



# NORMA TÉCNICA

L5.621

Set/1994  
36 PÁGINAS

Mutação gênica reversa em salmonella typhirium: teste de Ames - método direto - 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	<p style="text-align: center;"><b>MUTAÇÃO GÊNICA REVERSA EM</b>  <i>Salmonella typhimurium</i> - TESTE DE AMES -  <b>MÉTODO DIRETO</b></p> <p style="text-align: center;">Método de ensaio</p>	<p>L5.621</p> <p>SET/94</p>
--------	--	-----------------------------

## SUMÁRIO

### Introdução

- 1 Objetivos
  - 2 Normas complementares
  - 3 Definições
  - 4 Aparelhagem
  - 5 Execução do ensaio
  - 6 Resultados
  - 7 Recomendações
- Anexo A - Procedimentos complementares  
Anexo B - Esquema de procedimento  
Anexo C - Modelo de ficha de resultado  
Anexo D - Referências bibliográficas

## INTRODUÇÃO

É grande hoje a preocupação com a enorme quantidade de compostos químicos que estão sendo lançados no meio ambiente através de despejos industriais e domésticos e de atividades agrícolas. Esses compostos podem causar vários efeitos adversos à saúde humana e aos organismos em geral. Dentre eles estão os compostos genotóxicos que, devido ao seu papel na etiologia do câncer e das doenças hereditárias, têm sido alvo de atenção especial. Vários testes capazes de detectar esses compostos em amostras do ambiente têm sido desenvolvidos e utilizados com sucesso, como, por exemplo, o teste de Ames, que é o ensaio de curta duração mais empregado na atualidade, principalmente pela sua simplicidade, pelo baixo custo, sensibilidade e reprodutibilidade.

Esse teste foi desenvolvido pelo Dr. Bruce Ames, e colaboradores, na Universidade de Berkeley, Califórnia, em 1975, tendo sido aperfeiçoado por Maron & Ames em 1983. Na 18ª edição do *Standard Methods for Examination of Water and Wastewater*, o método está descrito como teste proposto na avaliação de compostos mutagênicos em amostras ambientais (APHA, 1992).

O 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 microsossomal de fígado de rato, um sistema de ativação enzimática, que permite a avaliação dos metabólitos da substância em teste.

O teste de Ames vem sendo muito utilizado na avaliação da genotoxicidade de amostras ambientais (água, ar, efluentes industriais, lixiviados de resíduos sólidos, extratos aquosos, etc.) e recomendado por conceituadas entidades governamentais e órgãos de pesquisas dos Estados Unidos, Canadá e de vários países da Europa. O teste já é obrigatório na obtenção de licença de funcionamento de indústrias no estado de New Jersey (EUA) e considerado, portanto, parte essencial dos testes toxicológicos na triagem e localização de fontes potenciais de agentes tóxicos.

Usualmente, para permitir a detecção adequada de baixas concentrações de mutágenos presentes nas amostras, empregam-se métodos de extração de compostos orgânicos, tais como: extração líquido-líquido, ou com resinas adsorventes. Os extratos se adequam ao método mais comum do teste de Ames, incorporação em placas, que permite testar um volume máximo de 0,2 mL/placa (Maron & Ames, 1983; CETESB, 1993).

No entanto, algumas vezes, amostras de efluentes industriais com atividade mutagênica podem apresentar, no método de incorporação em placas do teste de Ames, resposta negativa ou diminuída após extração orgânica (Coelho et alii, 1992). Para contornar esse problema, uma modificação do teste de Ames original foi sugerida, onde se testa diretamente a amostra que passa apenas por um processo de filtração em membrana e modifica-se as concentrações de ágar no ágar de superfície. O método direto, como foi denominado, aumenta a sensibilidade do ensaio, pois permite a concentração *in situ* da amostra em cerca de 10 a 20 vezes, podendo-se testar 2 mL da amostra como volume máximo (Coriell Institute for Medical Research, 1986). Esse método tem sido bastante aplicado em amostras ambientais líquidas, principalmente efluentes industriais e lixiviados. Possuem também a vantagem de poder ser aplicado nas amostras que apresentem alta viscosidade, sendo, nestes casos recomendado o uso da técnica de pré-incubação (Maron & Ames, 1983; Vargas et alii, 1988). Cabe ressaltar, porém, que alguns mutágenos que estejam adsorvidos ao material particulado da amostra podem ficar retidos na membrana durante o processo de filtração. Recomenda-se, portanto, quando se obtêm resultados negativos no método direto, concentrar a amostra através de algum dos processos de extração orgânica adequados e testá-la frente ao método de incorporação em placas.

## 1 OBJETIVOS

1.1 Esta Norma prescreve o teste de mutação gênica reversa em *Salmonella typhimurium* - Teste de Ames - Método Direto, empregado na detecção de substâncias mutagênicas em efluentes industriais e lixiviados.

1.2 O Teste de Ames Modificado - Método Direto, tem por finalidades:

- a) avaliar o potencial mutagênico de efluentes líquidos industriais, bem como a eficiência de processos de tratamento;
- b) avaliar poluentes mutagênicos em lixiviados aquosos de resíduos sólidos perigosos.
- c) avaliar o potencial mutagênico de águas residuais ou altamente contaminadas.

## 2 NORMAS COMPLEMENTARES

Na aplicação desta Norma é necessário consultar:

Norma CETESB L5.215	Prova de adequabilidade biológica de água destilada para fins microbiológicos - Método de ensaio.
Norma CETESB L5.010	Avaliação de laboratórios de análises microbiológicas de água - Procedimento
Norma CETESB M1.001	Lavagem, preparo e esterilização de materiais em laboratórios de microbiologia - Procedimento
Norma CETESB L5.216	Controle de qualidade de meios de cultura - Método de ensaio
Norma CETESB L5.009	Segurança e higiene do trabalho em laboratórios de microbiologia ambiental - Procedimento
Norma CETESB L5.620	Mutação gênica reversa em <i>S. typhimurium</i> - Teste de Ames - Método de ensaio
NBR 9898	Preservação e técnicas de amostragem de efluentes líquidos e corpos receptores - ABNT

### 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. Em 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 rfa

Mutação que causa modificações na camada lipopolissacarídica da membrana celular bacteriana, propiciando uma maior permeabilidade da 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 de gene uvrB se estendeu até o gene da biotina e, conseqüentemente, as cepas se tornaram auxotróficas para biotina (bio<sup>-</sup>).

#### 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 resistência à tetraciclina e contém a mutação hisG428.

#### 3.11 Plasmídeo pKM101

Plasmídeo que contém um gene para resistência 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 um tamanho suficiente para permitir a circulação do vapor ao redor do material a ser esterilizado e equipada com válvula de segurança, com 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 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 conter 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 de 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 que 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, do tipo Biotran, ou manual, do tipo Quebec.

#### **4.1.10 Destilador de água**

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 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.

#### 4.1.12 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, em glicerina ou em 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, as 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 ("pirex") ou de vidro neutro, com tampa de rosca, não tóxica, e capacidade de 125 mL e 250 mL.

#### 4.2.2 Frascos de coleta

De borossilicato ("pirex") ou de vidro neutro, com capacidade de cinco litros.

#### 4.2.3 Frascos para o preparo de meio de cultura

De borossilicato ("pirex") ou de vidro neutro, com capacidade de um a cinco litros, limpos e isentos de qualquer substância tóxica.

#### 4.2.4 Frascos para soluções

De borossilicato ("pirex") ou de 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 ("pirex") ou de 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 ("pirex") ou de 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 arco 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

Do tipo Swinnex, de polipropileno, com diâmetro de 13 mm ou do tipo Sterifil-D (Millipore), com diâmetro de 47 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 acetato de celulose, com porosidade de 0,45 µm e 0,22 µm.

#### 4.3.12 Micropipetadores

Pipetadores digitais com capacidade para medir volumes de 10 a 100  $\mu\text{L}$ , 100 a 1000  $\mu\text{L}$ , 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, regulagem com catraca, viseira em acrílico, anatômico e 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 de 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 a 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 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  $\beta$ -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 potássio monobásico ( $KH_2PO_4$ ) 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 Aroclor 1254, liofilizado, proveniente da Moltox - 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 Mitomicina C.  
 5.2.1.27 Nutrient Broth nº 2 (OXOID).  
 5.2.1.28 4-nitroquinolina-1-óxido (4NQO) (Sigma).  
 5.2.1.29 Peptona de soja.  
 5.2.1.30 Sulfato de magnésio (MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>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 bacteriológicos 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 histidina/biotina.....	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 (MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O) p.a. ....	2,0 g
Ácido cítrico (C <sub>6</sub> H <sub>8</sub> O <sub>7</sub> .H <sub>2</sub> O) .....	20,0 g
Fosfato de potássio dibásico (K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ) .....	100,0 g
Fosfato de sódio e amônio (NaNH <sub>4</sub> HPO <sub>4</sub> .4H <sub>2</sub> O) .....	35,0 g
Água destilada .....	1000,0 mL

Para o preparo deste meio, pesar as substâncias acima nas quantidades

especificadas e dissolver em 1000 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 histidina/biotina (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 sete 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 sete 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, com o auxílio de seringa automática. As placas que contêm ágar mínimo com biotina e histidina podem ser armazenadas sob refrigeração (2 a 8°C) durante um período máximo de sete 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 seringa automática. 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 sete dias.

### 5.3.5 Ágar mínimo com histidina/biotina e ampicilina/tetraciclina

#### 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
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 seringa automática. 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 sete dias.

### 5.3.6 Caldo nutriente

#### Fórmula:

Nutrient Broth nº 2 (OXOID) .....	25,0 g
Água destilada .....	1000,0 mL

#### Preparo:

Pesar o componente e acrescentar 1000 mL de água destilada fria. Deixar em repouso durante aproximadamente 15 minutos. Aquecer agitando frequentemente 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 Erlenmeyers 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 autoclavagem, 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 .....	1000,0 mL

#### Preparo:

Preparar o caldo nutriente de acordo com 5.3.6 e, após autoclavagem, 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 .....	1000,0 mL
pH final após esterilização: 7,0	

**Preparo:**

Pesar os componentes e acrescentar 1000 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 ágar nutriente podem ser armazenadas sob refrigeração (2 a 8°C) durante um período máximo de sete 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 .....	1000,0 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 sete 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 .....	1000,0 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 sete dias.

**5.3.11 Ágar de superfície ("Top ágar")****Fórmula:**

	CONCENTRAÇÃO DO ÁGAR DE SUPERFÍCIE				
	1.0x	1.5x	2.0x	2.5x	3.0x
Bacto ágar	6.0g	7.2g	9.0g	12.0g	18.0g
Cloreto de sódio (NaCl)	5.0g	6.0g	7.5g	10.0g	15.0g
Água destilada	1000 mL				

pH final: 7.0

#### Preparo:

Pesar os componentes e acrescentar 1000 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 ágar" podem ser armazenados sob refrigeração (2 a 8°C) durante um período máximo de 14 dias.

#### 5.3.12 Caldo de soja e triptona

##### Fórmula:

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 .....	1000.0 mL
pH final: 7.3 ± 0.1	

#### Preparo:

Pesar os componentes e acrescentar 1000 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 Soluções

##### 5.4.1 Solução de histidina/biotina

##### Fórmula:

L-histidina HCl .....	0.117 g
D-biotina .....	0.138 g
Água destilada .....	1000.0 mL

**Preparo:**

Pesar os componentes e dissolver em 1000 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 refrigeração (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 armazenados 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 .....	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 envolvê-lo 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  $\mu$ m), em tubo com tampa roscada previamente esterilizado e envolvê-lo 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 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 ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ) .....	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 ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ) .....	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 0.4M

##### Fórmula:

Cloreto de magnésio ( $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ ) ..... 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 frascos apropriados 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 1.65M

##### Fórmula:

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 frascos apropriados 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 1M

##### Fórmula:

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 (0,22µm) 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 0.1M

##### Fórmula:

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 (0,22µm) em tubo com tampa roscada previamente esterilizado. Os tubos que contêm a solução 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	µL
Tampão fosfato 0.2M .....	500	µL
Glicose-6-fosfato 1M .....	5	µL
Solução de NADP 0.1M .....	40	µL
Solução de cloreto de potássio 1.65M .....	20	µL
Solução de cloreto de magnésio 0.4M .....	20	µL
Fração S9 .....	40	µL

## 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 sete 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, cinco 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 <sub>3</sub> ) .....	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 às 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 às diluições adequadas. Alternativamente, soluções prontas podem ser estocadas a -20°C por um período de até 18 meses. Neste caso, alíquotas da solução devem ser descongeladas somente no dia do uso. Após o uso, a solução deve ser descartada em frasco apropriado 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-1-óxido, com máscara de proteção contra 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 às diluições adequadas. Alternativamente, soluções prontas podem ser estocadas a -20°C por um período de até 18 meses. Neste caso, alíquotas da solução devem ser descongeladas somente no dia do uso. Após o uso, a solução deve ser descartada em frasco apropriado para posterior incineração.

5.4.17 Solução de ácido sulfúrico/ácido nítrico H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>/HNO<sub>3</sub> (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:

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

Ácido sulfúrico (H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> ) p.a. ....	500,0 mL
Água destilada .....	500,0 mL

 Para o preparo, 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.
- preparar a solução de ácido nítrico 50% com a seguinte composição:  

Ácido nítrico (HNO <sub>3</sub> ) p.a. ....	500,0 mL
Água destilada .....	500,0 mL

 Para o preparo, 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.
- misturar vagarosamente seis partes da solução de ácido sulfúrico a uma 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.

#### 5.4.19 Água de diluição

**Fórmula:**

Solução-estoque A .....	1,25 mL
Solução-estoque B .....	5,00 mL
Água destilada .....	1000 mL

Para o preparo desta solução proceder como segue:

**a) Solução-estoque A:**

Fosfato de potássio monobásico ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) p.a. ....	34,0 g
Água destilada q.s.p. ....	1000,0 mL

Dissolver o fosfato de potássio monobásico em 500 mL de água destilada.

ajustar o pH para  $7,2 \pm 0,5$  com solução de hidróxido de sódio 1N e completar o volume para um litro com água destilada. Distribuir volumes adequados à necessidade do laboratório em frascos com tampa de rosca. Esterilizar em autoclave a  $121^\circ\text{C}$ . durante 15 minutos. Armazenar em geladeira<sup>(1)</sup>.

**b) Solução-estoque B:**

Cloreto de magnésio ( $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ) .....	81,1 g
Água destilada q.s.p. ....	1000,0 mL

Dissolver o cloreto de magnésio em 500 mL de água destilada e completar o volume para um litro com água destilada. Distribuir volumes adequados à necessidade do laboratório em frascos com tampa de rosca. Esterilizar em autoclave a  $121^\circ\text{C}$  durante 15 minutos. Armazenar em geladeira.

**c)** adicionar 1,25 mL da solução-estoque A e 5 mL da solução-estoque B a um litro de água destilada.

**d)** distribuir, em frascos de diluição, quantidades adequadas para que o volume final, após esterilização, seja de 100 mL  $\pm$  2 mL.

**e)** tamponar e esterilizar em autoclave a  $121^\circ\text{C}$ . durante 15 minutos.

**f)** armazenar à temperatura ambiente.

<sup>1</sup> Antes da utilização da solução-estoque A, deve-se verificar se não há quaisquer evidências de contaminação microbiana (turbidez, presença de material em suspensão). Em caso afirmativo, essa solução deve ser descartada.

### 5.5 Amostragem

A coleta deve ser realizada segundo a NBR 9898 - "Preservação e técnicas de amostragem de efluentes líquidos e corpos receptores". O volume coletado deverá ser de um litro em frascos de vidro "pirex", previamente lavados com solução de ácido sulfúrico, ácido nítrico 50% (6:1) (item A13).

#### 5.5.1 Amostra

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

#### 5.5.2 Preparo das amostras

5.5.2.1 Verificar o pH da amostra. Caso apresente valores menores que 5,0 ou maiores que 8,0, ajustar o pH para 7,0 antes de proceder a filtração da amostra.

5.5.2.2 Proceder à filtração da amostra em membranas de acetato-celulose de porosidade 0,45 µm e/ou 0,22 µm. No caso de amostras que apresentem muito material particulado, recomenda-se uma pré-filtração com pré-filtro do tipo AP20.

5.5.2.3 Verificar a esterilidade da amostra em placas de ágar nutriente, inoculando-se 200 µL e incubando-se por 24 horas a 37°C. Caso a amostra apresente contaminação, repetir o processo de filtração descrito no item 5.5.2.2.

5.5.2.4 O ensaio deverá ser realizado o mais rápido possível e a amostra deverá ser mantida sempre sob refrigeração (4°C) até o momento do ensaio.

### 5.6 Organismo indicador

Linhagens mutantes de *S. typhimurium* auxotróficas para histidina (*his*<sup>-</sup>), 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 de 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> , $\Delta$ <i>uvrB</i> , <i>bio</i> <sup>-</sup>
TA 1538	CG	15-35	<i>his</i> D3052, <i>rfa</i> , $\Delta$ <i>uvrB</i> , <i>bio</i> <sup>-</sup>
TA 97a*	CG	90-180	<i>his</i> D6610, <i>rfa</i> , $\Delta$ <i>uvrB</i> , <i>bio</i> <sup>-</sup> , pKM101(Ap <sup>R</sup> )
TA 98	CG	25-75	<i>his</i> D3052, <i>rfa</i> , $\Delta$ <i>uvrB</i> , <i>bio</i> <sup>-</sup> , pKM101(Ap <sup>R</sup> )

\* 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	<u>his</u> G46, <u>rfa</u> , $\Delta$ <u>uvrB</u> , <u>bio</u> <sup>-</sup>
TA 100	CG	75-225	<u>his</u> G46, <u>rfa</u> , $\Delta$ <u>uvrB</u> , <u>bio</u> <sup>-</sup> , pKM101(Ap <sup>R</sup> )
TA 102	AT	240-320	<u>his</u> G428, <u>rfa</u> , pKM101(Ap <sup>R</sup> ), pAQ1(Tc <sup>R</sup> )
TA 104	AT	245-475	<u>his</u> G428, <u>rfa</u> , $\Delta$ <u>uvrB</u> , <u>bio</u> <sup>-</sup> , pKM101(Ap <sup>R</sup> )

TABELA 3 - Cepas que detectam nitrocompostos transformados 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> , $\Delta$ <u>uvrB</u> , pKM101, (Ap <sup>R</sup> ) nitroreductase classica deficiente
TA 98/1,8DNP <sub>6</sub>	CG	25-75	<u>his</u> D3052, <u>rfa</u> , $\Delta$ <u>uvrB</u> , pKM101, (Ap <sup>R</sup> ) 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 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 com ampicilina. E, 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 (n° 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 até 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 TA97a, TA98, TA98NR, TA98/1.8 DNP6, TA100 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 dois Erlenmeyers com 30 mL de caldo nutriente. Incubar a 37°C por 16-18 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 dez 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 dois meses, sob refrigeração (4°C). As placas "master" da cepa TA102 só poderão ser armazenadas por duas semanas, sendo que, após esse período, a taxa de reversão espontânea se eleva significativamente, inviabilizando a 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 à sua taxa de reversão espontânea e à 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, elas deverão ser desprezadas e novas placas "master" deverão ser preparadas.

#### 5.8 Verificação das características genéticas das cepas de *Salmonella typhimurium*

Os testes para a verificação das características genéticas das cepas de *S. typhimurium* devem ser realizados a partir das culturas

(pernoite) que deram origem à placa "master" ou das culturas de cepas novas.

#### 5.8.1 Dependência da histidina

O caráter his<sup>-</sup> 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 o 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 e 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, TA98/1.8DNP<sub>6</sub>, TA100, TA102 e TA104) por oito segundos; as cepas sem plasmídeo pKM101 (TA1535, TA1537 e TA1538), por seis 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 plasmídio pKM101

As cepas com fator R (TA97a, TA98, TA98NR/1.8DNP<sub>6</sub>, TA100, TA102 e TA104) devem ser testadas rotineiramente para a presença do plasmídio pKM101, que confere resistência à ampicilina.

5.8.4.1 Com 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).

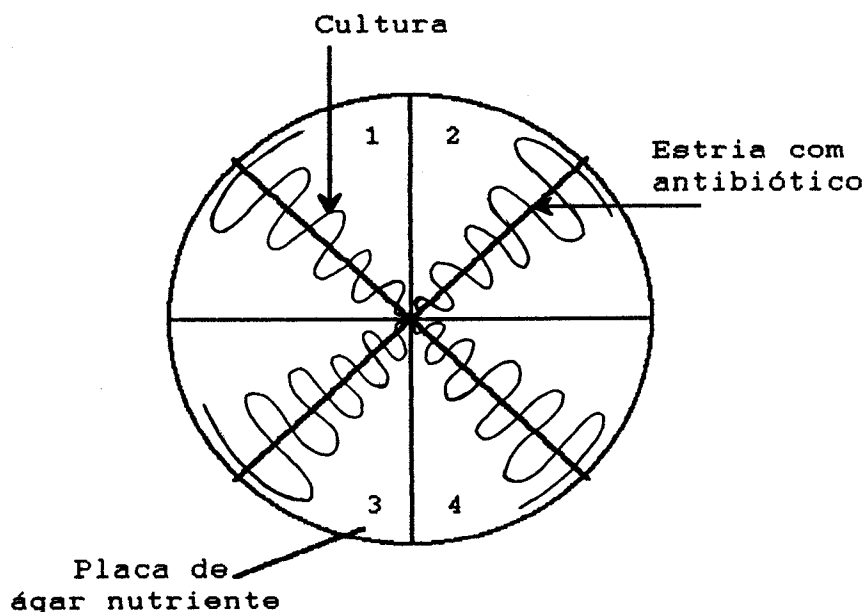


FIGURA 1 - Placa com inoculação de cultura

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, TA98/1.8DNP<sub>6</sub>, 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 plasmídio 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 de reversão é característica de cada 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 a 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 da cultura em caldo nutriente (pernoite). Agitar por três 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 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 os dois caldos de cultura que apresentaram taxa de reversão espontânea dentro dos limites normais e todas as demais características genéticas, e proceder ao congelamento deles, 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 o 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 18-20 horas, sob agitação (150-170 rpm), de modo a obter uma densidade de  $2 \times 10^9$  bactérias/mL.

5.9.3 Remover a cultura da estufa e mantê-la sob refrigeração durante o período em que ela 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, cinco 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 no inóculo da própria cepa e da mistura S9, quando for o caso.

#### 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 outros 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	TA1535, TA100
	mitomicina C	água destilada	1 µg	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 pernoite (5.9) deverá ser avaliada após diluição a  $10^{-7}$  e inóculo em ágar nutriente. O seguinte procedimento deve ser adotado, de tal forma que a concentração de 1 a  $2 \times 10^9$  células/mL sejam obtidas.

- a) Transferir, assepticamente, 100  $\mu$ L da cultura pernoite para um frasco contendo  $100 \pm 2$  mL de água de diluição, preparando-se assim uma diluição de 1000 vezes.
- b) Homogeneizar o frasco contendo a diluição no mínimo 25 vezes, inclinando o frasco, formando um ângulo de, aproximadamente,  $45^\circ$  entre o braço e o antebraço.
- c) Transferir, assepticamente, 100  $\mu$ L da diluição para um frasco contendo  $100 \pm 2$  mL de água de diluição.
- d) Proceder como em b).
- e) Transferir, assepticamente, em duplicata, 100  $\mu$ L da diluição obtida em b) para uma placa de ágar nutriente.
- f) Com um bastonete de vidro (alça de Drigalski), devidamente flambado e esfriado, tocar levemente a superfície do ágar nutriente contendo o inóculo e executar movimentos circulares em forma de oito, até que o inóculo fique uniformemente distribuído na placa de Petri contendo o meio de cultura.
- g) Incubar as placas invertidas a  $37^\circ\text{C}$  por 24 horas e proceder a contagem. O cálculo do número de bactérias por mL será feito multiplicando-se a média das contagens obtidas nas duas placas por  $10^7$ . O resultado será expresso em número de bactérias por mL. Esse valor deverá estar em 0,5 a  $2 \times 10^9$ /mL.

#### 5.15 Procedimento do ensaio

Dois métodos podem ser utilizados para a realização do Teste de Ames Modificado - Método Direto:

- a) método de incorporação em placa;
- b) método de pré-incubação.

##### 5.15.1 Método de incorporação em placa

5.15.1.1 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.

5.15.1.2 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  $45^\circ\text{C}$ .

5.15.1.3 Fundir o ágar de superfície ("top ágar") de várias concentrações (5.3.11) e estabilizar a  $45^\circ\text{C}$ .

5.15.1.4 Distribuir alíquotas nos tubos de ensaio acondicionados no banho seco, como indicado na Tabela 5.

5.15.1.5 Adicionar a amostra nos volumes descritos na Tabela 5.

5.15.1.6 Adicionar a cada tubo que contém o ágar de superfície e a amostra:

- a) 0,1 mL da cultura (pernoite) de *S. typhimurium*;
- b) 0,5 mL da mistura S9 (somente para o ensaio com ativação metabólica).

**TABELA 5 - Concentração do ágar de superfície com os seus correspondentes volumes e os da amostra por tubo**

Concentração do ágar na superfície	Volume de ágar de superfície por tubo (mL)	Volume da amostra por tubo (mL)
1.0 x	3.0	0.1 ou 0.2
1.5 x	2.5	0.5
2.0 x	2.0	1.0
2.5 x	1.5	1.5
3.0 x	1.0	2.0

5.15.1.7 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.

5.15.1.8 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.

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

5.15.1.10 Realizar os controles negativos (utilizar somente a cepa) e positivos de acordo com 5.15.1.1 a 5.15.1.4, utilizando ágar de superfície de concentração 1x. Deve, então, ser adicionado um volume adequado do controle específico (ver 5.12). Proceder como nos itens 5.15.1.6 a 5.15.1.9.

5.15.1.11 Proceder a 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.

5.15.1.12 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.

#### 5.15.2 Método de pré-incubação

5.15.2.1 Proceder como nos itens 5.15.1.1 e 5.15.1.2, porém colocando os tubos em estantes.

5.15.2.2 Dosar as amostras nos volumes especificados no item 5.15.1.5.

5.15.2.3 Adicionar a cada tubo contendo a amostra:

- a) 0.1 mL da cultura (pernoite) de *S. typhimurium*;
- b) 0.5 mL da mistura S9 (somente para o ensaio com ativação metabólica).

5.15.2.4 Agitar o tubo levemente por três segundos com o auxílio de um vortex a baixa velocidade e incubar por 30 minutos a 37°C sem agitação.

5.15.2.5 Realizar os controles negativos e positivos de acordo com 5.15.2.1 a 5.15.2.4, exceto 5.15.2.2, onde, ao invés da amostra, deve ser adicionado um volume adequado do controle específico (ver 5.12).

5.15.2.6 Fundir o ágar e distribuí-lo nos tubos contendo as amostras incubadas, como descrito nos itens 5.15.1.3 e 5.15.1.4.

5.15.2.7 Verter o conteúdo dos tubos em placa de ágar mínimo e incubar como descrito nos itens 5.15.1.7 a 5.15.1.9.

5.15.2.8 Proceder à contagem como descrito nos itens 5.15.1.11 e 5.12.1.12.

## 6 RESULTADOS

### 6.1 Expressão e avaliação estatística

Os resultados são expressos quantitativamente através do número de revertentes por mL ou litro da amostra, determinado pela inclinação da reta obtida da curva dose resposta. Esses dados podem ser calculados aplicando-se uma análise de variância seguida de uma regressão linear para o cálculo da potência da amostra. Os resultados são também expressos através da razão de mutagenicidade (RM), que é a razão entre o número de revertentes da placa-teste (revertentes espontâneas mais induzidas) e o número de revertentes na placa-controle (revertentes espontâneas).

Graficamente expressam-se os resultados através da curva dose resposta, plotando-se na abcissa as concentrações da amostra testada e na ordenada, o número de revertentes induzidas em cada dose.

Para esses cálculos, recomenda-se o uso de um programa denominado SALANAL, que pode ser adquirido no ILS - Integrated Laboratory Systems - POBOX 135001, Research Triangle Park, NC, 27709, USA.

### 6.2 Interpretação dos resultados

Uma amostra é considerada positiva quando existir uma relação dose-resposta entre as concentrações testadas e o número de revertentes induzidas e, em pelo menos uma dose, a razão de mutagenicidade (RM) for maior ou igual a 2. O fator 2 deve ser usado apenas como guia, pois quando a cepa apresentar taxa de reversão espontânea muito baixa, como é o caso da TA1535, TA1537 e TA1538, a razão de mutagenicidade deve ser igual ou superior a 3, a fim de assegurar a significância do ensaio.

O critério para avaliação da potência de efluentes industriais, proposto por HOUK (1992) está apresentado na Tabela 6.

### 6.3 Avaliação do ensaio

#### 6.3.1 Resultados positivos

Indicam que, sob as condições do ensaio, a amostra em teste induz mutações de ponto por substituição de bases ou do tipo "frameshift" no genoma desses microrganismos.

#### 6.3.2 Resultados negativos

Indicam que, sob as condições do ensaio, a amostra não apresenta atividade mutagênica frente às cepas testadas de *Salmonella typhimurium*.

**TABELA 6 - Classificação da genotoxicidade de efluentes industriais através do teste de Ames.**

Classificação da amostra	Potência no teste de Ames (revertentes/litro)
extrema	$>10^7$
alta	$10^5 - 10^7$
moderada	$10^3 - 10^5$
baixa	$<10^3$

#### 6.4 Laudo técnico

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) controles positivos e negativos;
- f) resultados do ensaio (curva dose resposta);
- g) interpretação dos resultados;
- h) método empregado;
- i) 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, do objetivo, das 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 DNP<sub>6</sub>).

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

**ANEXO A: Procedimentos complementares****A-1 Ensaio de controle****A-1.1 Teste de esterilidade**

Após terem sido preparadas, e antes de serem usadas, quaisquer soluções, ou meios de cultura, são rotineiramente testadas quanto à presença de fungos e/ou bactérias. O teste consiste na inoculação de 1 mL de cada frasco da solução em teste em dois tubos de caldo de soja e triptona (ver 5.3.12), os quais, após sementeira, são incubados a 37°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. A 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 enxaguadura, devem ficar submersos em solução de ácido sulfúrico/ácido nítrico 50% (6:1) por oito horas. Enxaguar oito a dez 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 37°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 a sobrevivência e o crescimento dos microrganismos. É recomendável a avaliação periódica de sua qualidade, através de testes específicos (ver Norma CETESB L5.215).

**A-1.6 Controle de eficiência da autoclave**

Utilizar ampolas com suspensão de esporos de *Bacillus pasteurianus* 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 24-48 horas. Se houver mudança na coloração da suspensão contida nas ampolas, de roxa para amarela, isso 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 à esterilização em estufa, a 170-180°C, ou em autoclave a 121°C. Para a realização desses testes, ver Norma CETESB L5.010.



## 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).

### 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*

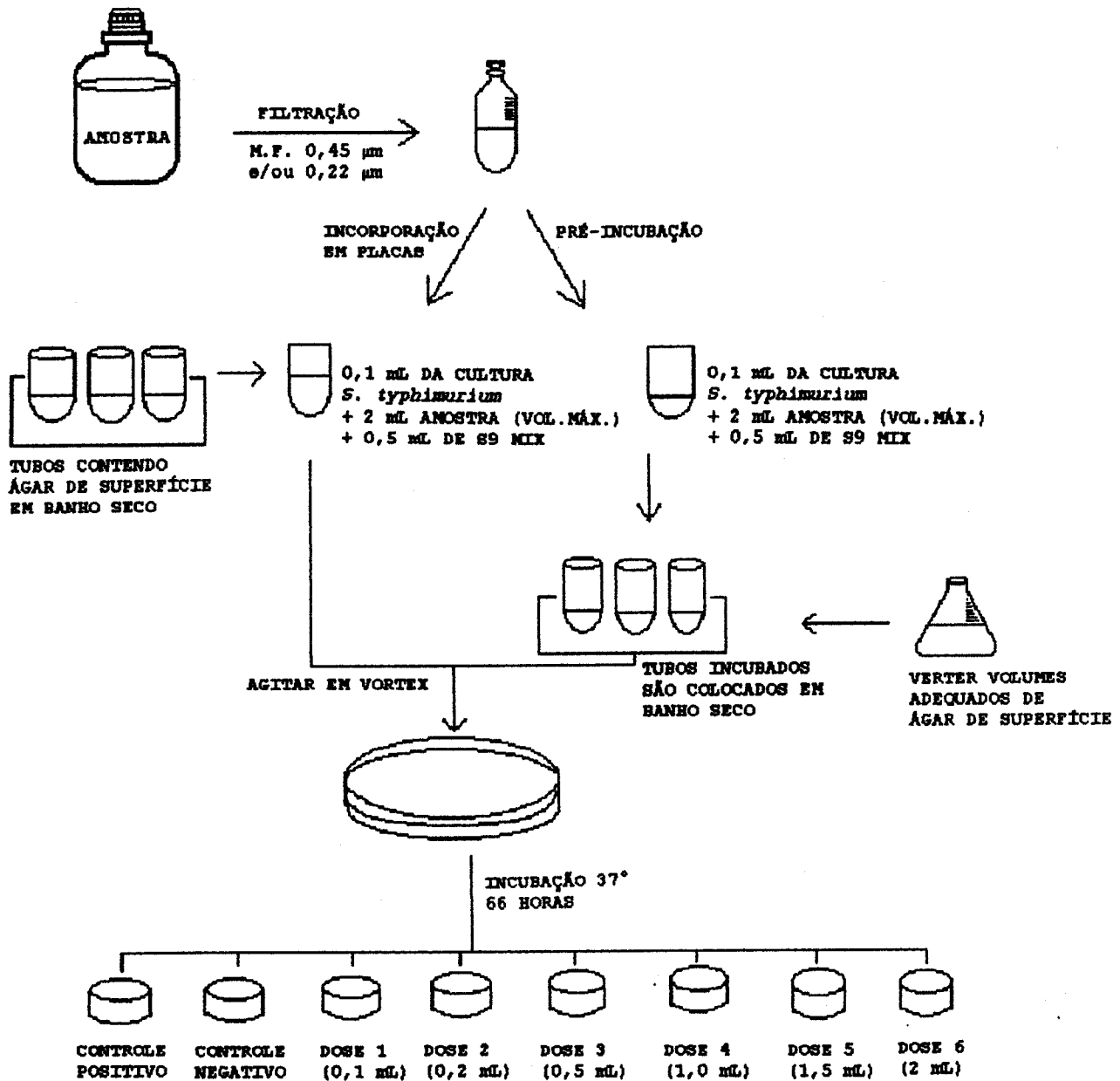
A-4.1 *Salmonella typhimurium* pode causar diarreia e intoxicação alimentar quando ingerida. Todas as cepas de *S. typhimurium* empregadas no teste de Ames são derivadas da linhagem LT2, que não apresenta alta virulência. A baixa virulência apresentada por essas cepas é devida à presença de mutação *rfa*.

A-4.2 Como precaução rotineira, deve-se autoclavar qualquer material contaminado, antes da lavagem ou descarte. Não se deve 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 - Esquema de procedimento



## ANEXO C - Modelo de ficha de resultados

## TESTE DE AMES - MÉTODO DIRETO

Local da coleta:						Nome arquivo de dados:				
Data	coleta:					Nome arquivo de saída:				
	entr. lab.:					Disquete nº:				
Cepa:	Data do Exame:					Data da leitura:				
Doseu/ Placa	- S9					+ S9				
mL	P1	P2	P3	MÉDIA	RM	P1	P2	P3	MÉDIA	RM
Branco										

Cepa:	Data do Exame:					Data da leitura:				
Doseu/ Placa	- S9					+ S9				
mL	P1	P2	P3	MÉDIA	RM	P1	P2	P3	MÉDIA	RM
Branco										

Observações: \_\_\_\_\_

Técnico responsável: \_\_\_\_\_

/ANEXO D

## ANEXO D - Referências Bibliográficas

- D-1 ABNT - Preservação e técnicas de amostragem de efluentes líquidos e corpos receptores. NBR 9898. Brasil, 1987.
- D-2 AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION. Toxicity. In: **Standard methods for the examination of water and wastewater**. 18<sup>a</sup> ed. Washington, APHA, AWWA, WPCF, 1992.
- D-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.
- D-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).
- D-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).
- D-6 CETESB - Avaliação de laboratórios de análises microbiológicas de água - Procedimento. Norma CETESB L5.010, São Paulo, 1989
- D-7 CETESB - Controle de qualidade de meios de cultura - Método de ensaio. Norma CETESB L5.216, São Paulo, 1987.
- D-8 CETESB - Lavagem, preparo e esterilização de materiais de laboratório de microbiologia - Procedimento. Norma CETESB M1.001, São Paulo, 1986.
- D-9 CETESB - Prova de adequabilidade biológica da água destilada para fins microbiológicos - Método de ensaio. Norma CETESB L5.215, São Paulo, 1985.
- D-10 CETESB - Segurança e higiene do trabalho em laboratórios de microbiologia ambiental - Procedimento. Norma CETESB L5.009 - São Paulo, 1986.
- D-11 CETESB - Mutação gênica reversa em *Salmonella typhimurium* - Teste de Ames - Método de ensaio. Norma CETESB L5.620, São Paulo, 1993.
- D-12 CLAXTON, D.; ALLEN, J.; AVLETTO, A.; MORTELMANS, K.; NESTMANN, E. & ZEIGER, E. Guide for the *Salmonella typhimurium*/mammalian microsome tests for bacterial mutagenicity. *Mutat. Res.*, 189: 83-91, 1987.
- D-13 CLAXTON, L.D.; HOUK, V.S.; WARNER, J.R.; MYERS, L.E. & HUGUES, T.J. Assessing the use of known mutagens to calibrate the *Salmonella typhimurium* mutagenicity assay: I. without exogenous activation. *Mutat. Res.*, 253: 137-147, 1991.
- D-14 CLAXTON, L.D.; HOUK, V.S.; WARNER, J.R.; MYERS, L.E. & HUGUES, T.J. Assessing the use of known mutagens to calibrate the *Salmonella typhimurium* mutagenicity assay: II. with exogenous activation. *Mutat. Res.*, 253: 149-159, 1991.

- 
- D-15 COELHO, M.C.L.S.; COIMBRÃO, C.A.; VALENT, G.U.; SATO, M.I.Z.; SANCHEZ, P.S. & TARGA, H. - Mutagenicity evaluation of industrial effluents by Ames assay. *Environ. Mol. Mutagen.* 19, (S20): 11, 1992.
- D-16 CORIELL INSTITUTE FOR MEDICAL RESEARCH - Department of Microbiology, Camden, New Jersey 08103 - Ames *Salmonella* mutagenicity assay protocol, 1986.
- D-17 GODET, F.; VASSEUR, P. & BABUT, M. - Essais de génotoxicité in vitro et in vivo applicables à l'environnement hydrique. *Rev. Sci. L'eau*, 6, 285-314, 1993.
- D-18 HOUK, V. The genotoxicity of industrial wastes and effluents. A review. *Mutat. Res.*, 277: 91-138, 1992.
- D-19 JOICE, R.M. Prudent practices for disposal of chemicals from laboratories. *Science*, 224: 449-452, 1984.
- D-20 LEONARD, A. Stratégie et interpretation des tests à court terme. *Ann. Biol. Clin.*, 44: 662-664, 1986.
- D-21 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.
- D-22 MARON, D.M. & AMES, B.N. Revised methods for the *Salmonella* mutagenicity test. *Mutat. Res.*, 113: 173-215, 1983.
- D-23 PAGANO, D.A. & E. ZEIGER. The stability of mutagenic chemicals stored in solution. *Environ. Mutag.*, 7: 293-302, 1985.
- D-24 PELCZAR, M.; REID, R. & CHAN, E.C. - Microbiologia. São Paulo. McGraw Hill, v. 1, 1980, p. 574.
- D-25 SHELBY, M.D. - The genetic toxicity of human carcinogens and its implications. *Mutat. Res.*, 204: 3-15, 1988.
- D-26 VARGAS, V.M.F.; MOTTA, V.E.P. & HENRIQUES, J.A.P. - Analysis of mutagenicity of waters under the influence of petrochemical industrial complexes by the Ames test (*Salmonella*/microsome). *Rev. Bras. Genet.*, 11: 505-518, 1988.
- D-27 WHO-IARC. Handling Chemical Carcinogens in the Laboratory: Safety Problems. p. 16-19, 1979.
-