



VERSION 2
SEP 18, 2023

Cyanobacteria growth V.2

Gabriela de Assis

Ricardo M. Borges¹, Ferreira¹,

Fernanda

Chagas¹,

pauloihc¹

¹UFRJ

LAABio-IPPN-UFRJ



Ricardo M. Borges

UFRJ

OPEN ACCESS



DOI:
dx.doi.org/10.17504/protocols.io.4r3l22o8xl1y/v2

Protocol Citation: Ricardo M. Borges, Gabriela de Assis Ferreira, Fernanda Chagas, pauloihc 2023. Cyanobacteria growth . **protocols.io** <https://dx.doi.org/10.17504/protocols.io.4r3l22o8xl1y/v2> Version created by Ricardo M. Borges

License: This is an open access protocol distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](#), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited

Protocol status: Working
We use this protocol and it's working

ABSTRACT

Este documento tem como objetivo apresentar um protocolo abrangente para o cultivo de cianobactérias em meio aquático salino. O protocolo incorpora informações detalhadas sobre a composição das soluções, cálculos fundamentais e volumes requeridos para a execução bem-sucedida de todo o procedimento. É pertinente ressaltar que as taxas de crescimento podem manifestar consideráveis variações interspecíficas entre as diferentes estirpes de cianobactérias.

SAFETY WARNINGS



Autoclave:

Proteção Pessoal: Sempre use roupas de proteção adequadas, como avental, luvas, óculos de proteção e calçados fechados ao operar a autoclave.

Condições de Trabalho: Verifique se a área de trabalho está bem ventilada e se possui fácil acesso a chuveiros de emergência e lava-olhos.

Resfriamento: Após a autoclavagem, espere o ciclo de resfriamento antes de abrir a autoclave. A alta pressão e temperatura podem causar explosões se o processo não for concluído corretamente.

Cuidado com o Vapor: Esteja atento ao vapor quente que é liberado quando a autoclave é aberta. Mantenha o rosto e as mãos afastados da abertura.

Manutenção: Certifique-se de que a autoclave esteja em boas condições de funcionamento e tenha passado por manutenção regular.

Substâncias Químicas:

1. **Manuseio Seguro:** Use as luvas apropriadas e tome cuidado ao manusear substâncias químicas. Evite contato direto com a pele e os olhos.
2. **Filtragem:** Ao usar filtros, siga as diretrizes para descarte seguro de filtros contaminados.
3. **Armazenamento:** Guarde todas as substâncias químicas de acordo com as regulamentações de segurança e em áreas designadas para armazenamento de produtos químicos.

Tampões de Algodão:

1. **Manuseio Cuidadoso:** Tenha cuidado ao manusear os tampões de algodão e verifique se não há resíduos químicos ou contaminantes presentes neles.
2. **Autoclave com Cuidado:** Ao autoclavar os tampões de algodão, siga as instruções de autoclave com cuidado para evitar superaquecimento ou explosões.
3. **Secagem Adequada:** Certifique-se de que os tampões de algodão estejam completamente secos antes de usá-los nos frascos Erlenmeyer.

Geral:

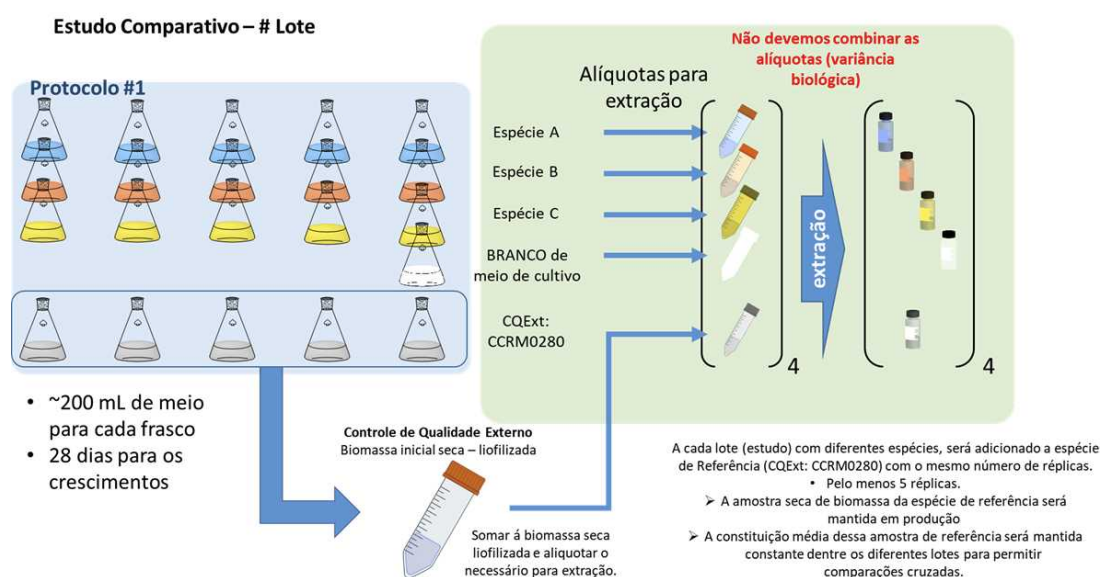
1. **Procedimentos Adequados:** Siga rigorosamente todas as etapas e procedimentos descritos no protocolo. Não tome atalhos e evite improvisar.
2. **Treinamento:** Pessoas que executam esses procedimentos devem ser treinadas em segurança laboratorial e familiarizadas com os riscos associados.
3. **Plano de Emergência:** Esteja ciente do plano de emergência do laboratório e saiba como agir em caso de acidentes.
4. **Descarte Seguro:** Certifique-se de descartar resíduos químicos e materiais biológicos de acordo com os regulamentos locais e as diretrizes do laboratório.
5. **Documentação:** Mantenha registros precisos de todas as etapas realizadas, incluindo datas e detalhes relevantes.

Lembrando que as precauções de segurança podem variar de acordo com as regulamentações locais e o nível de risco associado ao trabalho realizado no laboratório. Portanto, é fundamental consultar as diretrizes de segurança específicas do seu local de trabalho e seguir as melhores práticas de segurança em todos os momentos.

Preparo Anterior ao Cultivo

- 1 A quantidade de **frascos Erlenmeyer de 500 mL** necessária variará conforme o número de amostras a serem produzidas. Siga o seguinte esquema:
 - X amostras em **quintuplicatas** (x5)
 - Cepa Controle de Qualidade Externo (**CCRM0280**) em quintuplicatas (x5)
 - **Amostras Branco de Meio de Cultivo** (2 frasco Erlenmeyer tratado da mesma forma com meio e nutrientes, mas sem a etapa de inoculação)

Por exemplo: se estivermos comparando 3 espécies diferentes, serão necessários $(3 \times 5) + 5 + 2$ (=22) frascos no total.



2 Preenchimento do Arquivo Metadata:

- Código das amostras
- Código das cepas
- Espécie
- Meios de cultivo
- Data de início
- Datas de adição dos nutrientes
- Data de coleta da biomassa
- Método de extração (média polaridade: Diclorometano-Metanol)
- Método de extração 2 (alta-polaridade: Metanol-Água)
- Comentários

Lembre-se de seguir essas etapas para um registro completo e preciso das informações relacionadas ao experimento.

Material

- 3
- Frascos Erlenmeyer de 500 mL
 - Frascos tipo Scotch de 250 mL e de 1 litro
 - Tubos de centrifuga de 50 mL do tipo Falcon
 - Alças estéreis
 - Reagentes para preparo das soluções estoque (ver abaixo)
 - Centrífuga de Bancada Refrigerada (Hettich Modelo 320R, Tuttlingen, Alemanha)
 - SpeedVac (Christ modelo RVC 2-25, Osterode am Harz, Alemanha) no LabMeta - Instituto de Química - UFRJ
 - Liofilizador (modelo L120, Liotop, Brazil)



4 **Preparo das Soluções Estoque:**

Solução Estoque de NaNO_3 :

- Utilize um frasco devidamente lavado (lavado previamente com extran 5% e rinsado com água destilada até exaustão)
- Acrescente 7,5 g de NaNO_3 (NEON, p# 01813) a 100 mL de água destilada
- Armazene a solução sob resfriamento em geladeira

Uso: 1 mL para cada 1 litro de meio.

5 **Solução Estoque de $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$:**

- Utilize um frasco previamente lavado (lavado previamente com extran 5% e rinsado com água destilada até exaustão)
- Adicione 0,5 g de $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (NEON, p# 01415) a 100 mL de água destilada
- Armazene a solução sob resfriamento em geladeira

Uso: 1 mL para cada 1 litro de meio.

6 **Solução Estoque de Metais-Traço:**

- Utilize um frasco lavado (lavado previamente com extran 5% e rinsado com água destilada)

até exaustão).

■ Adicione os seguintes componentes:

- 23 mg de $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$
- 152 mg de $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$
- 7,3 mg de $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$
- 14 mg de $\text{CoSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$
- 6,8 mg de $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$
- 4,6 g de $\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$
- 4,4 g de $\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$

Complete o volume com água destilada **até 1 litro**.

- Armazene a solução sob resfriamento em geladeira

Uso: 1 mL para cada 1 litro de meio.

7 Solução Estoque de Vitaminas:

- Utilize um frasco que tenha sido previamente lavado (lavado previamente com etanol 5% e rinsado com água destilada até exaustão).
- Adicione os seguintes componentes:
- 200 mg de Tiamina
- 10 mL (0,1 g) de Biotina
- 1 mL (1 g/L) de Cianocobalamina

Complete o volume com água destilada **até 1 litro**.

- Armazene a solução sob resfriamento em geladeira

Uso: Após a autoclavagem do meio, adicione 1 mL para cada 1 litro de meio.

8 Preparo de Solução Estoque de Nutrientes:

- Misture:
- 20 mL da Solução Estoque de NaNO_3
- 20 mL da Solução Estoque de $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$
- 1 mL da Solução Estoque de Vitaminas
- 1 mL da Solução Estoque de Metais-Traço
- Filtração em filtro em 0.22 μm
- Armazene a solução sob resfriamento

9 Preparo dos Tampões de Algodão:

Materiais necessários: algodão hidrofóbico, gaze, tesoura, barbante.

- Corte um pedaço de gaze do tamanho da palma da mão.
- Abra a gaze e insira parte dela dentro do frasco.
- Coloque o algodão hidrofóbico dentro da gaze que está dentro da boca do frasco.
- Continue inserindo algodão até que, ao retirar a gaze com o algodão do frasco, um som semelhante a "puf" seja ouvido (indicando o vácuo causado pelo Tampão).
- Corte um pedaço de barbante.
- Amarre a gaze com o barbante, assegurando que fique bem acima do algodão (sem deixar

espaço).

- Corte o excesso de barbante e gaze.
- Verifique se o Tampão está um pouco acima da boca do vidro.
- Se necessário, ajuste sua posição.
- **Autoclave:** 15 minutos a 15 min a 121°C.
- Seque o frasco tampado com os Tampões de algodão na estufa por 8-12 horas a 70°C.

Garanta que cada etapa seja seguida de maneira precisa para assegurar a qualidade do meio de cultivo e dos procedimentos subsequentes.

Os Tampões de algodão são reutilizadas de um cultivo para o próximo. Ao final do cultivo, é suficiente secá-las em uma estufa para evitar a proliferação de fungos.

10 Preparo do Meio de Cultivo F/2:

- Para 1 litro de água destilada, adicione:
- 41,5 gramas de sal marinho para aquário (Reef Salt)
- 1 mL de Solução Estoque de NaNO_3
- 1 mL de Solução Estoque de $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$
- 1 mL de Solução Estoque de Metais-Traço
- **Autoclave:** 15 minutos a 15 min a 121°C
- Aguarde o resfriamento.
- **Adicione 0,5 mL da Solução Estoque de vitaminas antes de usar.**

Preparo Anterior ao Cultivo

11 Separe todos os frascos Erlenmeyer de 500 mL

- Lave-os com Extran a 5%.
- Enxágue-os abundantemente com água destilada.

Importante considerar o número de cepas e réplicas a serem cultivadas.

12 Prepare os Tampões de algodão para vedar os cultivos

13 Autoclave os frascos previamente lavados com os Tampões de algodão

- **Autoclave:** 15 minutos a 15 min a 121°C.
- Seque o frasco tampado com os Tampões de algodão na estufa por 8-12 horas a 70°C.

14 Autoclave os frascos contendo o meio de cultivo F/2

- Para 22 frascos: 22 x 200 ml = 4.4 litros (arredondado para 5 litros).

- Prepare a solução em um frasco de 5 litros e divida em frascos Schott de 1 litro.
- **Autoclave:** 15 minutos a 121°C.

15 Após o meio de cultivo resfriar, adicione 0,5 mL de solução de vitaminas (previamente filtrada em filtro de seringa: 0.22 µm)

- Nota: Não utilize o filtro de seringa de 0.45 µm

16

- Identifique cada frasco Erlenmeyer com etiquetas contendo código (rastreador na lista de amostras do projeto) e data de produção
- As datas de produção de cada espécime, adição de solução de nutrientes e coletas de biomassa devem ser documentadas na lista de amostras do projeto.
- Garanta que cada etapa seja realizada de forma metódica para assegurar um início apropriado para o cultivo e um rastreamento confiável dos processos subsequentes.

Inoculação

17 Utilizando alças estéreis, proceder à coleta da biomassa de um cultivo previamente preparado

- Quantidade: "tufo" com dimensões semelhantes a uma moeda de 50 centavos.
- É imperativo realizar todas as operações utilizando luvas descartáveis e minimizar a exposição ao fluxo de ar.
- Vede adequadamente os frascos Erlenmeyer com os Tampões de algodão preparados anteriormente.

Manutenção do Cultivo

18 Para manter as cianobactérias em fase logarítmica, é essencial fornecer alimentação frequente por meio da adição da **Solução Estoque de Nutrientes**, preparada previamente

- Em cada cultivo, é recomendado adicionar **200 µL da Solução Estoque de Nutrientes**.

A necessidade de nutrientes nas cianobactérias pode ser visualizada pela sua coloração verde característica.

Coleta da biomassa e tratamento

19 O período de cultivo está estipulado em:

- 28 dias.
- Com a adição da Solução Estoque de Nutrientes a cada intervalo de 7 dias.

- 20 Ao término dos 28 dias, de cada frasco Erlenmeyer, será coletada uma quantidade que corresponda visualmente a 80-90% da biomassa
- Permitiremos que cada espécime continue seu crescimento até que seja necessário interrompê-lo.
 - Inicialmente, podemos fixar um limite de 4 meses para cada espécime.
- 21 Transfira o meio de cultivo de cada frasco Erlenmeyer com a biomassa para um tubo cônico de centrífuga de 50 mL (tipo Falcon), devidamente identificado com etiqueta (correspondente ao código de referência na lista de amostras)
- **Centrifugue:** 3011 xg (4500 rpm) por 15 minutos a 4°C
 - Descarte o sobrenadante
 - Continue transferindo o conteúdo de cada frasco Erlenmeyer, centrifugando e descartando o sobrenadante até completa eliminação de todo o conteúdo aquoso
 - Registre o volume de biomassa obtido (foto para arquivo)
- 22 Submeta cada amostra devidamente identificada a processo de liofilização à secura
- Cada amostra deve ser identificada separadamente em tubos Falcon limpos e semi-rosqueados (para não haver contaminação cruzada das amostras)
 - Inserir detalhes e observações pertinentes no Metadata.
 - Sempre armazene em freezer a -20 °C