

**AVALIAÇÃO DA MUTAGENICIDADE DE CULTURAS DA ALGA
Cylindrospermopsis raciborskii ISOLADAS
DO RESERVATÓRIO BILLINGS**

Nancy de Castro Stoppe⁽¹⁾

Bióloga pela Univ. de São Paulo. Mestre em Ciências Biológicas (Genética) pela Univ. Estadual de Campinas. Bióloga do Setor de Mutagênese e Citotoxicidade da Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental-CETESB desde 1989.

Maria Inês Zanoli Sato

Biomédica pela Escola Paulista de Medicina. Mestre em Microbiologia pela Escola Paulista de Medicina. Doutora em Microbiologia pela Univ. de São Paulo. Biomédica da CETESB (1978-1984). Gerente do Setor de Microbiologia da CETESB (1984-1996). Gerente da Divisão de Análises Microbiológicas Ambientais da CETESB desde 1996.



Gisela de Aragão Umbuzeiro

Bióloga pela Univ. Estadual de Campinas. Mestre e Doutora em Ciências Biológicas (Genética) pela Univ. Estadual de Campinas. Bióloga da CETESB (1986-1995). Gerente do Setor de Mutagênese e Citotoxicidade da CETESB desde 1995.

Endereço⁽¹⁾: Av. Prof. Frederico Hermann Junior, 345 - Pinheiros - São Paulo - SP - CEP: 05489-900 - Brasil - Tel: (011) 3030-6532 - e-mail: nancys@cetesb.br

RESUMO

O monitoramento da qualidade das águas do Reservatório Billings iniciou-se em 1975 e nos últimos dez anos vários estudos têm sido realizados para avaliação da degradação do ecossistema aquático, visando obter respostas relativas a qualidade e quantidade dessas águas no que refere a seus múltiplos usos, principalmente o abastecimento público. O Braço do Taquacetuba, hoje, tem recebido atenção especial em decorrência da possibilidade de transposição de suas águas para o Reservatório Guarapiranga e também sua captação para abastecimento público. Estudos recentes demonstraram a presença de atividade mutagênica nas águas deste Braço e seus tributários. Durante esse evento detectou-se também a presença de toxicidade crônica e alteração da composição fitoplanctônica com predominância de cianofíceas, tendo sido isoladas espécies consideradas tóxicas ou potencialmente tóxicas.

Suspeitou-se que a toxina ou metabólitos de uma das espécies de algas isoladas, a *Cylindrospermopsis raciborskii*, pudessem ser responsáveis pela mutagenicidade observada. Para avaliar essa hipótese, culturas das algas produtoras de toxina foram testadas quanto a mutagenicidade sob duas condições. Os resultados obtidos mostraram respostas negativas, sugerindo que a mutagenicidade observada nas amostras de água do Braço Taquacetuba e seus formadores não pode ser atribuída à presença desta alga e portanto, análises químicas

complementares seriam necessárias para identificação dos compostos responsáveis pela atividade mutagênica.

PALAVRAS-CHAVE: Saúde Pública, Mananciais, Mutagenicidade, Algas Tóxicas.
INTRODUÇÃO

A represa Billings possui uma área de aproximadamente 127 Km² e foi construída na década de 20 com o intuito de gerar energia para a Usina Elétrica Henry Borden em Cubatão. Este reservatório está localizado na região sudeste da cidade de São Paulo (23°42' e 23°45' S; 46°27' e 46°22' W) e retém o maior volume de água armazenado na Região Metropolitana de São Paulo tendo uma bacia de drenagem de 560 Km² e capacidade máxima de armazenamento de 1,2 bilhões de metros cúbicos. É formado por um canal principal e vários braços (Bororé, Capivari, Cocaia, Pedra Branca, Rio Grande, Rio das Pedras, Rio Pequeno e Taquacetuba) (6,14).

O monitoramento da qualidade das águas do Reservatório Billings iniciou-se em 1975 e nos últimos dez anos uma série de estudos tem sido realizados para avaliação da degradação do ecossistema aquático e impacto de contaminantes orgânicos e inorgânicos nesse reservatório, visando obter respostas relativas a qualidade e quantidade dessas águas no que refere a seus múltiplos usos, e principalmente ao seu uso mais nobre que é o abastecimento público. A deterioração do reservatório acentuou-se na década de 50 com o recebimento de esgotos da Grande São Paulo. Atualmente a captação de água para abastecimento público é realizada através do braço do rio Grande, isolado do corpo da represa desde 1981, onde se localiza a Estação de Tratamento de Água Rio Grande e abastece a região industrial de Santo André, São Caetano do Sul, São Bernardo do Campo, Ribeirão Pires e Rio Grande da Serra.

Devido ao aumento da demanda de água na Região Metropolitana de São Paulo e a escassez de mananciais foi levantado o papel do reservatório Billings como reserva estratégica. O Braço do Taquacetuba, hoje, tem recebido atenção especial em decorrência da possibilidade de transposição de suas águas para o Reservatório Guarapiranga e também sua captação para abastecimento público.

Estudos recentes demonstraram a presença de atividade mutagênica nas águas do Braço do Taquacetuba e seus tributários, detectada através de bioensaios de mutagenicidade com microrganismos. Durante esse evento detectou-se também a presença de toxicidade crônica e alteração da composição fitoplanctônica com predominância de cianofíceas, tendo sido isoladas espécies consideradas tóxicas ou potencialmente tóxicas, como *Anabaena solitaria*, *Cylindrospermopsis raciborskii*, *Limnothrix* sp., *Microcystis* sp e *Pseudoanabaena muciola*.

Os ensaios de mutagenicidade de curta duração podem auxiliar na indicação da presença de substâncias químicas potencialmente nocivas à saúde pública e ao ecossistema aquático. Estes bioensaios são capazes de detectar compostos químicos que lesam o material genético das células, provocando mutações que podem levar ao aumento de

incidência de câncer ou doenças hereditárias nas populações expostas. Dentre esses bioensaios, o teste de Ames é o mais comumente utilizado na detecção dos compostos com atividade mutagênica presentes em amostras ambientais, sendo hoje reconhecido pelas principais agências de controle ambiental do mundo. Este ensaio tem se mostrado muito útil, não só em estudos de monitoramento de qualidade ambiental, como também na localização de fontes potenciais de poluição. Baseia-se na capacidade desses compostos de induzir mutações no genoma de linhagens da bactéria *Salmonella typhimurium*, o que leva à reversão da mutação *his⁻* para *his⁺*, possibilitando o crescimento dos mutantes em meio mínimo. Este ensaio apresenta como vantagens: facilidade de execução, boa sensibilidade e relativo baixo custo (2, 11).

Desde 1980, a CETESB vem empregando o teste de Ames para avaliação da mutagenicidade de amostras ambientais, tendo sido realizada uma ampla caracterização em corpos d'água do Estado de São Paulo (5, 18).

Das espécies de algas isoladas, a *Cylindrospermopsis raciborskii* tem recebido especial atenção, tendo sido associada a um surto de hepatoenterite ocorrido na Austrália. A atividade hepatotóxica da toxina produzida por esta alga foi confirmada em diversos estudos na literatura mundial (1, 7, 8, 13).

Cylindrospermopsis raciborskii foi isolada do braço Taquacetuba e duas linhagens da espécie foram cultivadas em laboratório. Constatou-se que eram produtoras de toxinas, mas não hepatotoxinas, tendo sido identificadas como produtoras de neurotoxinas do tipo PSP ("paralytic shellfish poison"), considerada extremamente potente (10).

Devido a presença de atividade mutagênica nas águas do Braço Taquacetuba do Reservatório Billings, detectada através do teste de Ames e a ocorrência de algas da espécie *Cylindrospermopsis raciborskii* no período estudado, suspeitou-se que a toxina ou metabólitos desta alga pudessem ser responsáveis pela mutagenicidade observada.

Para avaliar essa hipótese, as duas culturas produtoras de toxina foram analisadas frente ao teste de Ames e foram testadas sob duas condições com a linhagem TA98 de *Salmonella typhimurium* com e sem ativação metabólica.

MATERIAIS E MÉTODOS

Culturas da alga *Cylindrospermopsis raciborskii*

As culturas de algas de *Cylindrospermopsis raciborskii* foram isoladas do reservatório Billings e cultivadas em laboratório pelo Setor de Ictiologia e Bioensaios com Organismos Aquáticos da CETESB. Das culturas isoladas do braço Taquacetuba, duas linhagens da espécie *Cylindrospermopsis raciborskii* foram identificadas como produtoras de neurotoxinas do tipo PSP ("paralytic shellfish poison"), e foram denominadas de T2 e T3. Culturas dessas linhagens foram ressuspensas em solução fisiológica em concentrações de 2mg/mL que foram testadas frente ao teste de Ames após extração aquosa e extração orgânica.

Extratos aquosos das culturas da alga *Cylindrospermopsis Raciborskii*

As culturas de algas T2 e T3 foram ultrasonicadas, por 10 minutos, separadamente, em solução fisiológica e posteriormente esterilizadas por filtração consecutiva através de membranas de acetato de celulose 0,45 e 0,22 μm (3) e testadas frente ao teste de Ames.

Extração orgânica de água ultra-pura contaminada com culturas da alga *Cylindrospermopsis Raciborskii*

Água ultra-pura foi contaminada, separadamente, com as culturas de algas T2 e T3 em concentrações equivalentes às encontradas na represa Billings na época do evento e submetidos à extração orgânica, segundo a mesma metodologia utilizada nas amostras de água da referida represa que apresentaram atividade mutagênica. Volumes de 10L dessas amostras de água foram submetidas a extração orgânica neutro/básica e ácida em resina adsorvente XAD₂ e eluídas com metanol/diclorometano e acetato de etila, respectivamente. Os extratos obtidos foram concentrados em evaporador rotatório, secos completamente em nitrogênio gasoso, ressuspensos em dimetilsulfóxido (14) e testados frente ao teste de Ames.

Teste de Ames

Para a realização do teste de Ames, foi utilizada a metodologia de incorporação em placas descrita por MARON & AMES (11) e CETESB (2), com a linhagem TA98 de *Salmonella typhimurium* na ausência e presença de sistema de metabolização enzimática, utilizando-se microsomas de células de fígado de rato induzidos com Aroclor 1254 (mistura S9). Doses crescentes dos extratos (aquosos ou orgânicos) são misturados a culturas bacterianas crescidas pernoite e a mistura S9 (adicionada somente quando o ensaio foi feito com ativação metabólica) em tubos contendo ágar de superfície fundido e estabilizado a 45°C. Após a homogeneização, a mistura foi vertida em placas de ágar mínimo. As placas foram incubadas a 37°C por 66h. A seguir, procedeu-se a contagem do número de colônias bacterianas (revertentes) crescidas nas placas de ágar mínimo. O número de revertentes é função da concentração e da potência dos agentes mutagênicos presentes na amostra examinada.

Tanto para os extratos aquosos como para os orgânicos, foram testadas 5 doses, em triplicata. Em cada ensaio, foram também realizados controles negativos e controles positivos, que contêm compostos químicos sabidamente mutagênicos. Para tanto, foram utilizados 0,25 µg de 4-nitroquinolina-1-óxido (4-NQO) por placa como controle positivo para os ensaios sem ativação metabólica e 2,5 µg de 2-amino-antraceno (2AA) por placa para os ensaios com ativação metabólica.

Para avaliação dos resultados, foi calculada a média de revertentes por placa de cada dose testada e a razão de mutagenicidade (RM) que é a razão da média dos revertentes na placa teste (revertentes espontâneos e induzidos) e a média de revertentes nas placas de controle negativo. Os resultados foram também submetidos a um programa estatístico (SALANAL) que realiza cálculos de análises de variância entre as médias do número de revertentes nas diferentes doses testadas e o controle negativo, seguido de uma regressão linear.

RESULTADOS

As tabelas 1 e 2 e a figura 1 apresentam os resultados obtidos com os extratos aquosos de *Cylindrospermopsis raciborskii* das culturas T2 e T3 e mostram a ausência de atividade mutagênica no teste de Ames frente a linhagem TA98 de *Salmonella typhimurium* na presença e ausência de ativação metabólica.

Tabela 1: Resultados do teste de Ames com o extrato aquoso da cultura T2 de *Cylindrospermopsis raciborskii* frente a linhagem TA98 de *Salmonella typhimurium* com e sem ativação metabólica (+S9 e -S9).

DOSE (μ g)	T2					
	-S9			+S9		
	Média	DP	RM	Média	DP	RM
Controle negativo	70,00	12,55	-	70,75	6,02	-
10	77,33	1,53	1,1	58,50	0,71	0,8
20	72,67	9,07	1,0	67,00	4,00	0,9
50	82,33	7,23	1,2	72,00	4,58	1,0
100	73,67	6,66	1,1	67,00	6,08	0,9
200	52,50	3,54	0,8	70,33	13,43	1,0
Controle positivo	785,50	47,38	11,2	1064,00	237,59	15,0
RESULTADO	NEGATIVO			NEGATIVO		

DP - desvio padrão

RM - razão de mutagenicidade - $RM \geq 2$ indica amostra com atividade mutagênica (positiva).

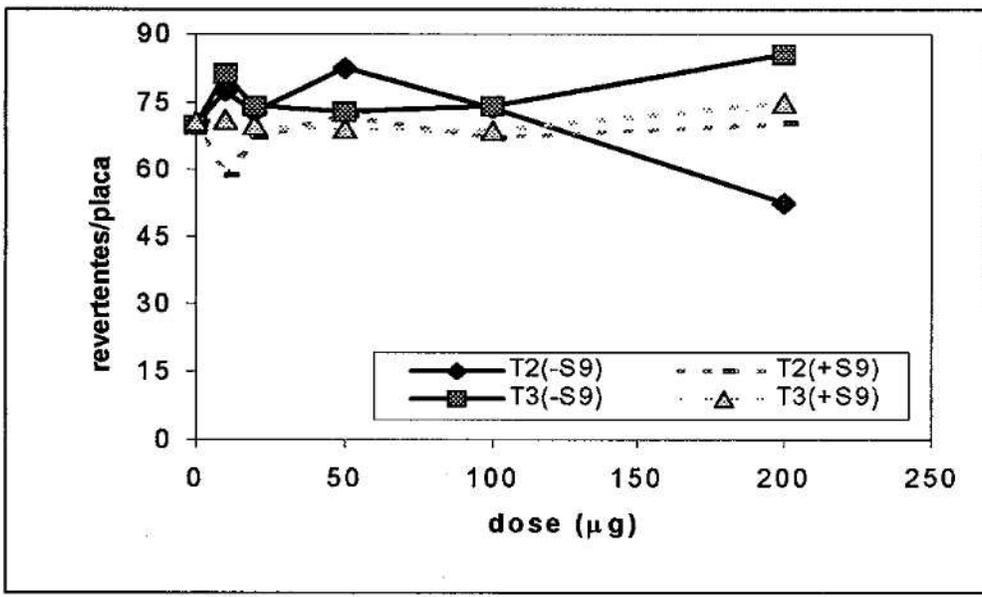
Tabela 2: Resultados do teste de Ames com o extrato aquoso da cultura T3 de *Cylindrospermopsis raciborskii* frente a linhagem TA98 de *Salmonella typhimurium* com e sem ativação metabólica (+S9 e -S9).

DOSE (mL)	T3					
	-S9			+S9		
	Média	DP	RM	Média	DP	RM
Controle negativo	70,00	12,55	-	70,75	6,02	-
10	81,33	4,04	1,2	71,00	12,73	1,0
20	74,00	15,56	1,1	70,00	2,83	1,0
50	73,00	9,85	1,0	69,00	5,00	1,0
100	74,00	11,31	1,1	68,67	5,69	1,0
200	85,50	6,36	1,2	75,00	6,24	1,1
Controle positivo	785,50	47,38	11,2	1064,00	237,59	15,0
RESULTADO	NEGATIVO			NEGATIVO		

DP - desvio padrão

RM - razão de mutagenicidade - $RM \geq 2$ indica amostra com atividade mutagênica (positiva).

Figura 1: Resultados do teste de Ames com os extratos aquosos T2 e T3 de *Cylindrospermopsis raciborskii* frente a linhagem TA98 de *Salmonella typhimurium* com e sem ativação metabólica (+S9 e -S9).



As tabelas 3 e 4 e a figura 2 apresentam os resultados obtidos com os extratos orgânicos da água contaminada com as culturas T2 e T3 de *Cylindrospermopsis raciborskii* e mostram a ausência de atividade mutagênica no teste de Ames frente a linhagem TA98 de *Salmonella typhimurium* na presença e ausência de ativação metabólica.

Tabela 3: Resultados do teste de Ames nos extratos orgânicos de água ultra-pura contaminada com a cultura T2 de *Cylindrospermopsis raciborskii* frente a linhagem TA98 de *Salmonella typhimurium* com e sem ativação metabólica.

DOSE (mL equiv.)	Água contaminada com T2					
	-S9			+S9		
	Média	DP	RM	Média	DP	RM
Controle negativo	37,60	3,21	-	38,60	4,34	-
25	30,00	4,36	0,8	39,33	11,06	1,0
50	33,67	8,50	0,9	35,67	2,52	0,9
100	30,33	6,43	0,8	33,00	1,41	0,9
150	30,33	10,02	0,8	28,67	6,03	0,7
200	27,33	4,04	0,7	35,00	16,09	0,9
Controle positivo	591,00	28,28	15,7	1085,00	178,89	28,1
RESULTADO	NEGATIVO			NEGATIVO		

DP - desvio padrão

RM - razão de mutagenicidade - RM ≥ 2 indica amostra com atividade mutagênica (positiva).

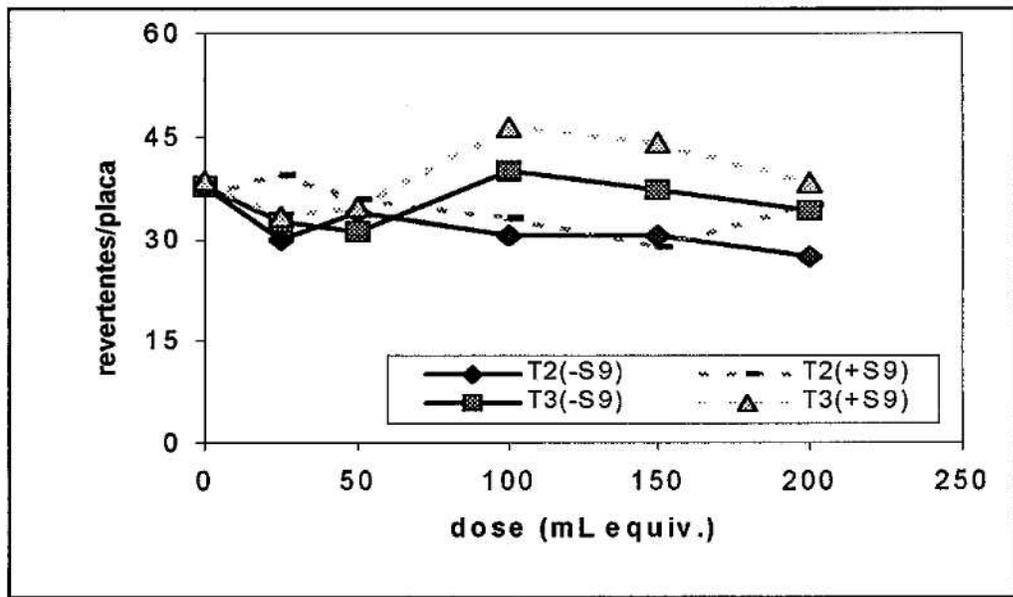
Tabela 4: Resultados do teste de Ames nos extratos orgânicos de água ultra-pura contaminada com a cultura T3 de *Cylindrospermopsis raciborskii* frente a linhagem TA98 de *Salmonella typhimurium* com e sem ativação metabólica.

DOSE (mL equiv.)	Água contaminada com T3					
	-S9			+S9		
	Média	DP	RM	Média	DP	RM
Controle negativo	37,60	3,21	-	38,60	4,34	-
25	32,33	5,69	0,9	33,33	4,16	0,9
50	31,00	9,54	0,8	34,67	4,04	0,9
100	40,00	7,21	1,1	46,33	1,15	1,2
150	37,00	1,00	1,0	44,00	10,58	1,1
200	34,00	3,61	0,9	38,33	6,11	1,0
Controle positivo	591,00	28,28	15,7	1085,00	178,89	28,1
RESULTADO	NEGATIVO			NEGATIVO		

DP - desvio padrão

RM - razão de mutagenicidade - $RM \geq 2$ indica amostra com atividade mutagênica (positiva).

Figura 2: Resultados do teste de Ames com os extratos orgânicos de água pura contaminada com as culturas T2 e T3 de *Cylindrospermopsis raciborskii* frente a linhagem TA98 de *Salmonella typhimurium* com e sem ativação metabólica (+S9 e -S9).



DISCUSSÃO E CONCLUSÕES

Os resultados obtidos mostraram que nem os extratos aquosos de *Cylindrospermopsis raciborskii* nem os extratos orgânicos de água ultra-pura contaminada com as culturas de algas apresentaram atividade mutagênica no teste de Ames frente a linhagem TA98

de *Salmonella typhimurium* na presença e ausência de ativação metabólica, nas doses testadas.

A presença de atividade mutagênica em amostras de águas superficiais já foi extensamente relatada na literatura, sendo que no Estado de São Paulo foi detectada em 11% de 155 amostras de corpos d'água durante uma caracterização realizada por um período de cinco anos. No período de outubro de 1992 a outubro de 1993, em um estudo de Avaliação do Complexo Billings foi detectada atividade mutagênica em 12% das amostras procedentes de água do canal principal e dos braços Rio Grande, Rio Pequeno e Taquacetuba (4, 5, 16, 18). A mutagenicidade detectada apresentou um perfil semelhante em termos de resposta mutagênica e foi classificada com potência baixa, segundo critérios estabelecidos por Houk (9), sendo também bastante semelhante à observada nas águas do Braço do Taquacetuba e seus tributários neste período.

A represa Billings apresentou uma floração da cianofícea *Cylindrospermopsis raciborskii* apenas no braço do rio Pequeno no período de novembro de 1992 a maio de 1993, tendo sido associada a dois casos de mortandade de peixes (4, 17). A presença de cianofíceas em represas está relacionada com ambientes eutrofizados. A alteração da composição fitoplanctônica no Braço do Taquacetuba e seus tributários é preocupante, devido a predominância de cianofíceas tóxicas ou potencialmente tóxicas.

Portanto, a presença de *Cylindrospermopsis raciborskii* na represa não explica os episódios de ocorrência de mutagenicidade detectada no período estudado, como pode ser observado pelos experimentos conduzidos.

RECOMENDAÇÕES

Com base no trabalho realizado, recomenda-se que:

- Sejam realizados estudos adicionais empregando diferentes linhagens de *Salmonella typhimurium* e outros sistemas biológicos para avaliação mais abrangente do potencial mutagênico dessas toxinas;
- Seja avaliada a mutagenicidade de outras algas produtoras de toxinas isoladas desta represa;
- Sejam realizadas análises químicas complementares para identificação dos compostos responsáveis pela atividade mutagênica, bem como estudos para avaliar o papel destas algas na estocagem e metabolização de compostos orgânicos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. BOURKE, A.T.C; HAWES, R.B.; NEILSON, A. & STALLMAN, N.D. An outbreak of hepatoenteritis (the Palm Island mystery disease) possibly caused by algal intoxication. *Toxicon.*, 21: 40-2, 1983.
2. CETESB **Mutação gênica em *Salmonella typhimurium* – teste de Ames**, São Paulo, Norma Técnica CETESB L5.620, 1993.
3. CETESB **Mutação gênica em *Salmonella typhimurium* – teste de Ames – método direto**, São Paulo, Norma Técnica CETESB L5.621, 1994.

4. CETESB Avaliação do Complexo Billings: comunidades aquáticas, água e sedimento - (out/92 a out/93) . São Paulo, CETESB, 1996a.
5. CETESB Avaliação da mutagenicidade e toxicidade aguda das águas superficiais do Estado de São Paulo: Integração com Programas de Controle de Poluição das Águas. São Paulo, CETESB, 1996b.
6. CETESB Relatório de qualidade das águas interiores do Estado de São Paulo - 1996. São Paulo, CETESB, Série Relatórios, 1998.
7. HARADA, K.I.; OHTANI, I.; IWAMOTO, K.; SUZUKI, M.; WATANABE, M.F.; WATANABE, M. & TERAQ, K. Isolation of cylindrospermopsin from a cyanobacterium *Umezakia natans* and its screening method. **Toxicon**, **32**: 73-84, 1994.
8. HAWKINS, P.R.; RUNNEGAR, M.T.C.; JACKSON, A.R.B. & FALCONER, I.R. Severe hepatotoxicity caused by the tropical cyanobacterium (blue-green algae) *Cylindrospermopsis raciborskii* (Woloszynka) Seenaya and Raju isolated from a domestic water supply reservoir. **Appl. Environ. Microbiol.**, **50**: 1292-5, 1985.
9. HOUK, V.S. The genotoxicity of industrial wastes and effluents - a review. **Mutat. Res.**, **277**: 91-138, 1992.
10. LAGOS, N.; ONODERA, H.; ZAGATTO, P.A., ANDRINOLO, D.; AZEVEDO, S.M.F.Q. & OSHIMA, Y. - The first evidence of paralytic shellfish toxins in the freshwater cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii*, isolated from Brazil. **Toxicon** (no prelo).
11. MARON, D.M. & AMES, B.N. Revised methods for the *Salmonella* mutagenicity test. **Mutat. Res.**, **113**: 173-215, 1983.
12. MOORE, R.E.; OHTANI, I.; MOORE, B.S.; DE KONING, C.B.; YOSHIDA, W.Y.; RUNNEGAR, M.T.C. & CARMICHAEL, W.W. Cyanobacterial toxins.
13. OHTANI, I.; MOORE, R. & RUNNEGAR, M.T.C. Cylindrospermopsin: a potent hepatotoxin from the blue-green alga *Cylindrospermopsis raciborskii*. **J. Am. Chem. Soc.**, **114**: 7941-2, 1992.
14. PELLIZZARI, E.D.; SHELDON, L.S.; BURSEY, J.T.; MICHAEL, I.C. & ZWEIDINGER, R.A. **Master analytical scheme for organic compounds in water**. EPA, Athens, GA, 1984, chapter 9, p. 154-69.
15. ROCHA, A.A. **A ecologia, os aspectos sanitários e de saúde pública da represa Billings, na região metropolitana de São Paulo: uma contribuição a sua recuperação**. Tese (Livre-Docência), Faculdade de Saúde Pública, Universidade de São Paulo, 1984.
16. ROUBICEK, D.A.; VALENT, G.U.; COIMBRÃO, C.A.; MELO, J.P.; SATO, M.I.Z. & SANCHEZ, P.S. Genotoxic assessment of the Billings water reservoir. **Congresso Latino-Americano de Mutagênese, Carcinogênese e Teratogênese Ambiental**, **3**. Puerto Viarta, México, 1994 (Anais).
17. SOUZA, R.C.R.; CARVALHO, M.C. & TRUZZI, A.C. *Cylindrospermopsis raciborskii* (Wolosz.) Seenaya and Subba Raju (Cyanophyceae). Dominance and a contribution to the knowledge of Rio Pequeno Arm, Billings Reservoir, Brazil. **Environ. Toxicol. Water Qual.**, **13**: 73-81, 1998.
18. VALENT, G.U. **Avaliação da atividade mutagênica de extratos orgânicos de corpos d'água do Estado de São Paulo, através do teste de Ames**. Tese (Doutoramento); Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, 1990.