

Sep 18, 2023

Collect and Extract Biomass Cyanobacteria

DOI

dx.doi.org/10.17504/protocols.io.ewov1qqpkgr2/v1

Ricardo M. Borges¹, Fernanda Chagas¹, Fernanda FOC Chagas²

¹UFRJ; ²Universidade Federal do Rio de Janeiro

Ricardo M. Borges: orcid.org/0000-0002-7662-6734;
Fernanda Chagas: <https://orcid.org/0000-0001-9534-3521>

LAABio-IPPN-UFRJ



Ricardo M. Borges

UFRJ

Create & collaborate more with a free account

Edit and publish protocols, collaborate in communities, share insights through comments, and track progress with run records.

[Create free account](#)

OPEN  ACCESS



DOI: <https://dx.doi.org/10.17504/protocols.io.ewov1qqpkgr2/v1>

Protocol Citation: Ricardo M. Borges, Fernanda Chagas, Fernanda FOC Chagas 2023. Collect and Extract Biomass Cyanobacteria. [protocols.io https://dx.doi.org/10.17504/protocols.io.ewov1qqpkgr2/v1](https://dx.doi.org/10.17504/protocols.io.ewov1qqpkgr2/v1)

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

Created: August 24, 2023

Last Modified: September 18, 2023

Protocol Integer ID: 86921

Keywords: desprovido de biomassa seca, extract biomass cyanobacteria protocolo abrangente para, meio de cultivo sem adição de cianobactéria, meio de cultivo desprovido de inoculação cianobacteriana, extração sem biomassa, controle de qualidade combinada, cianobactérias cultivada, controle de qualidade externo, das amostras com cianobactérias cultivada, controle de qualidade, qualidade combinada, qualidade externo, biomassa, branco de cultivo, controles rigorosos de qualidade abrangem, branco de extração, cepa ccrm0280 cultivada, cepa ccrm0280 cultivada simultaneamente, envolvendo solvente, qualidade, microtubo de, cultivo, qualidade abrangem, cqext para distribuição equitativa, frasco de amostra para extração, inclusive para otimização do

Funders Acknowledgements:

Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro - FAPERJ

Grant ID: E-26/201.260/2021

Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro - FAPERJ

Grant ID: E-26/210.489/2019

Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq

Grant ID: 304501/2021-2

Abstract

Protocolo Abrangente para a Extração de Biomassa de Cianobactérias Cultivadas em Laboratório.

É crucial prestar uma atenção meticulosa a materiais de qualidade, envolvendo solventes de grau HPLC, microtubos imaculados e ponteiras Eppendorf Quality nunca antes utilizados. Controles rigorosos de qualidade abrangem "Branco de Cultivo" (meio de cultivo sem adição de cianobactéria), "Branco de Extração" (recipiente de extração sem biomassa), "Controle de Qualidade Combinadas (QC-pool)" (contendo alíquotas dos diferentes cultivos) e "Controle de Qualidade Externo" (cepa CCRM0280 cultivada simultaneamente).

Entende-se por:

- **Branco de Cultivo:** meio de cultivo desprovido de inoculação cianobacteriana, submetido aos mesmos procedimentos das amostras com cianobactérias cultivadas.
- **Branco de Extração:** frasco de amostra para extração (microtubo de 2 mL com tampa de rosca) desprovido de biomassa seca, submetido aos mesmos procedimentos de extração.
- **Controle de Qualidade Combinadas (QC-pool):** amostra representativa do estudo que representará uma média fiel a todos os metabólitos extraídos. Pode ser usado, inclusive para otimização dos parâmetros técnico de análise.
- **Controle de Qualidade Externo (QCExt):** A amostra contendo a cepa CCRM0280 cultivada em paralelo servirá como referência para estudos comparativos. Após a secagem, a nova amostra de CCRM0280 obtida no atual cultivo será combinada com o estoque de CCRM0280-CQExt para distribuição equitativa de Controle de Qualidade interlote. **Este protocolo está descrito em documento próprio.**

Guidelines

Solventes e Materiais de Laboratório:

1. **Solventes HPLC e LCMS:** Todos os solventes utilizados neste laboratório devem ser de qualidade compatível com HPLC e LCMS. A pureza dos solventes é crucial para garantir resultados confiáveis em nossos experimentos. Certifique-se de que todos os solventes adquiridos atendam a esses padrões de qualidade.
2. **Vidrarias Novas:** Quando utilizar vidrarias, certifique-se de que elas sejam novas e estejam limpas. Qualquer resíduo ou contaminação presente nas vidrarias pode afetar negativamente os resultados dos experimentos.
3. **Materiais Plásticos de Alta Qualidade:** Recomenda-se o uso de plásticos de alta qualidade, tais como aqueles referenciados como "Eppendorf Quality," para evitar a contaminação cruzada e garantir a integridade das amostras durante o manuseio e o armazenamento. A qualidade dos materiais plásticos desempenha um papel crítico na precisão das análises.

Adotar essas diretrizes ajudará a manter a qualidade e a precisão de nossos procedimentos laboratoriais, assegurando resultados consistentes e confiáveis em nossos estudos.

Troubleshooting

Safety warnings

Metanol (Álcool Metílico):

- Toxicidade:** O metanol é altamente tóxico quando ingerido, inalado ou absorvido pela pele. Nunca beba ou coma alimentos em áreas onde o metanol é manuseado. Evite o contato direto com a pele e olhos. Use equipamento de proteção adequado, como luvas e óculos de proteção.
- Ventilação:** Sempre trabalhe com metanol em um local bem ventilado, como uma capela de exaustão, para minimizar a exposição a vapores tóxicos.
- Armazenamento:** Armazene o metanol em recipientes adequados e rotulados, longe de fontes de calor ou ignição. Mantenha-o trancado em um armário apropriado e longe do alcance de pessoas não autorizadas.
- Derramamentos:** Em caso de derramamento, limpe imediatamente com materiais absorventes apropriados. Evite inalar os vapores e descarte os materiais de limpeza de acordo com os regulamentos locais.

Diclorometano (Clorometano):

- Toxicidade:** O diclorometano é uma substância altamente tóxica que pode causar irritação na pele, olhos e sistema respiratório. Evite o contato direto com a pele e olhos. Use equipamento de proteção adequado, incluindo luvas, óculos de proteção e, quando apropriado, máscara de proteção respiratória.
 - Ventilação:** Trabalhe com diclorometano apenas em áreas bem ventiladas ou em uma capela de exaustão. Evite a inalação de vapores tóxicos.
 - Armazenamento:** Armazene o diclorometano em recipientes apropriados e rotulados, longe de fontes de calor ou ignição. Mantenha-o trancado em um armário adequado e fora do alcance de pessoas não autorizadas.
 - Derramamentos:** Em caso de derramamento, limpe imediatamente com materiais absorventes adequados. Evite inalar os vapores e descarte os materiais de limpeza de acordo com as regulamentações locais.
 - Manipulação:** Evite o uso desnecessário de diclorometano e siga rigorosamente as boas práticas de laboratório ao manuseá-lo.
- É fundamental que todos os membros da equipe de laboratório estejam cientes dos riscos associados ao manuseio desses solventes e sigam estritamente os procedimentos de segurança. Além disso, é aconselhável ter um plano de ação para situações de emergência, como derramamentos acidentais, e que todos saibam como agir nessas circunstâncias.

Before start

Importante:

- Antes de iniciar o procedimento, **é imperativo que todo o protocolo seja minuciosamente lido e compreendido**. Além disso, **uma conversa com o responsável é essencial** para esclarecer quaisquer dúvidas antes da execução das etapas. Isso garantirá que o procedimento seja conduzido de maneira precisa e confiável.

Material e Equipamentos

- 1
- Microtubos com tampa de rosca de 2 mL (e.g. SSIbio) para FastPrep novos (nunca usados)
 - Microtubos do tipo Eppendorf (Eppendorf Quality, Eppendorf, Hamburg, Germany) de 2 mL novos (nunca usados)
 - Ponteiras P1000 (Eppendorf Quality, Eppendorf, Hamburg, Germany) novas (nunca usadas)
 - Esferas de Zirconia de 1 mm (e.g. BioSpec) novas (nunca usadas)
> Dica: usar um "gabarito" para medir uma quantidade única, em volume, de esferas para cada amostra



- Metanol grau HPLC (Tedia, Fairfield, OH, USA | Honeywell, Charlotte, NC, USA)*
- Diclorometano grau HPLC (Tedia, Fairfield, OH, USA | Honeywell, Charlotte, NC, USA)*
- Água ultrapura (e.g. Milli-Q)
*ou outro de qualidade comparável.
- FastPrep (FastPrep-24, MP Biomedicals LLC., Santa Ana, CA, USA) no *Plataforma de Expressão, Purificação e Análise de Biomoléculas (PEPAB) - Biofícia - UFRJ*
- Cuba de Ultrassom (Cristofoli, Brasil)
- Vortex (mod. 772, Fisatom)
- Centrífuga de Bancada Refrigerada (Hettich Modelo 320R, Tuttlingen, Alemanha)
- Pipeta automática P1000 (Eppendorf, Hamburg, Germany)
- SpeedVac (Christ modelo RVC 2-25, Osterode am Harz, Alemanha) no *LabMeta - Instituto de Química - UFRJ*



Coleta da Biomassa

- 2 **Após 28 dias, extraia ~80-90% de biomassa de cada frasco Erlenmeyer (quantidade determinada apenas visualmente)**
 - Permita que os espécimes cresçam até formar uma boa quantidade de biomassa, com um limite tentativo empírico de quatro meses por espécime.
 - > Será permitido que cada espécime se mantenha crescendo até que seja necessário interromper o cultivo por algum motivo (excesso de biomassa, morte celular etc).
 - > A princípio, será estabelecer um limite de quatro meses para cada espécime.
- 3
 1. Transfira o meio de cultivo de cada frasco Erlenmeyer com a biomassa para um tubo cônico de centrífuga de 50 mL do tipo Falcon, devidamente identificado com etiqueta (correspondente ao código de referência na lista de amostras)
 2. **Centrifugue:** 3011 xg (4500 rpm) a 4°C por 15 minutos
 3. Descarte o sobrenadante
 4. 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)
- 4
 5. Se possível, filtre e seque a biomassa obtida anteriormente.
 - Isso pode não ser viável em alguns casos.
- 5
 6. 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

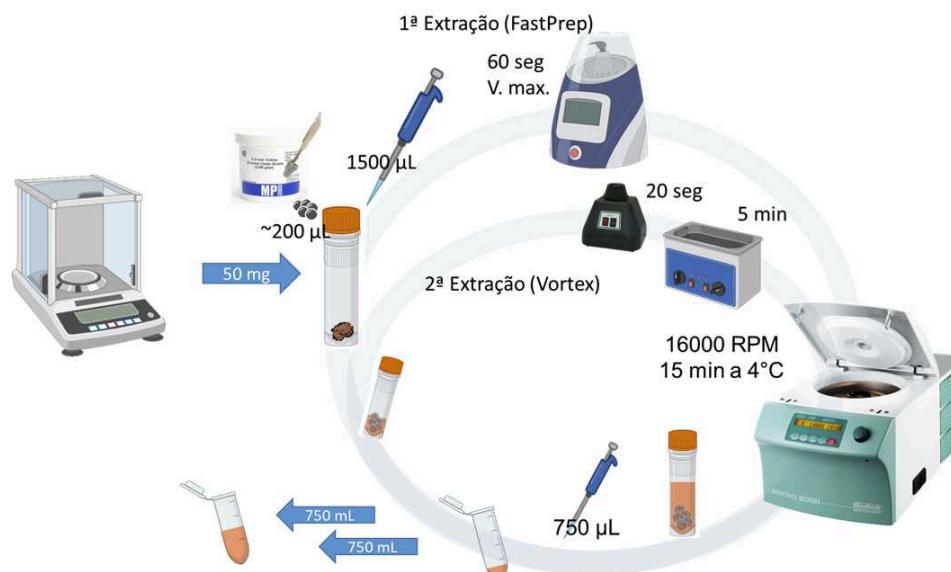
Prepare o material para a etapa de extração

- 6
 - Verifique os códigos nas etiquetas e na lista de amostras de biomassa seca.
 - Organize os microtubos para adição de biomassa seca (microtubos com tampa de rosca de 2 mL) e para estoque de extratos (microtubos do tipo Eppendorf de 2 mL - Eppendorf Quality).
 - Identifique todos com etiquetas apropriadas, de acordo com a tabela de amostras. Todos os materiais (microtubos Eppendorf, ponteiras Eppendorf, vials etc) devem ser novos. Nunca reutilize esses materiais para essa finalidade.

Extração da Biomassa - para obtenção de metabólitos de baixa a média-polaridade

- 7 7. Pese **50 mg da biomassa seca** e transfira para um microtubo de 2 mL com tampa de rosca.
 - Incluir as amostras **Branco de Extração**: frascos vazios adicionados a partir desta etapa, no início e final da sequência de amostras, e em intervalos de 10 amostras.
- 8 8. Adicione cerca de **200 µL de Esferas de Zircônia** a cada amostra de biomassa contida nos microtubos de 2 mL com tampa de rosca (use o gabarito para transferencia de esperas mencionado acima)
 - Trate sempre as amostras de Branco analítico como se fossem amostras reais.
- 9 9. Adicione **1,5 mL do solvente de extração** escolhido (neste caso: **diclorometano-metanol, na proporção 2:1, v/v**) a todos os microtubos de tampa de rosca
- 10 10. Homogeneize todas as amostras por **60 segundos na velocidade mais alta** (6 m/s) do homogeneizador FastPrep
- 11 11. **Centrifugue** todas as amostras a 24900 xg (16000 rpm) por 15 minutos a **4°C**
- 12 12. **Colete 750 µL** (0,750 mL) do sobrenadante de todas as amostras em novos microtubos do tipo Eppendrof de 2 mL (Eppendorf Quality), devidamente identificados com etiquetas
- 13 13. **REPETIR A EXTRAÇÃO:**
 13. Adicione **mais 750 µL (0,750 mL) do mesmo solvente de extração** escolhido (neste caso: diclorometano-metanol, 2:1, v/v) a todos os frascos

- 14 14. Homogeneize as amostras por 20 segundos em agitador do tipo Vortex, **seguido por banho de ultrassom por 5 minutos**
- 15 15. **Centrifugue** todas as amostras a 24900 xg (16000 rpm) por 15 minutos a **4°C**
- 16 16. **Colete 750 uL** (0,750 mL) do sobrenadante de todas as amostras nos mesmos microtubos do tipo Eppendorf de 2 mL (Eppendorf Quality) usados anteriormente

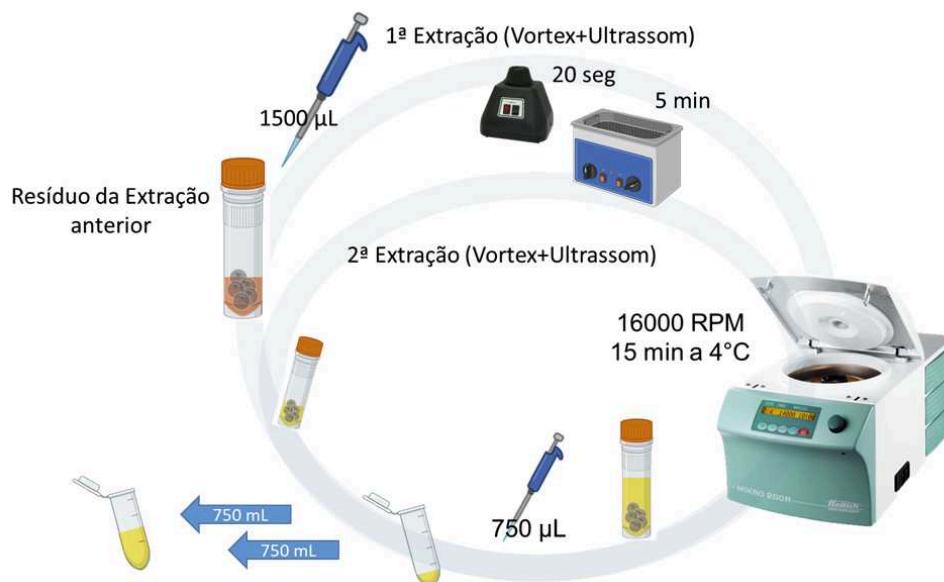


- 17 17. Evapore completamente todas as amostras utilizando o **SpeedVac até a secura**
 - Armazene todas as amostras em freezer (-80°C) até o momento da preparação para análise.

Extração da Biomassa - para obtenção de metabólitos de alta polaridade

- 18 18. Adicione **1,5 mL do solvente de extração** mais polar escolhido (neste caso: **metanol-água, na proporção 1:1, v/v**) a todos os microtubos de tampa de rosca contendo o resíduo de biomassa extraído previamente
- 19 19. Homogeneize as amostras por 20 segundos em agitador do tipo Vortex, **seguido por banho de ultrassom por 5 minutos**
- 20 20. **Centrifugue** todas as amostras a 24900 xg (16000 rpm) por 15 minutos a **4°C**

- 21 21. **Colete 750 μ L (0,750 mL)** do sobrenadante de todas as amostras em novos microtubos do tipo Eppendorf de 2 mL (Eppendorf), devidamente identificados com etiquetas
- 22 **REPETIR A EXTRAÇÃO:**
 22. Adicione **mais 750 μ L (0,750 mL) do mesmo solvente de extração mais polar** scolhido (neste caso: metanol-água, 1:1, v/v) a todos os frascos
- 23 23. Homogeneize as amostras por 20 segundos em agitador do tipo Vortex, **seguido por banho de ultrassom por 5 minutos**
- 24 24. **Centrifugue** todas as amostras a 24900 xg (16000 rpm) por 15 minutos a **4°C**
- 25 25. **Colete 750 μ L (0,750 mL)** do sobrenadante de todas as amostras nos mesmos microtubos do tipo Eppendorf de 2 mL (Eppendorf Quality) usados anteriormente

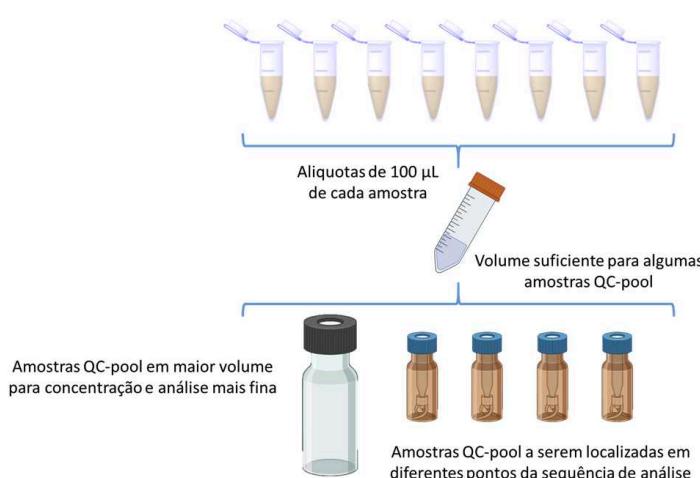


- 26 26. Evapore completamente todas as amostras utilizando o **SpeedVac até a secura**
 - Armazene todas as amostras em freezer (-80°C) até o momento da preparação para análise.

Amostras de Controle de Qualidade POOL (combinadas)

27 27. Após o preparo das amostras para análise (ressuspensão em solvente para injeção), prepare as **amostras de Controle de Qualidade Combinadas (QC-pool)** a partir da combinação de aproximadamente 10% do volume (50 µL) de cada amostra produzida em um frasco de 20 mL

- As aliquotas de 100 µL devem ser transferidas para 4 novos vials analíticos previamente identificados, formando um conjunto de amostras QC-pool.
- A quantidade sobressalente será armazenada para avaliação futura (p.ex.: análise de RMN 2D).



Resultados Esperados

28 ▪ Ao término do protocolo, é esperado obter extratos de **baixa a média polaridade** e **alta polaridade para cada amostra produzida**, além das amostras de Controle de Qualidade (Branco de Extração e QC-pool), permitindo uma análise abrangente e comparativa dos metabólitos sendo produzidos pelas diferentes cianobactérias, e com controle de qualidade inter-lotes.