



NORMA TÉCNICA

L5.620

Jan/1993
40 PÁGINAS

Mutação gênica reversa em *Salmonella typhimurium* - teste de ames: 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	MUTAÇÃO GÊNICA REVERSA EM <u>SALMONELLA TYPHIMURIUM</u> - TESTE DE AMES Método de ensaio	L5.620 JAN/93
--------	---	----------------------

SUMÁRIO

	Pág.
Introdução.....	1
1 Objetivo.....	2
2 Normas complementares.....	3
3 Definições.....	3
4 Aparelhagem.....	4
5 Execução do ensaio.....	9
6 Resultados.....	33
7 Recomendações.....	34
Anexo A - Procedimentos complementares.....	35
Anexo B - Esquema de procedimento.....	38
Anexo C - Referências bibliográficas.....	39

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 têm 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 agentes químicos foram desenvolvidos ensaios que detectam direta ou indiretamente o dano causado por esses agentes ao material genético. Tais testes podem ser realizados tanto em microrganismos (bactérias e fungos) como em culturas de células de mamíferos, plantas e animais. Entre os vários ensaios microbianos de curta duração, que utilizam bactérias, o mais comumente utilizado tem sido o teste de Ames, principalmente pela sua simplicidade, baixo custo, sensibilidade e reprodutibilidade.

O teste de Ames foi desenvolvido pelo Dr. Bruce Ames e colaboradores, na Universidade de Berkeley, Califórnia, em 1975, e foi aperfeiçoado por Maron e Ames em 1983.

Esse ensaio utiliza linhagens de S. typhimurium especialmente construídas, capazes de detectar produtos químicos que causam mutações gênicas por deslocamento do quadro de leitura ("frameshift") ou por

substituição dos pares de base do ADN. Para detecção de substâncias promutagênicas, inclui-se no ensaio fração microsomal de fígado de rato, um sistema de ativação enzimática, que permite a avaliação dos metabólitos da substância em teste.

O ensaio tem sido amplamente utilizado para se determinar a mutagenicidade de grande número de compostos químicos puros ou fracionados, sendo que até o ano de 1982 já tinham sido testados mais de 5 000 produtos frente ao teste de Ames, segundo o Environmental Mutagen Information Center Index (EMIC), 1982.

O teste de Ames tem também aplicação de interesse no monitoramento de populações expostas a agentes químicos, detecção de mutágenos em urina de fumantes ou de animais tratados com mutágenos e alimentos contaminados com agentes mutagênicos.

O teste de Ames vem sendo muito utilizado na avaliação da genotoxicidade de amostras ambientais (água, ar, efluentes industriais, lixiviados de resíduos sólidos, extratos fracionados, etc.) e é recomendado por conceituadas entidades governamentais e órgãos de pesquisas dos Estados Unidos, Canadá e vários países da Europa. O ensaio é considerado parte essencial dos testes toxicológicos, na triagem e localização de fontes potenciais de agentes genotóxicos e constitui-se em valioso instrumento no gerenciamento e planejamento de medidas, tais como monitorar e controlar a introdução de poluentes mutagênicos no meio ambiente.

1 OBJETIVO

1.1 Esta Norma prescreve o método de mutação gênica reversa em Salmonella typhimurium - teste de Ames, empregado na detecção de substâncias mutagênicas.

1.2 O teste de Ames tem por finalidades:

- 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, pesticidas, produtos naturais, fluidos 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 microbiológicas 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 no trabalho em laboratórios de microbiologia ambiental (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 Mutaçãõ por deslocamento do quadro de leitura ("frameshift")

Mutaçãõ causada pela adiçãõ ou deleçãõ de nucleotídios na molécula de ADN.

3.6 Mutaçãõ rfa

Mutaçãõ que causa modificações na camada lipopolissacarídica da membrana celular bacteriana, propiciando uma maior permeabilidade da célula a moléculas grandes.

3.7 Mutaçãõ por substituiçãõ de pares de bases ("base pair substitution")

Mutaçãõ causada pela troca ou substituiçãõ de nucleotídios na molécula de ADN.

3.8 Mutaçãõ uvrB

Mutaçãõ causada por deleçãõ de um dos genes responsáveis pelo reparo de excisãõ, 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 deleçãõ 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 que contém um gene para resistênciã à tetraciclina e contém a mutaçãõ hisG428.

3.11 Plasmídeo pKM101

Plasmídeo que contém um gene para resistênciã à ampicilina. Sua presença confere à bactéria maior sensibilidade a mutágenos.

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 ar existente na câmara. A operação 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 10g.

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 deva 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 Congeladores

Com regulagem 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.

4.1.9 Contador de colônias

Automático, tipo Biotran; ou manual, tipo Quebec.

4.1.10 Destilador de água ou aparelho para desionização

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

4.1.11 Estufa para esterilização e secagem

A estufa deve acondicionar pipetas, placas de Petri, frascos para coleta, tubos e toda a 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 $170-180^{\circ}\text{C}$. O tempo de esterilização para a maior parte da vidraria é de duas horas, a uma temperatura de $170-180^{\circ}\text{C}$.

4.1.12 Incubadora bacteriológica

Deve ser equipada com termostato e projetada de tal forma que a temperatura, em todas as partes utilizadas, seja a 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 .

4.1.13 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.

4.1.14 Placa aquecedora

Com temperatura regulável até 100°C .

4.1.15 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.

4.1.16 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 roscada, não tóxica, e capacidade de 125 mL e 250 mL.

4.2.2 Frascos de coleta

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

4.2.3 Frascos para o 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 150 mm, com tampas de aço inoxidável, e tubos 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 Máscaras 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 estéreis

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 10 a $100\ \mu\text{L}$, 100 a $1\ 000\ \mu\text{L}$, com ponteiros de polipropileno apropriadas e autoclaváveis. As ponteiros 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 dosadoras 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 Tripé

4.3.25 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.

4.3.26 Zaragatoas

Hastes de madeira com aproximadamente 20 cm de comprimento, contendo na extremidade algodão hidrófilo, embrulhadas em papel de alumínio e papel Kraft e esterilizadas por calor seco à 170-180°C durante duas horas.

5 EXECUÇÃO DO ENSAIO

5.1 Princípio do método

Diferentes linhagens de S. typhimurium auxotróficas para a histidina são expostas à amostra ou ao produto químico em teste com e sem ativação metabólica e plaqueadas em ágar mínimo. Após 66 horas de incubação a 37°C 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 testada. Dada a composição do meio de cultura, só formarão colônias as células prototróficas para histidina (his⁺), provenientes de mutações espontâneas ou originadas de mutações provocadas pela amostra.

5.2 Reagentes

5.2.1 Para a preparação dos meios de cultura e das soluções utilizados neste ensaio são necessários os reagentes de 5.2.1.1 a 5.2.1.32.

- 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 Cloreto de magnésio ($MgCl_2 \cdot 6H_2O$) p.a.
- 5.2.1.12 Cloreto de potássio (KCl) p.a.
- 5.2.1.13 Cloreto de sódio (NaCl) p.a.
- 5.2.1.14 Cristal violeta.
- 5.2.1.15 Dimetilsulfóxido (DMSO).
- 5.2.1.16 Fosfato de potássio dibásico (K_2HPO_4) p.a.
- 5.2.1.17 Fosfato de sódio e amônia ($NaNH_4HPO_4 \cdot 4H_2O$) p.a.
- 5.2.1.18 Fosfato de sódio dibásico (Na_2HPO_4) p.a.
- 5.2.1.19 Fosfato de sódio monobásico (NaH_2PO_4) p.a.
- 5.2.1.20 Fração S9 - homogenado de fígado de rato, induzido com Aroclor 1254 liofolizado, proveniente da Molttox - Molecular Toxicology Inc. 111 Gibraltar St., Annapolis, MD, 21401, USA.
- 5.2.1.21 Glicose.
- 5.2.1.22 D-Glicose 6-fosfato.
- 5.2.1.23 Hidróxido de sódio (NaOH) p.a.
- 5.2.1.24 L-histidina HCl.
- 5.2.1.25 Mitomicina C.
- 5.2.1.26 Nutrient Broth nº 2 (OXOID).
- 5.2.1.27 4-nitroquinolina 1 óxido (4NQO) (Sigma).
- 5.2.1.28 Peptona de soja.

5.2.1.30 Sulfato de magnésio ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) p.a.

5.2.1.31 Tetraciclina.

5.2.1.32 Triptona.

5.2.2 Os reagentes devem ser de grau p.a. ou bacteriológico e de procedência idônea, apresentar odor, cor e consistência inalterados, ser livres 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 freqüentemente 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 ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) p.a.	2,0 g
Ácido cítrico ($\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}$)	20,0 g
Fosfato de potássio dibásico (K_2HPO_4)	100,0 g
Fosfato de sódio e amônio ($\text{NaNH}_4\text{HPO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$).....	35,0 g
Água destilada.....	1 000,0 mL

Para o preparo deste meio pesar as substâncias acima nas quantidades especificadas e dissolver em 1 000 mL de água destilada fria. Esterilizar 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 5.3.1 -a) e b) e, antes da distribuição em placas, adicionar assepticamente 6 mL de solução de biotina 0,5 mM (item 5.4.2) 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 contêm 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 contêm 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:

Nutrient Broth nº 2 (OXOID).....	25,0 g
Água destilada	1 000,0 mL

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 30 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 ampicilina

Fórmula:

Nutrient Broth nº 2 (OXOID)	25,0 g
Solução de ampicilina 8 mg/mL	3,15 mL
Água destilada	1 000,0 mL

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 5.4.4). Distribuir alíquotas de 30 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 nutriente

Fórmula:

Nutrient Broth nº 2 (OXOID)	25,0 g
Ágar	15,0 g
Água destilada	1 000,0 mL
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 frequentemente 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:

Nutrient Broth nº 2 (OXOID)	25,0 g
Ágar	15,0 g
Solução de ampicilina 8 mg/mL	3,15 mL
Água destilada	1 000,0 mL

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 5.4.4). 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:

Nutrient 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	1 000,0 mL

Preparo:

Preparar o ágar nutriente com ampicilina de acordo com 5.3.9. 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	1 000,0 mL
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 o "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	1 000,0 mL
pH final: 7,3 ± 0,1	

Preparo:

Pesar os componentes 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/biotinaFórmula:

L-histidina HCl	0,117 g
D-biotina	0,138 g
Água destilada	1 000,0 mL

Preparo:

Pesar os componentes e dissolver em 1 000 mL 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 refri

geração (2 a 8 °C) durante um período máximo de 30 dias.

5.4.2 Solução de biotina 0,5 mM

Fórmula:

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/mL

Fórmula:

Ampicilina	0,08 g
Hidróxido de sódio 0,02 N 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 µm), 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/mL

Fórmula:

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 µm), em tubo com tampa roscada previamente esterilizado e envolver este em papel de 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 1 N

Fórmula:

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. Armazenar em frascos com tampa roscada à temperatura ambiente.

5.4.7 Solução de tampão fosfato 0,2M

Fórmula:

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)	2,84 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)	2,76 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 a solução-estoque A para elevar o pH ou com solução-estoque B para baixá-lo). Distribuir volumes de 100 mL em frascos apropriados. Esterilizar em autoclave a 121°C por 15 minutos. 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, 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.

5.4.9 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 potássio podem ser armazenados sob refrigeração (2 a 8°C) durante um período máximo de 60 dias.

5.4.10 Solução de glicose-6-fosfato 1MFórmula:

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

Preparo:

Para o preparo desta solução dissolver a glicose-6-fosfato em 10 mL de água destilada esterilizada. Esterilizar por membrana filtrante (0,22 μ m) 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.

5.4.11 Solução de NADP 0,1MFórmula:

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

Preparo:

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

5.4.12 Mistura S9 4%Fórmula:

Água destilada.....	375 μ L
Tampão fosfato 0,2M	500 μ L
Glicose-6-fosfato 1M.....	5 μ L
Solução de NADP 0,1M.....	40 μ L
Solução de cloreto de potássio 1,65M.....	20 μ L
Solução de cloreto de magnésio 0,4M.....	20 μ L
Fração S9.....	40 μ L

Preparo:

Esta solução deve ser preparada em capela de fluxo laminar e todos os componentes devem ser mantidos em banho de gelo. Adicionar os componentes assepticamente, em tubos de 18 mm x 180 mm com tampa de aço inoxidável, tomando o cuidado de acrescentar os componentes na ordem apresentada acima (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 contém 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 37°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, 5 horas. A porção da mistura S9 não utilizada deve ser descartada. **Nunca** esterilizar a mistura S9.

5.4.13 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 pós 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 as diluições adequadas. A solução deverá ser descartada após o uso, em frasco apropriado para posterior incineração.

5.4.14 Solução de 2 aminoantraceno 1 mg/mL

Fórmula:

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

Preparo:

Pesar 1 mg de 2 aminoantraceno, com máscara de proteção respiratória para pós 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 dimetilsulfóxido e proceder as diluições adequadas. A solução deverá ser descartada após o uso, em frascos apropriados para posterior incineração.

5.4.15 Mitomicina C 10% v/v

Fórmula:

Mitomicina C.....	0,1 mL
Água destilada esterilizada.....	0,9 mL

Preparo:

Adicionar 0,1 mL de mitomicina C a 0,9 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. Após o uso, pode-se neutralizar a solução com permanganato de potássio a 1% por 30 minutos a 100°C.

5.4.16 Solução de 4-nitroquinolina 1 óxido 1 mg/mL

Fórmula:

4-nitroquinolina 1 óxido	1,0 mg
Dimetilsulfóxido (DMSO).....	1,0 mL

Preparo:

Pesar 1 mg de 4-nitroquinolina, com máscara de proteção contra póx 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 dimetilsulfóxido e proceder as diluições adequadas. A solução deverá ser descartada após o uso, em frascos apropriados para posterior incineração.

5.4.17 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 ₂ SO 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.

5.4.18 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 Amostra

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 ultrassonicação 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 amostradores apropriados em volumes de aproximadamente 2000 m³. Os extratos obtidos poderão ser armazenados, se necessário, em freezer a -20°C, secos e ressuspensos em dimetil

sulfóxido no momento da análise ou um dia antes.

5.6 Organismo indicador

Linhagens mutantes de *S. typhimurium* auxotróficas para histina (*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 nas Tabelas 1 a 3 podem ser empregadas rotineiramente no teste de Ames.

Tabela 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> , Δ <i>uvrB</i> , <i>bio</i> ⁻
TA 1538	CG	15-35	<i>his</i> C3052, <i>rfa</i> , Δ <i>uvrB</i> , <i>bio</i> ⁻
TA 97a *	CG	90-180	<i>his</i> D6610, <i>rfa</i> , Δ <i>uvrB</i> , <i>bio</i> ⁻ , pKM101(Ap ^R)
TA 98	CG	25-75	<i>his</i> D3052, <i>rfa</i> , Δ <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.

Tabela 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	25-35	<i>his</i> G46, <i>rfa</i> , Δ <i>uvrB</i> , <i>bio</i> ⁻
TA 100	CG	75-225	<i>his</i> G46, <i>rfa</i> , Δ <i>uvrB</i> , <i>bio</i> ⁻ , pKM101, Ap ^R
TA 102	AT	240-320	<i>his</i> G428, <i>rfa</i> , pKM101 (Ap ^R), pAQ1 (Tt ^R)
TA 104	AT	245-475	<i>his</i> G428, <i>rfa</i> , Δ <i>uvrB</i> , <i>bio</i> ⁻ , pKM101 (Ap ^R)

TABELA 3 - Cepas que detectam nitrocompostos transformados pelas reduções bacterianas

Cepa	Alvo da mutação	Taxa de reversão espontânea	Genótipo
TA 98 NR	CG	25-75	<u>his D3052, rfa, ΔuvrB, pKM101, (Ap^R)</u> nitroreductase clássica deficiente
TA 98/1,8DNP ₆	CG	25-75	<u>his D3052, rfa, ΔuvrB, pKM101, (Ap^R)</u> nitropireno reductase 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 TA102, 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 a 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 4°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 TA104, 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 16 a 18 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 agitada ra 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 só 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 *Salmonella 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 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 a cultura em caldo nutriente (pernoite) na superfície de uma placa de ágar nutriente com o auxílio de uma zaragatoa. 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 µL 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 de diâmetro.

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, com auxílio de uma zaragatoa.

5.8.3.2 Retirar a tampa da placa, cobrir metade com cartolina ou papel de 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 Tabela 2, item 5.6).

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 8 mg/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).

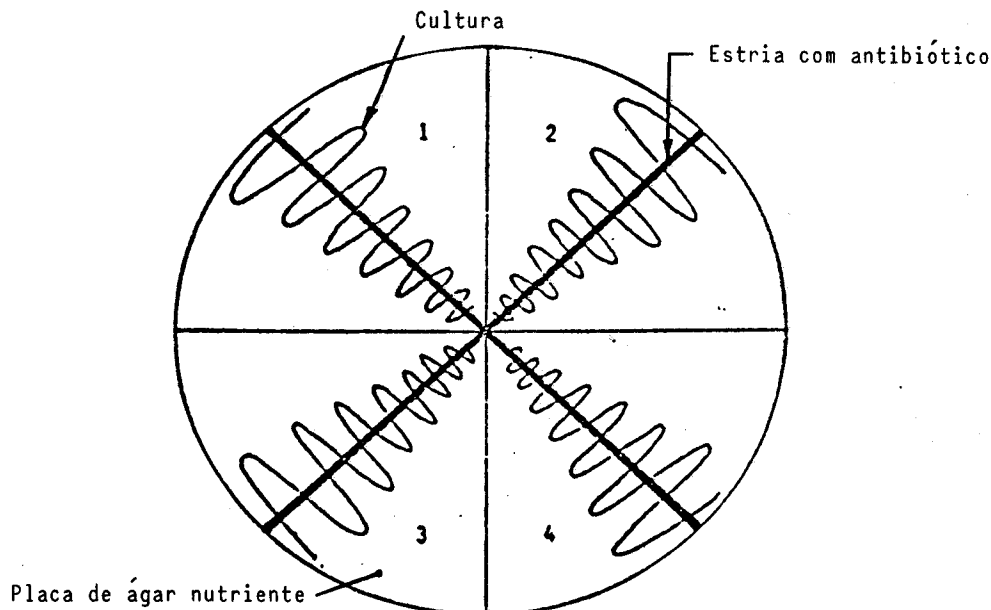


FIGURA 1 - Placa com inoculação de cultura

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 plasmídeo 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 e estabilizar em banho maria a 45°C.

5.8.5.2 Após homogeneização, dispensar alíquotas de 3 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 nas Tabelas 1, 2 e 3, item 5.6.

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 de de mais 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 do crescimento da cultura da placa "master" em 30 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 (150-170 rpm), de modo a obter uma densidade de 2×10^9 bactérias/mL.

5.9.3 Remover a cultura da estufa e mantê-la sob refrigeração durante o período em que a mesma não estiver sendo utilizada.

5.10 Preparo da mistura S9

5.10.1 Preparar quantidade adequada de mistura S9 conforme recomendações em 5.4.12, imediatamente antes do início do ensaio.

5.10.2 Manter a mistura em banho de gelo por, no máximo, 5 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 4, podendo-se empregar ou

tros controles, desde que em concentrações adequadas.

TABELA 4 - Controles positivos empregados no ensaio

Ensaio	Composto	Solvente	Concentração por placa	Cepas
Sem ativação (-S9)	4-nitroquinolina 1-óxido	DMSO	0,5 µg	TA1537, TA1538, TA97a, TA98, TA104
	2-nitrofluoreno	DMSO	10,0 µg	TA98NR e 1,8 DNP6
	azida sódica	água destilada	5,0 µg	TA 1535, TA100
	mitomicina C	água destilada	1 µL	TA102
Com ativação (+S9)	2-aminoantraceno	DMSO	2,5 µg	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 Controle de toxicidade

A toxicidade de uma amostra ou substância química pode ser verificada através do exame rotineiro da presença de "background" (crescimento de fundo) 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.

5.14 Controle de viabilidade

A viabilidade de cultura concentrada (5.9) deverá ser avaliada após diluição a 10^{-7} e inóculo em ágar nutriente. Deve-se utilizar culturas com concentrações de 1 a 2×10^9 células/mL.

5.15 Procedimento do ensaio

Diversos métodos têm sido descritos para a realização do teste de Ames. Dentre eles, os mais usados são:

- método de incorporação em placa;
- método de pré-incubação;
- método direto

Esta Norma descreve o método de incorporação em placa, segundo Maron & Ames, 1983.

5.15.1 Antes de iniciar qualquer operação, desinfetar a capela de fluxo laminar, usando álcool 70% ou outro desinfetante que não deixe resí

duos. Trabalhar sempre em capela de fluxo laminar.

5.15.2 Colocar tubos de ensaio (15 x 150 mm, com tampa de aço inoxidável), em número suficiente para realizar os testes em triplicata, em banho seco regulado para a temperatura de 45°C.

5.15.3 Fundir o ágar de superfície ("top agar") e estabilizar a 45°C.

5.15.4 Distribuir alíquotas de 3 mL nos tubos de ensaio previamente acondicionados no banho seco (45°C).

5.15.5 Adicionar a cada tubo que contém 3 mL de "top agar":

- a) 200 µL da amostra, ou menos, de forma que sejam testadas as doses desejadas;
- b) 0,1 mL da cultura (pernoite) de S. typhimurium;
- c) 0,5 mL da mistura S9 (somente para o ensaio com ativação metabólica).

5.15.6 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.

5.15.7 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.

5.15.8 Incubar as placas invertidas a 37°C por 66 horas.

5.15.9 Realizar os controles negativos e positivos de acordo com 5.15.1 a 5.15.8, exceto 5.15.5-a, onde, ao invés da amostra, deve ser adicionado um volume adequado do controle específico (ver 5.12).

5.15.10 Proceder à contagem do número de colônias revertentes prototróficas por placa com o auxílio de um contador automático do tipo Biotran ou manual tipo Quebec e anotar os valores em ficha apropriada.

5.15.11 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 ou alterado, se a taxa de reversão espontânea estiver fora do esperado e se os controles positivos não apresentarem atividade mutagênica frente às cepas-teste.

6 RESULTADOS

6.1 Expressão dos resultados

6.1.1 Os resultados podem ser expressos através do número de colônias revertentes por placa ou mais comumente através da razão de mutagenicidade (RM):

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

onde:

T = número de colônias revertentes na placa-teste (revertentes espontâneas + revertentes induzidas);

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

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

6.1.2 Deve-se também expressar os resultados em n° 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 e de Análise de Variância poderão ser empregadas.

6.2 Interpretação dos resultados

6.2.1 Amostra positiva

Resultados positivos no teste de Ames, 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, compro

vada através do emprego de análises estatísticas adequadas.

6.2.2 Amostra negativa

Resultados negativos no teste de Ames, 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 de qualidade dos reagentes, meios de cultura e vidraria utilizada no ensaio, a fim de assegurar a confiabilidade dos resultados.

ANEXO A - PROCEDIMENTOS COMPLEMENTARESA-1 Ensaaios 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 triptona (ver 5.3.12), 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 triptona. 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 enxágüe, 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 170-180°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 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 alimen

tar 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.

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 à temperatura elevada, o suficiente para que ocorra a destruição do agente mutagênico. O mesmo procedimento deve ser efetuado para luvas, ponteiros, 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

ANEXO B

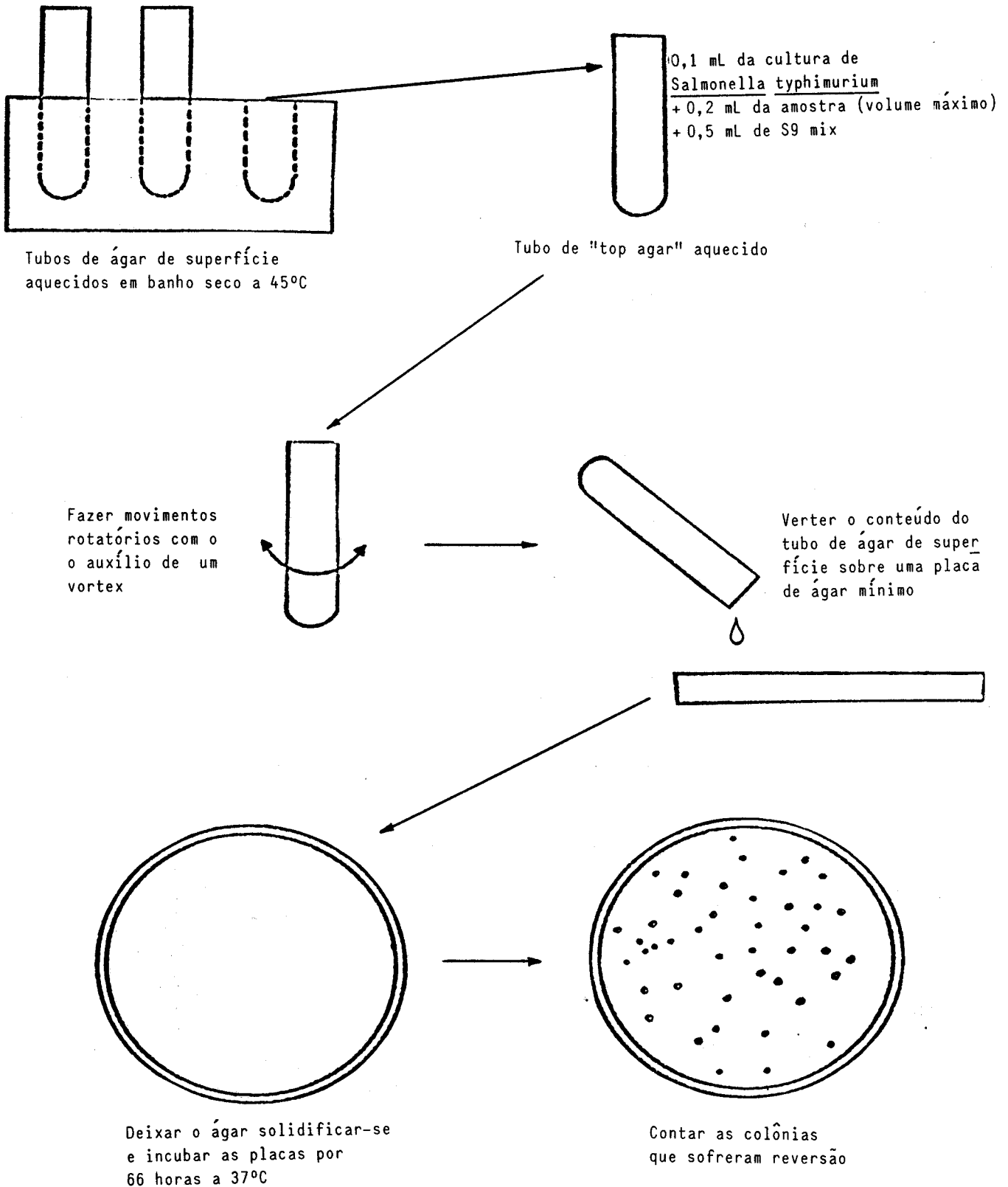


FIGURA 2 - Esquema de procedimento

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 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-5 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-6 CETESB - Avaliação de laboratórios de análises microbiológicas de água. Norma CETESB L5.010, São Paulo, 1979.
- C-7 CETESB - Controle de qualidade de meios de cultura. Norma CETESB L5.216, São Paulo, 1979.
- C-8 CETESB - Lavagem, preparo e esterilização de materiais de laboratório de microbiologia. Norma CETESB M1.001, São Paulo, 1986.
- C-9 CETESB - Prova de adequabilidade biológica da água destilada para fins microbiológicos. Norma CETESB L5.215, São Paulo, 1985.
- C-10 CETESB - Segurança e higiene do trabalho em laboratórios de microbiologia ambiental. Norma CETESB L5.009, São Paulo, 1987.
- C-11 CLAXTON, D.; ALLEN, J.; AULETTO, A.; MORTELMANS, K., NESTMANN, E. & ZEIGER, E. Guide for the Salmonella typhimurium/mammalian microsome tests for bacterial mutagenicity. Mutat. Res., 189: 83-91 1987.
- C-12 EPA. Manual of analytical methods for the analysis of pesticides in humans and environmental samples. Washington, U.S. EPA, 1980 (EPA-600/8-80-038).
- C-13 JOICE, R.M. Prudent practices for disposal of chemicals from laboratories. Science, 224: 449-452, 1984.

- C-14 HOUK, V. The genotoxicity of industrial wastes and effluents. A review. Mutat.Res., 277: 91-138, 1992
- C-15 HUGHES, T.J.; PELLIZZARI, E.; LITTLE, L., SPARACINO, C. & KOLBER, A. Ambient air pollutants: collection, chemical characterization and mutagenicity testing. Mutat.Res., 76: 51-83, 1980.
- C-16 LEONARD, A. Stratégie et interpretation des tests à court terme. Ann. Biol. Clin., 44: 662-664, 1986.
- C-17 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-18 MARON, D.M. & AMES, B.N. Revised methods for the Salmonella mutagenicity test. Mutat. Res., 113: 173-215, 1983.
- C-19 MEIER, J.R. Genotoxic activity of organic chemicals in drinking water. Mutat. Res., 196: 211-245, 1988.
- C-20 PELCZAR, M.; REID, R. & CHAN, E.C. Microbiologia. São Paulo, McGraw Hill, v. 1, 1980, p. 574.
- C-21 SHELBY, M.D. The genetic toxicity of human carcinogens and its implications. Mutat. Res., 204: 3-15, 1988.
- C-22 WHO-IARC. Handling Chemical Carcinogens in the Laboratory: Safety Problems. p. 16-19, 1979.
-