

BIONOTA

Manipulación de protozoos por ultrasonido

Protozoa manipulation by ultrasound

*Yancy Milena Porras Rodríguez**, *Omar Alexander Pedraza Díaz**,
*Flavio Humberto Fernández Morales***, *Julio Enrique Duarte****

RESUMEN

La manipulación de microorganismos, entendida como su posicionamiento y su movimiento controlado, es una de las principales preocupaciones en áreas como la microbiología y la medicina. Con este fin se han desarrollado diferentes técnicas que van desde la utilización de sustancias químicas, hasta el empleo de campos eléctricos, campos magnéticos, fuerzas ópticas y gravitatorias, entre otras. Aparte de ser técnicas sofisticadas, muchas de ellas causan alteraciones irreversibles en los microorganismos, lo cual impide su reutilización en ensayos posteriores. Lo anterior justifica el estudio de alternativas novedosas y de bajo costo, que permitan la manipulación de organismos microscópicos en forma sencilla y eficiente. En el presente trabajo se ilustran los efectos producidos por la interacción entre protozoos ciliados y microburbujas de aire, cuando son sometidos a un campo ultrasónico de 5.8 mW. A las frecuencias de resonancia de las microburbujas se observó que los microorganismos se adhieren a la frontera de las burbujas, permaneciendo allí mientras se encuentra aplicado el campo ultrasónico. Una vez eliminado el ultrasonido, los protozoos recuperan su libertad de movimiento sin daño aparente. Estos efectos podrían servir como el principio de actuación de un dispositivo capaz de atrapar, retener y liberar microorganismos de gran movilidad, sin causarles ningún daño. Las microburbujas se originan por electrólisis a través de una rejilla de electrodos, mientras que el ultrasonido es generado mediante un transductor piezoeléctrico. Como microorganismos se emplearon aquellos presentes en agua estancada, y su observación se realizó directamente por medio de un estereomicroscopio metalográfico.

Palabras clave: manipulador, protozoos, ultrasónico, transductor, piezoeléctrico.

ABSTRACT

Microorganism manipulation, considered as controlled motion and positioning, is one of the most important activities in microbiology and medicine. To achieve this goal there are some techniques such as those which use chemicals, electric and magnetic fields, or gravitational and optical forces, among others. These techniques are usually sophisticated, and some of them can induce irreversible alterations on the microorganisms which prevents their use in another tests. Thus, there is justified the study of technological alternatives to manipulate microorganisms in an easy and cost-effective way. This work shows the interaction between protozoa and air microbubbles when they are under the influence of an ultrasonic field of 5.8 mW. At the microbubbles resonant frequencies, microorganisms were attracted toward the bubbles' frontier remaining there while the ultrasonic field was applied. Once the ultrasound disappears, protozoa recover their freedom of movement. The observed effects could be used as the actuation principle of devices capable to trap, hold and release microorganisms of high mobility without any apparent damage. Microbubbles are generated by electrolysis which take place on the surface of an electrode array, while the ultrasound is originated by means of a piezoelectric transducer. As microorganisms there were employed those present in stagnated water, and were observed through an stereomicroscope.

Key words: manipulator, protozoa, ultrasonic, transducer, piezoelectric.

* Ingeniero electromecánico.

** Doctor en ingeniería electrónica.

*** Doctor en ciencias físicas.

Grupo de Energía y Aplicación de Nuevas Tecnologías (GEANT). Universidad Pedagógica y Tecnológica de Colombia,
Sede Duitama. Carrera 18, calle 22, Duitama, Boyacá, Colombia. Correo electrónico: flavio@duitama.uptc.edu.co

Recibido: agosto 14 de 2003. **Aceptado:** abril 30 de 2004.

INTRODUCCIÓN

La manipulación de microorganismos, entendida como su movimiento controlado, concentración, retención y posicionamiento, es una de las principales preocupaciones en áreas como microbiología, biotecnología y medicina, entre otras. Lo anterior debido a que muchos ensayos y pruebas de laboratorio exigen la observación directa bajo el microscopio de diversos organismos, como protozoos, bacterias y virus, cuya movilidad es elevada. Esto último dificulta enormemente los procedimientos, haciendo deseable la existencia de herramientas capaces de ubicar a los microorganismos en posiciones fijas.

Con este fin se han desarrollado diferentes técnicas que van desde la simple utilización de sustancias químicas como el formol, hasta el empleo de circuitos integrados basados en el control de campos eléctricos, campos magnéticos, fuerzas ópticas, hidrodinámicas y gravitatorias (Fuhr *et al.*, 1994; Choi *et al.*, 1999; Nishioka *et al.*, 1997; Gale *et al.*, 1998).

Aparte de ser técnicas sofisticadas y en algunos casos de carácter experimental, muchas de ellas pueden causar alteraciones irreversibles en los microorganismos bajo estudio (Berns, 1998; Neuman *et al.*, 1999), lo cual impide la utilización de la misma muestra en ensayos posteriores. Lo anterior justifica el estudio de alternativas novedosas y de bajo costo, que permitan la manipulación de organismos microscópicos en forma sencilla y eficiente.

Una opción tecnológica interesante es la aplicación del ultrasonido como fuerza básica de actuación en el proceso de manipulación (Black *et al.*, 1999), cuya principal ventaja es la de permitir el estudio de muestras con valores altos de conductividad, tales como los existentes en los medios de cultivo celular. A pesar de que el ultrasonido es muy utilizado en sensores para el control de procesos industriales, en biotecnología y para la obtención de imágenes médicas (Hauptmann *et al.*, 2002; Bakkali *et al.*, 2001), en la literatura existen pocas referencias a los manipuladores ultrasónicos (Saito *et al.*, 2002), y éstas normalmente implican la concentración o separación de mezclas de partículas artificiales (Coakley, 1997; Meng *et al.*, 1999). Es así como en la investigación se planteó la exploración de las posibilidades del ultrasonido como un mecanismo para facilitar el manejo y la observación de microorganismos.

En el presente reporte se ilustran los efectos producidos por la interacción entre los protozoos existentes en el agua y microburbujas de aire, cuando son sometidos a un campo ultrasónico. Estos efectos podrían servir como el principio de actuación de un dispositivo capaz de atrapar, retener y liberar microorganismos de gran movilidad, sin causarles ningún daño aparente. Las microburbujas se originan por electrólisis a través de una rejilla de electrodos diseñados para tal fin, mientras que el ultrasonido es generado mediante un transductor piezoeléctrico. Como microorganismos se emplearon protozoos presentes en agua estancada, y su observación se realizó directamente por medio de un estereomicroscopio metalográfico.

MATERIALES Y MÉTODOS

Para el desarrollo de los experimentos fue necesario fabricar una "cámara ultrasónica", es decir, un receptáculo capaz de contener la muestra bajo estudio y en el cual se halla convenientemente dispuesto el transductor piezoeléctrico para generar el ultrasonido. Así mismo fue necesario implementar un oscilador electrónico capaz de producir frecuencias superiores a 20 kHz, cuya señal de salida, una vez amplificada, sirve como señal de alimentación para el transductor piezoeléctrico. Una vez implementado el dispositivo transductor, se estableció el protocolo a seguir durante los ensayos. Estos elementos se describen brevemente en los siguientes apartados.

Cámara ultrasónica

Tal y como se ilustra en la figura 1, la cámara de transducción está constituida por un piezobuzzer, una rejilla de electrodos, un portaobjetos, agujas hipodérmicas y una base plástica, adheridos entre sí con silicona líquida.

A continuación se describe la función de cada uno de los componentes de la cámara:

Piezobuzzer. Nombre comercial para un transductor de ultrasonido. Este dispositivo electrónico consta de un cristal piezoeléctrico y dos electrodos, que se utiliza especialmente para la conversión de energía eléctrica en vibraciones mecánicas, cuya frecuencia es igual a la frecuencia de la señal eléctrica que lo alimenta.

Rejilla de electrodos. La rejilla está elaborada con alambres de cobre de 0.12 mm de diámetro y cuya

distancia de separación varía entre 0.5 y 2 mm, dependiendo del voltaje aplicado. Su función es la de producir microburbujas dentro del líquido, aprovechando para ello el fenómeno de la electrólisis.

lla descargado, por lo que el cuarto terminal de la compuerta está conectado directamente a tierra (0 lógico), forzando su salida a un 1 lógico. El condensador comenzará a cargarse por medio de la resistencia R1 a un voltaje de 5V, es decir, que conmuta de bajo a alto. En el momento en que supera su voltaje de umbral de subida, la salida del inversor cambia a un 0 lógico. El condensador comenzará a descargarse a través de la resistencia R1, pasando de alto a bajo. Cuando pase el voltaje de umbral de bajada, la salida del inversor cambiará a un 1 lógico, repitiéndose el ciclo ya descrito.

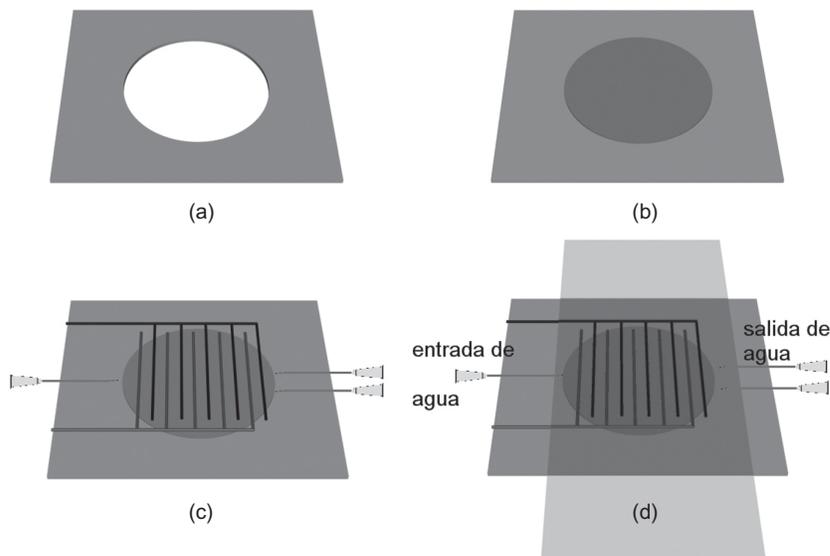


Figura 1. Secuencia del montaje de la cámara ultrasónica. (a) Base plástica, (b) Piezo-buzzer, (c) Rejilla de electrodos y agujas hipodérmicas, (d) Portaobjetos.

La salida de la primera compuerta NAND es conectada a las cuatro entradas de la segunda compuerta NAND, con el objeto de mejorar la señal, obteniéndose una onda cuadrada de 0 a 5V, cuya frecuencia puede cambiar entre 15 kHz y 1 MHz, a libre albedrío dependiendo del valor de la resistencia variable.

Otros componentes son: *Los portaobjetos* son elementos de vidrio utilizados para cubrir el área del transductor mientras se realiza la observación directa del proceso. *Las agujas hipodérmicas* son elementos utilizados para permitir el flujo de líquido en el interior del transductor. *La base plástica* es utilizada para sujetar toda la estructura, aislando la conexión eléctrica del agua, y permitiendo la libre vibración del piezobuzzer para producir el ultrasonido. Sus dimensiones varían en función del tamaño del piezoeléctrico.

Para amplificar la onda cuadrada se conecta la salida de la segunda compuerta NAND a la base de un transistor 2N3904, en saturación o corte dependiendo de la señal aplicada en la base. Finalmente, el transductor es conectado entre el colector y el emisor del transistor. Cuando el transistor está en corte, el piezoeléctrico se cargará a un voltaje de 12V (fuente de alimentación 2) a través de la resistencia R2, y cuando el transistor se encuentra en saturación, el piezoeléctrico se descargará a través del transistor.

Circuito oscilador

El desarrollo del oscilador se basó en el empleo de un circuito integrado 74LS13, constituido por dos compuertas NAND Schmitt Trigger, y el uso de un transistor de baja potencia 2N3904 como se muestra en la figura 2.

A continuación se describe el funcionamiento del circuito. Se cortocircuitan tres de las cuatro entradas de la primera compuerta NAND y se conectan a un voltaje DC de 5V (1 lógico). En el instante t_0 el condensador C1 se ha-

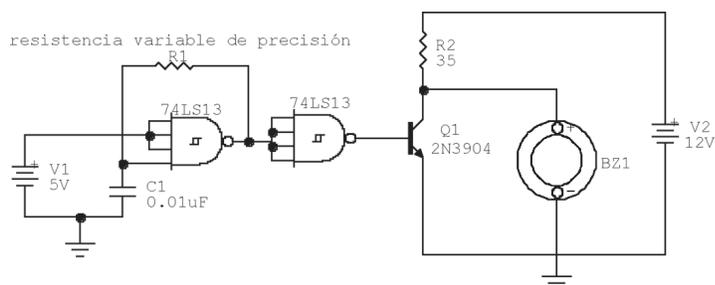


Figura 2. Circuito oscilador que alimenta al transductor piezoeléctrico.

Debido a que la señal eléctrica con que se alimenta el cristal piezoeléctrico es cuadrada, éste se deformará produciendo ultrasonido con una frecuencia similar a la de la señal de alimentación.

Los microorganismos

Los experimentos se realizaron con microorganismos presentes en agua estancada. En el agua se encuentran diversas clases de microbios tales como: bacterias, algas, protozoos y rotíferos cuyo tamaño oscila entre 1 y 100 μm y su densidad es aproximadamente igual a la del agua.

Las muestras empleadas en el presente trabajo contenían diversos tipos de protozoos tales como: *Coleps hirtus*, *Tetrahymena* sp, *Euplotes aediculatos* y *Colurella* sp. Sin embargo, se observó que el microorganismo que predomina es el *Paramecium caudatum*, un protozoo ciliado que se alimenta de bacterias y habita aguas dulces con elevada carga nutritiva (Porras *et al.*, 2003).

Protocolo experimental

Una vez fabricada la cámara, se llevan a cabo los siguientes pasos:

A través de la aguja hipodérmica de entrada se introduce agua pura a la cavidad interior de la cámara transductora, donde se encuentran ubicados los electrodos. Se aplica una tensión continua de 12 V_{DC} a los electrodos, polarizándolos en un sentido y luego en el otro durante un tiempo no superior a 1 segundo. De esta manera se induce la electrólisis para generar las microburbujas. Se retira la alimentación de los electrodos. Luego se introduce agua contaminada con protozoos a la cavidad interior de la cámara transductora. Se activa el cristal piezoeléctrico a través del oscilador, y se realiza un barrido de frecuencia. Las frecuencias de resonancia para las burbujas se determinan mediante la observación, a través del microscopio, de los fenómenos que ocurren en la muestra. Se desarrollan pruebas repetitivas con las frecuencias encontradas. Finalmente se analizan los resultados obtenidos.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El primer resultado experimental es la obtención de las microburbujas de aire sobre los electrodos. La rejilla de electrodos se puede alimentar con voltajes

que van de 3 a 12 voltios, cuya polaridad se varía alternadamente. La polarización positiva se mantiene durante un segundo, con el fin de producir microburbujas en la superficie de los electrodos alimentados negativamente. Luego se invierte la polarización durante un intervalo no superior a un segundo, con el fin de producir microburbujas en los electrodos restantes (ver figura 3). La razón por la cual el periodo de electrólisis es tan corto radica en que a mayor tiempo, no sólo aumenta el número de microburbujas dificultando la observación, sino que también su tamaño se hace exagerado, y no apto para la manipulación de los microorganismos. De esta manera se producen microburbujas con radios que oscilan entre 30 y 120 μm .



Figura 3. Fotografía de las microburbujas formadas sobre la rejilla de electrodos en la cámara ultrasónica.

Una vez generadas las microburbujas, se procedió a determinar sus frecuencias de resonancia, realizando para ello un barrido entre 15 kHz y 1 MHz; este último es el máximo permitido por el circuito oscilador. Las frecuencias de resonancia más relevantes fueron: 47.6, 52.6, 67.8 y 125 kHz.

Las frecuencias de resonancia encontradas cumplen la ecuación de Minneart (Kajiyama *et al.*, 1999):

$$f_{res} * r = 332 \quad [\text{Hz} * \text{cm}] \quad (1)$$

donde f_{res} es la frecuencia de resonancia para las microburbujas y r es el radio de las mismas. Por tanto, para las frecuencias más relevantes: 47.6, 52.6, 67.8 y 125 kHz, corresponden radios de 69.75, 63.12, 48.97 y 26.56 μm , respectivamente.

Una vez están disponibles las microburbujas con tamaño comparable al de los microorganismos, se aplica la señal ultrasónica a alguna de las frecuencias de resonancia. En la figura 4 se muestra una secuencia de imágenes que ilustran el proceso de atrapado y liberación de protozoos (*Coleps hirtus* y *Paramecium caudatum*) en la medida en que se aplica y retira el ultrasonido.

A las frecuencias de trabajo se observa que los microorganismos se adhieren a la frontera de las burbujas, permaneciendo allí mientras se encuentra aplicado el campo ultrasónico. Una vez eliminado el ultrasonido, los protozoos recuperan su libertad de movimiento sin daño aparente. En ocasiones se observa que los microorganismos son repelidos y atraí-

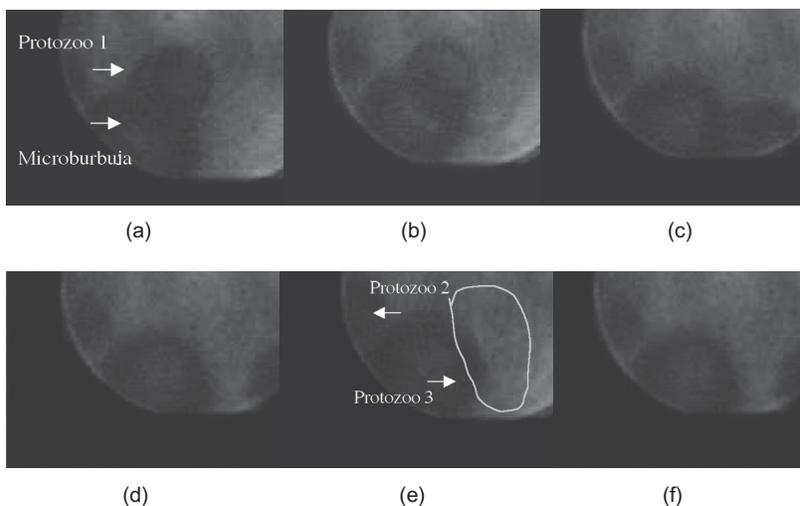


Figura 4. Secuencia de fotos que muestra la manipulación de protozoos. (a) El protozoo 1 se encuentra adherido a la microburbuja cuando hay presencia de ultrasonido. (b) Se suspende el ultrasonido. (c) El protozoo se aleja de la microburbuja. (d) Se aplica ultrasonido nuevamente. (e) Se adhieren dos protozoos de distinta especie. (f) Fotografía idéntica a (e), pero sin la demarcación del protozoo 3. Los protozoos 1 y 2 son *Coleps hirtus* y el protozoo 3 es *Paramecium caudatum*.

dos en forma repetitiva, sin causarles daño alguno. Estas ideas se ilustran esquemáticamente en la figura 5. Cabe decir que la potencia eficaz a la cual se genera ultrasonido es aproximadamente de 5.8 mW, lo cual implica que se trata de un método de bajo consumo energético.

Durante el desarrollo de los experimentos se observó además que no solamente son afectados

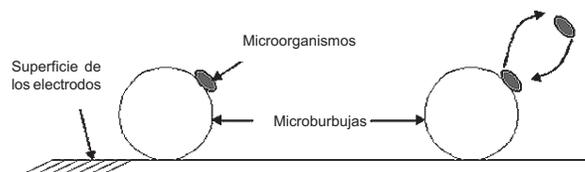


Figura 5. Esquema de la manipulación de los microorganismos por medio de ultrasonido.

los protozoos, sino que la manipulación también influye en otros elementos suspendidos en el agua (fragmentos de algas, arenas, protozoos muertos, etc.). Esto es importante ya que existe la posibilidad de aprovechar este fenómeno con el fin de desarrollar un equipo para la remoción de lodos de pequeño tamaño presentes en los ríos, lo cual se conoce como tratamiento terciario de aguas residuales.

CONCLUSIONES

El estado del arte del tema bajo análisis muestra que son muy pocos los trabajos y logros en este campo. El presente estudio explora y presenta resultados esperanzadores que permiten pensar en la utilización del ultrasonido como un nuevo mecanismo para la manipulación y el tratamiento de protozoos.

Durante el desarrollo de los experimentos se pudo observar el efecto de aplicar un campo ultrasónico a una muestra que incluye microorganismos y microburbujas generadas por electrólisis.

Es así como los protozoos se pueden atraer a la frontera de las microburbujas y mantener allí mientras se halle aplicado el ultrasonido. Una vez eliminado el campo sónico, los protozoos recobran su libertad de movimiento sin daño fisiológico aparente.

Con base en las anteriores observaciones se concluye que el ultrasonido tiene un potencial enorme para ser utilizado como principio básico de actuación en el diseño de dispositivos que permitan la manipulación de microorganismos presentes en el agua. Estos dispositivos son requeridos en análisis bacteriológicos y microbianos, e incluso podrían servir en procesos de purificación del agua.

Mediante la utilización de elementos electrónicos de fácil adquisición se demuestra la factibilidad de desarrollar transductores ultrasónicos, de bajo costo, para la manipulación, posicionamiento e incluso la eliminación de microorganismos en suspensiones acuosas.

Los resultados aquí expuestos permiten vislumbrar la aplicación del ultrasonido en otro tipo de suspensiones y con otra clase de microorganismos. Sin embargo, para poder utilizar esta técnica será necesario realizar experimentos previos que permitan determinar las alteraciones metabólicas y posibles efectos nocivos del ultrasonido sobre los microorganismos a estudiar.

AGRADECIMIENTOS

Los autores expresan su agradecimiento a la Dirección de Investigaciones (DIN) de la Universidad Pedagógica y Tecnológica de Colombia, por el apoyo brindado al desarrollo del trabajo, a través del proyecto interno con Código 9009.039.

BIBLIOGRAFÍA

- Bakkali, F.; Moudden, A.; Faiz, B.; Amghar, A.; Maze, G.; Montero de Espinosa, F.; Akhnak, M. 2001. Ultrasonic measurement of milk coagulation time. *Measurement Science and Technology* (12): 2154-2159.
- Berns, M. 1998. Tijeras y pinzas de laser. *Investigacion y ciencia*, junio de 1998: 40-45.
- Black, J.; White, R. 1999. Microfluidic applications of ultrasonic flexural plate waves. *Transducers '99*. Sendai, Japón. 1134-1137.
- Choi, J-W.; Bhansali, S.; Ahn, C.; Thurman, H. 1999. A new magnetic bead-based filterless bio-separator for integrated bio-molecule detection systems. The 13th European Conference on Solid-State Transducers Eurosensors XIII. The Hague. *The Netherlands*. 363 - 364.
- Coakley, W. T. 1997. Ultrasonic separations in analytical biotechnology. *Trends in Biotechnology* (15): 506 - 511.
- Fuhr, G.; Müller, T.; Schnelle, T.; Hagedorn, R.; Voigt, A.; Fiedler, S. 1994. Radio-frequency microtools for particle and living cell manipulation. *Naturwissenschaften* (81): 528 - 535.
- Gale, B.; Caldwell, K.; Frazier, A. 1998. A micromachined electrical field-flow fractionation (μ -EFFF) system. *IEEE Transactions on Biomedical Engineering* (45): 1459-1469.
- Hauptmann, P.; Hoppe, N.; Püttmer, A. 2002. Application of ultrasonic sensors in the process industry. *Measurement Science and Technology* (13): R73-R83.
- Kajiyama, T.; Tomita, H.; Miyahara, Y. 1999. Manipulation Of Micro Air Bubbles In A Flow-Through Cell Using Ultrasonic Standing Wave. *Transducers '99*. Sendai. Japón. 764-767.
- Meng, A. H.; Wang, A. W.; White, R. M. 1999. Ultrasonic sample concentration for microfluidic systems. *Transducers'99*. Sendai, Japan. 876-879.
- Neuman, K.; Chadd, E.; Liou, G.; Bergman, K.; Bock, S. 1999. Characterization of photodamage to *Escherichia coli* in optical traps. *Biophysical Journal* (77): 2856-2863.
- Nishioka, M.; Katsura, S.; Hirano, K.; Mizuno, A. 1997. Evaluations of cell characteristics by step-wise orientational rotation using optoelectrostatic micromanipulation. *IEEE Transactions on Industry Applications* (33): 1381-1388.
- Porras, Y.; Pedraza, O. 2003. Diseño y cálculo de un purificador bacteriológico de agua mediante ultrasonido. Duitama, Colombia. Proyecto de grado Ing. Electromecánica. Universidad Pedagógica y Tecnológica de Colombia.
- Saito, M.; Kitamura, N.; Terauchi, M. 2002. Ultrasonic manipulation of locomotive microorganisms and evaluation of their activity. *Journal of Applied Physics* (92): 7581-7586.