

Aug 24, 2023

Version 1

Cyanobacteria growth V.1

DOI

dx.doi.org/10.17504/protocols.io.4r3l22o8xl1y/v1



Ricardo M. Borges¹, Gabriela de Assis Ferreira¹, Paulo liboshi Hargreaves¹

¹UFRJ

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.4r3l22o8xl1y/v1>

Protocol Citation: Ricardo M. Borges, Gabriela de Assis Ferreira, Paulo liboshi Hargreaves 2023. Cyanobacteria growth .
protocols.io <https://dx.doi.org/10.17504/protocols.io.4r3l22o8xl1y/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: July 20, 2023

Last Modified: August 24, 2023

Protocol Integer ID: 85319

Keywords: cyanobacteria in saltwater, cultivating cyanobacteria, growth rates of different cyanobacteria species, cyanobacteria growth, different cyanobacteria species, cianobactérias podem variar significativamente, em água salgada, saltwater

Abstract

Este documento apresenta o protocolo para cultivar cianobactérias em água salgada, incluindo informações detalhadas sobre as soluções, cálculos e volumes necessários para o processo. É importante observar que as taxas de crescimento de diferentes espécies de cianobactérias podem variar significativamente.

This document outlines the protocol for cultivating cyanobacteria in saltwater, including detailed information on the solutions, calculations, and volumes required for the process. It is essential to note that the growth rates of different cyanobacteria species may vary significantly.

Troubleshooting

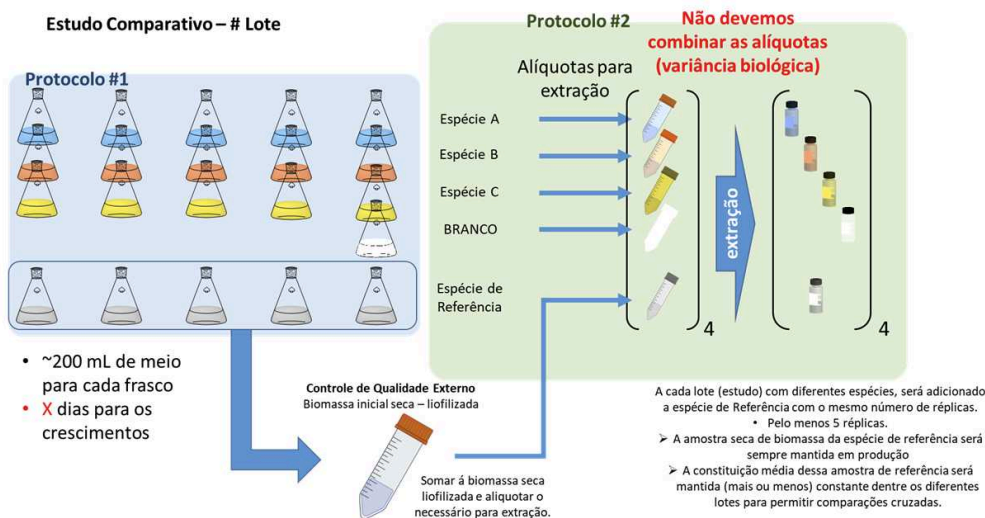
Preparo Anterior ao Cultivo

1 # frascos erlenmeyer de 500 ml

O número de frascos erlenmeyer vai variar de acordo com o número de amostras que serão produzidas:

- X amostras em quintuplicatas (x5) +
- Controle (**CCMR0280**) em quintuplicatas (x5) +
- Branco de meio (1 frasco erlenmeyer tratado da mesma forma com meio e adição de nutrientes, mas apenas sem a etapa de inoculação)

> **por exemplo:** Vamos comparar 3 espécies diferentes, então usaremos $(3 \times 5) + 5 + 1$ (=21) frascos



2 Iniciar a criação e preenchimento do arquivo **Metadata**:

- código das amostras;
- código das cepas;
- espécie;
- meios de cultivo;
- data de início;
- data de coleta da biomassa;
- método de extração 1;
- método de extração 2;
- comentários



Material

3 Preparo de soluções Estoque:

Solução estoque de NaNO_3 :

- Em um frasco previamente lavado (com extran 5% e rinsado a exaustão com água destilada), adicionar 7.5 g de NaNO_3 (MARCA e PartNumber) a 100 ml de água destilada
- Uso: 1 ml para cada 1 litro de meio.

4 Solução estoque de $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$:

- Em um frasco previamente lavado (com extran 5% e rinsado a exaustão com água destilada), adicionar 0.5 g de $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ a 100 ml de água destilada
- Uso: 1 ml para cada 1 litro de meio.

5 Solução de Metais-traço:

- Em um frasco previamente lavado (com extran 5% e rinsado a exaustão com água destilada), adicionar:

1. 23 mg de $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$
 2. 152 mg de $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$
 3. 7.3 mg de $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$
 4. 14 mg de $\text{CoSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$
 5. 6.8 mg de $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$
 6. 4.6 g de $\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$
 7. 4.4 g de $\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$
 8. E completar o volume com água destilada até 1 litro
- Uso: 1 ml para cada 1 litro de meio.

#	Component	Amount	Stock Solution Concentration	Final Concentration
1	$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$			
(Sigma Z 0251)	23 mg/L		0.08 μM	
2	$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$			
(Sigma M8179)	152 mg/L		0.9 μM	
3	$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$			
(J.T. Baker 3764)	7.3 mg/L		0.03 μM	
4	$\text{CoSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$			
(Baker 1696)	14 mg/L		0.05 μM	
5	$\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$			
(Fisher C-455)	6.8 mg/L		0.04 μM	
6	$\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$			
(Sigma F-1513)	4.6 g/L		11.7 μM	
7	$\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$			
(Sigma ED255)	4.4 g/L		11.7 μM	



6 Preparo da solução de vitaminas:

- Em um frasco previamente lavado (com extran 5% e rinsado a exaustão com água destilada), adicionar:
 1. 200 mg de Thiamina
 2. 10 ml (0.1 g) de Biotina
 3. 1 ml (1g/l) de Cyanocobalamine
 4. E completar o volume com água destilada até 1 litro
- Uso: 0.5 ml para cada 1 litro de meio (após autoclave)

Table 3: Vitamin Composition

Components	Stock Solution	Quantity	Molar Concentration in Final Medium
thiamine HCl			
(vitamin B1)			
---	200 mg	2.96 x10 ⁻⁷ M	
Biotin			
(Vitamin H)			
0.1 g/L dH2O	10 mL	2.05 x10 ⁻⁹ M	
Cyanocobalamin			
(Vitamin B12)			
1 g/L dH2O	1 mL	3.69 x10 ⁻¹⁰ M	

7 Preparo do meio de cultivo F/2:

- Para 1 litro de água destilada:
 1. 41,5 gramas de sal marinho para aquario (Reef Salt)
 2. 1 mL de solução de NaNO₃
 3. 1 mL de solução de NaH₂PO₄•H₂O
 4. 1 mL de solução de metais traço
 5. Autoclave: 15 minutos 1.5 ATM
 6. Espera esfriar
 7. Adiciona a solução de vitaminas antes do uso.

8 Preparo de solução de nutrientes:

- 20 ml
- 20 ml
- 1 ml de vitaminas

- 1 ml de metais
- filtra em 0.22 um

9 **Preparo das rolhas de algodão:**

- Material a ser utilizado: algodão hidrófobo, gaze, tesoura, barbante
1. Corte um pedaço de gaze do tamanho da palma da sua mão;
 2. Abra a gaze e insira parte dela dentro do frasco;
 3. Coloque, dentro da gaze que estão dentro da boca do frasco, o algodão hidrofóbico;
 4. Continue inserindo algodão até que, quando tirar a gaze com o algodão do frasco, seja feito um barulho semelhante a: "puf" (barulho ocasionado pelo vácuo causado pela rolha);
 5. Corte um pedaço de barbante;
 6. Amarre a gaze com o barbante (faça isso bem em cima do algodão colocado, ou seja, não deixe espaço);
 7. Corte o excesso de barbante e de gaze;
 8. Verifique se a rolha está um pouco acima da boca do vidro;
 9. Caso a resposta do item anterior seja negativa, suba um pouco ela;
 10. Autoclave: 15 minutos 1.5 ATM
 11. Seque na estufa o frasco tampado com as rolhas de algodão por entre 8-12 horas a 70°C;

Preparo Anterior ao Cultivo

- 10 Separar todos (#) os frascos erlenmeyer de 500 ml
 - Lavá-los com Extran 5%
 - Rinsa-los em excesso com água destilada

> Atenção ao número de cepas e réplicas a serem cultivadas
- 11 Preparar as rolhas com algodão para vedar o cultivo
- 12 Autoclavar os frascos previamente lavados com as rolhas de algodão
 - Depois secar em estufa (frasco com rolhas): 24 horas a 70oC
- 13 Autoclavar os frascos tipo Schott com 1 L do meio de cultivo F/2
 - por exemplo para 21 frascos: $21 \times 200 \text{ ml} = 4.2 \text{ litros}$ (5 litros)
 - Fazer em frasco becher de 5 litros
 - Dividir em frascos Schott de 1 litro
 - Autoclave: 15 minutos 1.5 ATM
- 14 Após o meio resfriar, adicionar 0,5 mL de solução de vitaminas (previamente filtrada em filtro de seringa: 0.22 um)

- não vale o filtro de seringa 0.45 um
- 15 Identificar cada frasco erlenmeyer com etiquetas contendo código (rastreável a lista de amostras do projeto) e data de produção
- as datas de produção de cada espécime, de adição da solução de nutrientes, de coletas das biomassas, etc deverão ser documentadas na lista de amostras do projeto.

Inoculação

- 16 Com o auxílio de alças estéreis coletar a biomassa de um cultivo já preparado.
- Quantidade: "tufo" do tamanho de uma moeda de 50 centavos
 - Importante: Tudo deve ser feito utilizando luvas descartáveis e evitando o fluxo de ar
 - Vedar bem os frascos erlenmeyer com as rolhas de algodão previamente preparadas

Manutenção do cultivo

- 17 Para manter as cianos em fase log deve-se alimentá-las com frequência adicionando a solução de nutrientes preparada previamente (item #).
- Para cada cultivo o recomendado é de 200 µL da solução de nutrientes
 - É possível observar que as cianos precisam de nutrientes pela cor verde delas

Rotina de adição da solução de nutrientes:

- A cada semana
- Anotar na folha de controle de adição da solução de nutrientes

Coleta da biomassa e tratamento

- 18 O tempo de cultivo será estabelecido como sendo:
- 4 semanas ou 28 dias
 - Com adição da solução de nutrientes a cada 7 dias
- 19 Ao final dos 28 dias, de cada frasco erlenmeyer, será retirada uma quantidade visualmente equivalente a 80-90% da biomassa.
- Vamos permitir que cada espécime se mantenha crescendo até que seja necessário interromper
 - a princípio, podemos estabelecer um limite de 4 meses para cada espécime
- 20 **Procedimento para retirada do meio:**



- Centrifugação:

- Filtração:

21 Liofilizar cada amostra devidamente identificada em separado

- Adicionar detalhes e comentários ao Metadata