesma finalidade que o primeiro. Estes ensaios são realizados em 3 fases: a) seleção e medição de fatores apropriados ou condições durante o ensaio (ex. biomassa, medida ou cálculo do peso); b) apresentação e análise estatística das medidas e c) interpretação dos resultados. A interpretação dos resultados envolve avaliação da água tendo como referência a resposta do bioindicador, ou seja, o seu desenvolvimento e sobrevivência no meio em questão. As espécies utilizadas nos bioensaios são selecionadas de modo a permitir padronizar o teste sob condições padrões de laboratório.

Capone e Bauer (1992), descrevem que os acréscimos de compostos inorgânicos geralmente não são diretamente tóxicos para a biota nativa, entretanto pode promover crescimento excessivo de algas. Simultaneamente, tal crescimento é um estímulo para bactérias heterotróficas que podem contribuir para desenvolvimento de hipoxia ou anoxia, resultado das florações de algas próximas as praias.

Os problemas causados pela eutrofização, segundo Perry e Vanderklein (1996), afetam cinco categorias: água para consumo humano, recreação, pesca e reservatórios, e redução da diversidade biológica.

Gomez (1988) cita que grupos de investigadores do Instituto de Ecologia Litorais de Campello identificaram 30 espécies de microalgas marinhas capazes de produzir toxinas que

podem provocar a morte de indivíduos consumidores de moluscos que delas se alimentaram , é o caso do dinoflagelado *Alexandrium catenella*. Os mecanismos que produzem as florações de algas estão relacionados à persistência de altas temperaturas, pouco movimento de águas e excesso de nutrientes conseqüente da depuração deficiente de águas residuárias.

2.9 – Controle de algas

“Segundo a CETESB, o controle da água destinada ao abastecimento é feito colocando-se algicidas, como sulfato de cobre ou peróxido de hidrogênio, nas represas, mas a morte das algas acaba por liberar suas toxinas na água agravando o problema” (UMA AMEAÇA..., 2000).

De acordo com Branco (1986) os algicidas são aplicados antes que a quantidade de algas aumente, pois sua destruição em massa pode resultar no acúmulo de matéria orgânica em decomposição ocasionando sabor e odor desagradável. Uma parte do algicida é perdida por decantação outra parte retida em aparelhos de filtração (filtros de terra diatomácea).

Segundo o mesmo autor, o cloro também é empregado como algicida principalmente em espécies resistentes ao sulfato de cobre. A variação de resistência ao cloro se deve as diferentes permeabilidades das membranas celulares. A desvantagem deste processo é o custo elevado e a contaminação da água, pois se torna necessário utilizar altas concentrações de cloro para reduzir o gosto e o cheiro na água. Em doses menores formam compostos odoríferos clorofenólicos.

2.10 – Remoção de compostos inorgânicos

De acordo com Manahan (1994), um dos métodos para remoção de compostos inorgânicos em água é a destilação. Porém a energia requerida é muito alta tomando-se um processo economicamente inviável. Além disso, materiais voláteis como amônia e compostos

odoríferos não são removidos após a etapa da destilação. Processos utilizando-se membranas semipermeáveis são mais promissores para volumes menores na remoção de inorgânicos em água como, por exemplo, a eletrodialise e osmose reversa.

2.11 - Som e onda sonora

Garcia (1998) define ondas sonoras como sendo vibrações sincronizadas das moléculas que constituem o meio, que ao vibrarem em conjunto criam em torno da fonte sonora regiões de alta e baixa pressão. Segundo o mesmo autor é comum confundir o conceito de onda com o conceito de som, este se propaga nos ambientes materiais e elásticos através de ondas.

Ao contrário da luz, que é constituída por ondas que vibram perpendicularmente à direção de propagação do raio luminoso denominada de onda transversal, a onda sonora se propaga na mesma direção do som e por este motivo é classificada como onda longitudinal. A onda sonora é periódica, isto é, após intervalos de tempos iguais, a velocidade de cada uma das moléculas vibrantes é a mesma. De acordo com Okuno, Caldas e Chow (1982) Outras propriedades das ondas sonoras são:

- Amplitude (A) – refere-se ao maior deslocamento das moléculas do meio em relação ao ponto médio da vibração
- Período (T) – é a duração de um ciclo, ou seja, o movimento completo de ida e volta à mesma posição inicial
- Frequência (F) – número de ciclos em um determinado intervalo de tempo

Uma onda sonora é produzida por elemento vibrador que pode ser desde um cristal até uma corda vocal causando variações na densidade ou pressão do meio ao seu redor. O aparelho de audição do ser humano é sensível somente a sons com frequência entre 20 e 20 000 Hz. Ondas mecânicas longitudinais com frequência abaixo de 20 Hz são chamadas infra-som e acima de 20 000 Hz, ultra-som.

Santin (1997), define ondas ultra-sônicas como sendo ondas mecânicas que consistem na oscilação de partículas atômicas ou moleculares de uma substância em torno de sua propagação de equilíbrio. As ondas ultra-sônicas comportam-se da mesma forma que as ondas

sônicas audíveis. Elas propagam-se em meios elásticos, os quais podem ser sólidos, líquidos ou gasosos, mas nunca no vácuo.

Pécora e Guerisoli (1997), citam que as ondas ultra-sônicas são geradas por transdutores ultra-sônicos, dispositivos que convertem energia elétrica em energia mecânica e vice-versa. São feitos de materiais piezoelétricos que apresentam fenômeno chamado efeito piezoelétrico. Este fenômeno foi descoberto pelos irmãos Curie em 1880 e consiste na variação das dimensões físicas de certos materiais (quartzo, turmalina) sujeitos a campos elétricos.

2.12– Aplicações do ultra-som

Okuno, Caldas e Chow (1982) lembram que alguns animais como morcegos, golfinhos e mariposas, se locomovem, encontram alimento e fogem do perigo através da percepção de ondas ultra-sônicas. Muitas espécies de animais emitem as ondas ultra-sônicas. Das observações do comportamento desses animais surgiram a idéia do desenvolvimento de instrumentos como o sonar durante a Segunda Guerra Mundial para detectar objetos sob a água. Outras aplicações do ultra-som podem ser consideradas: ensaio não destrutivo de materiais, medida das propriedades elásticas de materiais, diagnóstico e terapia médica, atomização de líquidos, limpeza por cavitação, ruptura de células biológicas, soldas e homogeneização de materiais.

De acordo com Barbosa e Serra (1992) as ondas de alta intensidade que produzem alterações definitivas no meio são utilizadas em atomização de líquidos, limpezas por cavitação, esterilização de materiais cirúrgicos ou de meios biológicos, etc. Por outro lado, as ondas de baixa intensidade, cujo propósito é o de transmitir energia ao meio e obter informações deste, sem provocar alterações do mesmo, são aplicadas em ensaios não destrutivos de materiais, diagnose médica entre outros.

Neis (2000) cita que o ultra-som utilizado como metodologia para desintegração de detritos e degradação ou transformação de poluentes em águas residuárias poderá ter outras aplicações a serem propostas futuramente, especialmente em conjunto com outros métodos

semelhante a degradação de detritos por anaerobiose. A desintegração de detritos necessita de baixa frequência e alta intensidade do ultra-som.

2.13– Efeitos biológicos do ultra-som

De acordo com Okuno, Caldas e Chow (1982), dentre os efeitos que o ultra-som pode causar é o aumento da temperatura local quando atravessa um tecido. Outro efeito possível está associado à cavitação ou formação de bolhas no meio líquido contendo quantidades variáveis de gás ou vapor que podem alterar estrutural e/ou funcionalmente células biológicas.

Neis (2000) postula que apenas a cavitação exerce uma ação física nas substâncias do líquido e que condições extremas induz reações químicas (reações sonoquímicas) causadas pela formação de radicais H e OH e o colapso de substâncias (pirólise). Este fenômeno sonoquímico ocorre em frequência entre 100 KHz e 1000 KHz.

FIGURA 1 - Esquema representando cavitação, crescimento e colapso de bolhas provocado por ondas ultra-sônicas (NEIS, 2000).

Moat e Foster (1988), descrevem que frequência alta causa consideráveis variações na pressão em pouco intervalo de tempo, ocasionando crescimento de cavidades ou bolhas colapsando-se com mudança de pressão e rompendo a célula. O crescimento destas bolhas ocorre por coalescência e a microcorrenteza ocasionada pelas ondas ultra-sônicas é suficiente para provocar o rompimento da célula. Os organismos variam consideravelmente em sua suscetibilidade no rompimento por ultra-som. O tamanho, forma do organismo, a natureza estrutural da superfície da célula pode afetar a resposta.

Segundo Borges e Korn (2002) o colapso das bolhas transientes provoca a liberação de grande quantidade de energia, gerando temperaturas locais instantâneas muito elevadas (5200 K) e pressão da ordem de centenas de atmosferas.

2.14 – Pesquisas realizadas com aplicação do ultra-som em microrganismos

Limaye, Hawkes e Coakley (1996), comprovaram a remoção de organismos eucarióticos de suspensões celulares por meio do ultra-som que quantificado em sistema de batelada mostrou-se altamente eficiente, enquanto que a remoção de procariontes necessita ainda ser melhorada.

Fontana (1996), avaliou a ação do ultra-som com frequência 20 KHz na destruição de esporos e células vegetativas do *Bacillus subtilis* em suspensão. Ocorreu aumento na porcentagem de morte com aumento da duração da exposição à radiação (tempos 1, 2 e 3 minutos) tanto para esporos quanto para as células vegetativas. Verificou também aumento na ativação da germinação dos esporos em suspensão, quando comparado com o controle. O autor observou que os efeitos químicos produzidos pelo ultra-som, formação de radicais livres, não são a principal causa de morte ou inativação celular, podendo ser claramente separado dos efeitos provocados pelas ondas acústicas e pela cavitação.

Phull et al (1997), utilizaram o ultra-som em conjunto com cloro diminuindo significamente o número de bactérias presentes na amostra evidenciando que pode ser utilizado o ultra-som com eficácia na desinfecção da água. Além disso verificou-se que o aparelho em alta frequência foi mais eficiente que o de baixa frequência.

Guiro (1999), estudou a ação do ultra-som contínuo em cultura de *Escherichia coli* BH1000 e *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 nas intensidades de 0,5 e 0,8 W/cm², nas frequências de 1 a 3 MHz, nos tempos 0, 5 e 15 minutos. Os resultados sugerem que a ação do ultra-som em diferentes culturas de bactérias, associadas ou não a agentes antimicrobianos é dependente da frequência de oscilação, da intensidade e do tempo de aplicação.

Raso et al (1999) verificaram que o poder transferido do ultra-som no meio depende de muitas variáveis como a amplitude das ondas ultra-sônicas, pressão estática externa, temperatura e viscosidade do meio. O efeito da temperatura pode ser compensado pelo aumento da pressão e ambos crescem exponencialmente enquanto que a amplitude cresce linearmente. O ultra-som demonstra ser um instrumento útil na otimização e reprodução dessas variáveis na preservação de alimentos.

Villamiel e Jong (2000), descrevem que o tratamento com ultra-som em alta intensidade com corrente contínua tem sido aplicado para ativação de bactérias importantes na indústria de laticínios. Microrganismos *Pseudomonas fluoresceres* e *Streptococcus thermophilus* foram inativados por ondas ultra-sônicas e os resultados obtidos mostraram que o ultra-som pode ser uma técnica promissora no tratamento da descontaminação do leite.

Mason (2000) afirma que o processo sonoquímico é bem visto considerando os motivos como a rápida reação, melhor conversão e aperfeiçoamento de novos produtos. Há muitos sistemas ultra-sônicos disponíveis e usados em processos químicos industriais, mas poucos foram amplamente explorados. Atualmente existem vários grupos multidisciplinares envolvendo projetos sonoquímicos, que é sem dúvida um caminho de avanço.

Tomasin (2001) verificou a bioresistência e os efeitos da ação da corrente elétrica e radiação ultra-sônica não ionizante de baixa intensidade e média potência em suspensões celulares da levedura *Saccharomyces cerevisiae*, assim como a excreção de proteínas intra e extra celular liberada após os tratamentos com ultra-som e eletrólise. O ultra-som utilizado foi o de potência 600W de 20 KHz de intensidade e amplitude de 80% e os tempos de sonicação: 0; 4; 8; 12; 16 e 20 minutos. O tratamento mais eficiente entre o ultra-som, eletrólise e sonoeletrólise com relação à sobrevivência de *S. cerevisiae* foi o tratamento sonoeletrolítico, com diminuição de cerca de 86% na viabilidade celular após o tempo de 20 min.

Campanha (2001), aplicou ultra-som para o controle do crescimento de *Aspergillus flavus* em cosméticos obtendo eficiência do mesmo como biocida. Amostras de

cosméticos contaminadas com o fungo foram irradiadas nos tempos 12, 16 e 20 minutos com a mesma intensidade (600 Watts/cm^2) e temperatura constante de 25°C . Obteve-se diminuição significativa após 20 minutos de irradiação, mostrando que o ultra-som é eficiente na inibição do crescimento do microrganismo, possuindo efeito biocida e conseqüentemente atuando na preservação do cosmético.

Vargas (2001), avaliou os efeitos da sonicação na liberação de invertase pelo fungo *Aspergillus niger*, assim como os melhores parâmetros de irradiação (tempo, amplitude, etc). As culturas foram irradiadas por períodos de 2 a 10 min. Com ondas de amplitude 20 e 40 e processador ultra-sônico de 20KHz. Mesmo com o menor tempo de irradiação houve a liberação de invertase intracelular.

Hernandez (2002), aplicou o ultra-som em culturas de *Saccharomyces cerevisiae* e *S. cerevisiae* contaminada com *Lactobacillus fermentum* no estágio de floculação. Foi utilizado o ultra-som de frequência 20 KHz, potência nível 4 e guia de onda de 13 mm de diâmetro nos tempos: 0, 2, 4, 6 e 10 minutos com objetivo de verificar a viabilidade celular, cuja aplicabilidade seria evitar a contaminação das domas de fermentação nas indústrias alcooleiras. Verificou-se que o ultra-som contribui para manter as células em suspensão e que somente no tempo maior, 10 minutos, a viabilidade de *S. cerevisiae* diminuiu.

Bello (2003) elaborou um estudo da eficiência das ondas de ultra-som em relação ao hipoclorito de sódio à filtração/adsorção na eliminação de microrganismos em estação de tratamento de água. O experimento foi realizado em mini estação de tratamento de água (ETA-CB) analisando-se parâmetros físico-químicos. O resultado do ultra-som seguido da coagulação-floculação, decantação e filtração. Mostrou-se eficiente podendo substituir o processo tradicional de coagulação, pré-desinfecção com cloro, floculação, decantação e filtração, com a vantagem adicional de que com a utilização do ultra-som não há formação indesejável de compostos organoclorados.

3 - MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram realizados nos laboratórios do Departamento de Bioquímica e Microbiologia do Instituto de Biociências, campus de Rio Claro da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” e Departamento de Física do Instituto de Geociências e no Centro de Estudos Ambientais (CEA).

3.1 - Material

3.1.1 – Microalgas

Selenastrum capricornutum , origem: CETESB - Piracicaba

Chlorella sorokiniana , origem: lagoa de estabilização da Petrobrás, identificada no Instituto de Botânica, Secretaria do Meio Ambiente, pela Dra. Denise Bicudo.

3.1.2 – Meio de manutenção das microalgas

Meio peptona para cultivo de alga :

Agar.....	8,00 g
KNO ₃	0,10 g
KH ₂ PO ₄	0,01 g
MgSO ₄ .7H ₂ O.....	0,01 g
Peptona.....	0,50 g
Água destilada.....	500 mL

Meio L.C. Oligo para cultivo de alga

(L5.018.-CETESB, 1991 a)

Soluções:

Solução 1:

nitrito de cálcio – Ca(NO ₃) ₄ H ₂ O.....	4 g
água bidesionizada.....	100 mL

Solução 2:

nitrito de potássio – KNO ₃	10 g
água bidesionizada.....	100 mL

Solução 3:

sulfato de magnésio – MgSO ₄ .7H ₂ O.....	3 g
água bidesionizada.....	100 mL

Solução 4:

fosfato de potássio dibásico – K ₂ HPO ₄	4 g
água bidesionizada.....	100 mL

Solução 5:

sulfato de cobre (CuSO ₄ .5H ₂ O).....	30 mg
molibdato de amônia – (NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ .4H ₂ O.....	60 mg
sulfato de zinco – ZnSO ₄ .7H ₂ O.....	60 mg
cloreto de cobalto – CoCl ₂ .6H ₂ O.....	60 mg
nitrito de manganês – Mn(NO ₃) ₂ .4H ₂ O	60 mg
ácido cítrico – H ₃ C ₆ H ₅ O ₇ .H ₂ O	60 mg
ácido bórico (H ₃ BO ₃)	60 mg
água bidesionizada	100 mL

Solução 6:

citrato de ferro – $C_6H_5FeO_7 \cdot 5 H_2O$	1,625 g
sulfato de ferro – $FeSO_4 \cdot 7 H_2O$	0,625 g
cloreto de ferro – $FeCl_3 \cdot H_2O$	0,625 g
água bidesionizada.....	100 mL

Solução 7:

bicarbonato de sódio – $NaHCO_3$	15 g
água bidesionizada.....	100 mL

3.1.3 – Outros materiais

Vidraria de uso rotineiro no laboratório

Microscópio (CARL ZEISS – JENA)

Câmara de Neubauer (KNITTEL GLASER)

Autoclave (SOC. FABBE LTDA)

Contador de colônias (PHOENIX - EC.589)

Fotoincubadora (FANEM – MOD 347)

Gerador de ondas ultra-sônicas (SONICS & MATERIALS – VIBRA CELL): intensidade 20KHz, potência 600W, sondas de 9 e 30 mm de diâmetros e amplitudes 40 e 80%.

3.2 – Métodos**3.2.1 – Método de preparo do meio****Meio líquido:**

Adicionou-se as soluções nas medidas: 1mL da sol. 1; 2; 3; 4 e 7; 05 mL das sol. 5 e 6 em 449 mL de água deionizada. Estes foram esterilizados em autoclave a $121^{\circ}C$ por 15 minutos.

Meio sólido:

Em 500 mL de água destilada acrescentou-se: 8g de ágar; 0,1g de KNO₃; 0,01g KH₂PO₄; 0,01 de MgSO₄.7H₂O Após fundir a mistura acrescentou-se 0,5g de peptona. Este meio foi autoclavado a 121° C por 15 minutos.

3.2.2 – Método de manutençãoCultura estoque líquida:

Manteve-se a cultura estoque à temperatura de 6° a 7°C em frasco de vidro devidamente rotulado.

Cultura estoque sólida:

Foram mantidos à temperatura de 23° C com luz natural.

3.2.3 – Método de cultivo do inóculoCultura estoque líquida:

Preparou-se o meio Oligo, meio de cultura líquido para algas, segundo **CETESB, 1991a**. Este meio de cultura foi distribuído em 5 erlenmeyers e autoclavados por 15 minutos a 121° C. Inoculou-se *Selenastrum capricornutum* ou *Chlorella sorokiniana* proveniente de cultura sólida em meio de alga e deixou-se desenvolver durante quatro dias em shaker sob iluminação constante. A seguir os frascos foram transferidos para a câmara fria (6 e 7°C). Após três dias as células estavam decantadas e com uma pipeta estéril retirou-se o sobrenadante juntando-se as células em um único frasco, que foram quantificadas posteriormente em Câmara de Neubauer.

Cultura estoque sólida:

Preparou-se o meio sólido distribuído em tubos de cultura e inoculou-se a alga *S. capricornutum* utilizando-se da técnica de esgotamento por estrias.

O mesmo procedimento foi realizado para a alga *Chlorella sorokiniana*.

3.2.4 - Método de avaliação do crescimento

Contagem em microscópio com Câmara de Neubauer de acordo com SUSSMAN (1974).

3.2.5 - Utilização do ultra-som

Após o cultivo separou-se 10 porções de 50 mL da cultura de alga (*Selenastrum capricornutum* ou *Chlorella sorokiniana*). Cada porção foi irradiada a um determinado tempo no aparelho ultra-som (FIGURA 2), com sonda de 9 mm de diâmetro e amplitude de 80% com ambas as algas; ou variando-se a amplitude (40 e 80%) e mantendo a sonda 9mm somente com a *Selenastrum*; ou ainda mantendo-se a amplitude 80% e variando-se o diâmetro da sonda (9 e 30mm) somente com a *Chlorella*. O frasco contendo a amostra a ser irradiada foi previamente colocado dentro de um béquer e envolvido com gelo picado.

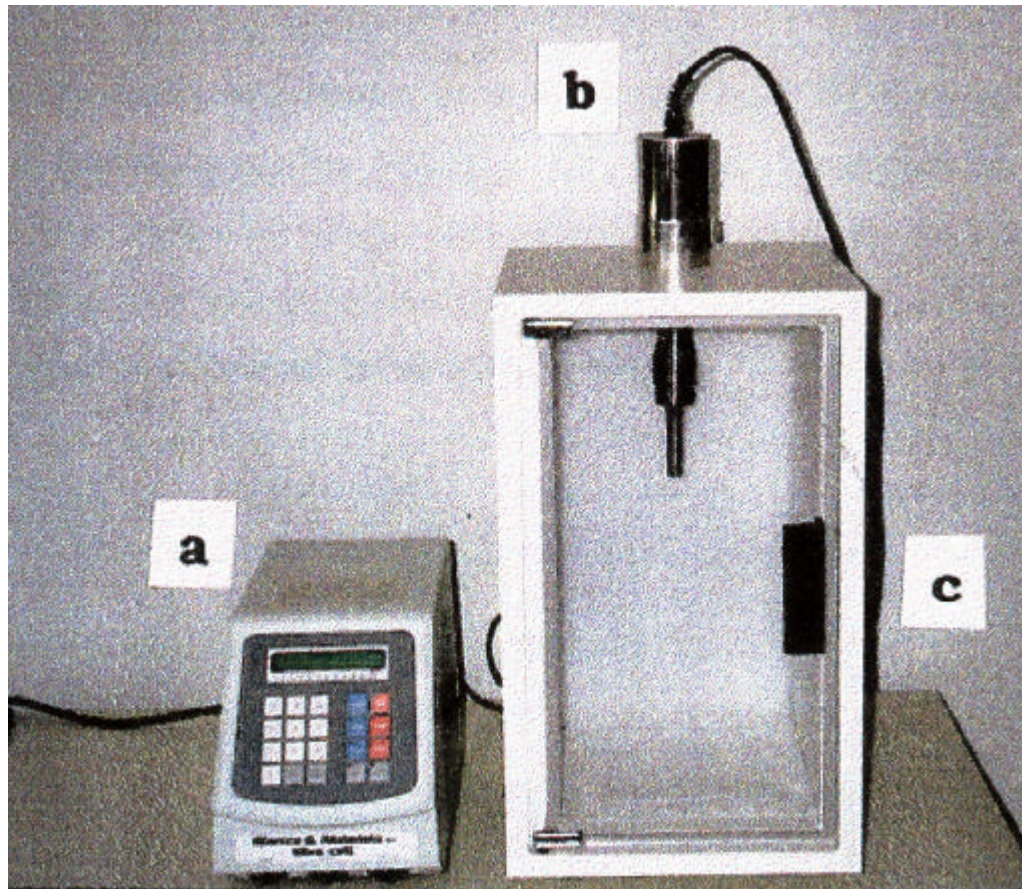


FIGURA 2. Gerador de ondas ultra-sônicas: a- Processador de alta Intensidade; b- Guia de onda e c- Capela de proteção acústica

Tabela 01 – Protocolo experimental da aplicação do ultra-som em cultura de *Selenastrum capricornutum* em frequência de 20 KHz, sonda de 9mm variando-se a amplitude

experimento	repetição	Tempo de irradiação (min.)	Amplitude (%)
1	1	0; 1; 2; 3; 4; 5; 6; 7; 8; 9; 10	80
	2	0; 1; 2; 3; 4; 5; 6; 7; 8; 9; 10	80
2	1	0; 2; 4; 6; 8; 10	80
	2	0; 2; 4; 6; 8; 10	80
3	1	0; 0,5; 1; 10; 12; 15	80
4	1	1; 2	40
5	1	1; 2	80

Tabela 02 - Protocolo experimental da aplicação do ultra-som em cultura de *Chlorella sorokiniana* em frequência de 20 KHz, 80% de amplitude variando-se o diâmetro da sonda

experimento	repetição	Tempo de irradiação (min.)	Diâmetro da sonda (mm)
1	1	0; 4; 6; 8; 10	9
	2	0; 4; 6; 8; 10	9
2	1	0; 0,5; 5; 10	9
3	1	0; 0,5; 5; 10	30

Mantendo-se amplitude 80%, diâmetro da sonda 9 mm alterou-se o pH do meio para: *Selenastrum*, pH 5,6 e *Chlorella*, pH 5,7 e irradiou-se nos tempos 5; 10 e 15 minutos. O ajuste do pH foi realizado com acréscimo de HCl 0,1 M e NaOH 0,1 M.

Tabela 03 - Protocolo experimental da aplicação do ultra-som em cultura de *Selenastrum capricornutum* e *Chlorella sorokiniana* em frequência de 20 KHz, sonda de 9 mm e 80% de amplitude modificando o pH do meio de cultura

Microalga	experimento	repetição	Tempo de irradiação (min.)	pH do meio
<i>Selenastrum</i>	6	1	5; 10; 15	5,6
		2	5; 10; 15	5,6
<i>Chlorella</i>	4	1	5; 10; 15	5,7
		2	5; 10; 15	5,7

3.2.6 – Análise dos resultados com ultra-som

A eliminação das algas foi indicada pela quantificação das células e presença de fragmentos, utilizando-se o microscópio óptico com a Câmara de Neubauer.

3.2.7 - Avaliação estatística

A análise estatística dos dados obtidos com as microalgas *Selenastrum capricornutum* e *Chlorella sorokiniana* foram registrados em tabelas e gráficos (SOKAL e ROHLF, 1969).

4 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 – Escolha de *Selenastrum capricornutum* e *Chlorella sorokiniana*

S. capricornutum (Figura 3) e *Chl. sorokiniana* (Figura 4) são algas freqüentemente encontradas em água doce. Estes microrganismos constituem importante recurso para o estabelecimento da cadeia alimentar da biota aquática. Estas microalgas são encontradas na água juntamente com outras espécies produtoras de toxinas como por exemplo, os dinoflagelados.

S. capricornutum e *Chl. sorokiniana* sistematicamente pertencem ao grupo das clorofíceas. A parede celular da maioria das espécies de clorofíceas é constituída de celulose que também é encontrada em algas pardas, crisófitas, haptofíceas e dinoflagelados. Acredita-se pela natureza química da parede que estes grupos teriam respostas semelhantes às algas utilizadas nos experimentos após irradiação por ultra-som.

As Figuras 3 e 4 mostram as células das algas *S. capricornutum* e *Chl. sorokiniana* respectivamente, observadas no microscópio (aumento 400x) em Câmara de Neubauer.

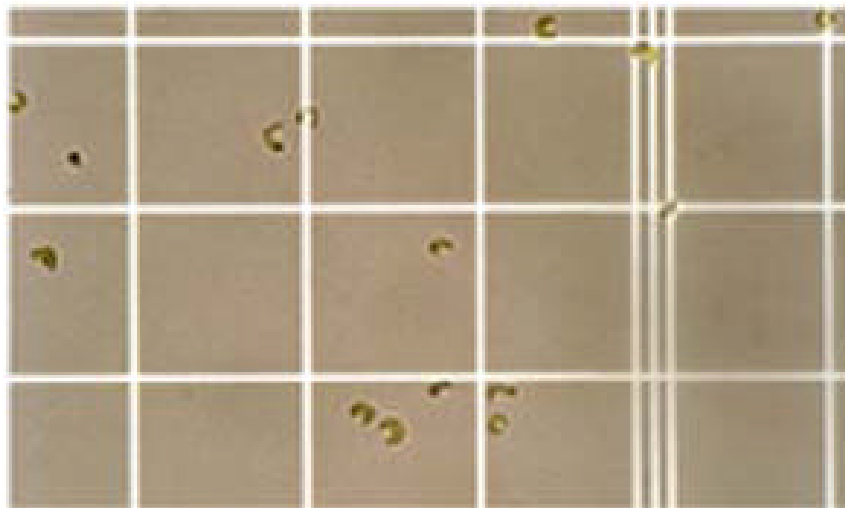


FIGURA 3 . Células de *Selenastrum capricornutum*, observadas no microscópio óptico em Câmara de Neubauer, aumento 400x

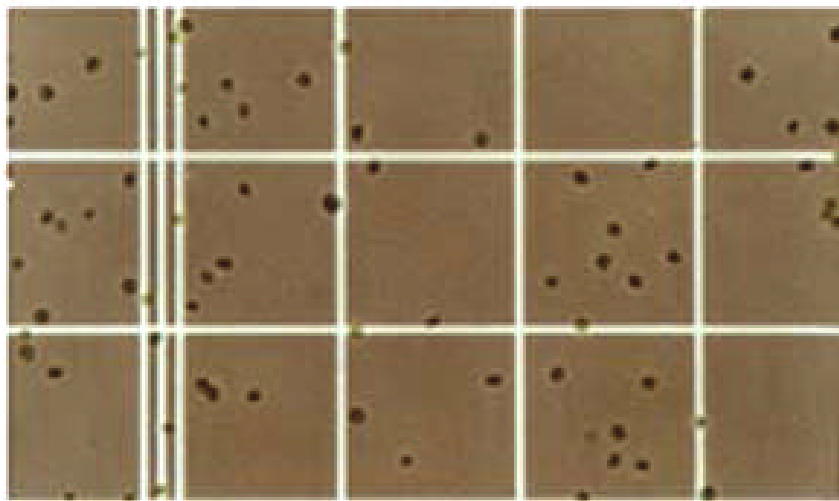


FIGURA 4 . Células de *Chlorella sorokiniana*, observadas no microscópio óptico em Câmara de Neubauer, aumento 400x

4.2 - Resultados da aplicação de ultra-som em *Selenastrum capricornutum* em diferentes tempos

Os resultados do ultra-som quando aplicado em *S. capricornutum* na intensidade de 20 KHz, amplitude de 80% e sonda de 9 mm de diâmetro (Tabelas 4 a 6 e Figuras 5 e 6) indicam que após 30 segundos de irradiação ocorre aumento do número de células dispersas. Este número não sofreu diferença quando se alterou a amplitude da irradiação. Este fato foi verificado após o segundo experimento.

Tabela 04 – Quantificação microscópica em Câmara de Neubauer do número de células de *Selenastrum capricornutum* após irradiação ultra-sônica de frequência 20 KHz, sonda de 9mm de diâmetro e amplitude 80%, nos tempos 0; 1; 2; 3; 4; 5; 6; 7; 8; 9 e 10 minutos no experimento 1 com duas repetições

experimento	Repetição	número de células $\times 10^4/\text{mL}$										
		Tempo de irradiação ultra-sônica (min.)										
		0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1	1	600	560	392	350	290	252	126	135	151	119	108
	2	523	803	788	766	605	718	433	679	397	533	386

O aumento do número de células após a primeira irradiação também foi constatado por Campanha (2001) quando trabalhou com fungos formadores de esporos e a suspensão destes irradiada nos tempos 30 segundos, 1 e 2 minutos, indicando aumento do número de esporos dispersos. Acredita-se que, o primeiro tempo de irradiação da alga corresponde ao tempo para dispersão de células.

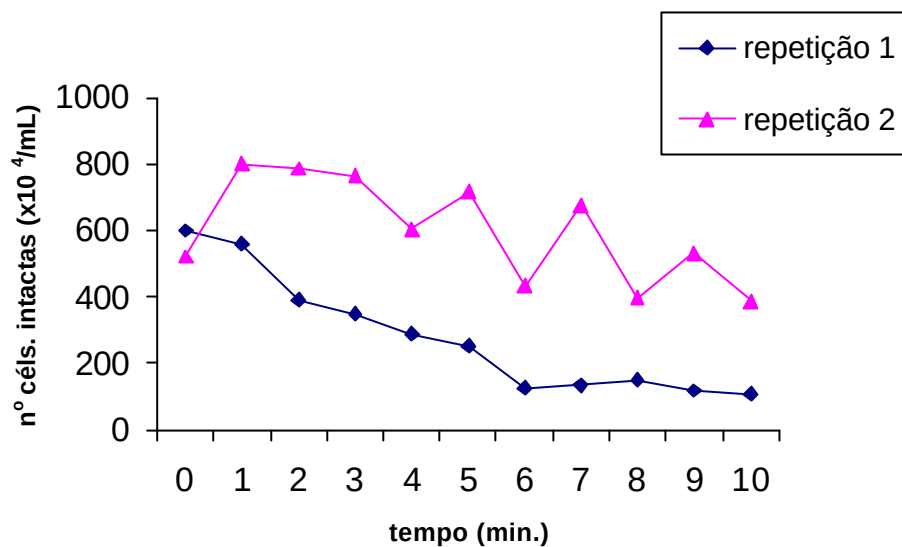


FIGURA 5. Representação gráfica da diminuição do número de *Selenastrum capricornutum* após irradiação ultra-sônica de 20KHz, sonda de 9 mm de diâmetro e amplitude 80% nos tempos: 0; 1; 2; 3; 4; 5; 6; 7; 8; 9 e 10 minutos no experimento 1 com duas repetições.

Tabela 05 – Quantificação microscópica em Câmara de Neubauer do número de células de *Selenastrum capricornutum* após irradiação ultra-sônica de frequência 20 KHz, sonda de 9mm de diâmetro e amplitude 80% nos tempos 0; 2; 4; 6; 8 e 10 minutos no experimento 2 com duas repetições

Experimento	repetição	número de células x10 ⁴ /mL					
		Tempo de irradiação ultra-sônica (min.)					
		0	2	4	6	8	10
2	1	869	1012	729	612	451	414
	2	622	715	575	418	262	429

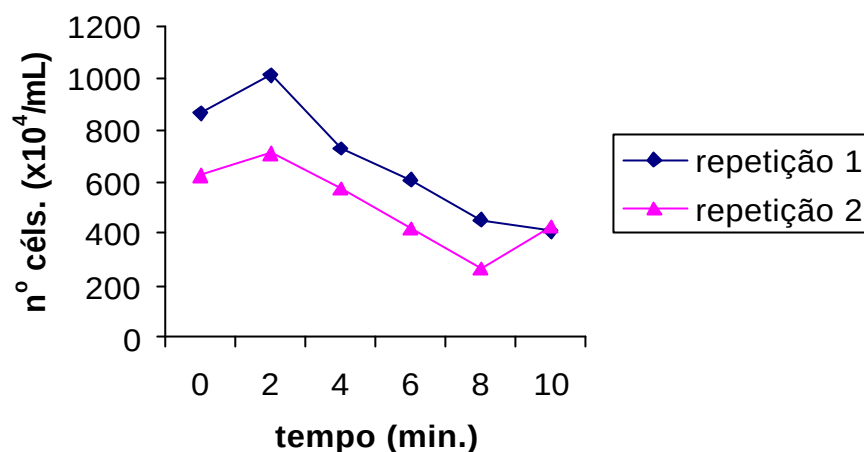


FIGURA 6. Representação gráfica da diminuição do número de células de *Selenastrum capricornutum* após irradiação ultra-sônica de 20KHz, sonda de 9 mm de diâmetro e amplitude 80%, nos tempos: 0; 2; 4; 6; 8 e 10 minutos no experimento 2 com duas repetições.

Tabela 06 – Quantificação microscópica em Câmara de Neubauer do número de células de *Selenastrum capricornutum* após irradiação ultra-sônica de frequência 20 KHz, sonda de 9mm de diâmetro e amplitude 80%, nos tempos 0; 0,5; 1; 10; 12; 15 minutos no experimento 3 com 1 repetição

Experimento	Repetição	número de células x10 ⁴ /mL					
		Tempo de irradiação ultra-sônica (min.)					
3	1	0	0,5	1	10	12	15
		184	207	197	124	103	90

As alterações constatadas entre o tempo zero e o tempo correspondente a 0,5; 1 e 2 minutos encontrados nas Tabelas 4, 5 e 6 detectam que a irradiação ultra-sônica promove a desagregação de células propiciando uma suspensão homogênea.

O aumento do número de algas após o primeiro tempo de irradiação poderá ser considerado um alerta em áreas em que se utilize o uso da contagem de células como por exemplo, no diagnóstico médico de células sanguíneas, viabilidade celular de leveduras, contagem de esporos, partículas inorgânicas, etc., considerando a possibilidade destes constituintes estarem agregados induzindo uma falsa contagem.

Os experimentos com irradiação em *S. capricornutum* registrados nas Tabelas 4, 5 e 6 indicam que esta microalga apresenta-se resistente à ruptura celular. Quando em dois experimentos independentes irradiou-se as células durante 15 minutos, constatou-se 51% de rompimento acompanhado de danos celulares visíveis ao microscópio em forma de fragmentos. Por outro lado, *S. capricornutum* apresentou-se muito mais resistente ao ultra-som que *Saccharomyces cerevisiae* (Tomasin, 2001), pois com irradiação de apenas 4 minutos a viabilidade atingiu 55% e 14% com 20 minutos.

Comparando-se os dados das irradiações nos esporos de *Aspergillus flavus*, Campanha (2001), àqueles obtidos com *S. capricornutum* este se mostrou mais resistente que o fungo, ambos irradiados durante 10 minutos, empregando-se o mesmo equipamento. A pesquisa com fungo comprovou que houve diminuição de 45% das unidades formadoras de colônias geradas dos esporos irradiados.

4.2.1 – Aplicação do ultra-som sobre *S. capricornutum* variando-se a amplitude

Ensaio realizado com *Selenastrum capricornutum*, ativada em amplitude 40 e 80% revelaram que as células produziram respostas pouco distintas quando houve alteração deste parâmetro (Tabela 7). A sonda empregada nos ensaios foi de 9mm de diâmetro.

Tabela 07 - Quantificação microscópica em Câmara de Neubauer do número de células de *Selenastrum capricornutum* após irradiação ultra-sônica de frequência 20 KHz e sonda de 9 mm de diâmetro e amplitudes de 40 e 80%, nos tempos 0; 1 e 2 minutos nos experimentos 4 e 5 com uma repetição cada.

Número de células x10 ⁴ /mL					
Experimento	Repetição	Tempo (min.)			Amplitude (%)
		0	1	2	
4	1	621	677	654	40
5	1	621	639	633	80

A amplitude da onda, ao contrário da sua velocidade, não se mantém constante ao longo do percurso, pois sofre diminuição à medida que se afasta da fonte (Garcia, 1998).

Neste experimento verificou-se que a dispersão das células da alga com aplicação da sonicação aumentou a quantidade de unidades celulares na suspensão tomando-se como referência o tempo zero ($621 \times 10^4/\text{mL}$). Embora, manualmente se procedesse a homogeneização o número de células irradiadas no tempo de 01 minuto, não se manteve homogêneo. A detecção das alterações estruturais visíveis ao microscópio (aumento 400x) após 2 minutos em ambas amplitudes de irradiação apresentou valores de pouca representatividade, indicando pequena tendência às alterações morfológicas detectáveis ao microscópio.

4.2.2 – Aplicação do ultra-som sobre *S. capricornutum* variando-se o pH do meio

Alterações no ambiente podem modificar o desenvolvimento do microrganismo, podendo torná-lo mais sensível à resposta da sonicação. Considerando este fato alterou-se o pH do meio com a intenção de verificar se esta modificação iria modificar a resposta após irradiação (Figura 7).

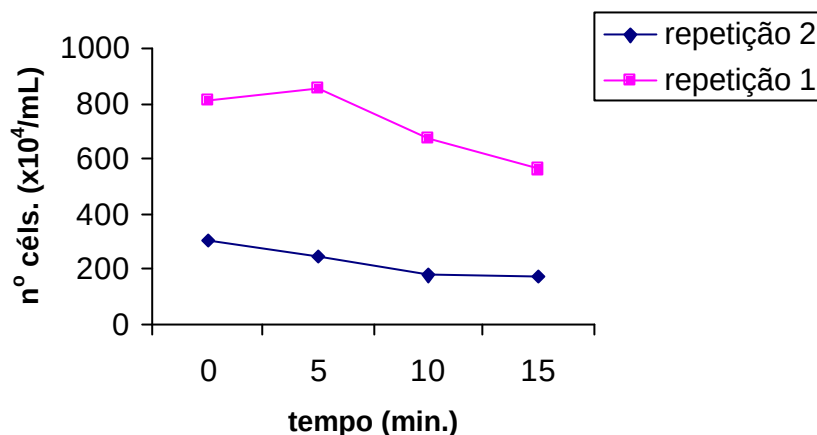


FIGURA 7. Representação gráfica da diminuição do número de células de *Selenastrum capricornutum* em meio com pH 5,6 após irradiação com sonda 9 mm de diâmetro e amplitude 80% nos tempos 0; 5; 10 e 15 minutos, no experimento 6 com duas repetições.

Os microrganismos quando se desenvolvem em meio de cultura com composição química diferente àquela usual, geralmente tem modificações morfológicas que podem atingir diferentes partes da célula. Pode-se cultivar células bacterianas sem parede celular quando ao meio de cultivo acrescenta-se antibióticos. A parede celular de leveduras fica alterada quando fermenta em pH muito baixo. Diante destas afirmações procurou-se cultivar *S. capricornutum* em pH mais ácido e posteriormente verificar sua suscetibilidade à radiação de ultra-som. Constatou-se que a resistência das células não alterou para esta espécie de alga, que manteve o seu número de células, como mostra a Figura 7.

A Figura 8 mostra comparativamente a média (valores da Tabela 4 e Figura 7) do número de células cultivadas em pH 7 e 5,6 irradiadas nos tempos 0; 5; 10 e 15 minutos.

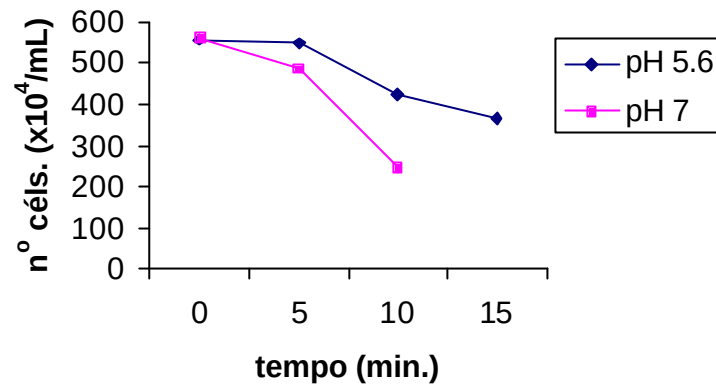


FIGURA 8. Representação gráfica comparativa da diminuição do número de células de *Selenastrum capricornutum* após irradiação ultra-sônica de 20 KHz, sonda 9 mm de diâmetro e amplitude 80% em meio com pH 5,6 e pH 7 nos tempos 0; 5; 10 e 15 minutos.

4.3 – Resultados da aplicação do ultra-som em *Chlorella sorokiniana* em diferentes tempos

No ensaio com a microalga *Chl. sorokiniana* houve diminuição de células atingindo 88% (Tabelas 8 e 9 e Figuras 9 e 10). Mostrando-se mais sensível à radiação do ultra-som que *S. capricornutum*. Pressupõe-se que a sua maior sensibilidade se deva à sua morfologia diferente da *Selenastrum* (Figuras 3 e 4). “O tamanho e a forma do organismo e a natureza estrutural pode afetar a resposta da célula ao ultra-som” (MOAT E FOSTER, 1988).

Tabela 08 - Quantificação microscópica em Câmara de Neubauer do número de células de *Chlorella sorokiniana* e porcentagem destruídas após irradiação ultra-sônica de frequência 20 KHz, sonda de 9mm de diâmetro e amplitude 80%, nos tempos 0; 4; 6; 8 e 10 minutos, no experimento 1 com duas repetições.

Repetição		Tempo de irradiação (min.)				
		0	4	6	8	10
1	número células intactas x 10 ⁴	582	246	152	85	72
	% células destruídas	0	58	74	85	88
2	número células intactas x 10 ⁴	673	213	222	189	108
	% células destruídas	0	68	67	72	84

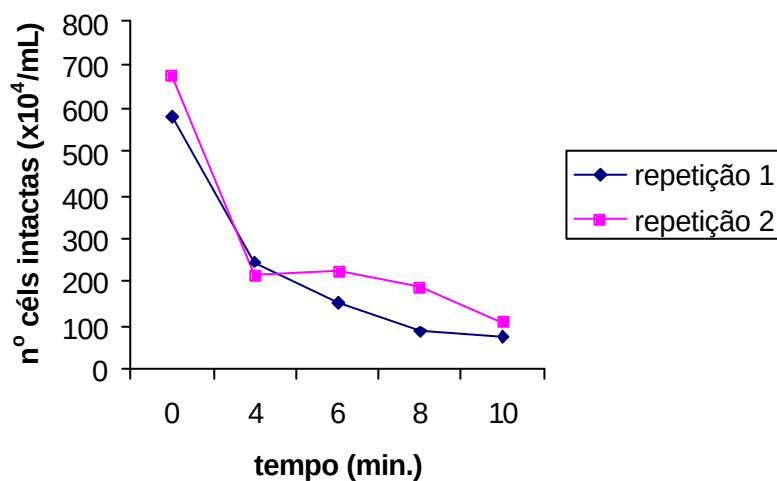


FIGURA 9. Representação gráfica da diminuição do número de *Chlorella sorokiniana* após irradiação ultra-sônica de 20 KHz, sonda de 9mm de diâmetro e amplitude 80% nos tempos: 0; 2; 4; 6; 8 e 10 minutos, no experimento 1 com duas repetições.

4.3.1- Aplicação do ultra-som em *Chl. sorokiniana* variando-se o diâmetro da sonda

Na tabela 9 e figura 10 é possível verificar que mesmo alterando-se o diâmetro da sonda não houve modificação no número de células nos experimentos 2 e 3.

Tabela 09 – Quantificação microscópica em Câmara de Neubauer do número de células de *Chlorella sorokiniana* após irradiação ultra-sônica de 20KHz, amplitude 80% com sondas de 9 e 30 mm de diâmetro, nos tempos 0; 0,5; 5 e 10 minutos.

Diâmetro da sonda (mm)		Tempo de irradiação (min.)			
		0	0,5	5	10
9	Número de células intactas x 10 ⁴	446	343	117	55
	% de células destruídas	0	34	74	88
30	Número de células intactas x 10 ⁴	1034	945	430	127
	% de células destruídas	0	9	58	88

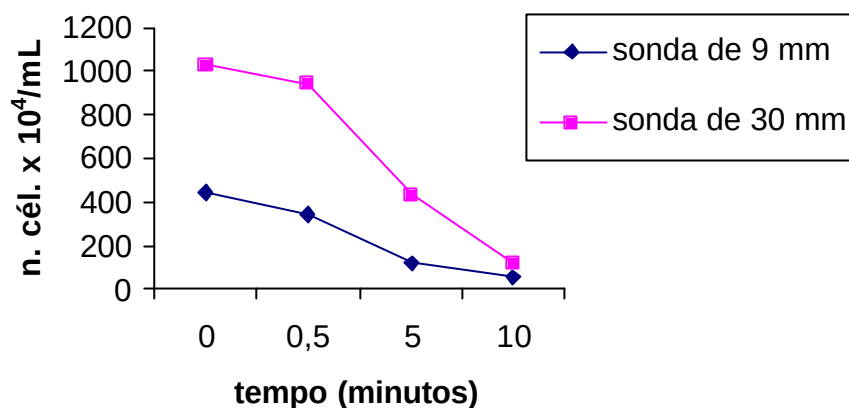


FIGURA 10. Representação gráfica do número de *Chlorella sorokiniana* após irradiação ultrassônica de 20 KHz, sondas de 9 e 30 mm de diâmetro e amplitude 80% nos tempos: 0; 0,5; 5 e 10 minutos.

De acordo com a Figura 10, o diâmetro da sonda de 9 e 30 mm tem o mesmo comportamento na destruição final das células. Entretanto, pode-se afirmar que em alguns casos o ultra-som constitui uma ferramenta de trabalho que pode ser utilizado no controle de populações algais. Referindo-se apenas ao tratamento de água como para impedir a formação de florações de algas em médio prazo.

O número de células contadas em Câmara de Neubauer pode não corresponder necessariamente ao número de células vivas no caso da *Selenastrum* e *Chlorella*. Esta afirmação se baseia no fato de que não foram realizados experimentos de cultivo posterior a irradiação. Considerando-se dentre as espécies de microrganismos, *S. capricornutum* e *Chlorella sorokiniana*, *Aspergillus flavus*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, sendo que a alga *S. capricornutum* foi a mais resistente.

4.3.2- Aplicação do ultra-som em *Chl. sorokiniana* variando-se o pH do meio

O cultivo de *Chlorella* no meio com pH de 5,7 parece ter induzido maior resistência das células ao ultra-som, quando se comparam resultados obtidos nas mesmas condições empregando-se *S. capricornutum* (Figura 11). A ruptura celular de *Chl. sorokiniana* atingiu a média de 87% quando cultivada em meio de cultura pH 7,0 porém, alterando-se o pH para 5,7 a ruptura celular após irradiação diminuiu para 52%. Este experimento mostra a diversidade e a adaptação do microrganismo ao meio ambiente.

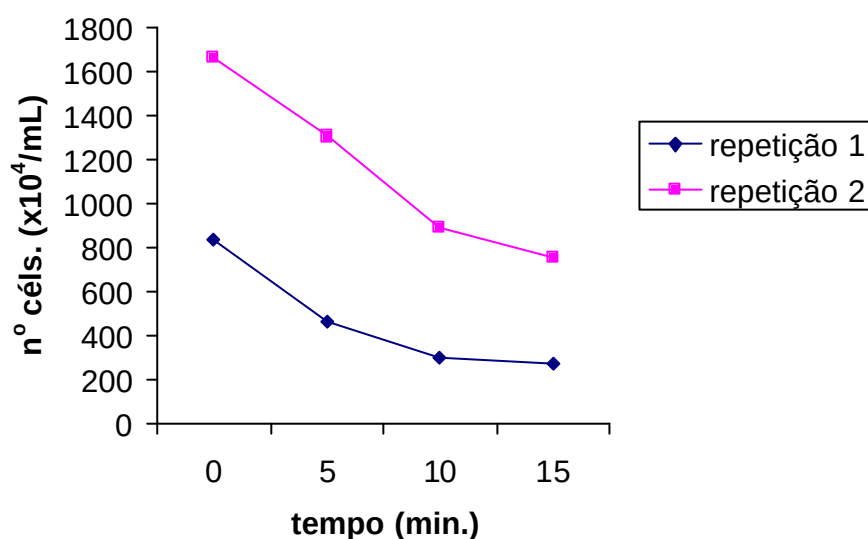


FIGURA 11. Representação gráfica da diminuição do número de células de *Chlorella sorokiniana* em meio com pH 5,7 após irradiação ultra-sônica de 20 KHz, sonda de 9 mm de diâmetro e amplitude 80% nos tempos 0; 5; 10 e 15 minutos, no experimento 4 com duas repetições.

A Figura 12 mostra comparativamente a média (valores da Tabela 9 e Figura 11) do número de células em pH 7 e 5,7 irradiadas nos tempos 0; 5; 10 e 15 minutos.

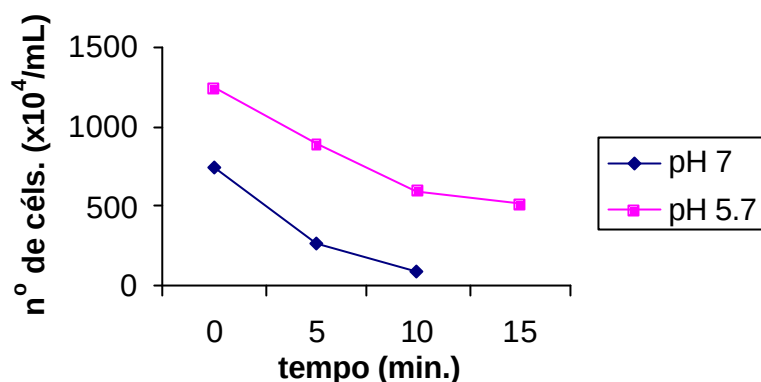


FIGURA 12. Representação gráfica comparativa da diminuição do número de células de *Chlorella sorokiniana* em meio com pH 5,7 e pH 7 após irradiação ultra-sônica de 20 KHz, sonda de 9mm de diâmetro e amplitude 80% nos tempos 0; 5; 10 e 15 minutos.

A diminuição significativa do número de células de *Chl. sorokiniana* e *S. capricornutum* pelo efeito de ondas ultra-sônicas reafirma a eficiência da utilização do ultra-som no controle de microrganismos evidenciado em outros trabalhos como a inibição de bactérias *E. coli* e *Staphylococcus aureus* realizado por Guirro (1999); a eliminação de células e esporos de *Bacillus subtilis* por Fontana (1996) e a viabilidade de *Saccharomyces cerevisiae* submetido ao ultra-som e eletrólise realizado por Tomasin (2002) entre outros.

O exame microscópico das células irradiadas comprova a desintegração de parede celular encontrada para a *Chlorella* quando localizados fragmentos de células na lâmina no momento da contagem. O tempo de irradiação utilizado foi semelhante ao tempo aplicado na destruição de bactérias por Guirro (1999). Esta verificação pressupõe que ao se controlar a proliferação de algas por irradiação ultra-sônica haveria ainda o controle da viabilidade de bactérias em um tratamento de água.

Mediante a alteração do pH de 7,0 para 5,7 do meio de cultivo a desintegração das células *Chl. sorokiniana* diminuiu de 88 para 64% de células desintegradas no tempo de 10 minutos, indicando que o meio de cultivo tem influência sobre a resistência celular.

A utilização do ultra-som nos primeiros estágios de tratamento da água para abastecimento combateria o crescimento de algas antes de se tornarem grandes populações. A sua aplicação após formação destas florações resultaria no desprendimento de substâncias até indesejáveis como toxinas de algumas espécies e contaminaria a água, por isso seria adequado o controle no início do processo.

Além da aplicabilidade do ultra-som no controle da proliferação de microalgas em águas de abastecimento, espera-se também sua eficiência em processos de obtenção de subprodutos intracelulares de interesse em pesquisa ou outros fins. Tomasin (2002) mostrou que o ultra-som foi eficiente para extração de proteínas intracelulares, isto se deve ao fato de no tratamento sonificação ocorrer lise ou rompimento da célula, espalhando material citoplasmático no meio. Também Vargas (2001) mostrou que o ultra-som pode ativar invertase de *Aspergillus niger* bem como facilitar sua excreção no meio de cultivo.

5 – CONCLUSÕES

Com os experimentos realizados aplicando-se ultra-som (20 KHz, alta intensidade) em microrganismos *Chlorella sorokiniana* e *Selenastrum capricornutum* obteve-se as seguintes respostas:

A irradiação propicia a formação de suspensão celular mais homogênea desagregando células que por algum motivo não estavam isoladas e o ultra-som provavelmente induziu a sua dissociação em *Chlorella sorokiniana* e *Selenastrum capricornutum*.

Alterando-se a amplitude de irradiação num mesmo intervalo de tempo não ocorre variação na quantidade de células de *Selenastrum capricornutum*.

O diâmetro da sonda não influencia na quantidade de células de *Chlorella sorokiniana* contadas na suspensão irradiada por até 10 minutos, mas alteração do pH no meio de cultura interfere na resposta da sonicação desta alga.

O aumento do tempo de irradiação faz com que o número de células diminua de *Selenastrum capricornutum* e *Chlorella sorokiniana*.

O ultra-som mostrou capacidade de desintegrar diferentemente as algas *Selenastrum capricornutum* e *Chlorella sorokiniana*.

6 - Propostas de continuidade da pesquisa

- Quantificar a clorofila liberada no meio após irradiação das células
- Estabelecer a condição ótima para rompimento das células
- Verificar mediante o crescimento em meio de cultura a quantidade de células inativadas pelo ultra-som

7 - RESUMO

Microalgas quando se desenvolvem intensamente recebem o nome de florações. Como consequência formam-se flocos ou cobertura laminar que podem obstruir os sistemas de tratamento de água para uso industrial ou doméstico. Tratamentos convencionais por insumos químicos no sentido de inibir o crescimento nem sempre são eficientes. Na busca de métodos alternativos para o controle da população de microalgas, procurou-se aplicar ondas ultra-sônicas para destruir as células destes microrganismos. As espécies *Selenastrum capricornutum* e *Chlorella sorokiniana* foram cultivadas em meio mineral sólido e líquido por cerca de cinco dias. Amostras de 50 mL foram irradiadas com ultra-som de frequência 20 KHz com amplitude de 80 % e sonda de 9 mm de diâmetro nos tempos: 30 segundos; 01; 10; 12 e 15 minutos. As células foram quantificadas em Câmara de Neubauer procedendo-se cinco contagens para cada tempo de sonicação. Os resultados com a *S. capricornutum* demonstraram que o ultra-som promove a desagregação celular após irradiação de 30 segundos identificado pelo aumento do número de células, permitindo que se infira que em algumas situações os resultados das contagens podem não ser totalmente exatas. Entretanto, a sonicação após dez minutos produziu 88% e 82% de morte da *Chlorella sorokiniana* e *S. capricornutum* respectivamente.

8 - ABSTRACT

Micro-algae when developing intensely under favorable conditions is said to be flourishing. As consequence, flakes or laminar layer formations can obstruct industrial or domestic water treatment plant installations. Conventional treatments utilizing chemicals are not always very efficient in inhibiting these formations. In the search for alternative methods to control the micro-algae population we tried the application of ultra-sound for the destruction of the cells of these microorganisms. *Selenastrum capricornutum* and *Chlorella sorokiniana* were cultivated in solid and liquid mineral media for about 5 days. 50 mL samples were irradiated with ultra-sound with a frequency of 20 KHz, 80% amplitude and a 9 mm probe for: 30 seconds; 01; 10; 12 and 15 minutes. The cells were quantified in a Neubauer Chamber with 5 counts being done for each individual exposure time. The results with the *S. capricornutum* showed that a 30 seconds application of ultra-sound promotes cellular desegregation, evidenced by the results from counts are not reliable. We were able to determine though that the application of ultra-sound for 10 minutes was able to kill 88% and 82% of the *Chlorella sorokiniana* and *S. capricornutum* respectively.

9 – REFERÊNCIAS

ALEXOPOULOS, C. J.; BOLD, H.C. **Algae e fungi**. London; 1967. 135 p.

BARBOSA, J.C.S.; SERRA, A.A. Ultra-som: influência do ultra-som na química. **Química Nova**, v. 15, número 4, p. 302-316, 1992

BELLO, A. R. C. **Eficiência comparativa das ondas de ultra-som em relação ao hipoclorito de sódio e filtração-adsorção na eliminação de microrganismos em estação de tratamento de água**. 2003. Dissertação. (Mestrado em Microbiologia Aplicada) – Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, São Paulo, 2003.

BICUDO, C. E. M.; BICUDO, R. M. T. **Algas de águas continentais brasileiras** – chave ilustrada para identificação de gêneros, fundação brasileira para o desenvolvimento do ensino em ciências, São Paulo: Fundação Brasileira para o Desenvolvimento do Ensino de Ciências, 1994. p. 71.

BORGES, S. S.; KORN, M. Geração Sonoquímica de oxidantes em solução aquosa saturada de tetracloreto de carbono, **Química Nova**, Salvador, v. 25, número 4, p.558-562, 2002. Disponível em:< www.quimicanova.sbq.org.br/qnol/2002/vol25n4/08.pdf>. Acesso em: 20 abril.2003.

BRANCO, S. M. **Hidrologia Aplicada à Engenharia Sanitária**, 1971. 1214 p.

BRANCO, S. M. **Hidrologia Aplicada à Engenharia Sanitária: Água**. 3. ed., São Paulo: Convênio CETESB-ASCETESB, 1986. 640 p.

CAMPANHA, K. T. G. **Aplicação de ultra-som como controle do crescimento de *Aspergillus flavus* em cosméticos**. 2001. 57f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Aplicada) – Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 2001.

CAPONE, D. J.; BAUER, J. E. Microbial Processes in Coastal Pollution número In: MITCHELL, Ralph. **Environment Microbiology**. New York: Wiley, 1992. cap. 8, p. 191-237.

CLESCERI, L. S.; GREENBERG, A. E.; EATON, A. D. **Standard Methods** – for the Examination of Water and Wastewater. 20 th. ed., 1998. p. 8.42-8.47.

CETESB – COMPANHIA DE TECNOLOGIA E SANEAMENTO AMBIENTAL – L5.018, Água- teste de toxicidade aguda com *Daphnia similis*, São Paulo, 1991 p.31.

FONTANA, R. **Efeitos do ultra-som de alta intensidade na ativação e inativação de esporos bacterianos**. 1996. 69 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Aplicada) – Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, São Paulo, 1996.

GARCIA, E.A.C. **Biofísica** – Bioeletricidade, Bioacústica, Biotermologia, Biomecânica, Bio-óptica, Biofísica das radiações ionizantes, Técnicas especiais. São Paulo: Sarvier, 1998. 387 p.

GEE, J.H.R. Specialist Aquatic Feeding Mechanisms. In: BARNES, E.R.S.K.; MANN, K.H. **Fundamentals of Aquatic Ecology**. 2th ed. Massachusetts: Blackwell Science, 1991. cap. 10, p. 186-209.

GÓMEZ, I. **Biólogos analizan la calidad de las aguas donde han proliferado las algas tóxicas**. Universidad de Alicante, Levante, Guardamar. 1988. Disponível em: <<http://www.Ua.es/dossierprensa>> Acesso em: 20 mar.2002.

GUIRRO, E. C. de O. **Bioefeitos induzidos por ultra-som em *Staphylococcus aureus* e *Echerichia coli* estudo in vitro**. 1999. 144f. Tese (Doutorado em Microbiologia Aplicada) – Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 1999.

GRAHAM, L. E.; WILCOX, L. W. **Algae**. Rio de Janeiro: Prentice-Hall do Brasil, 2000. 699p.

HERNANDEZ, A L. **Desfloculação de *Saccharomyces cerevisiae* contaminada com *Lactobacillus fermentum* CCT 1396 por meio de ultra-som**. 2002. 85 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Aplicada) – Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 2002.

HOEK, C. Van Den; MANN, D. G.; JAHNS, H.M. **Algae** – Na Introduction to phycology. Cambridge: University Press, 1997. 627 p.

IMPORTÂNCIA das microalgas, O Povo - o jornal do Ceará, Ciência e Saúde, março de 2003
Disponível em: < www.noolhar.com/opovo/cienciaesaude/196398.html>

JOLY, A. B. suplemento I , Gêneros de algas de água doce da cidade de São Paulo e arredores. **Rickia**, São Paulo, 1963. p. 47-121. Suplemento 1.

KALBFLEICH, J.D.; PRENTICE, R.L. **The statistical analysis of failure time data**. New York: J. Wiley, 1980.

LEE, R. E. **Phycology**. Cambridge University Press, 1980. 478 p.

LIMAYE, M. S.; HAWKES, J.J.; COAKLEY, W. T. Ultrasonic standing wave removal of microorganisms from suspension in small batch systems. **Journal of Microbiological Methods**,. número 27, p.211-220. 1996

MANAHAN, S. E. **Environmental Chemistry**. 6th ed., Florida: Lewis , 1994. 811p.

MASON, T. J. Large scale sonochemical processing: aspiration and actually. **Ultrasonics sonochemistry**, número 7, p.145-149, 2000.

MAUSETH, J. D. **Plant Anatomy**. Texas: The Benjamin/Cummings, 1998. 560p.

MOAT, A. G.; FOSTER, J. W. **Microbial physiology**, 2th ed. Singapura: John Wiley, 1988. 597 p.

MOORE, W.J. **Físico-Química** 4. ed., São Paulo: Edgar Blucher, 1976. v. 2, 383 p

NEIS, U. Ultrasound in water, wastewater and sludge treatment, **Magazine of the International Water Association**número London: Iwa & Editorial Address, april 2000.

OKUNO, E.; CALDAS, I. L.; CHOW, C. **Física para Ciências Biológicas e Biomédicas**, São Paulo: Harbra, , 1982. p. 222-249

PÉCORA, J. D.; GUERISOLI, D. M. Z. **Ultra-som**. 1997. Apresenta textos sobre ultra-som e seu uso em endodontia. Disponível em: <<http://www.forp.usp.br/restauradora/us01.htm>> Acesso em: 20. Janúnero 2002.

PELCZAR M. J.; CHAN, E.C.S.; KRIEG, Noel R. **Microbiologia** – conceitos e aplicações, 2. ed., São Paulo: Makron Books, 1997. v.1,p. 524

PERRY, J.; VANDERKLEIN, E. **Water Quality Management of a Natural Resource**. Massachusetts: Blackwell Science, 1996. 639p.

PHULL,S.S; NEWMAN, A P.; LORIMER, J.P.; POLLET, B.; MASON, T.J. The development and evaluation of ultrasound in the biocidal treatment of water. **Ultrasonics sonochemistry**, v.4, p.157-164, 1997.

PICKETT-HEAPS, J.D. **Green Algae**: Structure, Reproduction and Evolution in Selected Genera. Massachusetts: Sinauer Associates, 1975. 606 p.

PINTO-COELHO,R.M. **Fundamentos em Ecologia**. Porto Alegre: Artmed, 2002. 252 p.

RASO, J.; MAÑAS, P.; PAGÁN, R.; SALA, F. J. Influence of different factors on the output power transferred into medium by ultrasound. **Ultrasonics sonochemistry**. v.5. p.157-162, 1999.

RAVEN, P. H.; EVERT, R F.; EICHHORN, S. E. **Biologia Vegetal**. 6. ed.. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002. 206 p.

ROUND, F.E. **Biologia das Algas**, 2. ed., Guanabara Dois, 1973.p.263

SANTIN, J. L. **Ultra-som**: Técnica e Aplicação. Rio de Janeiro: Qualitymark, 1997. 287 p.

SUSSMAN, A. S. **Microrganismos** – crescimento, nutrição e interação, Edart, 1974. p. 54 –58

TOMASIN, A. C. **Biorresistência e efeitos causados pela ação acoplada da irradiação ultra-sônica e processo eletrolítico no aproveitamento da levedura *Saccharomyces cerevisiae***. 2001. 91f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Aplicada) – Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 2001.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiologia**, 6 d. Porto Alegre: Artemed, 2000. 827 p.

UMA AMEAÇA a qualidade de água. **Pesquisa FAPESP**, São Paulo, número 23, 2000. Disponível em:< <http://www.fapesp.br/ciencia5310.htm>> Acesso em: 22. janeiro 2002.

VARGAS, L. H. M. **Efeitos do ultra-som sobre a invertase de *Aspergillus niger***. 2001. 91f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Aplicada) – Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 2001.

VILLAMIEL, M.; JONG, P. Inactivation of *Pseudomonas fluorescens* and *Atreptococcus thermophilus* in Tryptcase Soy Broth and total bacteria in milk by continuous-flow ultrasonic treatment and conventional heating. **Journal of Food Engineering**, v.45, p.171-179. 2000.

VOET, D.; VOET, J. G.; PRATT, C. W. **Fundamentos de Bioquímica**. São Paulo: Artmed, 2002. 931p.