



NORMA TÉCNICA

L5.241

Set/1991
43 PÁGINAS

Teste de Kado: ensaio de microssuspensão com salmonella typhimurium - método de ensaio

Companhia Ambiental do Estado de São Paulo
Avenida Professor Frederico Hermann Jr., 345
Alto de Pinheiros CEP 05459-900 São Paulo SP
Tel.: (11) 3133 3000 Fax.: (11) 3133 3402

[http: // www . cetesb . sp . gov . br](http://www.cetesb.sp.gov.br)

CETESB	TESTE DE KADO - ENSAIO DE MICROSSUSPENSÃO COM SALMONELLA TYPHIMURIUM Método de ensaio	L5.241 SET/91
--------	---	------------------

SUMÁRIO	Pág.
Introdução.....	1
1 Objetivo.....	2
2 Normas complementares.....	3
3 Definições.....	3
4 Aparelhagem.....	4
5 Execução do ensaio.....	5
6 Resultados.....	34
7 Recomendações.....	35
ANEXO A - Procedimentos complementares.....	37
ANEXO B - Esquema de procedimento.....	40
ANEXO C - Referências bibliográficas.....	42

INTRODUÇÃO

Devido ao acelerado crescimento urbano e industrial nos últimos anos, tem aumentado a complexidade dos resíduos e produtos tóxicos lançados no meio ambiente provocando sérios problemas toxicológicos. Entre esses compostos, aqueles com atividade mutagênica tem recebido especial atenção pois podem causar mutações no genoma das células somáticas e germinativas dos indivíduos expostos, podendo aumentar a incidência de câncer e doenças hereditárias nas populações.

Com o objetivo de avaliar a mutagenicidade de produtos químicos, vários ensaios foram desenvolvidos, especialmente aqueles que empregam microrganismos devido à facilidade de execução, à rápida resposta e reprodutividade. Dentre eles, o teste de Ames tem sido o ensaio mais amplamente utilizado para análise de produtos químicos. Amostras ambientais, tais como extratos orgânicos de efluentes industriais, material particulado de ar, água bruta e tratada, podem ser submetidas também ao teste de Ames; porém, tem-se observado limitações de emprego deste teste em diferentes condições devido à pequena quantidade de compostos mutagênicos extraídos dessas amostras, muitas vezes com concentrações inferiores ao limite de detecção do teste de Ames.

Com o objetivo de tornar o teste de Ames mais sensível, Kado e col., em 1983 desenvolveram uma metodologia baseada no aumento da quantidade de bactérias utilizadas no ensaio e na redução da quantidade de a

mostra e mistura S9, aumentando assim em dez vezes a sensibilidade do teste de Ames.

Este ensaio utiliza linhagens de Salmonella typhimurium que são capazes de detectar compostos que causam mutações do tipo substituição de pares de base e deslocamento do quadro de leitura do DNA. O ensaio é realizado na presença e ausência de sistema de ativação metabólica, permitindo a detecção de mutágenos diretos e indiretos. Portanto, considerando sua alta sensibilidade, o teste de Kado tem sido proposto como instrumento auxiliar na detecção de mutágenos ambientais, especialmente em estudos de triagem e monitoramento.

1 OBJETIVO

1.1 Esta Norma prescreve o teste de microssuspensão com Salmonella typhimurium - teste de Kado, utilizado na detecção de substâncias mutagênicas quando se dispõe de pequenas quantidades de material para teste, com as seguintes aplicações:

- a) controlar o processo de tratamento de água de abastecimento público em relação a:
 - remoção de compostos mutagênicos presentes nos mananciais que abastecem as estações de tratamento;
 - possível adição de substâncias mutagênicas durante o processo de tratamento;
 - presença de substâncias com atividade mutagênica na água de consumo;
- b) avaliar a eficiência dos processos de tratamento de esgoto e efluentes industriais na remoção ou presença desses compostos;
- c) avaliar aditivos alimentares, corantes, agrotóxicos, pesticidas, produtos naturais, fluídos corpóreos (urina, fezes ou sangue de indivíduos expostos), medicamentos e materiais utilizados em biomedicina ou na fabricação de produtos descartáveis para uso externo ou de asseio corporal;
- d) caracterizar poluentes mutagênicos em estudos de impacto ambiental e proteção de ecossistemas, visando a tomada de medidas corretivas e preventivas;
- e) localizar fontes potenciais de compostos mutagênicos no ar (material particulado), solo, água e alimentos, em áreas industrializadas, agrícolas e urbanas, visando o controle dos referidos poluentes.

2 NORMAS COMPLEMENTARES

Na aplicação desta Norma é necessário consultar:

- L5.215 - Prova de adequabilidade biológica de água destilada para fins microbiológicos (CETESB).
- L5.010 - Avaliação de laboratórios de análises bacteriológicas de água (CETESB).
- NBR 9898- Preservação e técnicas de amostragem de efluentes líquidos e corpos receptores (ABNT).
- M1.001 - Lavagem, preparo e esterilização de materiais em laboratório de microbiologia (CETESB).
- L5.216 - Controle de qualidade de meios de cultura (CETESB).
- L5.009 - Segurança e higiene do trabalho em laboratórios de microbiologia ambiental (CETESB).
- L5.620 - Mutação gênica reversa em Salmonella typhimurium - Teste de Ames (CETESB).

3 DEFINIÇÕES

Para os efeitos desta Norma são adotadas as definições de 3.1 a 3.14.

3.1 ADN

Ácido desoxirribonucleico.

3.2 Auxotrófico

Organismo mutante que apresenta exigências nutritivas além daquelas apresentadas pelo organismo selvagem.

3.3 Operon

Conjunto de genes que comandam a biossíntese de uma proteína.

3.4 Mutação

Mecanismo biológico universal que promove modificações genéticas nos organismos. A nível molecular, é a alteração da molécula de ADN, resultando na formação de proteínas alteradas ou ausentes no organismo que sofreu a mutação.

3.5 Mutação por deslocamento do quadro de leitura ("frameshift")

Mutação causada pela adição ou deleção de nucleotídeos na molécula de ADN.

3.6 Mutação xfa

Mutação que causa modificações na camada lipopolissacarídica da parede celular bacteriana, propiciando uma maior permeabilidade de célula a moléculas grandes.

3.7 Mutação por substituição de pares de bases ("base pair substitution")

Mutação causada pela troca ou substituição de nucleotídeos na molécula de ADN.

3.8 Mutação uvrB

Mutação causada por deleção de um dos genes responsáveis pelo reparo de excisão, a qual impede a bactéria de reparar alguns tipos de danos causados ao ADN, tornando-a mais sensível a agentes mutagênicos. Por razões técnicas, a deleção do gene uvrB se estendeu até o gene da biotina e conseqüentemente as cepas se tornaram auxotróficas para biotina (bio-).

3.9 Mutágeno ou agente mutagênico

Agentes químicos ou físicos que interagem com o ADN, causando mutações.

3.10 Plasmídeo pAQ1

Plasmídeo presente em múltiplas cópias, que contém a mutação hisG 428 e confere à célula resistência à tetraciclina.

3.11 Plasmídeo pKM101

Plasmídeo que contém o gene muc, responsável pela ativação do reparo SOS e confere à célula resistência à ampicilina.

3.12 Prototrófico

Organismo do tipo selvagem.

3.13 p.a.

Para análise.

3.14 q.s.p.

Quantidade suficiente para.

4 APARELHAGEM

4.1 Equipamentos

4.1.1 Agitador do tipo vortex

4.1.2 Autoclave

Deve ter tamanho suficiente para permitir a circulação do vapor ao redor do material a ser esterilizado e equipada com válvula de segurança, manômetro e termômetro, cujo bulbo fique na direção de escape do vapor condensado (dreno). A autoclave é normalmente operada à pressão de vapor de 103 426 Pa (15 psi), produzindo em seu interior a temperatura de 121,6°C ao nível do mar. Deve-se observar, em seu funcionamento, a substituição, por vapor, de todo o ar existente na câmara. A o

peração total de uma autoclave deve durar no máximo uma hora, sendo recomendado o acompanhamento dos ciclos de operação e os registros de tempo-temperatura. É recomendável que a autoclave atinja a temperatura de esterilização de 121°C em 30 minutos e mantenha essa temperatura durante o período de esterilização.

4.1.3 Balança analítica

Deve ter sensibilidade mínima de 1 mg ao pesar 10 g.

4.1.4 Balança semi-analítica

Deve ter sensibilidade mínima de 0,1 g ao pesar 150 g.

4.1.5 Banho-maria

Equipado com termostato para manutenção da temperatura a 55°C, com capacidade suficiente para comportar recipientes que contenham meios de cultura, cuja temperatura deve ser estabilizada antes de sua distribuição em placas de Petri.

4.1.6 Banho seco

Equipado com termostato para manutenção da temperatura a 45°C e suportes com capacidade suficiente para conterem os tubos de ensaio a serem utilizados durante o teste. Para verificar a temperatura deve ser utilizado um termômetro com escala adequada e registros periódicos devem ser efetuados.

4.1.7 Capela de segurança biológica (câmara de fluxo laminar vertical)

Equipamento que possibilita a retenção de partículas do ar por um filtro adequado, sendo o ar filtrado dirigido em forma de fluxo direto sobre a área de trabalho. O equipamento deve ser de segurança biológica Classe II - tipo B, com exaustão externa que proporcione grande segurança nas manobras, as quais devem ser realizadas em condições de esterilidade, e na manipulação de pequenas quantidades de produtos voláteis perigosos.

4.1.8 Centrífuga refrigerada

Com velocidade até 10 000 g, que tenha rotores com caçapas para volumes de 20 a 30 ml e permita operação a 4°C.

4.1.9 Congeladores

Com regulação para manter a temperatura no intervalo de -20°C a -70°C. Destina-se ao armazenamento de soluções e culturas de bactérias. Sua limpeza e desinfecção devem ser feitas periodicamente.

4.1.10 Contador de colônias

Automático, tipo Biotran; ou manual, tipo Quebec.

4.1.11 Destilador de água ou aparelho para desionização

Deve produzir água não tóxica, livre de substâncias que tenham efeito tóxico ou mutagênico.

4.1.12 Estufa para esterilização e secagem

A estufa deve acondicionar pipetas, placas de Petri, frascos para coleta, tubos e toda vidraria e aparelhagem que possam ser esterilizadas por calor seco, e ter capacidade suficiente para permitir a circulação do ar quente ao redor do material a ser esterilizado. Deve ser equipada com um termômetro e um termostato, e operar normalmente a uma temperatura de 170-180°C. O tempo de esterilização para a maior parte da vidraria é de duas horas, a uma temperatura de 170-180°C.

4.1.13 Incubadora bacteriológica

Deve ser equipada com termostato e projetada de tal forma que a temperatura, em todas as partes utilizadas, seja de 37°C; sua capacidade deve ser suficiente para permitir a circulação do ar ao redor de todas as culturas, quando o material de trabalho estiver sendo incubado. Para verificar a temperatura de uma incubadora grande deve ser colocado um ou mais termômetros, com o bulbo submerso em água, glicerina ou óleo mineral, em lugares representativos da câmara, e feitos registros periódicos da temperatura. A incubadora deve manter 75 a 85% de umidade relativa e ser colocada em local onde a temperatura permaneça no intervalo de 16 a 27°C.

4.1.14 Mesa agitadora alternativa ("shaker")

Equipamento portátil de dimensão adequada para ser acondicionado na incubadora bacteriológica, capaz de imprimir de 100 a 200 movimentos por minuto. Deve conter garras apropriadas para frascos e tubos.

4.1.15 Placa aquecedora

Com temperatura regulável até 100°C.

4.1.16 Potenciômetro

Deve ter escala bem legível e medir com precisão de 0,1 unidade de pH. A calibração do potenciômetro deve ser feita pelo menos duas vezes ao dia, com tampões de pH 4,00, pH 6,86 e pH 9,18.

4.1.17 Refrigerador

Certificado para manter a temperatura no intervalo de 2 a 8°C; sua capacidade deve ser suficiente para conter os meios de cultura, soluções e amostras a serem mantidas sob refrigeração. Sua limpeza e desinfecção devem ser feitas periodicamente.

4.2 Vidraria

4.2.1 Erlenmeyers

De borossilicato ("pyrex") ou de vidro neutro, com tampa rosca, não tóxica, e capacidade de 125 mL.

4.2.2 Frascos de coleta

De borossilicato ("pyrex") ou vidro neutro, com capacidade de 5 litros.

4.2.3 Frascos para preparo de meio de cultura

De borossilicato ("pyrex") ou vidro neutro, com capacidade de 1 a 5 litros, limpos e isentos de qualquer substância tóxica.

4.2.4 Frascos para soluções

De borossilicato ("pyrex") ou vidro neutro, com tampa de rosca, não tóxica, com capacidade de 50 e 100 mL, e frascos âmbar, com capacidade de 30-50 mL.

4.2.5 Pipetas

Pipetas do tipo Mohr, de 1 mL, 5 mL e 10 mL, com graduação de 1/10 e erro de calibração inferior a 2,5%, e com bocal para tampão de algodão. Devem ser acondicionadas em caixas de aço inoxidável ou embrulhadas individualmente em papel Kraft, e esterilizadas por calor seco a 170-180°C durante duas horas.

4.2.6 Placas de Petri de vidro

De borossilicato ("pyrex") ou vidro neutro de boa qualidade, com fundo perfeitamente plano, sem ranhuras ou bolhas de ar, medindo 100 mm de diâmetro e 15 mm de altura. Devem ser embrulhadas em papel Kraft e esterilizadas por calor seco a 170-180°C por duas horas.

4.2.7 Tubos de ensaio

De borossilicato ("pyrex") ou vidro neutro, de medidas aproximadas de 18 x 180 mm e 15 x 120 mm, com tampas de aço inoxidável, e de medidas de 20 x 120 mm, com tampas de rosca de material não tóxico. Devem ser esterilizados por calor seco a 170-180°C, durante duas horas, excluindo-se as tampas de rosca, que são embrulhadas individualmente em papel de alumínio e esterilizadas em autoclave a 121°C por 15 minutos.

4.3 Outros materiais

4.3.1 Alças de inoculação

De platina, com um comprimento de 7 a 8 cm e diâmetro de 0,5 mm, apresentando na extremidade uma parte encurvada, formando um aro com diâmetro mínimo de 3 mm, com cabo de metal (cabo de Kolle).

4.3.2 Ampolas descartáveis

De polipropileno autoclaváveis, com tampas apropriadas para congelamentos a -70°C ou -196°C (nitrogênio líquido) para volumes máximos de 2 mL.

4.3.3 Bico de Bunsen

Com funcionamento adequado para permitir uma combustão completa.

4.3.4 Estantes

De arame galvanizado para suportarem tubos de ensaio.

4.3.5 Filtros para esterilização

Tipo Swinnex, de polipropileno, com diâmetro de 13 mm.

4.3.6 Fita crepe

4.3.7 Lâmpada germicida (UV)

Lâmpada germicida (UV), de 15 W.

4.3.8 Luvas cirúrgicas

4.3.9 Máscara de proteção respiratória contra gases

Equipada com filtro apropriado contra gases, ácidos e outros compostos voláteis, com proteção facial de acrílico.

4.3.10 Máscaras de proteção respiratória contra pós tóxicos

Equipada com filtro apropriado contra pós tóxicos.

4.3.11 Membranas filtrantes estêreis

De éster de celulose, com porosidade de $0,22\ \mu\text{m}$ e 13 mm de diâmetro.

4.3.12 Micropipetadores

Pipetadores digitais com capacidade para medir volumes de 2, 10, 50, 100, 500 μL com ponteiras de polipropileno apropriadas e autoclaváveis. As ponteiras devem ser embrulhadas em papel de alumínio e papel Kraft e esterilizadas em autoclave a 121°C durante 15 minutos.

4.3.13 Papel de filtro

4.3.14 Papel Kraft

4.3.15 Parafilme

Película termoplástica flexível e semitransparente, utilizada para vedação.

4.3.16 Pera de sucção

4.3.17 Pinças

De aço inoxidável, com extremidades arredondadas.

4.3.18 Placas de Petri descartáveis

Devem ser de boa qualidade, medindo 90 mm de diâmetro e 12 mm de altura. É essencial que a esterilização seja realizada pelo processo de raio gama cobalto (Co). NÃO devem ser utilizadas placas esterilizadas por processos químicos.

4.3.19 Porta-pipetas de aço inoxidável

4.3.20 Protetor facial

Protetor facial com cúpula e coroa de polietileno articulada, regulação com catraca, viseira em acrílico, anatômico, incolor.

4.3.21 Seringas automáticas do tipo Cornwall de 5 e 10 mL.

4.3.22 Seringas hipodérmicas descartáveis

4.3.23 Tela de amianto

De 22 x 22 cm.

4.3.24 Tripê

4.3.25 Tubos de centrífuga para 20 mL

Tubos de polipropileno tipo Nalgene, autoclaváveis, com capacidade para volumes de 20 mL.

4.3.26 Vasilhames de nitrogênio líquido

Com capacidade para conservação de 50 litros de nitrogênio líquido à temperatura de -196°C e equipado com seis recipientes para comportar as ampolas com culturas bacterianas.

5 EXECUÇÃO DO ENSAIO

5.1 Princípio do método

Este ensaio é uma modificação do teste de Ames e se baseia no aumento da concentração de bactérias e no decréscimo da quantidade de amostra utilizada no ensaio, elevando assim a sensibilidade do teste em aproximadamente 10 vezes. Diferentes cepas de Salmonella typhimurium auxotróficas para o aminoácido histidina ($2 \cdot 10^9$ células) são expostas a diferentes concentrações de amostra em teste (em volume de $2 \mu\text{L}$) com e sem ativação metabólica por 90 minutos. Após esse período de pré-incubação, a mistura é plaqueada em ágar mínimo, as placas incubadas por 66 horas a 37°C e as colônias revertentes são contadas. Um aumento significativo do número de revertentes nas placas teste em relação às placas-controle indicam presença de atividade mutagênica na amostra em teste. Dada a composição do meio de cultura, são formadas colônias células prototróficas para histidina (his⁺) provenientes de mutações

espontâneas ou induzidas pela amostra.

5.2 Reagentes

5.2.1 Para a preparação dos meios de cultura e das soluções utiliza dos neste ensaio são necessários os reagentes de 5.2.1.1 a 5.2.1.30.

5.2.1.1 2 aminoantraceno (2AA).

5.2.1.2 Ácido cítrico ($C_6H_8O_7 \cdot H_2O$) p.a.

5.2.1.3 Ácido clorídrico (HCl) p.a.

5.2.1.4 Ácido nítrico (HNO_3) p.a.

5.2.1.5 Ácido sulfúrico (H_2SO_4) p.a.

5.2.1.6 Ampicilina.

5.2.1.7 Azida sódica (NaN_3).

5.2.1.8 Bacto ágar (Difco).

5.2.1.9 β -nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADP).

5.2.1.10 D-Biotina.

5.2.1.11 Caldo de soja e triptona.

5.2.1.12 Cloreto de magnésio ($MgCl_2 \cdot 6H_2O$) p.a.

5.2.1.13 Cloreto de potássio (KCl) p.a.

5.2.1.14 Cloreto de sódio (NaCl) p.a.

5.2.1.15 Cristal violeta.

5.2.1.16 Dimetilsulfóxido (DMSO).

5.2.1.17 Fosfato de potássio dibásico (K_2HPO_4) p.a.

5.2.1.18 Fosfato de sódio e amônia ($NaNH_4HPO_4 \cdot 4H_2O$) p.a.

5.2.1.19 Fosfato de sódio dibásico (Na_2HPO_4) p.a.

5.2.1.20 Fosfato de sódio monobásico (NaH_2PO_4) p.a.

5.2.1.21 Fração S9 - homogenado de fígado de rato, induzido com Aro clor 1254 liofilizado, proveniente da Molttox - Molecular Toxicology Inc. 111 Gibraltar St., Annapolis, MD, 21401, USA.

5.2.1.22 Glicose.

5.2.1.23 D-Glicose 6-fosfato.

5.2.1.24 Hidróxido de sódio (NaOH) p.a.

5.2.1.25 L-histidina HCl.

- 5.2.1.26 Nutrient Broth nº 2 (Oxoid).
5.2.1.27 Metilmetanossulfonato (MMS).
5.2.1.28 4-nitroquinolina, 1 óxido (4NQO) (Sigma).
5.2.1.29 Sulfato de magnésio ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$) p.a.
5.2.1.30 Tetraciclina.

5.2.2 Os reagentes devem ser de grau p.a. ou bacteriológico e de procedência idônea, apresentar odor, cor e consistência inalterados, ser livre de elementos bactericidas ou bacteriostáticos inespecíficos, bem como de carboidratos inespecíficos.

5.3 Meios de cultura

5.3.1 Ágar mínimo

Fórmula:

Ágar glicose.....	900,0 mL
Meio de Vogel-Bonner "E" (10X).....	100,0 mL
Solução de biotina/histidina.....	10,0 mL

Preparo:

Este meio deve ser preparado como segue:

a) preparar o meio ágar glicose, com os seguintes componentes:

Bacto ágar.....	15,0 g
Glicose.....	20,0 g
Água destilada.....	900,0 mL

Para o preparo deste meio pesar os componentes e acrescentar 900 mL de água destilada fria. Aquecer, agitando frequentemente até a completa dissolução das substâncias, tomando cuidado para que não seja atingida a temperatura de ebulição. Esterilizar em autoclave a 121°C por 15 minutos e deixar estabilizar em banho-maria a 55°C.

b) preparar o meio de Vogel-Bonner "E" (10X), com os seguintes componentes:

Sulfato de magnésio ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$) p.a.....	2,0 g
Ácido cítrico ($C_6H_8O_7 \cdot H_2O$).....	20,0 g
Fosfato de potássio dibásico (K_2HPO_4).....	100,0 g
Fosfato de sódio e amônio ($NaNH_4HPO_4 \cdot 4H_2O$).....	35,0 g
Água destilada.....	1,0 L

Para o preparo deste meio pesar as substâncias acima nas quantidades especificadas e dissolver em 1 L de água destilada fria. Este rilizar em autoclave a 121°C por 15 minutos e deixar estabilizar em banho-maria a 55°C.

- c) juntar assepticamente os meios ágar glicose, Vogel-Bonner "E" (10X) e solução de biotina/histidina (item 5.4.1) nas quantidades especificadas acima e distribuir volumes de 24 mL em placas de Petri esterilizadas, com auxílio de uma seringa automática. As placas que contêm ágar mínimo podem ser armazenadas sob refrigeração (2 a 8°C) durante um período máximo de 7 dias.

5.3.2 Ágar mínimo com biotina

Fórmula:

Ágar glicose.....	900,0 mL
Meio Vogel-Bonner "E" (10X).....	100,0 mL
Solução de biotina 0,5 mM.....	6,0 mL

Preparo:

Preparar o meio ágar mínimo de acordo com 5.3.1-a) e b) e, antes da distribuição em placas, adicionar assepticamente 6 mL de solução de biotina 0,5 mM (item 5.4.2). Distribuir volumes de 24 mL em placas de Petri esterilizadas com o auxílio de seringa automática. As placas que contêm ágar mínimo com biotina podem ser armazenadas sob refrigeração (2 a 8°C) durante um período máximo de 7 dias.

5.3.3 Ágar mínimo com histidina/biotina

Fórmula:

Ágar glicose.....	900,0 mL
Meio de Vogel-Bonner "E" (10X).....	100,0 mL
Solução de biotina 0,5 mM.....	6,0 mL
Solução de histidina 0,5%.....	10,0 mL

Preparo:

Preparar o meio ágar mínimo de acordo com 5.3.2-a) e b) e, antes da distribuição em placas, adicionar assepticamente 6 mL de solução de biotina 0,5 mM (item 5.4.2) e 10 mL de solução de histidina 0,5% (item 5.4.3). Distribuir volumes de 24 mL em placas de Petri previamente esterilizadas. As placas que contêm ágar mínimo com biotina e histidina podem ser armazenadas sob refrigeração (2 a 8°C) durante um período máximo de 7 dias.

5.3.4 Ágar mínimo com histidina/biotina e ampicilina

Fórmula:

Ágar glicose	900,0 mL
Meio de Vogel-Bonner "E" (10X).....	100,0 mL
Solução de biotina 0,5 mM	6,0 mL
Solução de histidina 0,5%.....	10,0 mL
Solução de ampicilina 8 mg/mL.....	3,15 mL

Preparo:

Preparar o meio ágar mínimo de acordo com 5.3.1-a) e b) e, antes da distribuição em placas, adicionar assepticamente 6 mL de solução de biotina 0,5 mM (item 5.4.2), 10 mL de solução de histidina 0,5% (item 5.4.3) e 3,15 mL de solução de ampicilina 8 mg/mL (item 5.4.4). Distribuir volumes de 24 mL em placas de Petri esterilizadas com auxílio de seringas automáticas. As placas que contem ágar mínimo com biotina, histidina e ampicilina podem ser armazenadas sob refrigeração (2 a 8°C) durante um período máximo de 7 dias.

5.3.5 Ágar mínimo com histidina/biotina e ampicilina/tetraciclinaFórmula:

Ágar glicose.....	900,0 mL
Meio de Vogel-Bonner "E" (10X).....	100,0 mL
Solução de biotina 0,5 mM.....	6,0 mL
Solução de histidina 0,5%.....	10,0 mL
Solução de ampicilina 8 mg/mL.....	3,15 mL
Solução de tetraciclina 8 mg/mL.....	0,25 mL

Preparo:

Preparar o meio ágar mínimo glicosado de acordo com 5.3.1-a) e b) e antes da distribuição em placas, adicionar assepticamente 6 mL de solução de biotina 0,5 mM (item 5.4.2), 10 mL de solução de histidina 0,5% (item 5.4.3), 3,15 mL de solução de ampicilina 8 mg/mL (item 5.4.4) e 0,25 mL de solução de tetraciclina 8 mg/mL (item 5.4.5). Distribuir volumes de 24 mL em placas de Petri esterilizadas com auxílio de seringas automáticas. As placas que contem ágar mínimo com biotina, histidina, ampicilina e tetraciclina podem ser armazenadas sob refrigeração (2 a 8°C) durante um período máximo de 7 dias.

5.3.6 Caldo nutrienteFórmula:

Nutriente Broth nº 2 (OXOID).....	25,0 g
Água destilada.....	1,0 L

Preparo:

Pesar o componente e acrescentar 1 000 mL de água destilada fria. Deixar em repouso durante aproximadamente 15 minutos. Aquecer agitando freqüentemente até a completa dissolução do meio de cultura, tomando cuidado para que não seja atingida a temperatura de ebulição. Distribuir alíquotas de 20 mL em erlenmeyer ou frascos secos de 125 mL, com tampas roscadas, ou alíquotas de 5 mL, em tubos de 18 mm x 180 mm, com tampas de aço inoxidável. Esterilizar em autoclave a 121°C durante 15 minutos. Após a autoclavação, os tubos que contêm o meio preparado podem ser armazenados sob refrigeração (2 a 8°C) durante um período máximo de 14 dias.

5.3.7 Caldo nutriente com ampicilinaFórmula:

Nutriente Broth nº 2 (OXOID).....	25,0 g
Solução de ampicilina 8 mg/mL.....	3,15 mL
Água destilada.....	1,0 L

Preparo:

Preparar o caldo nutriente de acordo com 5.3.6 e, após autoclavação, estabilizar o meio à temperatura de 55°C em banho-maria e adicionar assepticamente 3,15 mL de solução de ampicilina com 8 mg/mL (item 5.5.4). Distribuir alíquotas de 20 mL em erlenmeyers ou frascos de 125 mL, com tampa roscada, previamente esterilizados, ou alíquotas de 5 mL, em tubos de 18 mm x 180 mm, com tampa de aço inoxidável, previamente esterilizados. O caldo nutriente com ampicilina poderá ser armazenado sob refrigeração (2 a 8°C) durante um período máximo de 14 dias.

5.3.8 Ágar nutrienteFórmula:

Nutriente Broth nº 2 (OXOID).....	25,0 g
Ágar.....	15,0 g
Água destilada.....	1,0 L
pH final após esterilização: 7,0	

Preparo:

Pesar os componentes e acrescentar 1 000 mL de água destilada fria. Deixar em repouso durante aproximadamente 15 minutos. Aquecer agitando freqüentemente até a completa dissolução dos ingredientes, tomando cuidado para que não seja atingida a temperatura de ebulição. Esterilizar em autoclave a 121°C durante 15 minutos. Após a esterilização, manter o meio preparado em banho-maria a 55°C, para estabilização da

temperatura. Com todos os cuidados de assepsia, distribuir volumes de aproximadamente 24 mL em placas de Petri esterilizadas. As placas de Petri que contêm o ágar nutriente podem ser armazenadas sob refrigeração (2 a 8°C) durante um período máximo de 7 dias.

5.3.9 Ágar nutriente com ampicilina

Fórmula:

Nutriente Broth nº 2 (OXOID).....	25,0 g
Ágar.....	15,0 g
Solução de ampicilina 8 mg/mL.....	3,15 mL
Água destilada.....	1,0 L

Preparo:

Preparar o ágar nutriente de acordo com 5.3.8 e, após a estabilização da temperatura em banho-maria a 55°C, adicionar assepticamente 3,15 mL de solução de ampicilina 8 mg/mL (item 5.4.2). Com todos os cuidados de assepsia, distribuir volumes de 24 mL em placas de Petri esterilizadas. As placas de Petri que contêm o ágar nutriente com ampicilina podem ser armazenadas sob refrigeração (2 a 8°C) durante um período máximo de 7 dias.

5.3.10 Ágar nutriente com ampicilina/tetraciclina

Fórmula:

Nutriente Broth nº 2 (OXOID).....	25,0 g
Ágar.....	15,0 g
Solução de ampicilina 8 mg/mL.....	3,15 mL
Solução de tetraciclina 8 mg/mL.....	0,25 mL
Água destilada.....	1,0 L

Preparo:

Preparar o ágar nutriente com ampicilina de acordo com 5.3.8. Adicionar assepticamente 3,15 mL de solução de ampicilina 8 mg/mL (item 5.4.4), e 0,25 mL de solução de tetraciclina 8 mg/mL (item 5.4.5). Com todos os cuidados de assepsia distribuir volumes de aproximadamente 24 mL em placas de Petri esterilizadas. As placas de Petri que contêm o ágar nutriente com ampicilina e tetraciclina podem ser armazenadas sob refrigeração (2 a 8°C) durante um período máximo de 7 dias.

5.3.11 Ágar de superfície ("Top agar")

Fórmula:

Bacto ágar.....	6,0 g
Cloreto de sódio (NaCl).....	5,0 g
Água destilada.....	1,0 L
pH final: 7,0	

Preparo:

Pesar os componentes e acrescentar 1 000 mL de água destilada fria. Aquecer agitando até a completa dissolução do meio, tomando cuidado para que não seja atingida a temperatura de ebulição. Distribuir volumes de 150 mL em erlenmeyers de 250 mL. Esterilizar em autoclave a 121°C por 15 minutos. Os frascos que contêm "top-agar" podem ser armazenados sob refrigeração (2 a 8°C) durante um período máximo de 14 dias.

5.3.12 Caldo de soja e triptonaFórmula:

Triptona.....	17,0 g
Peptona de soja.....	3,0 g
Glicose.....	2,5 g
Cloreto de sódio.....	5,0 g
Fosfato de potássio dibásico.....	2,5 g
Água destilada.....	1,0 L
pH final: 7,3 ± 0,1	

Preparo:

Pesar 30 g do meio desidratado "tryptic soy broth" (caldo de soja e triptona) e acrescentar 1 000 mL de água destilada fria, deixando em repouso por aproximadamente 15 minutos. Aquecer agitando até a completa dissolução do meio, tomando cuidado para que não seja atingida a temperatura de ebulição. Se necessário, ajustar o pH para 7,3 ± 0,1 com solução de hidróxido de sódio 1 N. Distribuir volumes de 12 a 13 mL em tubos de ensaio com tampa roscada. Esterilizar em autoclave a 121°C por 15 minutos. Os tubos que contêm caldo de soja e triptona podem ser armazenados sob refrigeração (2 a 8°C) durante um período máximo de 30 dias.

5.4 Soluções5.4.1 Solução de histidina/biotina

Fórmula:

L-histidina HCl.....	0,138 g
D-biotina.....	0,117 g
Água destilada.....	1,0 L

Preparo:

Pesar os componentes e dissolver em 1 L de água destilada quente (temperatura de ebulição). Distribuir volumes de 100 mL em frascos escuros. Esterilizar em autoclave a 121°C por 15 minutos. Os frascos que contêm a solução de histidina/biotina podem ser armazenados sob refrigeração (2 a 8°C) durante um período máximo de 30 dias.

5.4.2 Solução de biotina 0,5 mMFórmula:

D-biotina.....	0,012 g
Água destilada.....	100,0 mL

Preparo:

Dissolver a D-biotina em 100 mL de água destilada quente (temperatura de ebulição). Distribuir volumes de 50 mL em frascos escuros. Esterilizar em autoclave a 121°C por 15 minutos. Os frascos que contêm a solução de biotina 0,5 mM podem ser armazenados sob refrigeração (2 a 8°C) durante um período máximo de 30 dias.

5.4.3 Solução de histidina 0,5%Fórmula:

L-histidina HCl.....	0,5 g
Água destilada.....	100,0 mL

Preparo:

Dissolver a L-histidina HCl em 100 mL de água destilada quente (temperatura de ebulição). Distribuir volumes de 50 mL em frascos escuros. Esterilizar em autoclave a 121°C por 15 minutos. Os frascos que contêm a solução de histidina 0,5% podem ser armazenadas sob refrigeração (2 a 8°C) durante um período máximo de 30 dias.

5.4.4 Solução de ampicilina 8 mg/mLFórmula:

Ampicilina.....	0,08 g
Hidróxido de sódio 0,02N q.s.p.....	10,0 mL

Preparo:

A solução de ampicilina deve ser preparada como segue:

a) preparar a solução de hidróxido de sódio com a seguinte composição:

Hidróxido de sódio (NaOH).....	0,08 g
Água destilada q.s.p.....	100,0 mL

Para o preparo desta solução dissolver o hidróxido de sódio em 100 mL de água destilada esterilizada fria.

b) preparar a solução final, dissolvendo a ampicilina em 10 mL da solução de hidróxido de sódio 0,02 N. Esterilizar por membrana filtrante (0,22 μ m), em tubo com tampa roscada, previamente esterilizado, e envolver este em papel alumínio. Os tubos que contêm solução de ampicilina podem ser armazenados sob refrigeração (2 a 8°C) durante um período máximo de 30 dias.

5.4.5 Solução de tetraciclina 8 mg/mLFórmula:

Tetraciclina.....	0,08 g
Ácido clorídrico 0,02 N q.s.p.....	10,0 mL

Preparo:

A solução de tetraciclina deve ser preparada como segue:

a) preparar a solução de ácido clorídrico com a seguinte composição:

Ácido clorídrico (HCl) 12,1 N.....	0,14 mL
Água destilada q.s.p.....	100,0 mL

Para o preparo desta solução juntar 0,14 mL de ácido clorídrico 12,1 N a 100 mL de água destilada esterilizada fria,

b) preparar a solução final dissolvendo a tetraciclina em 10 mL de ácido clorídrico 0,02 N. Esterilizar por membrana filtrante (0,22 μ m), em tubo com tampa roscada previamente esterilizado e envolver este em papel alumínio. Os tubos que contêm a solução de tetraciclina podem ser armazenados sob refrigeração (2 a 8°C) durante um período máximo de 30 dias.

5.4.6 Hidróxido de sódio 1NFórmula:

Hidróxido de sódio (NaOH).....	4,0 g
Água destilada q.s.p.....	100,0 mL

Preparo:

Dissolver o hidróxido de sódio em 100 mL de água destilada fria. Arma-
zenar em frascos com tampa rosca a temperatura ambiente.

5.4.7 Solução de tampão fosfato 0,015 MFórmula:

Solução-estoque A.....	81,0 mL
Solução-estoque B.....	19,0 mL
pH final: 7,4	

Para o preparo desta solução proceder como segue:

a) Solução-estoque A:

Fosfato de sódio dibásico (Na_2HPO_4).....	0,213 g
Água destilada q.s.p.....	100,0 mL

Dissolver o fosfato de sódio dibásico em 100 mL de água destilada
fria.

b) Solução-estoque B:

Fosfato de sódio monobásico (NaH_2PO_4).....	0,207 g
Água destilada q.s.p.....	100,0 mL

Dissolver o fosfato de sódio monobásico em 100 mL de água destilada
fria.

- c) juntar a solução-estoque A à solução-estoque B e verificar o pH.
Ajustá-lo para 7,4 (com solução-estoque A para elevar o pH ou com a
solução-estoque B para baixá-lo). Distribuir volumes de 100 mL em
frascos apropriados. Esterilizar em autoclave a 121°C por 15 minu-
tos. Os frascos que contêm tampão fosfato podem ser armazenados sob
refrigeração (2 a 8°C) durante um período máximo de 60 dias.

5.4.8 Solução de cloreto de magnésio 0,4MFórmula:

Cloreto de magnésio ($\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$).....	8,13 g
Água destilada q.s.p.....	100,0 mL

Preparo:

Dissolver o cloreto de magnésio em 100 mL de água destilada, distri-
buir em frasco apropriado e esterilizar em autoclave a 121°C por 15 mi-
nutos. Os frascos que contêm a solução de cloreto de magnésio podem
ser armazenados sob refrigeração (2 a 8°C) durante um período máxi-
mo de 60 dias.

5.4.9 Solução de cloreto de potássio 1,65MFórmula:

Cloreto de potássio (KCl).....	12,3 g
Água destilada q.s.p.....	100,0 mL

Preparo:

Dissolver o cloreto de potássio em 100 mL de água destilada, distribuir em frasco apropriado e esterilizar em autoclave a 121°C por 15 minutos. Os frascos que contêm a solução de cloreto de magnésio podem ser armazenados sob refrigeração (2 a 8°C) durante um período máximo de 60 dias.

5.4.10 Mistura S9 4%Fórmula:

Solução A.....	915 L
Solução de glicose 6 fosfato 1M.....	5 L
Solução de NADP 0,1M.....	40 L
Fração S9.....	40 L

Preparo:

Esta solução deve ser preparada como segue:

a) preparar a solução A com a seguinte composição:

Cloreto de potássio (KCl) 1,65 M.....	20 mL
Cloreto de magnésio (MgCl ₂) 0,4 M.....	20 mL
Tampão fosfato 0,015 M.....	500 mL
Água destilada.....	375 mL

Esta solução deverá ser preparada assepticamente em frascos previamente esterilizados e poderá ser armazenada sob refrigeração (2 a 8°C) por um período máximo de 60 dias.

b) preparar a solução de glicose 6-fosfato 1 M com a seguinte composição:

Glicose 6-fosfato.....	2,821 g
Água destilada q.s.p.....	10,0 mL

Para o preparo desta solução dissolver a glicose 6-fosfato em 10 mL de água destilada esterilizada. Esterilizar por membrana filtrante (0,22 µm) em tubo com tampa roscada previamente esterilizado. A solução de glicose 6-fosfato pode ser armazenada em "freezer" (-20°C) durante um período máximo de 30 dias.

c) preparar a solução de NADP 0,1 M com a seguinte composição:

β -nicotinamida adenina dinucleotídio fosfato NADP..	0,7654 g
Água destilada q.s.p.....	10,0 mL

Para o preparo desta solução dissolver a NADP em 10 mL de água destilada esterilizada. Esterilizar por membrana filtrante (0,22 μ m) em tubo com tampa rosca previamente esterilizado. Os tubos que contêm a solução de NADP podem ser armazenados em "freezer" (-20°C) durante um período máximo de 30 dias.

d) preparar a solução de tampão fosfato 0,015 M conforme item 5.4.7.

e) a solução final deve ser preparada em uma capela de fluxo laminar e todos os componentes devem ser mantidos em banho de gelo. Adicionar os componentes asépticamente, em tubos de 18 mm X 18 mm com tampa de aço inoxidável, tomando o cuidado de acrescentar o S9 por último e mantendo a solução final em banho de gelo até o momento de sua utilização no teste. Em paralelo, fazer o controle de esterilidade de cada solução em tubos que contêm o caldo de soja e triptona e o controle da fração S9 é feito em ágar mínimo. Incubar os meios por 7 dias em estufa a 35 \pm 0,5°C e realizar leituras diárias.

Nota: A mistura S9 deve ser preparada para cada teste e deve permanecer no banho de gelo por, no máximo, 3 horas. A porção da mistura S9 não utilizada deve ser descartada. NUNCA este reutilizar a mistura S9.

5.4.11 Solução de azida sódica 1 mg/mL

Fórmula:

Azida sódica (NaN_3).....	1,0 mg
Água destilada esterilizada.....	1,0 mL

Preparo:

Pesar 1 mg de azida sódica, com máscara de proteção respiratória para póis tóxicos e luvas cirúrgicas, em ampolas descartáveis. Armazenar as ampolas contendo a substância previamente pesada em freezer a -20°C por tempo indeterminado. Na hora do ensaio, adicionar 1 mL de água destilada esterilizada e proceder às diluições adequadas. A solução deve não ser descartada após o uso, em frasco apropriado para posterior incineração.

5.4.12 Solução de 2 aminoantraceno 1 mg/mL

Fórmula:

2 aminoantraceno.....	1,0 mg
Dimetilsulfóxido (DMSO).....	1,0 mL

Preparo:

Pesar 1mg de 2 aminoantraceno, com máscara de proteção respiratória para p_os t_oxicos, luvas cirúrgicas, em ampolas descartáveis. Armazenar as ampolas contendo a substância previamente pesada em freezer a -20°C por tempo indeterminado. Na hora do ensaio adicionar 1 mL de dimetil sulfóxido e proceder às diluições adequadas. A solução deverá ser descartada ap_os o uso, em frascos apropriados para posterior incineração.

5.4.13 Solução de metilmetano sulfonato 1% V/VFórmula:

Metilmetano sulfonato.....	0,1 mL
Água destilada esterilizada.....	9,9 mL

Preparo:

Adicionar 0,1 mL de metilmetano sulfonato a 9,9 mL de água destilada esterilizada, com o auxílio de um micropipetador automático, utilizando luvas cirúrgicas e máscara de proteção respiratória para gases, em câmara de segurança biológica Classe II-tipo B. Essa solução não pode ser armazenada, sendo preparada a cada ensaio.

5.4.14 Solução de 4-nitroquinoline oxide 1 mg/mLFórmula:

4-nitroquinoline oxide.....	1,0 mg
Dimetilsulfóxido (DMSO).....	1,0 mL

Preparo:

Pesar 1mg de 4-nitroquinoline, com máscara de proteção contra p_os t_oxicos e luvas cirúrgicas, em ampolas descartáveis. Armazenar as ampolas contendo a substância previamente pesada em freezer a -20°C por tempo indeterminado. Na hora do ensaio adicionar 1 mL de dimetilsulfóxido e proceder às diluições adequadas. A solução deverá ser descartada ap_os o uso, em frascos apropriados para posterior incineração.

5.4.15 Solução de ácido sulfúrico/ácido nítrico H₂SO₄/HNO₃ (6:1)Fórmula:

Solução de ácido sulfúrico 50%.....	600,0 mL
Solução de ácido nítrico 50%.....	100,0 mL

Preparo:

Esta solução deve ser preparada como segue:

- a) preparar a solução de ácido sulfúrico 50% com a seguinte composição:

Ácido sulfúrico (H_2SO_4) p.a.....	500,0 mL
Água destilada.....	500,0 mL

Para o preparo desta solução, medir 500 mL de ácido sulfúrico p.a. e adicioná-lo vagarosamente à água, utilizando máscara de proteção respiratória contra gases, e luvas de borracha.

- b) preparar a solução de ácido nítrico 50% com a seguinte composição:

Ácido nítrico (HNO_3) p.a.....	500,0 mL
Água destilada.....	500,0 mL

Para o preparo dessa solução, medir 500 mL de ácido nítrico p.a. e adicioná-lo vagarosamente à água, utilizando máscara de proteção respiratória contra gases, e luvas de borracha.

- c) misturar vagarosamente 6 partes da solução de ácido sulfúrico a 1 parte da solução de ácido nítrico.

Nota: NUNCA adicionar a água ao ácido, sempre o ácido à água.

5.4.16 Solução de cristal violeta 0,1%

Fórmula:

Cristal violeta.....	0,1 g
Água destilada q.s.p.....	100 mL

Preparo:

Pesar 0,1 g de cristal violeta e dissolver em 100 mL de água destilada esterilizada previamente. Os frascos que contêm a solução de cristal violeta poderão ser armazenados à temperatura ambiente por tempo indeterminado.

5.5 Amostragem

A coleta deve ser realizada segundo NBR 9898 - "Preservação e técnicas de amostragem de efluentes líquidos e corpos receptores".

5.5.1 Preparo das amostras

A amostra deve ser bem identificada e as informações sobre a mesma devem ser completas: nº e tipo da amostra, data, local de coleta, pH, cloro residual e outras informações relevantes para que os resultados possam ser corretamente interpretados.

5.5.2. Preparo das amostras

5.5.2.1 Os compostos químicos podem ser testados diretamente ou dissolvidos em solventes apropriados como, por exemplo, água destilada ou dimetilsulfóxido (DMSO). As amostras ambientais líquidas, como água bruta, tratada e efluentes, são normalmente submetidas a processos de concentração e extração orgânica. Existem vários métodos de extração orgânica, cada um sendo preferencial para determinados grupos de substâncias químicas, devendo-se, portanto, escolher o método mais apropriado para o tipo de amostra a ser analisada. Recomenda-se o uso de extração por resinas tipo XAD₂ ou XAD₄ para água bruta e tratada; extração líquida/líquida para efluentes industriais, cujo conteúdo orgânico frequentemente é mais elevado e extração por ultra-sonicação para resíduos sólidos, sedimentos e material particulado de ar.

5.5.2.2 O volume da amostra a ser concentrado é variável, pois vai depender do tipo de amostra e do fim a que se destina. Normalmente concentram-se de 2-10 litros para água bruta e de 20-100 litros para água tratada. Os resíduos sólidos e sedimentos são coletados em quantidades de 400 a 500 g e acondicionados em sacos plásticos atóxicos. O material particulado de ar é coletado em amostrados apropriados em volumes de aproximadamente 2000 m³. Os extratos obtidos poderão ser armazenados, se necessário, em freezer a -20°C e secos e ressuspensos em dimetilsulfóxido no momento da análise ou um dia antes.

5.6 Organismo indicador

Linhagens mutantes de *S. typhimurium* auxotróficas para histidina (*his*⁻) que detectam diferentes tipos de mutágenos e possuem várias mutações no operon da histidina que serão os alvos para mutação reversa, bem como mutações que aumentam sua sensibilidade aos agentes genotóxicos. Podem ser obtidas através do Dr. B.N. Ames, Biochemistry Department, University of California, Berkeley, California 94720 (USA). As cepas listadas abaixo podem ser empregadas rotineiramente no teste de Kado.

5.6.1 Cepas que detectam mutágenos que causam deslocamento do quadro de leitura do ADN.

Cepa	Alvo da mutação	Taxa de reversão espontânea	Genótipo
TA 1537	CG	5-25	<i>his</i> C3076, <i>rfa</i> , <i>uvrB</i> , <i>bio</i> ⁻
TA 1538	CG	15-35	<i>his</i> C3052, <i>rfa</i> , <i>uvrB</i> , <i>bio</i> ⁻
TA 97 a*	CG	90-180	<i>his</i> D6610, <i>rfa</i> , <i>uvrB</i> , <i>bio</i> ⁻ , pKM101, Ap ^R
TA 98	CG	25-75	<i>his</i> D3052, <i>rfa</i> , <i>uvrB</i> , <i>bio</i> ⁻ , pKM101, Ap ^R

* A cepa TA 97a é sensível a altas concentrações de glicose, por isso recomenda-se o uso de placas de ágar mínimo modificado contendo 0,4% de glicose ao invés de 2% como usual.

5.6.2 Cepas que detectam mutágenos que causam substituição de pares de base no ADN.

Cepa	Alvo da mutação	Taxa de reversão espontânea	Genótipo
TA 1535	CG	20-35	<u>his</u> G46, <u>rfa</u> , <u>uvrB</u> , <u>bio</u> ⁻
TA 100	CG	75-225	<u>his</u> G46, <u>rfa</u> , <u>uvrB</u> , <u>bio</u> ⁻ , pKM101, Ap ^R
TA 102	AT	240-320	<u>his</u> G428, <u>rfa</u> , pKM101, Ap ^R , pAQ1, Tt ^R
TA 104	AT	245-475	<u>his</u> G428, <u>rfa</u> , <u>uvrB</u> , <u>bio</u> ⁻ , pKM101, Ap ^R

5.6.3 Cepas que detectam nitrocompostos formados pelas redutases bacterianas.

Cepa	Alvo da mutação	Taxa de reversão espontânea	Genótipo
TA 98 NR	CG	25-75	<u>his</u> D3052, <u>rfa</u> , <u>uvrB</u> , pKM101, Ap ^R nitroredutase-deficiente
TA 98 1,8 DNP ₆	CG	25-75	<u>his</u> D3052, <u>rfa</u> , <u>uvrB</u> , pKM101, Ap ^R nitropireno redutase deficiente

5.7 Manutenção e estoque das cepas de *S.typhimurium*

Nota: As culturas de *S.typhimurium* são normalmente fornecidas adsorvidas em discos de papel, contidos em sacos plásticos com pequena quantidade de meio de cultura semi-sólido.

5.7.1 Ao receber as culturas, retirar os discos assepticamente dos sacos plásticos com o auxílio de uma pinça esterilizada, fazer estrias em placas de ágar nutriente e colocar o disco em caldo nutriente. Para as cepas TA97a, TA98, TA98NR, TA98 1,8 DNP₆, TA100 e TA104 deve-se utilizar ágar nutriente e caldo nutriente com ampicilina; para a cepa TA 102, ágar nutriente com ampicilina e tetraciclina.

5.7.2 Incubar os caldos (sob agitação - 150 a 170 rpm) e as placas (pernoite) a 37°C.

5.7.3 Culturas-estoque permanentes

Podem ser realizadas a partir do caldo, conforme 5.7.3.1 e 5.7.3.4.

5.7.3.1 Dispensar 0,9 mL do caldo em ampolas de vidro ou plástico, previamente esterilizadas e devidamente identificadas (nº da cepa e data).

5.7.3.2 Adicionar assepticamente 0,1 mL de dimetilsulfóxido (DMSO) como agente crioprotetor.

5.7.3.3 Homogeneizar e levar as ampolas ao "freezer", -20°C por 24 horas. Após este período, transferi-las para "freezer", -70°C ou nitrogênio líquido (-196°C).

5.7.3.4 Recomenda-se manter um controle das cepas congeladas, registrando a data de congelamento e o local de estoque, de cada cepa armazenada.

5.7.4 Placa "master"

Culturas para uso rotineiro devem ser mantidas em placa "master" a 40°C, preparadas conforme 5.7.4.1 a 5.7.4.8.

Nota: Para o preparo da placa master os meios empregados para as culturas que contêm plasmídios devem estar adicionados com os antibióticos específicos (ampicilina para as cepas TA98, TA100, TA97a, TA98NR, TA98 1,8 DNP₆ e TA 104, e ampicilina e tetraciclina para a cepa TA102).

5.7.4.1 Antes de iniciar o trabalho, desinfetar a bancada ou capela de fluxo laminar, usando álcool 70% ou outro desinfetante que não deixe resíduos.

5.7.4.2 Retirar as ampolas com a cultura-estoque permanente do nitrogênio líquido ou "freezer" a -70°C e, com o auxílio de um palito de inoculação, transferir uma alíquota da cultura congelada para 2 erlenmeyers com 30 mL de caldo nutriente. Incubar a 37°C por 12 a 16 horas sob agitação (150-170 rpm).

5.7.4.3 Após o período de incubação, com o auxílio de uma alça de inoculação, estriar as culturas em placas de ágar nutriente, de forma a obter colônias isoladas. Incubar as placas invertidas a 37°C por 24 horas.

5.7.4.4 Selecionar 10 colônias isoladas de cada cepa e transferir uma a uma para tubos com 5 mL de caldo nutriente. Incubar em mesa agitadora recíproca a 37°C por 12-16 horas, sob agitação de 150-170 rpm.

Nota: NÃO adicionar tetraciclina aos caldos utilizados para a cepa TA102.

5.7.4.5 Após o período de incubação, inocular as culturas em ágar mínimo glicosado com histidina/biotina em forma de estrias grossas e incubar as placas invertidas a 37°C por 24 horas.

5.7.4.6 As placas "master" devem ser vedadas com parafilme e armazenadas até 2 meses, sob refrigeração (4°C). As placas "master" da cepa TA102 são poderão ser armazenadas por 2 semanas, sendo que, após este período, a taxa de reversão espontânea se eleva significativamente, inviabilizando sua utilização.

5.7.4.7 Antes do uso de uma nova linhagem ou no preparo da placa "master", todas as culturas devem ser verificadas quanto a sua taxa de reversão espontânea e presença de marcadores genéticos (dependência da histidina, fator R, mutação rfa, deleção uvrB).

5.7.4.8 Se os caldos que deram origem às placas "master" não apresentarem as características esperadas, estas deverão ser desprezadas e novas placas "master" deverão ser preparadas.

5.8 Verificação das características genéticas das cepas de *S.typhimurium*
Os testes para verificação das características genéticas das cepas de *S.typhimurium* devem ser realizadas a partir das culturas (pernoite) que deram origem à placa "master" ou culturas de cepas novas.

5.8.1 Dependência da histidina

O caráter his⁻ das cepas-teste é confirmado pela demonstração do requerimento de histidina para crescer em placas de ágar mínimo.

5.8.1.1 Semear a cultura crescida em caldo nutriente em estria única, com o auxílio de uma alça de inoculação, em placa de ágar mínimo com biotina (controle) e, a seguir, em placa de ágar mínimo com histidina/biotina. Cinco a seis culturas podem ser testadas em uma mesma placa e devem ser devidamente identificadas, marcando-se o número correspondente a cada cultura testada, no local da estria, no fundo da placa de Petri.

5.8.1.2 Incubar as placas invertidas a 37°C (pernoite) e verificar a presença de crescimento.

5.8.1.3 Para todas as cepas de *S.typhimurium* as placas de controle, ágar mínimo com biotina não deverão apresentar crescimento; as placas com histidina/biotina deverão apresentar crescimento.

5.8.2 Presença de mutação rfa

O caráter rfa das cepas-teste é confirmado através da sensibilidade ao cristal violeta.

5.8.2.1 Semear 0,1 mL do caldo nutriente (pernoite) em placa de ágar nutriente com o auxílio de uma alça de Drigalski. Deixar secar.

5.8.2.2 Com auxílio de uma pinça previamente flambada, colocar no centro da placa de ágar nutriente um disco de papel de filtro esterilizado, de 5 mm de diâmetro, embebido com 10 μ L de solução de cristal violeta 0,1%.

5.8.2.3 Incubar as placas invertidas a 37°C por 24 horas e verificar a presença de halos de inibição de crescimento.

5.8.2.4 Todas as cepas de S.typhimurium deverão apresentar uma zona de inibição de crescimento de, no mínimo, 14 mm, ao redor do disco com solução de cristal violeta.

5.8.3 Presença de deleção uvrB

A mutação uvrB pode ser confirmada, verificando-se a sensibilidade a UV.

5.8.3.1 Semear a cultura em caldo nutriente (pernoite), na superfície de uma placa de ágar nutriente, em estrias paralelas.

5.8.3.2 Retirar a tampa da placa, cobrir metade com cartolina ou papel alumínio. Irradiar a placa com lâmpada germicida de 15 W, a uma distância de 33 cm. Expor as cepas que contêm plasmídeo pKM101 (TA97a, TA98, TA98NR, TA98 1,8 DNP₆, TA100, TA102 e TA104) por 8 segundos; as cepas sem plasmídeo pKM101 (TA1535, TA1537 e TA1538), por 6 segundos.

5.8.3.3 Incubar as placas invertidas a 37°C por 24 horas e verificar a presença de crescimento.

5.8.3.4 As cepas com deleção uvrB crescerão somente na metade da placa não irradiada. A cepa TA102, que não apresenta essa deleção, crescerá por toda a placa (ver item 5.6.2).

5.8.4 Presença de plasmídeo pKM101

As cepas com fator R (TA97a, TA98, TA98NR 1,8 DNP₆, TA100, TA102 e TA104) devem ser testadas rotineiramente para a presença do plasmídeo pKM101, que confere resistência à ampicilina.

5.8.4.1 Com o auxílio de uma alça de inoculação, estriar (em forma de X) uma solução de ampicilina 8mg/mL, em placas de ágar nutriente. Deixar secar.

5.8.4.2 Dividir a placa em quadrantes e, em cada um deles, inocular a cultura em caldo nutriente (pernoite), perpendicularmente à estria do antibiótico (ver Figura 1).

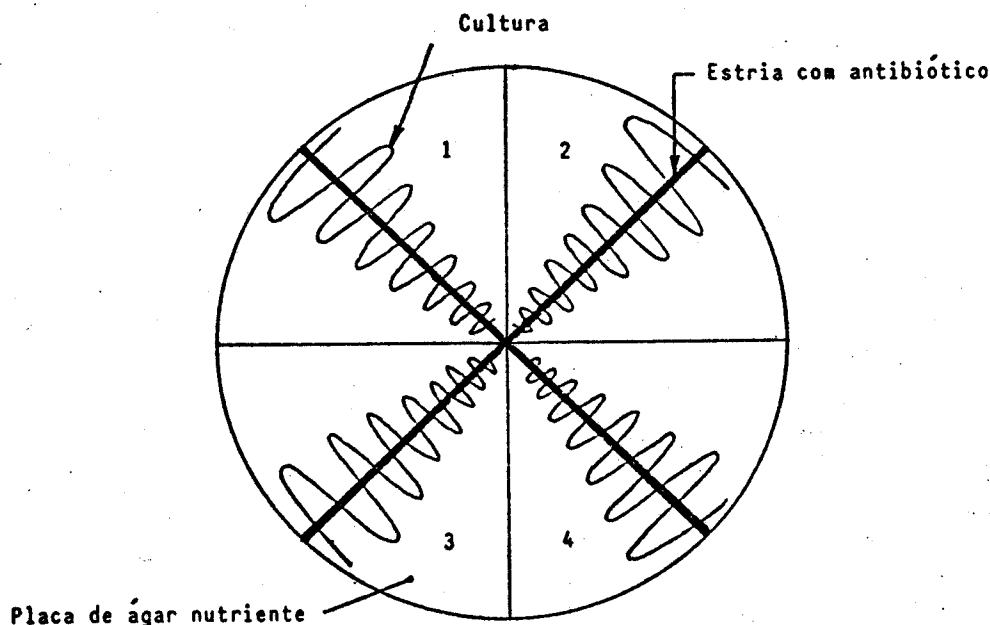


FIGURA 1 - Placa com inoculação de cultura

5.8.4.3 Incubar as placas invertidas a 37°C por 24 horas e verificar a ocorrência de crescimento.

5.8.4.4 As cepas resistentes à ampicilina (TA97a, TA98, TA98NR, TA98 1,8 DNP₆, TA100, TA102 e TA104) não serão inibidas pelo antibiótico, devendo crescer continuamente através das estrias. As cepas sensíveis à ampicilina (TA1535, TA1537 e TA1538) terão seu crescimento interrompido na zona da estria da solução de ampicilina.

5.8.4.5 Para verificar a presença do plasmódio pAQ1 que confere resistência à tetraciclina proceder como em 5.8.4.1 a 5.8.4.3, substituindo a solução de ampicilina por uma solução de tetraciclina 8 mg/mL. Apenas a cepa TA102, resistente à tetraciclina, não deverá ser inibida pelo antibiótico.

5.8.5 Taxa de reversão espontânea

A reversão espontânea das cepas-teste de his^- para his^+ é medida rotineiramente, sendo que a frequência da reversão é característica de uma única cepa. As colônias revertentes, prototróficas para a histidina,

são facilmente visíveis em placas de ágar mínimo em contraste com as colônias auxotróficas, que formarão uma fina camada de crescimento bacteriano ("background"). A determinação da taxa de reversão espontânea deve ser realizada conforme 5.8.5.1 a 5.8.5.9.

5.8.5.1 Fundir quantidade suficiente de ágar de superfície após a estabilização em banho-maria a 45°C.

5.8.5.2 Após homogeneização, dispensar alíquotas de 2,5 mL em tubos de 15 X 150 mm esterilizados, previamente estabilizados a 45°C em banho seco.

5.8.5.3 Mantendo os tubos em banho seco, adicionar 0,1 mL do caldo nutriente (pernoite). Agitar por 3 segundos em vortex a baixa velocidade e verter em placa de ágar mínimo.

5.8.5.4 Imprimir movimentos circulares à placa, de forma que o ágar de superfície distribua-se uniformemente sobre o meio de cultura.

5.8.5.5 Deixar o ágar solidificar-se em uma superfície plana e incubar as placas invertidas a 37°C por 66 horas.

5.8.5.6 Cada caldo deve ser testado, no mínimo, em triplicata.

5.8.5.7 As colônias revertentes deverão ser contadas como colônias individuais contra a fina camada de crescimento ("background").

5.8.5.8 Calcular a média aritmética para a contagem em triplicata de cada caldo de cultura testado. A taxa de reversão espontânea deverá estar dentro dos limites apresentados nos itens 5.6.1, 5.6.2 e 5.6.3.

Nota: Algumas diferenças no número de colônias revertentes espontâneas podem ser observadas ao longo do tempo, mas não deve haver variação extrema de um experimento para o outro. Um desvio de contagem que está fora das variações aceitáveis é uma indicação de que as características genéticas das cepas-teste devem ser verificadas.

5.8.5.9 Para cada cepa, escolher 2 caldos de cultura que apresentaram taxa de reversão espontânea dentro dos limites normais e todas as demais características genéticas, e proceder ao congelamento dos mesmos, como em 5.7.3, para manter adequado o estoque de culturas permanentes. Placas "master" novas devem ser sempre realizadas a partir da cultura-estoque permanente e nunca a partir de outra placa "master", devido à possibilidade de alterações nas características genéticas das cepas e perda de plasmídios por subcultivos.

5.9 Preparo dos inóculos de *S. typhimurium* utilizados no ensaio

5.9.1 Semear, com auxílio de uma alça de inoculação, pequena quantidade de do crescimento da cultura da placa "master" em 20 mL de caldo nutriente. Não adicionar antibióticos aos caldos de cultura.

5.9.2 Incubar a 37°C por 18 a 20 horas, sob agitação (150-170rpm), de modo a obter uma densidade de 2×10^9 bactérias/mL.

5.9.3 Remover as culturas da estufa e colocar o conteúdo dos caldos em tubos de centrifuga apropriados assepticamente.

5.9.4 Após tarar os tubos adequadamente em balança semi-analítica, centrifugar em centrifuga a 10 000 rpm por 10 minutos a 4°C.

5.9.5 Após centrifugação, descartar o sobrenadante e ressuspender o conteúdo em 4 mL de tampão fosfato 0,015 M. Manter as cepas preparadas sob refrigeração (2 a 8°C) até o momento do ensaio.

5.10 Preparo da mistura S9

5.10.1 Preparar quantidade adequada de mistura S9 conforme recomendações em 5.4.10, imediatamente antes do início do ensaio.

5.10.2 Manter a mistura em banho de gelo por, no máximo, 3 horas.

5.10.3 Observar os cuidados de assepsia durante a preparação e manipulação da mistura S9.

5.11 Controles negativos

O controle negativo consiste em água destilada ou no próprio solvente utilizado para dissolução do produto químico ou amostra em teste. Utilizar o mesmo volume utilizado para a amostra teste.

5.12 Controles positivos

Todo ensaio deve ser realizado incluindo controles positivos para confirmar as propriedades de reversão e especificidade de cada cepa, bem como a eficácia do sistema de ativação metabólica. Recomenda-se o uso das substâncias padrões descritas na Tabela 1, podendo-se empregar outros controles, desde que em concentrações adequadas.

5.13 Controle de toxicidade

A toxicidade de uma amostra ou substância química pode ser verificada através do exame rotineiro da presença de "background" nas placas-teste de ágar mínimo. Nos casos da presença de toxicidade ("background") ausente ou reduzido, reduzir as concentrações das amostras ou substâncias químicas testadas.

TABELA 1 - Controles positivos empregados no ensaio

Ensaio	Composto	Solvente	Concentração por placa (em volumes de 2 μ L)	Cepas
Sem ativação (-S9)	4-nitroquinoline oxide	DMSO	0,05-0,1 μ g	TA1537, TA1538, TA97a, TA98, TA104
	2-nitrofluoreno	DMSO	0,05-0,1 μ g	TA98NR e 1,8 DNP6
	azida sódica	água destilada	2,5-5,0 μ g	TA1535, TA100
	mitomicina C	água destilada	0,5-1,0 μ L	TA102
Com ativação (+ S9)	2-aminoantraceno	DMSO	0,1-0,2 μ g	TA1535, TA1537, TA1538, TA97a, TA98, TA100, TA102 e TA104

Notas: a) DMSO - dimetilsulfóxido.

b) As soluções dos compostos acima devem ser manipulados com o máximo cuidado, de forma a evitar qualquer contato com o operador.

5.13.1 Preparar diluições de 10^{-5} a 10^{-8} a partir da cultura de *S.typhimurium* em caldo nutriente (pernoite) a ser utilizada no ensaio. Quando for utilizada mais de uma cultura, realizar o teste de toxicidade, de preferência com a cepa TA98.

5.13.2 Adicionar 0,1 mL de cada diluição a 2,5 mL de ágar de superfície ("top ágar") esterilizado a 45°C, que contenha diferentes concentrações da amostra.

5.13.3 Em paralelo, usar um controle negativo com água destilada ou o solvente utilizado na dissolução das amostras.

5.13.4 Homogeneizar o ágar de superfície ("top ágar") levemente com o auxílio de um agitador tipo Vortex, verter sobre uma placa de ágar nutriente e, após solidificação, incubar as placas invertidas por 24 horas a 37°C.

5.13.5 Contar o número de colônias e comparar os resultados obtidos para as diferentes concentrações com o controle negativo. Verificar se houve inibição no crescimento de bactérias.

5.13.6 Utilizar como dose máxima no teste a maior concentração que não apresentou efeito tóxico sobre as cepas testadas, sempre em volumes de 2 μ L.

5.14 Controle de viabilidade

A viabilidade de cultura concentrada (5.9) deverá ser avaliada após diluição a 10^8 e inóculo em ágar nutriente. Deve-se utilizar culturas com concentrações de 0,5 a 2×10^{10} células/mL. Valores inferiores comprometem a sensibilidade do ensaio.

5.15 Procedimento do ensaio

Este teste utiliza o método de pré-incubação segundo KADO e COL (1987).

5.15.1 Antes de iniciar qualquer operação, desinfetar a capela de fluxo laminar, usando álcool 70% ou outro desinfetante que não deixe resíduos. Trabalhar sempre em capela de fluxo laminar.

5.15.2 Adicionar 2 μ L das diferentes diluições da amostra em tubos de ensaio (15 x 120 mm), com tampa de aço inoxidável, em duplicata, com todo cuidado, utilizando luvas apropriadas.

5.15.3 Acrescentar a cada tubo 50 μ L de cultura previamente concentrada.

5.15.4 Adicionar em seguida 50 μ L de tampão fosfato 0,015M para o ensaio sem ativação metabólica, e 50 μ L de mistura S9 para o ensaio com ativação metabólica.

5.15.5 Agitar cada tubo, utilizando um agitador tipo Vortex.

5.15.6 Incubar a mistura por 90 minutos, em estufa a 37°C sem agitação.

5.15.7 Fundir o ágar de superfície ("top ágar") e, após estabilização a 45°C, distribuir alíquotas de 2,5 mL em cada um dos tubos previamente dosados e incubados. Para este procedimento utilizar banho seco para manter a temperatura dos tubos em 45°C até o momento da distribuição da mistura nas placas.

5.15.8 Agitar o tubo levemente por 3 segundos com o auxílio de um Vortex a baixa velocidade e verter o conteúdo em placa de ágar mínimo.

5.15.9 Imprimir movimentos circulares à placa de forma que o ágar de superfície se distribua uniformemente sobre o meio de cultura. Deixá-lo solidificar-se em superfície plana.

5.15.10 Incubar em placas invertidas a 37°C por 66 horas.

5.15.11 Realizar os controles negativos e positivos de acordo com 5.15.1 a 5.15.8, exceto 5.15.2, onde, ao invés da amostra, devem ser adicionados 2 μ L do controle específico (ver 5.12).

5.15.12 Proceder à contagem do número de colônias revertentes proto-tróficas por placa com auxílio de um contador automático do tipo Bio-tran ou manual tipo Quebec e anotar os valores em ficha apropriada.

5.15.13 No momento da leitura das placas, deve-se verificar: a presença de "background" nas placas-teste e controle, a frequência de reversão espontânea das placas-controle (negativo) e a eficiência do controle positivo. O ensaio deverá ser repetido se o "background" estiver ausente, se a taxa de reversão espontânea normal estiver fora do esperado e se os controles positivos não apresentarem atividade mutagênica frente às cepas-teste. Neste ensaio, taxas de reversão um pouco mais elevadas são esperadas, não inviabilizando a interpretação dos resultados.

6 RESULTADOS

6.1 Expressão dos resultados

6.1.1 Os resultados podem ser expressos através da razão de mutagenicidade (RM), para cada uma das doses testadas:

$$RM = \frac{E}{C}$$

onde:

E = número de colônias revertentes na placa-teste (revertentes espontâneas + revertentes induzidas).

C = número de colônias revertentes na placa de controle negativo (revertentes espontâneas).

Deve-se especificar a concentração da amostra testada em μg de produto sólido em mL, litro, m^3 ou g equivalente, dependendo do tipo da amostra.

6.1.2 Deve-se também expressar os resultados em nº de revertentes por μg de extratos ou por mL, litro, m^3 ou g equivalente da amostra, dependendo da mesma. Para isso, deve-se calcular a inclinação da reta de regressão obtida após uma análise estatística adequada.

Nota: Para este cálculo recomenda-se o uso de um programa denominado SALMONEL, desenvolvido por Dr. Lawrence Myers do RTI, RTP, USA, porém outras análises de regressão linear poderão ser empregadas.

6.2 Interpretação dos resultados

6.2.1 Amostra positiva

Resultados positivos no teste de Kado, utilizando-se S.typhimurium, indicam que a substância em teste induz mutações de ponto por substituição de bases ou deslocamento do quadro de leitura no genoma desse microrganismo.

6.2.1.1 Um resultado é considerado positivo quando o número de colônias revertentes induzidas é igual ou superior ao dobro do número de colônias revertentes espontâneas do controle negativo. O fator 2 deve ser usado apenas como guia, pois, quando uma cepa apresenta taxa de mutação espontânea muito baixa, como é o caso da TA1535, TA1537 e TA1538, o número de revertentes deve ser igual ou superior ao triplo (fator 3), a fim de assegurar a significância do ensaio. Além disso, deve existir uma relação de dose-resposta entre as concentrações testadas e o número de revertentes induzidas em pelo menos 3 das doses testadas, comprovada através do emprego de análises estatísticas adequadas.

6.2.2 Amostra negativa

Resultados negativos no teste de Kado, utilizando-se S.typhimurium, indicam que, nas condições do ensaio, a substância ou amostra na dose testada não apresenta atividade mutagênica para a cepa-teste.

6.2.2.1 Considera-se resultado negativo quando o número de colônias revertentes da amostra e do controle negativo padronizado for inferior ao dobro da taxa da reversão das colônias revertentes espontâneas e não for observada uma relação de dose-resposta nas doses testadas.

6.2.3 O laudo técnico sobre o ensaio deve incluir as seguintes informações:

- a) caracterização completa da amostra;
- b) tipos de cepas empregadas;
- c) sistema de ativação metabólica utilizado;
- d) concentração(ões) da(s) amostra(s) empregada(s);
- e) resultados do ensaio;
- f) interpretação dos resultados;
- g) método empregado;
- h) nome e assinatura do responsável pela análise.

7 RECOMENDAÇÕES

7.1 Para uma triagem rotineira da atividade mutagênica de uma amostra recomenda-se o uso das cepas TA98 e TA100, as quais têm se mostrado eficientes na detecção de um grande número de mutágenos ambientais; entretanto, dependendo da amostra, objetivo, condições do teste e volume da amostra disponível para teste, também poderão ser empregadas outras cepas (ex.: TA102, TA104, TA97a, TA1535, TA1538, TA1537, TA98NR e TA98 1,8 DNP6).

7.2 Cuidados especiais devem ser tomados com relação à padronização da metodologia, verificação das características genéticas das cepas empregadas, atividade da fração S9, bem como o controle da qualidade dos reagentes, meios de cultura e vidraria utilizada no ensaio, a fim de assegurar a confiabilidade dos resultados.

/ANEXO A

ANEXO A - PROCEDIMENTOS COMPLEMENTARESA-1 Ensaio de controleA-1.1 Teste de esterilidade

Após terem sido preparados, e antes de serem usados, quaisquer soluções ou meios de cultura são rotineiramente testados, quanto à presença de fungos e/ou bactérias. Este teste consiste na inoculação de 1 ml de cada frasco da solução em teste em 2 tubos de caldo de soja e tripton (ver 5.5.1), os quais, após sementeira, são incubados a 35°C durante, no mínimo, 48 horas (deve-se efetuar leituras diárias até completar 14 dias). Constitui evidência da presença de microrganismos qualquer turvação do caldo de soja e tripton. Essa contaminação pode ser decorrente de falhas no processo de esterilização ou contaminação após a esterilização.

A-1.2 Lavagem, preparo e esterilização de materiais em laboratório de microbiologia (ver Norma CETESB M1.001)A-1.3 Lavagem do material utilizado no teste de Ames

Todos os materiais utilizados no teste, tais como: frascos de coleta, placas de Petri de vidro, tubos de ensaio, pipetas e ponteiras, devem ser descontaminados em autoclave a 121°C por 30 minutos e, a seguir, lavados com detergente neutro e enxaguados várias vezes. Após enxague, devem ficar submersos em solução de ácido sulfúrico/ ácido nítrico 50% (6:1) por 8 horas. Enxaguar 8 a 10 vezes com água corrente e uma vez com água destilada. Secar o material de vidro em estufa a 170-180°C e as ponteiras de polipropileno em estufa a 35°C. Não utilizar solução sulfocrômica na lavagem de material para teste de Ames.

Nota: Utilizar, de preferência, placas de Petri descartáveis.

A-1.4 Controle de qualidade dos meios de cultura (ver Norma CETESB L5.216)A-1.5 Controle da qualidade da água destilada

A água destilada a ser empregada no preparo de meios de cultura e soluções deve ser de alta qualidade, livre de substâncias tóxicas ou nutritivas que possam influenciar na sobrevivência e crescimento dos microrganismos. É recomendável a avaliação periódica de sua qualidade, através de testes específicos (ver Norma CETESB L5.215 - "Prova de adequabilidade da água destilada para fins microbiológicos").

A-1.6 Controle de eficiência da autoclave

Utilizar ampolas com suspensão de esporos de Bacillus stearothermophilus em meio de cultura, colocando-as no centro da caixa que contém os meios de cultura a serem esterilizados. Essas ampolas, depois da autoclavagem, são incubadas em banho-maria a 55°C durante 24 a 48 horas. Se houver mudança da coloração da suspensão contida nas ampolas, de roxa para amarela, isto significa que a esterilização foi insuficiente, pois houve desenvolvimento de bactérias.

A-1.7 Controle de esterilidade de vidraria e materiais

É recomendável a realização de testes específicos para avaliar e comprovar a esterilidade de vidraria e materiais submetidos a esterilização em estufa, a 171-180°C, ou em autoclave a 121°C. Para realização desses testes ver Norma CETESB L5.010 - "Avaliação de laboratório de análises bacteriológicas de água".

A-2 Local de trabalho

A-2.1 As câmaras de segurança biológica devem estar localizadas em áreas de movimento reduzido, livres de poeira; não deve haver movimentação excessiva de ar devido ao uso de ventiladores, exaustores etc.

A-2.2 Se a câmara estiver instalada em local com ar condicionado, a entrada de ar não deve ser dirigida diretamente sobre a área de trabalho, a não ser que o condicionador tenha um filtro de ar especial.

A-2.3 A câmara deve ter um duto de exaustão com filtros apropriados para filtrar o ar antes de ser liberado para o ambiente externo.

A-3 Precauções

Dentre as pessoas que trabalham no laboratório, aquelas que têm menor tempo de treinamento e as que estão mais diretamente associadas a manobras com material contaminado são as que apresentam maiores possibilidades de ser contaminadas acidentalmente. A inalação de aerossóis, a aspiração de soluções contaminadas através de pipetas e outros acidentes devem ser prevenidos pelo uso de protetores faciais adequados, pipetadores e pela obediência às normas específicas relativas ao trabalho e uso de equipamento (ver Norma CETESB L5.009 - "Segurança e higiene do trabalho em laboratório de microbiologia").

A-3.1 Protetor facial e máscaras de proteção contra gases e pós tóxicos

De utilização obrigatória (juntamente com luvas adequadas) no preparo de soluções de ácidos a serem empregados na lavagem de materiais, no

no preparo de soluções de compostos mutagênicos e na manipulação de solventes.

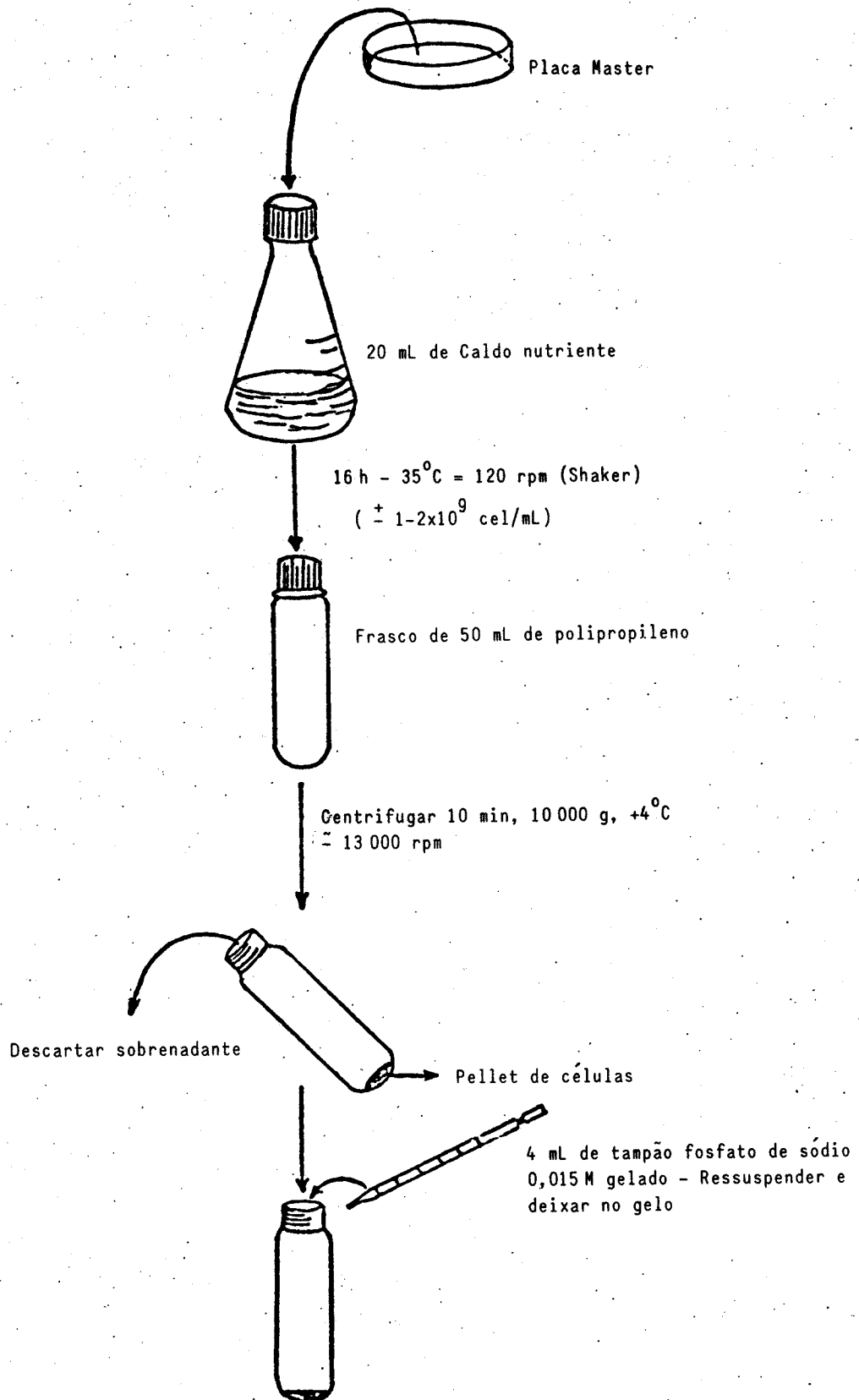
A-4 Cuidados na manipulação de cepas de *S.typhimurium*

A-4.1 *Salmonella typhimurium* pode causar diarreia e intoxicação alimentar quando ingerida. Todas as cepas de *S.typhimurium* empregadas no teste de Ames são derivadas da linhagem LT2, que não apresenta alta virulência. A baixa virulência apresentada por essas cepas é devida à presença de mutação rfa e plasmídios de resistência.

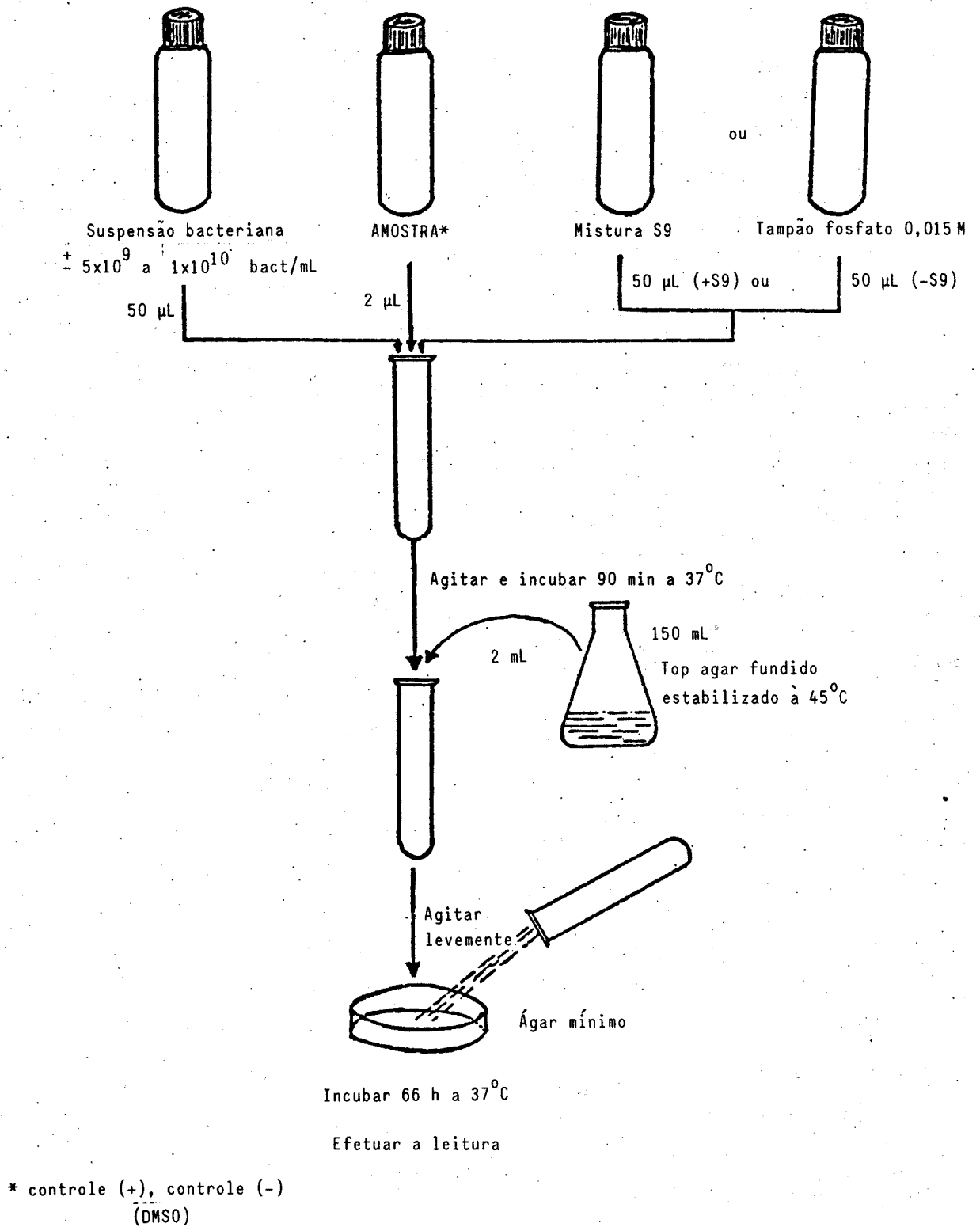
A-4.2 Como precaução rotineira, deve-se autoclavar qualquer material contaminado, antes da lavagem ou descarte dos mesmos. Não se deve permitir manter nenhum tipo de alimento no interior dos refrigeradores, onde as cepas são armazenadas.

A-5 Disposição de material contaminado por substâncias mutagênicas

Todo material mutagênico e/ou cancerígeno deve ser acondicionado em vasilhames plásticos adequados, selados em sacos plásticos duplos e incinerados a temperatura elevada, o suficiente para que ocorra a destruição do agente mutagênico. O mesmo procedimento deve ser efetuado para luvas, ponteiras, filtros e placas de Petri descartáveis utilizadas como controle positivo. Os materiais de vidro não podem ser incinerados; devem ser acondicionados adequadamente e dispostos em aterro para resíduos perigosos. Os materiais, bem como as soluções, podem também ser descontaminados através de neutralização por agentes químicos.

ANEXO B - ESQUEMAS DE PROCEDIMENTOSESQUEMA 1 - Preparo da suspensão bacteriana para o teste de Kado

OBS.: Para cada amostra ou controle utiliza-se um total de 600 µL de suspensão bacteriana

ESQUEMA 2 - Procedimento do teste de Kado

ANEXO C - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- C-1 ABNT - Preservação e técnicas de amostragem de efluentes líquidos e corpos receptores. NBR 9898, Brasil, 1987.
- C-2 AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION. Microbiological examination of water. In: Standard methods for the examination of water and wastewater. 16ª ed. Washington, APHA, AWWA, WPCF, 1985. p. 827-1028.
- C-3 AMES, B.N.; McCANN, J. & YAMASAKI, E. Methods for detecting carcinogens and mutagens with the Salmonella/mammalian microsome mutagenesis test. Mutat. Res., 31: 347-364, 1975.
- C-4 ASTM - Standard method for detection of bacterial mutagens in water and formed deposit. In: Annual Book of ASTM Standards Part 31, 1980.
- C-5 BRUSICK, D.J. & Young, R.R. - IERL-RTP Procedures Manual: Level 1 Environmental assessment biological tests. Washington, U.S. EPA, 1981, p. 138 (EPA 600/8-81-024).
- C-6 BRUSICK, D.J.; YOUNG, R.R. - MYHR, B.C. & JAGANNATH, D.R. Quality Control and Quality Assurance procedures for level 1 health effects bioassays. Washington, U.S. EPA 1983 p. 13-25 (EPA 600/8-83-034).
- C-7 CETESB. Avaliação de laboratório de análises bacteriológicas de água. Norma CETESB L5.010. São Paulo, 1989.
- C-8 _____. Controle de qualidade de meios de cultura. Norma CETESB L5.216. São Paulo, 1987.
- C-9 _____. Lavagem, preparo e esterilização de materiais de laboratório de microbiologia. Norma CETESB M1.001. São Paulo, 1986.
- C-10 _____. Prova de adequabilidade biológica da água destilada para fins microbiológicos. Norma CETESB L5.215. São Paulo, 1985.
- C-11 _____. Segurança e higiene do trabalho em laboratório de microbiologia ambiental. Norma CETESB L5.009. São Paulo, 1987.

- C-12 . Mutação gênica reversa em *Salmonella typhimurium* - Teste de Ames, Norma CETESB L5.620. São Paulo, 1987.
- C-13 DUKTA, B.J. Concentration procedures for liquid samples for mutagen testing. Canada, Feb. 1980 (ISO/TC147/SC5/WG7).
- C-14 HEALTH AND WELFARE, Guidelines on the use for mutagenicity tests in the toxicological evaluation of chemicals. Ottawa, Canada, 1986.
- C-15 JOICE, R.M. Prudent practices for disposal of chemicals from laboratories. Science, 224: 449-452, 1984.
- C-16 KADO, N.Y.; LANGLEY, D. & EISENSTADT. A simple modification of the *Salmonella* liquid incubation assay. Mutation Research, 121: 25-32, 1983.
- C-17 KADO, N.Y.; TESLUK, S.J.; HAMMOND, S.K.; WOSKIE, S.R.; SAMUELS, S.J. & SCHENKER, M.D. Use for the *Salmonella* micropreincubation procedure for studying personal exposure to mutagens in environmental tobacco smoke. Pilot study of urine and airborne mutagenicity from passive smoking. In: SANDHU e col (eds). Short term bioassays in the analysis of complex environmental mixtures, V New York, Plenum p. 375-390, 1987.
- C-18 LEONARD, A. Stratégie et interpretation des tests à court terme. Ann. Biol. Clin., 44: -62-664, 1986.
- C-19 LEVIN, D.E.; HOLLSTEIN, M.; CHRISTMAN, M.F.; SCHWIERS, E.A. & AMES, B.N. A new *Salmonella* tester strain (TA102) with A:T base pairs at the site of mutation detects oxidative mutagens. Proc. Natl. Acad. Sci. (USA), 79: 7445-7449, 1982.
- C-20 MARON, D.M. & AMES, B.N. Revised methods for the *Salmonella* mutagenicity test. Mutat. Res., 113: 173-215, 1983.
- C-21 PELCZAR, M.; REID, R. & CHAN, E.C. Microbiologia. São Paulo, McGraw-Hill, v. 1, 1980, p. 574.
- C-22 WHO. Long term and short-term screening assays for carcinogens: a critical appraisal. Lyon, IARC, WHO, supplement, 2, 1980. p.426.