

Biofotônica aplicada ao controle ambiental

Foto: Antoninho Perri

Método detecta contaminação fecal e acompanha crescimento de coliformes

JEVERSON BARBIERI

jeverson@unicamp.br

Estudo conduzido na Faculdade de Engenharia Agrícola (Feagri) em parceria com a Faculdade de Tecnologia (FT), de Limeira, ambas da Unicamp, permitiu ao tecnólogo em saneamento ambiental Samuel Santos desenvolver um método capaz de detectar contaminação fecal e acompanhar o crescimento de coliformes em meio nutritivo, em tempo real, em amostras de água. O método utiliza os conceitos da biofotônica, com medidas da emissão espontânea de luz por seres vivos.

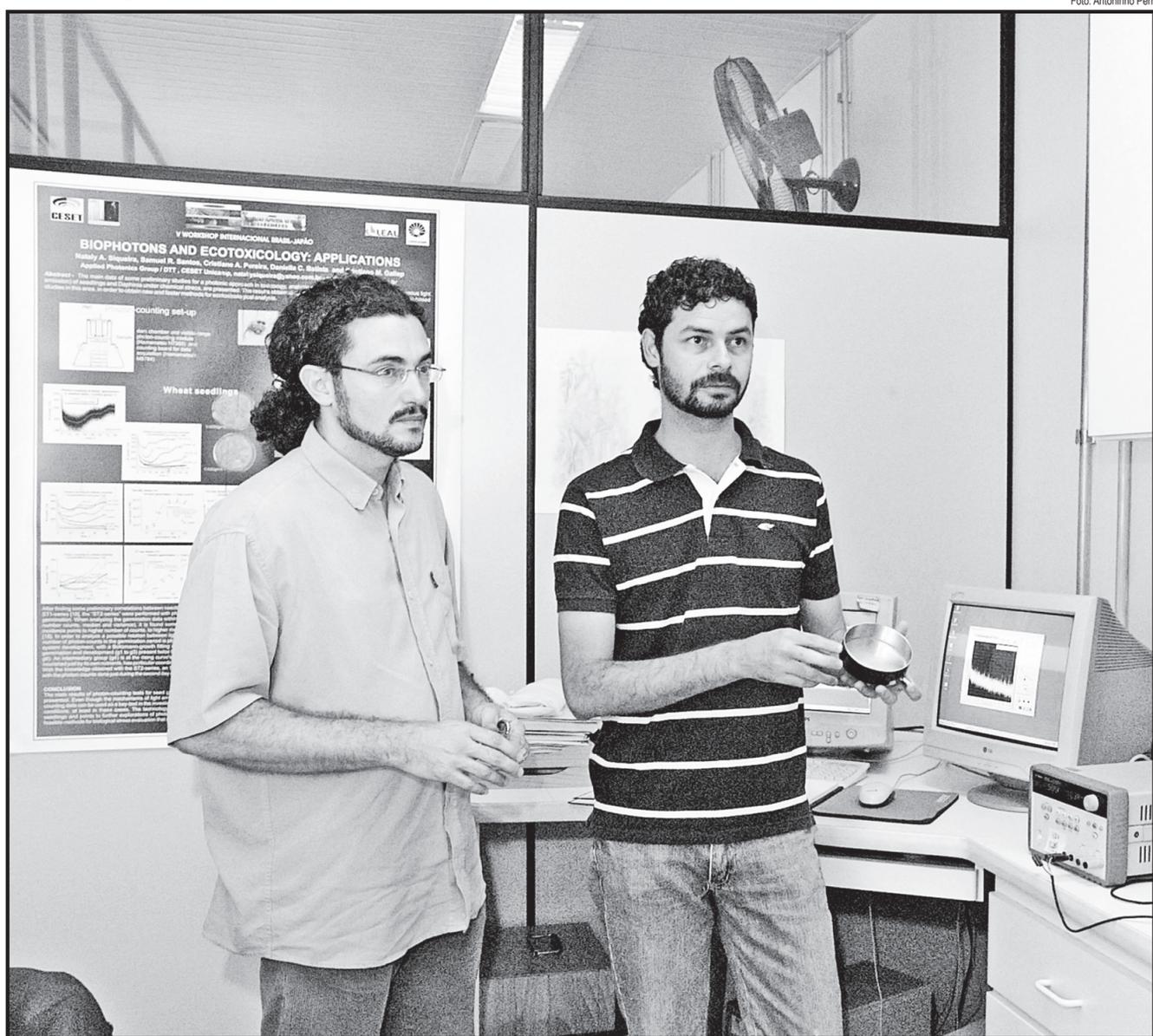
O termo biofóton é usado para denotar a emissão espontânea de fótons provenientes de todos os sistemas vivos com comprimentos de onda variando de 260 a 800 nm e intimamente relacionados com as condições metabólicas dos organismos. Os biofótons se relacionam também com a luminescência retardada (*delayed luminescence*), que reflete o comportamento do sistema biológico em termos da re-emissão de luz ultravioleta após a excitação por fonte luminosa. Esta emissão espontânea de fótons é influenciada pela temperatura e pelas funções biológicas como a permeabilidade seletiva da membrana celular e as reações bioquímicas refletindo diretamente no comportamento biofotônico.

A partir da construção de dois protótipos – câmaras escuras acopladas à válvulas foto-multiplicadoras (sensor capaz de contar fótons de luz no espectro visível) – foram feitas medidas de emissão espontânea nas amostras estudadas. A partir do momento que se iniciam as medidas de foto-emissão na amostra, dados significativos já começam a aparecer nas primeiras seis horas, em contraste às 24 horas dos testes-padrão atuais para detecção e quantificação da presença/ausência de coliformes. Essa redução de tempo, de acordo com o coordenador do Laboratório de Fotônica Aplicada (LaFA) da FT, professor Cristiano de Mello Gallep, implica numa rapidez de tomada de decisão a respeito do tipo de tratamento de um efluente, além da diminuição da quantidade de material utilizado e de pessoal envolvido. O trabalho de Santos resultou na sua dissertação de mestrado orientada pelo professor José Euclides Stipp Paterniani, da Feagri.

Em outra frente de trabalho do grupo, encabeçada pelo aluno Thiago Moraes, como explicou Gallep, são usadas medidas de emissão espontânea em testes de germinação de trigo. Aqui também a ideia é reduzir a quantidade de material e fazer uma análise semi-objetiva que, comparada com ensaios controle, torna possível detectar se uma solução é mais ou menos estressante.

Basicamente, o que é feito é a colocação de amostra biológica dentro da câmara para medir sua emissão espontânea de luz. “Dessa maneira foi possível estudar a relação das condições de germinação com a intensidade dessa emissão, e também com os períodos, os ritmos naturais envolvidos”, disse Gallep. Para as sementes, foi possível observar crescimento com períodos de 6, 12 e 24 horas, e também como esses ciclos se modificam quando há estresse, tanto na utilização de soluções de esgoto ou produzidas em laboratório, como, por exemplo, sais de metais pesados.

Santos contou que, para a pesquisa do seu mestrado, foram feitos ensaios com três meios de cultura. O primeiro, que é conhecido como meio P/A (presença/ausência); o segundo, substrato



O professor Cristiano de Mello Gallep (à esq.), coordenador, e Samuel Santos, autor da dissertação: ensaios com amostras reais

cromogênico – disponível e encontrado no mercado, muito simples de ser usado; e o terceiro é o meio EC, específico para crescimento de *E. coli*, uma bactéria que é indicadora de poluição por contaminação fecal. A ideia desenvolvida foi correlacionar as medidas biofotônicas com o crescimento dessa bactéria.

Com uma cepa fornecida pelo Instituto de Biologia (IB) da Unicamp, foram feitos ensaios controle positivo e negativo e, depois, ensaios com amostras reais, coletadas na estação de tratamento de esgoto da Feagri. Os resultados finais demonstraram que o crescimento dos coliformes pode ser acompanhado por emissão de luz. Com isso, pode-se correlacionar também com a qualidade do tratamento de esgoto: à medida que há redução da quantidade de coliformes, os patamares de emissão de luzes começam a variar, e isso pode ser acompanhado em tempo real.

Alguns meios de cultura utilizados atualmente, seja para a análise de presença/ausência ou a quantificação de coliformes, levam em conta características como, por exemplo, a acidificação, mudança de cor, fermentação e formação de gás. Essas características só podem ser confirmadas depois de pelo menos 12 horas de ensaio. O intuito do mestrado foi conseguir acompanhar, via ensaios biofotônicos, as correlações com essas características do crescimento e desenvolvimento bacteriano. Uma vez que se sabe que todo ser vivo emite luz, e essa luz está intimamente relacionada com o seu metabolismo, à medida que se incuba uma amostra de água num meio nutritivo para crescimento de bactérias é possível acompanhar o seu crescimento através da emissão de luz. Foi possível mostrar que o crescimento de micro-organismos típicos de efluentes sanitários, quando incubados em meios de cultura utilizados tradicionalmente nos laboratórios de microbiologia e estação de tratamento de água, pode ser acompanhado em tempo real via detecção de luz ultra-fracas, não havendo, portanto, a necessidade de se esperar 24 horas para saber se há coliformes numa amostra de água.

Órgãos

Na avaliação de Santos, principalmente os órgãos de controle ambiental se

interessariam no desenvolvimento dessa técnica. No caso das sementes, outra aplicação é a avaliação de fertilizantes ou mesmo reutilização de resíduos do tratamento de esgoto com esse fim, facilitando o estudo da melhor diluição de modo a não estressar as plantas. É necessário encontrar uma relação entre a utilização do composto e o crescimento do vegetal, de modo a não estressar as plantas. Os resultados da iniciação científica do Samuel mostraram que uma solução de esgoto de 5% a 10% é adubo, porém depois disso ela se torna mais deletéria do que fertilizante.

Aplicações de técnicas biofotônicas podem ser de grande utilidade no estudo da aplicação de resíduos urbanos na agricultura e no monitoramento ambiental ambiental, como no tratamento de resíduos pelas próprias indústrias. Existe uma demanda para que as indústrias tenham seu próprio controle de resíduos, de forma que o governo não precisaria ficar fiscalizando a qualidade de efluentes continuamente. Atualmente, por causa dos custos envolvidos, isso ainda não é realidade. “Se conseguirmos desenvolver uma técnica barata e rápida, que a empresa possa aplicar diariamente, sem dúvida facilitaria a expansão dos usos dos procedimentos de controle necessários”, acrescentou o coordenador.

Sobre os protótipos, Gallep esclareceu que existem alguns modelos comerciais, porém com alto custo. “O nosso protótipo é genérico e bem grande; porém, o próximo a ser construído deverá ser menor e mais dedicado aos tipos de experimentos desenvolvidos pelo grupo”, disse. O objetivo é, também, comprar um modelo japonês desenvolvido para controle ambiental utilizando algas como organismo-teste. Nesse equipamento, cujo procedimento utiliza excitação prévia com fonte luminosa externa, o teste dura poucos segundos e consegue detectar a ação deletéria de vários estressantes químicos presentes na água. A ideia é ter um equipamento portátil, para ser levado a campo para coletar amostras e ter os resultados *in-loco*. O gargalo dessa aquisição está no valor do equipamento. “Enquanto os japoneses cobram US\$ 35 mil por um modelo, gastamos cerca de US\$ 12 mil para a construção dos nossos dois protótipos”, afirmou.

Já pensando no doutorado, Santos revelou que o trabalho rumo agora para área aplicada à parasitologia ambiental. A portaria 518 do Ministério da Saúde (MS) apresenta um parágrafo que versa sobre a verificação da presença de cistos e oocistos de protozoários em estações de tratamento de água, mais especificamente oocistos de *Cryptosporidium* e cistos *Giardia*, que são considerados hoje micro-organismos emergentes. Só que um dos problemas é sobre a sua detecção.

Atualmente, as técnicas disponíveis para detectar esses organismos se valem da isolamento destes parasitos em amostras por processos físico-químicos e, com o uso de anticorpos monoclonais, a quantificação é efetuada com uso de microscopia de fluorescência que inclui como etapa do processo a visualização dos cistos e oocistos através da reação de imunofluorescência direta. Trata-se um processo demorado, extremamente caro e que não detecta a infectividade do parasito. Detecta-se apenas a presença deste numa amostra, porém, sem saber se ele está infectante.

Atualmente, um dos métodos utilizados para testes de infectividade, é a incubação em hospedeiros – modelos animais – como o camundongo. Desde a coleta no manancial até a etapa de isolamento e confirmação de infectividade, o período de observação pode chegar a semanas. A ideia do doutorado é eliminar a etapa de administração em camundongo, porque a partir do momento que se sabe que há correlação entre emissão de luz e metabolismo é possível inferir que esse protozoário detectado esteja metabolicamente ativo. Portanto, existe a probabilidade de estar infectante, mas que do ponto de vista sanitário, um micro-organismo patogênico capaz de comprometer a saúde pública, estando metabolicamente ativo há a necessidade de eliminá-lo com o uso de técnicas de desinfecção.

Publicação

Dissertação de mestrado “Biofotônica Aplicada ao Monitoramento Microbiológico de Efluentes Sanitários”
Autor: Samuel Ricardo dos Santos
Orientador: José Euclides Stipp Paterniani
Coorientador: Cristiano de Mello Gallep
Unidade: Faculdade de Engenharia Agrícola (Feagri)
Fonte de financiamento: CNPq