



NORMA TÉCNICA

L5.228

Dez/1988
21 PÁGINAS

Teste de toxicidade aguda utilizando spirillum volutans: método de ensaio

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

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

CETESB	TESTE DE TOXICIDADE AGUDA UTILIZANDO <u>SPIRILLUM VOLUTANS</u> Método de ensaio	L5.228 DEZ/88
--------	---	------------------

SUMÁRIO	Pág.
Introdução.....	1
1 Objetivo.....	2
2 Normas complementares.....	2
3 Definições.....	3
4 Aparelhagem.....	4
5 Execução do ensaio.....	9
6 Expressão dos resultados.....	11
Anexo A - Representação gráfica do microrganismo.....	13
Anexo B - Ficha de lançamento de resultados.....	15
Anexo C - Procedimentos para amostras turvas com muito material em suspensão.....	17
Anexo D - Procedimentos complementares.....	19
Anexo E - Referências bibliográficas.....	21

INTRODUÇÃO

O lançamento de substâncias químicas tóxicas nos corpos d'água su perfciais; seja através de resíduos industriais e ou carreamento por águas pluviais, de praguicidas, herbicidas e fertilizantes em pregados na agricultura, tem causado sérios problemas ecológicos e toxicológicos para os países desenvolvidos e em desenvolvimento.

A preocupação com os riscos ambientais e de saúde pública, que po dem advir dos processos de bioacumulação dessas substâncias tóxicas no meio ambiente aquático ao nível da cadeia alimentar, levou ao de senvolvimento de ensaios biológicos, os quais são utilizados para a detecção de substâncias potencialmente tóxicas no ambiente.

Entre os vários bioensaios utilizados na avaliação do impacto de subs tâncias químicas no meio aquático, os ensaios de toxicidade aguda com bactérias vem se constituindo em um excelente instrumento de triagem inicial desses agentes em complementação às tradicionais aná lises físico-químicas, uma vez que os organismos vivos irão apresen tar alguma resposta a níveis perigosos de quaisquer substâncias quí micas ou misturas complexas presentes em amostras ambientais.

De um modo geral, os bioensaios com bactérias são relativamente sim ples, rápidos, sensíveis e econômicos e apresentam uma série de van tagens quando comparados com bioensaios que utilizam outros organis

mos.

Entre os ensaios com bactérias utilizados no monitoramento de substâncias tóxicas está incluído o bioensaio com Spirillum volutans, desenvolvido inicialmente por BOWDRE & KRIEG (1974) e modificado por GOATCHER em 1984. Este bioensaio utiliza uma bactéria aquática de grandes dimensões, que apresenta uma motilidade típica, movimento reverso, devido à presença de flagelos polares em cada uma de suas extremidades. Substâncias tóxicas em níveis não letais alteram a motilidade típica dessas bactérias e essas alterações são utilizadas como medida da toxicidade, sendo a toxicidade relativa expressa como MEC₉₀ que é a concentração mínima efetiva da substância tóxica que causa perda da motilidade típica em 90% das bactérias após um determinado período de tempo.

Estudos comparativos realizados em vários países envolvendo bioensaios com Daphnia e peixes e, o Sistema Microtox e S. volutans tem revelado aspectos interessantes em relação à sensibilidade dos mesmos, tendo ambos apresentado boa concordância entre os referidos sistemas.

Deve-se salientar, no entanto, que não existe nenhum ensaio universal que possa ser usado em todas as situações para avaliação da toxicidade, assim como é óbvio que diferentes bioensaios não podem fornecer resultados equivalentes, devido às diferenças biológicas inerentes aos mesmos, frente a ampla gama de substâncias tóxicas existentes no meio ambiente.

1 OBJETIVO

Esta Norma descreve o ensaio de toxicidade aguda com Spirillum volutans utilizado como teste de triagem para detectar efeito tóxico em amostras de:

- efluentes industriais, corpos d'água receptores e águas residuárias;
- águas superficiais e subterrâneas, sedimentos, lixiviados e extratos de solo;
- água para consumo humano; e
- compostos químicos solúveis em água ou solventes orgânicos.

Nota: Este ensaio não pode ser utilizado para águas salobras.

2 NORMAS COMPLEMENTARES

Na aplicação desta Norma pode ser necessário consultar:

- da ABNT
 - NBR 9897 - Planejamento de amostragem de efluentes líquidos e corpos receptores
 - NBR 9898 - Preservação e técnicas de amostragem de efluentes líquidos e corpos receptores
- da CETESB
 - L5.009 - Segurança e higiene do trabalho em laboratórios de microbiologia ambiental
 - L5.201 - Bactérias heterotróficas - Contagem em placas.

3 DEFINIÇÕES

Para os efeitos desta Norma são adotadas as definições de 3.1 a 3.7.

3.1 *Spirillum volutans* ATCC 19554

Bactéria aquática de grandes dimensões (1,4-1,7 x 16 - 28 µm) que apresenta uma motilidade típica, movimento reverso, devido a presença de flagelos polares em cada uma das extremidades.

3.2 Agentes tóxicos

Substâncias ou produtos químicos que causam efeitos deletérios aos organismos e aos ecossistemas.

3.3 Toxicidade aguda

É a propriedade relativa do agente tóxico de causar efeitos adversos a organismos vivos após um curto período de exposição dos mesmos a esse agente.

3.4 Motilidade reversa

É o movimento bacteriano típico devido à presença de flagelos polares em cada uma das extremidades do *Spirillum volutans*.

3.5 Sistema de "endpoints"

É o conjunto das três alterações que podem ocorrer na motilidade típica da bactéria-teste, *S. volutans*, pela ação de produtos tóxicos (Ver Figura 1, Anexo A).

3.5.1 Motilidade "forward" ou descordenada

É o movimento bacteriano em apenas uma direção devido a rotação unidirecional dos flagelos.

3.5.2 Motilidade vibratória ou de "Spin"

É o movimento vibratório em uma área muito limitada ou então movi

mento tipo "Spin" devido à rotação oposta dos flagelos. Nesse estágio podemos observar bactérias imóveis com apenas os flagelos em movimento.

3.5.3 Imobilização total bacteriana

É a perda total do movimento celular e flagelar (inativação celular).

3.6 MEC₉₀ (30')

É a concentração mínima efetiva do agente tóxico que causa a perda da motilidade reversa típica em 90% dos microrganismos-teste (Spirillum volutans) em 30 minutos de exposição nas condições do ensaio.

3.7 Unidade tóxica (U.T.)

É a recíproca da diluição da amostra que causa efeito tóxico agudo após determinado período de exposição.

4 APARELHAGEM

4.1 Equipamentos

4.1.1 Autoclave

É normalmente operada a uma pressão de 15 libras por polegada quadrada (1.02 Kg/cm^2), produzindo em seu interior, uma temperatura de 121°C ao nível do mar. Em seu funcionamento deve-se observar a substituição por vapor de todo o ar existente na câmara e sua operação completa deve durar, no máximo uma hora sendo recomendável que a temperatura de esterilização seja atingida em até 30 minutos.

4.1.2 Balança

Com sensibilidade mínima de 0,1 g ao pesar 150 g.

4.1.3 Balança analítica

Com sensibilidade mínima de 0,001 g ao pesar 10 g.

4.1.4 Câmara de segurança biológica

Equipamento que possibilita a remoção de partículas presentes no ar através da passagem do mesmo por um filtro adequado, sendo o ar filtrado dirigido em forma de um fluxo direto sobre a área de trabalho.

4.1.5 Destilador de água ou aparelho para desionização

Deve produzir água não tóxica, cuja condutividade deve ser inferior a $2 \mu\text{mhos/cm}$ a 25°C e o pH estar na faixa de 5,5 a 7,5.

4.1.6 Estufa para esterilização e secagem

Deve manter a temperatura de $170 \pm 10^{\circ}\text{C}$ durante o período de esterilização de materiais (mínimo de 2 horas).

4.1.7 Incubadoras bacteriológicas

Deve ser equipada com termostato e deve manter a temperatura nas faixas de $25 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ e $35 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$.

4.1.8 Medidor de pH

Deve ter precisão de no mínimo 0,1 unidade de pH e sua calibração deve ser feita pelo menos duas vezes ao dia com no mínimo duas soluções tampão padrões (pH = 4,0; pH = 6,86 ou pH = 9,18).

4.1.9 Microscópio binocular de campo escuro

4.1.10 Porta filtro

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

4.1.11 Refrigerador

Deve manter a temperatura na faixa de 2 a 8°C .

4.2 Vidrarias

4.2.1 Balões

Devem ser de borossilicato (pyrex) ou vidro neutro, com capacidade de 2 litros a serem utilizados no preparo do meio de cultura.

4.2.2 Béqueres

Devem ser de borossilicato (pyrex) ou vidro neutro, com capacidade de 1 litro, a serem utilizados no descarte de lâminas e ponteiros durante a execução do ensaio.

4.2.3 Frascos para coleta de amostras

Frascos descartáveis de polietileno atóxico ou frascos de vidro neutro previamente lavados com solução de ácido sulfúrico/ácido nítrico a 50% (6:1), com capacidade mínima de 100 mL, boca larga e tampa atóxica à prova de vazamentos.

4.2.4 Lâminas para microscopia

Devem ser ultra finas com 26 x 76 mm de dimensão.

4.2.5 Pipetas

Pipetas tipo Mohr de 1 mL, 5 mL e 10 mL, com graduação de 1/10, erro de calibração inferior a 2,5% e com bocal para tampão de algodão.

4.2.6 Pipetas tipo Pasteur

4.2.7 Placas de Petri de vidro

Devem ser de borossilicato (pyrex) ou vidro neutro de boa qualidade com fundo perfeitamente plano sem ranhuras e bolhas de ar com 100 mm de diâmetro e 15 mm de altura.

4.2.8 Seringa dosadora

De borossilicato (pyrex) ou vidro neutro utilizada para distribuição do meio de cultura.

4.2.9 Tubos de ensaio

Devem ser de borossilicato (pyrex) ou vidro neutro de 16 x 150 mm e de 12 x 120 mm.

4.2.10 Tubos de ensaio com tampa de rosca

Devem ser de borossilicato (pyrex) ou vidro neutro de 15 x 150 mm.

4.3 Outros materiais

4.3.1 Algodão cardado

4.3.2 Bico de Bunsen ou similar

Devem ter funcionamento adequado de modo a produzir combustão completa.

4.3.3 Estantes

De tamanho adequado para colocação de tubos de ensaio empregados na análise.

4.3.4 Luvas de borracha

4.3.5 Marmitas de aço inoxidável

Para acondicionar pipetas Pasteur.

4.3.6 Micropipetador

Pipetador automático de alta precisão com capacidade para medir volumes de 100 μ m.

4.3.7 Papel de alumínio

4.3.8 Pera de sucção

4.3.9 Ponteiras

De polipropileno, descartáveis, de alta precisão, ajustáveis ao micropipetador utilizado durante a realização do ensaio.

4.3.10 Porta-pipetas de aço inoxidável4.3.11 Protetor facial

De utilização obrigatória, juntamente com máscara com filtro adequado, no preparo de solução de ácido ou amostras perigosas.

4.3.12 Seringa descartável4.3.13 Telas de amianto4.3.14 Tripés4.4 Reagentes

4.4.1 Para o preparo do meio de cultura e soluções utilizadas nesse ensaio, são os seguintes os reagentes necessários:

- ácido nítrico (H_2NO_3);
- ácido succínico ($C_4H_6O_4$);
- ácido sulfúrico (H_2SO_4);
- ágar;
- casitone;
- cloreto de sódio (NaCl);
- cloreto férrico ($FeCl_3$);
- hidróxido de potássio (K(OH));
- sulfato de amônia ($(NH_4)_2SO_4$); e
- sulfato de magnésio ($MgSO_4$).

Os reagentes devem ser de grau bacteriológico e de procedência idônea, apresentar odor, cor e consistência inalteradas, ser livres de elementos bactericidas ou bacteriostáticos inespecíficos bem como de carboidratos inespecíficos.

4.5 Meio de cultura4.5.1 Meio BCSS (Bacto Casitone Succinate Salts)Fórmula:

Cloreto de sódio (NaCl).....	0,1	g
Casitone.....	2,5	g
Ácido succínico.....	1,0	g
Sulfato de magnésio ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$).....	1,0	g
Sulfato de amônia($(NH_4)_2 \cdot 7H_2O$).....	1,0	g
Cloreto férrico ($FeCl_3 \cdot 6H_2O$).....	0,002	g
Ágar.....	1,2	g
Água bidestilada.....	1 000,0	mL
pH final após esterilização: $6,8 \pm 0,1$		

Preparo:

Pesar os ingredientes e colocar em um balão com capacidade de 2 litros. Acrescentar 1 000 mL de água bidestilada fria e aquecer, agitando frequentemente até completa dissolução do meio, tomando cuidado para que não seja atingida a temperatura de ebulição. Verificar o pH do meio efetuando, se necessário, o ajuste com KOH. Não usar NaOH, pois as bactérias são sensíveis ao sódio (Na^+). Distribuir 7 mL em tubos de ensaio de 16 x 150 mm com tampão de algodão. Esterilizar em autoclave a 121°C por 15 minutos, verificar o pH final do meio de cultura e estocar em geladeira a 4°C , protegidos da luz, por até 4 semanas. Testar a esterilidade e habilidade de crescimento de cada lote de meio de cultura, de acordo com os procedimentos descritos nos Anexos C-1 e C-2.

4.6 Soluções4.6.1 Solução de ácido sulfúrico/ácido nítrico a 50% $\text{H}_2\text{SO}_4/\text{HNO}_3(6:1)$ Preparo:

Misturar vagarosamente seis partes da Solução A com uma parte da Solução B.

a) Solução A - Solução de ácido sulfúrico a 50%Fórmula:

Ácido sulfúrico (H_2SO_4)..... 500 mL
Água destilada..... 500 mL

Preparo:

Medir o volume desejado de água destilada em recipiente adequado e adicionar **vagarosamente** o ácido sulfúrico.

b) Solução B - Solução de ácido nítrico a 50%Fórmula:

Ácido nítrico (HNO_3)..... 500 mL
Água destilada..... 500 mL

Preparo:

Medir o volume desejado de água destilada em recipiente adequado e adicionar **vagarosamente** o ácido nítrico.

Nota: Para o preparo das soluções A e B, adicionar o ácido à água e **nunca** o água ao ácido. Usar protetor facial, máscara com filtro adequado e luvas para o preparo dessas soluções.

5 EXECUÇÃO DO ENSAIO

5.1 Princípio do método

O princípio do ensaio baseia-se na observação microscópica da perda da motilidade típica reversa do Spirillum volutans quando em presença de substâncias químicas tóxicas em níveis não letais.

5.2 Amostragem

Deve ser realizada conforme descrito na Norma ABNT NBR 9898 - Preservação e técnicas de amostragem de efluentes líquidos e corpos receptores.

Nota: O prazo máximo entre a amostragem e o início do ensaio não deve exceder 72 horas sob refrigeração.

5.3 Manutenção das culturas de **S. volutans**

As culturas de Spirillum volutans são mantidas a 25 e 28°C em meio BCSS. Checar mensalmente a esterilidade da cultura de acordo com os procedimentos descritos no Anexo C-3.

5.4 Repique das culturas de **S. volutans**

O repique deve ser realizado em câmara de segurança biológica ou na bancada do laboratório, próximo ao bico de Bunsen.

5.4.1 Desinfetar a bancada do laboratório ou a câmara de segurança biológica, usando um desinfetante que não deixe resíduos.

5.4.2 Remover com uma pipeta Pasteur o anel de crescimento, cerca de 2-5 mm, abaixo da superfície do tubo.

5.4.3 Transferir o crescimento para um tubo novo de meio BCSS. Colocar o inóculo no fundo do tubo, tomando cuidado para não introduzir bolhas de ar no meio de cultura.

5.4.4 Incubar as culturas de manutenção a 25°C por 2-3 dias e as culturas-teste a 28°C por 24 horas.

5.5 Procedimento do ensaio

5.5.1 Checar a viabilidade da cultura colocando uma gota da cultura e uma gota de água destilada estéril em uma lâmina de vidro.

5.5.2 Fazer a leitura em microscópio de campo escuro, observando pelo menos, seis campos diferentes.

Nota: Uma cultura viável deve conter poucas bactérias mortas com a maioria delas movimentando-se rapidamente em direções inversas.

5.5.3 Preparar o controle negativo pipetando, em um tubo de vidro estéril de 12 x 120 mm, 0,9 mL de água destilada estéril mais 0,1 mL da cultura-teste de S. volutans.

5.5.4 Homogeneizar suavemente e retirar, com auxílio de uma pipeta Pasteur, uma gota colocando-a sobre uma lâmina de vidro.

5.5.5 Fazer leitura em microscópio de campo escuro, em pelo menos seis campos.

Nota: O controle negativo deverá apresentar pouca ou nenhuma perda da motilidade típica durante as 2 horas de teste.

5.5.6 Preparar o controle positivo pipetando, em um tubo de vidro estéril de 12 x 120 mm, 0,9 mL da solução de cloreto de mercúrio a 10 ppm de Hg^{+2} mais 0,1 mL da cultura-teste de S. volutans.

5.5.7 Homogeneizar suavemente e retirar, com auxílio de uma pipeta Pasteur, uma gota colocando-a sobre uma lâmina de vidro.

5.5.8 Fazer a leitura em microscópio de campo escuro em pelo menos seis campos.

Nota: O controle positivo deverá apresentar 100% de inativação celular no intervalo de tempo de 0-30 minutos.

5.5.9 Pipetar 0,9 mL da amostra pura em um tubo de vidro estéril de 12 x 120 mm.

5.5.10 Pipetar com pipetador automático 0,1 mL da cultura-teste de S. volutans, adicionando-o aos 0,9 mL da amostra. Assegurar-se de que o inóculo foi pipetado do anel de crescimento do tubo de BCSS.

5.5.11 Retirar imediatamente, com auxílio de uma pipeta Pasteur, uma gota da amostra, colocando-a sobre uma lâmina de vidro.

5.5.12 Fazer a leitura em microscópio de campo escuro, em pelo menos seis campos, sendo essa a leitura no tempo t_0 .

5.5.13 Anotar em protocolo apropriado (vide Anexo B) a porcentagem de células encontradas em cada um dos três "endpoints".

5.5.14 Fazer novas lâminas nos intervalos de tempo 5, 15, 30, 60, 90 e 120 minutos, repetindo as leituras em microscópio de campo escuro.

5.5.15 Se, no intervalo de tempo 0 a 15 minutos, a soma dos três "endpoints" observados for igual ou superior a 90%, testar uma concentração menor da amostra de acordo com os procedimentos descritos nos itens 5.5.9 a 5.5.14.

5.5.16 Determinar para o intervalo de tempo de 30 minutos, a concentração efetiva mínima capaz de mobilizar e/ou alterar o movimento reverso típico em 90% das bactérias.

Nota: Amostras de baixa toxicidade, com $MEC_{90} = 90\%$ poderão requerer intervalos de tempo maiores que 30 minutos (60, 90 ou 120') para obtenção da MEC_{90} .

6 EXPRESSÃO DOS RESULTADOS

Os resultados são expressos através da MEC_{90} em %, mL/L ou mg/L, devendo-se especificar o tempo correspondente de exposição da suspensão bacteriana à amostra ou diluição da amostra em teste (30 minutos).

6.1 Obtenção da MEC_{90}

A MEC_{90} é obtida considerando-se os 3 "endpoints": motilidade "forward", motilidade vibratória ou de "Spin" e inativação bacteriana. Por ser muito difícil estarem todas as células em uma das três categorias a um mesmo tempo, o resultado positivo é obtido quando a adição dos 3 "endpoints" for maior ou igual a 90%. Considerando ainda, que sempre existe uma pequena porcentagem de células mortas em uma cultura normal e, conseqüentemente, no controle negativo, devemos excluir, do cálculo da MEC_{90} , a porcentagem de inativação celular do controle negativo.

6.2 Cálculo dos valores de unidades tóxicas

Considerando que o valor da MEC_{90} é inversamente proporcional à toxicidade da amostra (quanto menor o valor da MEC_{90} , maior a toxicidade da mesma) a transformação desses valores em unidades tóxicas (U.T.) pode facilitar a compreensão dos resultados, visto que a mesma apresenta uma relação direta com o grau de toxicidade da amostra (quanto maior o valor de U.T., maior a toxicidade). Para este bioensaio a unidade tóxica (U.T.) é calculada através da seguinte fórmula:

$$U.T. = \frac{100\%}{MEC_{90}}$$

6.3 Interpretação dos resultados

6.3.1 Resultados negativos

Indicam que, nas condições do ensaio, não foi observado efeito tóxii

co agudo frente a cepa de S. volutans.

6.3.2 Resultados positivos

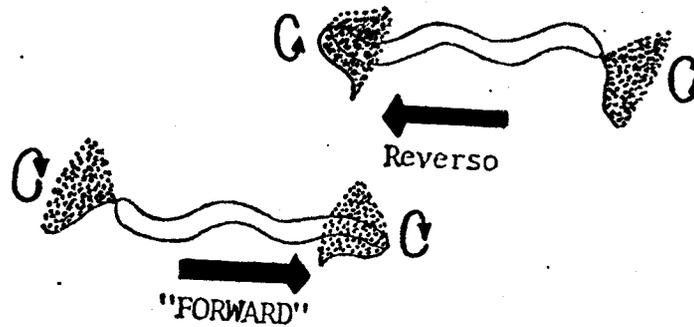
Indicam que, nas condições do ensaio a amostra apresentou efeito tóxico agudo capaz de alterar a motilidade típica em mais de 90% das bactérias.

O grau de toxicidade da amostra é definido através do valor da MEC_{90} obtida. As amostras podem ser classificadas em diferentes graus de toxicidade:

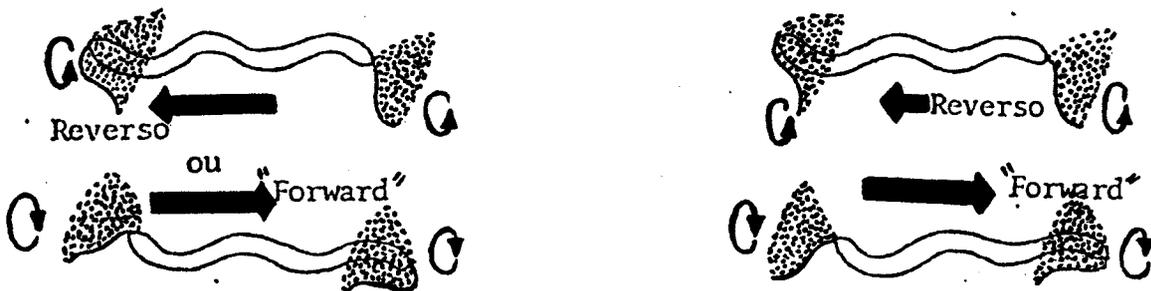
Grau de Toxicidade	
MEC_{90}	Classificação
< 25%	muito tóxica
25 - 50%	tóxica
> 50 - 75%	moderadamente tóxica
> 75%	levemente tóxica

/ANEXO A

ANEXO A - REPRESENTAÇÃO GRÁFICA DO MICRORGANISMO



a) Motilidade normal ou reversa

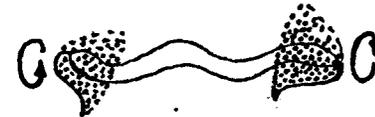
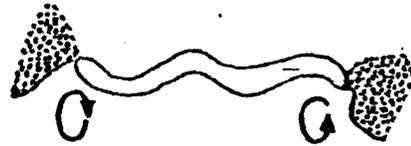
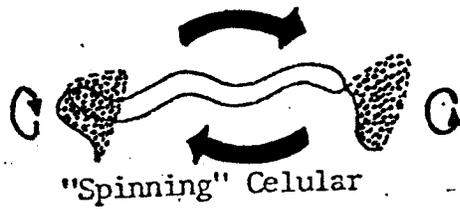


Motilidade unidirecional

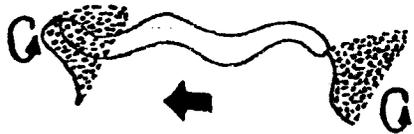
Motilidade reversa a curta distância

b) 1º "Endpoint": motilidade "forward" ou descordenada

FIGURA 1 - Padrões de motilidade e rotação flagelar de S. volutans



Células imóveis com rotação dos flagelos



c) 2º "Endpoint": motilidade de "Spin" ou vibratória



Orientação dupla da cauda



Orientação dupla da cabeça

d) 3º "Endpoint": imobilização bacteriana

Orientação dupla de cauda

Orientação dupla de cabeça

d) 3º "Endpoint": imobilização bacteriana

FIGURA 1 - Padrões de motilidade e rotação flagelar de S. volutans

ANEXO B - FICHA DE LANÇAMENTO DE RESULTADOS

Teste de toxicidade aguda utilizando-se *Spirillum volutans*

Ensaio nº _____ Data 16/10/87 Técnico _____ Temperatura do teste Ambiente
 Amostra nº 1750 Procedência Indústria A Data da coleta 16/10/87 Esterilização _____
 Observação _____ pH 6,7 Cultura 28°C 24 Horas Meio BCSS

Tempo de (min)	Diluição da amostra	Endpoints da amostra			Endpoints do controle (%ICB)		Anotações	MEC ₉₀ da amostra
		% MF ¹	% MV/S ²	% ICB	Positivo	Negativo		
0	90%			100%	100%	5%		
5								
15								
30								
60								
90								
120								
0	9%			5%		5%		
5		10%	-	20%				
15		10%	-	20%		5%		
30		10%	-	40%		5%		
60								
90								
120								
0	18%	10%		20%		5%		
5		10%	10%	30%		5%		
15		-	20%	50%		5%		
30		10%	30%	60%		5%		
60								
90								
120								

1 - Motilidade FORWARD (descordenção) 3 - Inativação da célula bacteriana

2 - Motilidade vibratória ou de "Spin"

ANEXO C - PROCEDIMENTOS PARA AMOSTRAS TURVAS COM MUITO MATERIAL EM SUSPENSÃO

Não existe necessidade de esterilizar as amostras a serem analisadas uma vez que os microrganismos presentes não interferem com o ensaio. Entretanto as amostras muito contaminadas ou com muita matéria orgânica em suspensão, que dificultam a observação microscópica, devem ser clarificadas.

A clarificação é feita através de filtração com membrans AP₂₀ ou membranas de ester de celulose com 0,45 μ de porosidade. Devido ao pequeno volume de amostra requerida para o ensaio, 10 mL, a filtração pode ser feita no próprio tubo de ensaio, utilizando um swinex adaptado a uma seringa descartável.

/ANEXO D

ANEXO D - PROCEDIMENTOS COMPLEMENTARESD-1 Teste de esterilidade do meio BCSS

Após ter sido preparado e antes de ser utilizado, o meio de cultura deve ser testado quanto à sua esterilidade. Este teste consiste em incubar o meio BCSS em estufa a 35°C durante 48 horas.

Qualquer turvação ou formação de película indicam presença de microrganismos e essa contaminação pode ser decorrente de falhas no processo de esterilização ou contaminação após esterilização.

D-2 Teste de habilidade de crescimento

Antes de ser utilizado o meio de cultura deve ser testado quanto à sua habilidade de crescimento. Este teste é feito repicando-se uma cultura de Spirillum volutans para dois tubos de meio BCSS. Após o repique incubar os tubos a 28°C por 24-48 horas e observar a formação do anel de crescimento característico.

D-3 Teste de esterilidade da cultura de **S. volutans**

Testar mensalmente a esterilidade da cultura de S. volutans, inoculando 1 mL da cultura em uma placa de "plate count agar" (técnica "pour plate") e incubar a 35°C durante 48 horas. O crescimento de qualquer colônia indica contaminação da cultura.

D-4 Lavagem, preparo e esterilização de materiais

Todos os materiais utilizados no teste, tais como: tubos de ensaio, pipetas, ponteiras e lâminas de vidro devem ser descontaminados em autoclave a 121°C por 30 minutos e, a seguir, lavados com detergente neutro e enxaguado várias vezes. Após enxagüe, 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.

Após secagem, a vidraria deve ser esterilizada em estufa a 170-180°C durante 2 horas e as ponteiras de polipropileno devem ser embrulhadas em papel de alumínio e papel Kraft e esterilizadas em autoclave a 121°C durante 15 minutos.

ANEXO E - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- E-1 ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS - ABNT - Planejamento de amostragem de efluentes líquidos e corpos receptores. NBR 9897, São Paulo, 1987.
- E-2 _____. Preservação e técnicas de amostragem de efluentes líquidos e corpos receptores. NBR 9898. São Paulo.
- E-3 BITTON, G. & DUTKA, B.J. (eds.) Toxicity Testing Using Microorganisms. Vol. I. Flórida. CRC Press. 1986.
- E-4 BOWDRE, J.H. & KRIEG, N.R. - Water quality monitoring: bacteria as indicators. Virginia Water Resources Research Center. Bulletin 69, 1974.
- E-5 CETESB. Bactérias heterotróficas - Contagem em placas - Norma Técnica L5.201, São Paulo, 1986.
- E-6 _____. Segurança e higiene do trabalho em laboratórios de microbiologia ambiental. Norma Técnica L5.009, São Paulo, 1987.
- E-7 COLEMAN, R.N. & QURESHI, A.A. Microtox and Spirillum volutans tests for assessing toxicity of environmental samples. Bull. Environ. Contam. Toxicol., 35 (443-451), 1985.
- E-8 GOATCHER L.J. et al. Evaluation and refinement of the Spirillum volutans test for use in toxicity screening. In: Toxicity screening procedures using bacterial systems. Liu D. and Dutka B.J. (eds) N. York, Marcel Dekker, 1984.
- E-9 KRIEG, N.R. TOMELTY, J.P. & WELLS, S. Jr. Inhibition of flagellar coordination in Spirillum volutans. Journal of Bacteriology, 94: 1431-1436, 1967.
- E-10 LIU, D. & DUTKA, B.J. (eds) Toxicity screening procedures using bacterial systems. New York, Marcel Dekker, Inc. 1984.
-