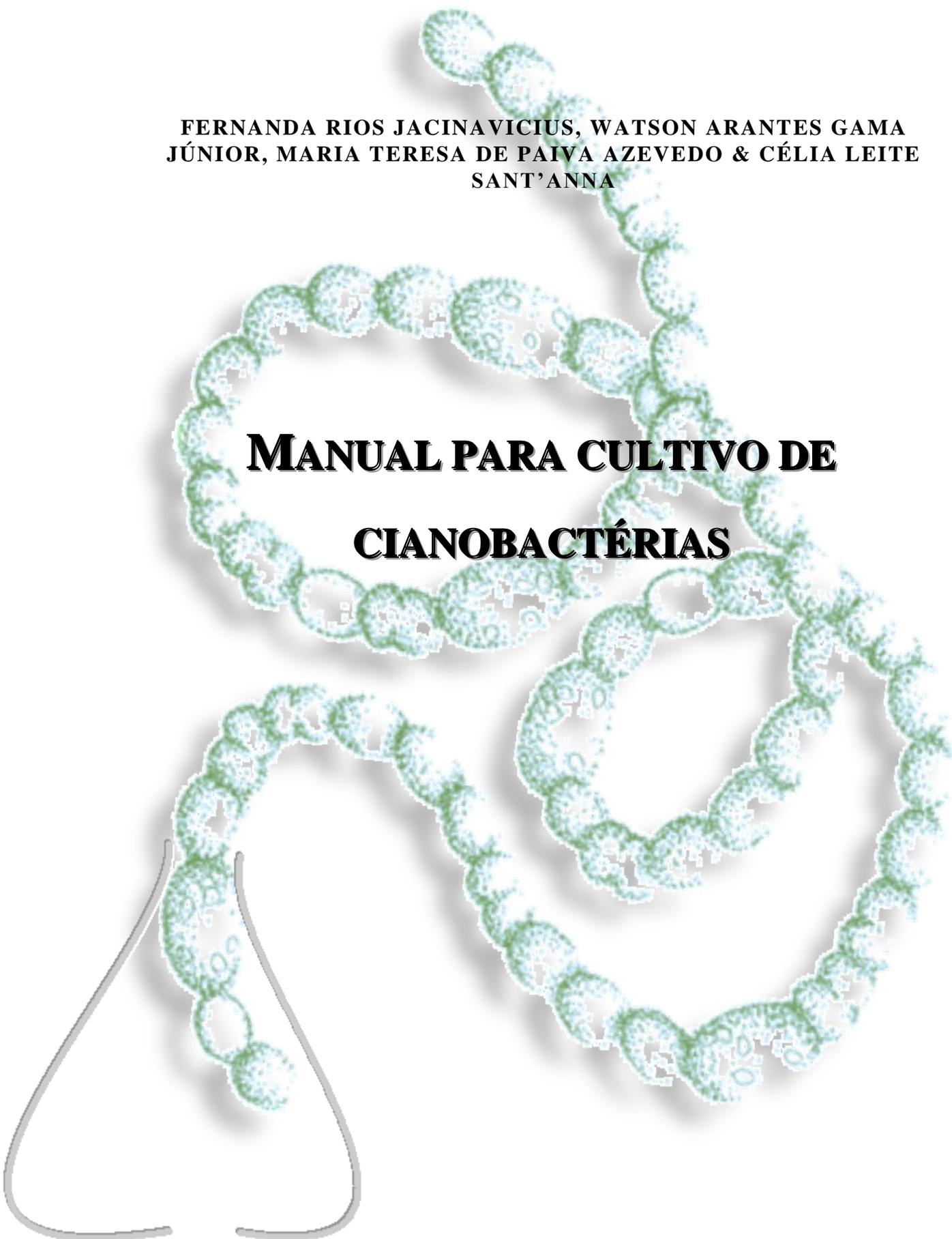


*Secretaria do Meio Ambiente do Estado de São Paulo  
Instituto de Botânica - Núcleo de Pesquisa em Ficologia*

**FERNANDA RIOS JACINAVICIUS, WATSON ARANTES GAMA  
JÚNIOR, MARIA TERESA DE PAIVA AZEVEDO & CÉLIA LEITE  
SANT'ANNA**

# **MANUAL PARA CULTIVO DE CIANOBACTÉRIAS**



# **CONTEÚDO**

---

---

<b>INTRODUÇÃO</b>	<b>1</b>
COLEÇÃO DE CULTURA DO INSTITUTO DE BOTÂNICA (CCIBT)	2
<b>INFRAESTRUTURA E EQUIPAMENTOS</b>	<b>3</b>
PLANEJAMENTO DO LABORATÓRIO	3
<b>EQUIPAMENTOS</b>	<b>4</b>
PARA ESTERILIZAÇÃO	4
PARA PREPARO E CONSERVAÇÃO DOS MEIOS DE CULTIVO	5
PARA TRANSFERÊNCIA E INOCULAÇÃO DAS CIANOBACTÉRIAS	5
PARA CULTIVO E MANUTENÇÃO DAS CEPAS	5
<b>MÉTODOS PARA LAVAGEM E ESTERILIZAÇÃO</b>	<b>6</b>
LAVAGEM DE VIDRARIA	6
ESTERILIZAÇÃO DE VIDRARIA	7
ESTERILIZAÇÃO DOS UTENSÍLIOS E EQUIPAMENTOS UTILIZADOS NO ISOLAMENTO	7
<b>MEIOS DE CULTURA</b>	<b>8</b>
PREPARO DOS MEIOS DE CULTURA	8
PREPARO DAS SOLUÇÕES - ESTOQUE PARA O MEIO DE CULTURA <b>BG-11</b>	9
PROCEDIMENTO <b>BG-11</b> CONCENTRADO	10
PROCEDIMENTO <b>BG-11</b> PARA USO IMEDIATO	10
PREPARO DAS SOLUÇÕES - ESTOQUE PARA O MEIO DE CULTURA <b>ASM-1</b>	11
PROCEDIMENTO <b>ASM-1</b> CONCENTRADO	12
PROCEDIMENTO <b>ASM-1</b> PARA USO IMEDIATO	12
PROCEDIMENTO <b>MEIO</b> SÓLIDO	13
PROCEDIMENTO <b>MEIO</b> LÍQUIDO E SÓLIDO COM CICLOHEXIMIDA	13
<b>DISTRIBUIÇÃO DOS MEIOS DE CULTURA</b>	<b>14</b>
<b>DESCARTE DO MATERIAL CULTIVADO</b>	<b>15</b>
<b>CULTIVO E ISOLAMENTO</b>	<b>15</b>
PROCEDIMENTO PARA O ISOLAMENTO DAS CEPAS	15
PLAQUEAMENTO	16
PÊSCARIA	17

<b><u>MANUTENÇÃO DAS CEPAS</u></b>	<b><u>18</u></b>
<b><u>PROTOCOLO PARA LAVAGEM DE CÉLULAS DE CIANOBACTÉRIAS COM EXTRAN® 0,1%</u></b>	<b><u>19</u></b>
<b><u>TIPOS DE CULTURA</u></b>	<b><u>21</u></b>
<b><u>PRODUÇÃO DE BIOMASSA</u></b>	<b><u>21</u></b>
<b><u>ESQUEMA PARA OBTENÇÃO DE UMA CULTURA UNIESPECÍFICA</u></b>	<b><u>23</u></b>
<b><u>DETERMINAÇÃO DAS CURVAS DE CRESCIMENTO</u></b>	<b><u>24</u></b>
DENSIDADE (CÉLULAS. ML <sup>-1</sup> )	24
BIOMASSA (BIOVOLUME – MM <sup>3</sup> L <sup>-1</sup> )	25
<b><u>DETERMINAÇÃO DAS TAXAS DE CRESCIMENTO, TEMPO DE DUPLICAÇÃO E RENDIMENTO CELULAR MÁXIMO</u></b>	<b><u>26</u></b>
<b><u>HIGIENIZAÇÃO E BIOSSEGURANÇA</u></b>	<b><u>26</u></b>
<b><u>REFERÊNCIAS</u></b>	<b><u>27</u></b>

FIGURA 1: ESQUEMA DA TÉCNICA DE PLAQUEAMENTO.....	17
FIGURA 2: ESQUEMA DA TÉCNICA DE PESCARIA .....	18
FIGURA 3: ESQUEMA DO PROCESSO DE REPICAGEM.....	19
FIGURA 4: LINHAGEM ANTES E DEPOIS DA LAVAGEM COM EXTRAN <sup>®</sup> 0,1%.....	20
FIGURA 5: CULTURA BATCH .....	21
FIGURA 6: OBTENÇÃO DE BIOMASSA .....	23
FIGURA 7: RESUMO DO ORGANOGRAMA.....	23
FIGURA 8: CÂMARA DE FUCHS-ROSENTHAL UTILIZADA PARA CONTAGEM DE CÉLULAS OU FILAMENTOS E EM DESTAQUE UM DOS CAMPOS DA CÂMARA.....	25
TABELA 9: FATORES DE CONVERSÃO PARA DETERMINAÇÃO DO Nº DE CÉLULAS. ML <sup>-1</sup> .....	25

---

---

TABELA 1. COMPOSIÇÃO E QUANTIDADE DAS SOLUÇÕES ESTOQUES .....	9
TABELA 2. COMPOSIÇÃO DOS METAIS TRAÇOS ( * ) .....	9
TABELA 3. QUANTIDADES UTILIZADAS PARA O PREPARO DO MEIO PARA USO IMEDIATO .....	11
TABELA 4. COMPOSIÇÃO E QUANTIDADE DAS SOLUÇÕES ESTOQUES .....	11
TABELA 5. QUANTIDADES UTILIZADAS PARA O PREPARO DO MEIO PARA USO IMEDIATO .....	12

## INTRODUÇÃO

---

As cianobactérias são organismos procariontes capazes de realizar fotossíntese oxigênica por possuírem clorofila *a* e fotossistema II (Reviere 2006). Atualmente, a taxonomia destes organismos fundamenta-se na chamada abordagem polifásica, isto é, a identificação taxonômica de acordo com características de múltiplas áreas de pesquisa, tais como morfologia, ecologia, fisiologia, ultraestrutura e biologia molecular (Komárek 2005).

Além de produtores primários, as cianobactérias também têm grande importância para o meio ambiente e para a saúde pública, dado que algumas são capazes de formar florações e produzir toxinas (Sant'Anna et al. 2008), além de geosmina e MIB (2-metil isoborneol) que causam forte odor na água (Tanaka et al. 1996). Adicionalmente, muitas espécies têm demonstrado capacidade de produzir grande diversidade de substâncias com propriedades bioativas (Gault & Marler 2009). Contudo, nem a taxonomia polifásica e tampouco a investigação de toxinas, compostos causadores de odor e bioativos seriam possíveis sem o cultivo das cianobactérias.

Inicialmente, as pesquisas envolvendo estudos em cultura eram voltadas principalmente para investigações taxonômicas e ecofisiológicas. Contudo, com o avanço da interdisciplinaridade, estudos de biotecnologia revelaram um potencial até então desconhecido das cianobactérias. Mais recentemente, o conhecimento sobre proteômica e genômica ampliou muito o entendimento sobre a evolução destes organismos, sendo isso possível graças ao cultivo desses procariontes.

No Brasil, o primeiro manual sobre cultivo de microalgas foi desenvolvido por Vieira (1977), sendo uma adaptação de várias técnicas amplamente utilizadas em outros países e voltadas para o cultivo do fitoplâncton marinho. Desde então, outros trabalhos descrevendo técnicas para cultivos de microalgas foram desenvolvidos no Brasil (Vieira & Tundisi 1979, Lourenço 2006), todos tratando do cultivo de microalgas aquáticas em geral, tanto marinhas como de água doce. Na literatura brasileira não há um compilado específico de técnicas de cultivo voltado apenas para cianobactérias, sendo estas informações encontradas dispersas em dissertações/teses e artigos científicos.

Conforme Lourenço (2006), os bancos de cultura de cianobactéria existentes no Brasil são os seguintes:

- Coleção de Cultura do Instituto de Botânica (CCIBt) – Instituto de Botânica de São Paulo (IBt)
- Laboratório de Ecofisiologia e Toxicologia de Cianobactérias (LETC) - Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho (UFRJ)
- Brazilian Cyanobacteria Collection (BCCUSP) – Universidade de São Paulo (USP)
- Laboratório de Ciências Ambientais – Universidade Estadual do Norte Fluminense (UENF)
- Coleção de Culturas de Microalgas de Água Doce – Universidade Federal de São Carlos (UFSCar)
- Coleção de Culturas do Laboratório de Ecologia Molecular de Cianobactérias (CENA) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura (CENA)
- Coleção de Cultura de Cianoprocaríotos (CCC) – Universidade Estadual de São Paulo (UNESP- São José do Rio Preto)
- Unidade de Pesquisas em Cianobactérias (UPC) – Fundação Universidade Federal do Rio Grande (FURG)

Visando à disseminação das técnicas de cultura, este manual tem como objetivo descrever métodos para o estabelecimento e manutenção de laboratórios para o cultivo de cianobactérias.

### **COLEÇÃO DE CULTURA DO INSTITUTO DE BOTÂNICA (CCIBT)**

A Coleção de Cultura do Instituto de Botânica (CCIBt) possui culturas de três grupos distintos de organismos: fungos, cianobactérias e macroalgas marinhas. As culturas de cada grupo são coordenadas separadamente: Dra. Célia Leite Sant'Anna, responsável pelas culturas de cianobactérias, Dra. Nair Sumie Yokoya, responsável pelas culturas de macroalgas marinhas e Dra. Marina Capelari/Dra. Carmen L.A.P. Zotarelli/Msc. Marcela Castilho Boro responsáveis pelas culturas de fungos. O laboratório no qual é mantido o cultivo de cianobactérias e macroalgas marinhas é denominado “Marilza Cordeiro Marino” em homenagem à pesquisadora que iniciou a estruturação do laboratório e os estudos em cultura de algas marinhas no Instituto de Botânica.

O cultivo de cianobactérias no Instituto de Botânica iniciou-se em 1986 com as Dras. Maria Teresa P. Azevedo e Célia L. Sant'Anna, sendo utilizado como ferramenta complementar para a taxonomia (Yokoya & Azevedo 2002). As primeiras cepas depositadas na coleção foram isoladas de diversos corpos d'água do estado de São Paulo, sendo a maioria de espécies planctônicas. Recentemente, além dos ambientes aquáticos, várias cepas têm sido isoladas de ambientes terrestres, principalmente da Mata Atlântica e Pantanal, além de algumas cepas do cerrado.

Hoje, a CCIBt possui 479 linhagens de cianobactérias isoladas de diferentes ecossistemas brasileiros, incluindo ambientes aquáticos e terrestres. Com a consolidação do laboratório e ampliação das linhas de pesquisa, estas linhagens vêm sendo utilizadas em estudos ecofisiológicos, toxicológicos e de bioprospecção, além de serem ferramentas em estudos de taxonomia e biologia molecular.

## **INFRAESTRUTURA E EQUIPAMENTOS**

---

### **PLANEJAMENTO DO LABORATÓRIO**

---

Para o cultivo apropriado de cianobactérias, o ideal é contar com quatro salas distintas:

- **Sala para preparo dos meios:** deve contar com bancadas, pia e armários para armazenar, separadamente, vidrarias e reagentes. Equipamentos como potenciômetro, agitador magnético e balança analítica também devem estar presentes nesta sala. Ressalta-se que a balança analítica deve ficar numa bancada anti-vibratória separada daquelas utilizadas para preparo dos meios e soluções.
- **Sala para repicagem e isolamento:** esta sala deve conter apenas a câmara de fluxo laminar, uma bancada de suporte, microscópio e ar condicionado.
- **Sala para manutenção das culturas:** local onde serão mantidas as cepas. Esta sala deve ter acesso restrito e condições controladas (temperatura, fotoperíodo e luminosidade).

- Alternativa

A sala de cultivo pode ser substituída por câmaras de cultivo. É uma opção quando há falta de espaço disponível ou quando é preciso manter cepas em diferentes condições.

- **Sala de lavagem:** nesta sala ficam a pia principal para lavagem da vidraria, a estufa para secagem de vidraria, além de outros itens de laboratório. Dentre os principais equipamentos dispostos nesta sala têm-se a autoclave e o destilador de água, que ficam em área próxima à janela e existe ventilador de teto para circular o ar. Atenção: é importante separar todos estes equipamentos dos demais devido à elevada umidade e calor gerados por eles, o que pode levar a oxidação de outros equipamentos e problemas com fungos nas outras salas. A osmose reversa é uma ótima alternativa ao destilador de água convencional, sendo um equipamento que produz água de melhor qualidade e diminui bastante o desperdício.

## **EQUIPAMENTOS**

---

### **PARA ESTERILIZAÇÃO**

---

- Autoclave – esterilização de vidraria, meios de cultura e descarte das cepas.
- Câmara de fluxo laminar, equipada com:
  - Bico de Bunsen – esterilização de materiais utilizados no momento da transferência e inoculação das cianobactérias.
  - Lâmpada germicida (UV) – esterilização do fluxo laminar e da sala de repicagem e isolamento.
- Estufas para esterilização e secagem.
- Estojos para autoclavagem de pipetas e tubos.

## **PARA PREPARO E CONSERVAÇÃO DOS MEIOS DE CULTIVO**

---

- Vidraria
  - ✓ Erlenmeyer: 50 mL, 100 mL, 200 mL, 500 mL, 1L, 2L e 4L;
  - ✓ Proveta: 50 mL, 100 mL, 500 mL, 1L e 2L;
  - ✓ Pipeta graduada: 5 mL, 10 mL e 20 mL;
  - ✓ Balão Volumétrico: 1L e 2L;
  - ✓ Becker: 100 mL, 200 mL, 500 mL, 1L.
- Agitador magnético
- Potenciômetro
- Balança analítica
- Frascos plásticos: 100 mL, 500 mL, 1L e 2L
- Freezers
- Refrigeradores
- Pêra de sucção

## **PARA TRANSFERÊNCIA E INOCULAÇÃO DAS CIANOBACTÉRIAS**

---

- Alças de níquel cromo
- Agulhas de inoculação
- Pipetas Pasteur de vidro
- Alça de Drigalski
- Bulbo de borracha para pipetas Pasteur

## **PARA CULTIVO E MANUTENÇÃO DAS CEPAS**

---

- Sala de cultivo e/ou câmara de cultivo
- Tubos de ensaio
- Placas de Petri
- *Parafilm*
- Rolhas de gaze e algodão hidrófobo ou rolha plástica
- Grades para tubos de ensaio

- Prateleiras com lâmpadas luz do dia para manutenção de cepas e crescimento de cianobactérias.

Para obtenção de biomassa:

- Erlenmeyer de 6L e 9L
- Rolhas para Erlenmeyer com saída de ar
- Compressor de ar/ Bomba de aquário
- Mangueiras para condução de ar
- Filtro de ar
- Agitador

## **MÉTODOS PARA LAVAGEM E ESTERILIZAÇÃO**

### **LAVAGEM DE VIDRARIA**

A lavagem da vidraria, seja ela nova ou já de uso rotineiro do laboratório, deve obedecer à seguinte sequência:

- Imersão em solução de cloro ativo com concentração entre 2 e 2,5% por 12 horas para desinfecção;
- Lavagem manual com sabão não residual (Extran<sup>®</sup> ou similar) para remover os resquícios mais grosseiros como material orgânico ou ágar aderido no interior na vidraria;
- Enxágue em água corrente até que todo sabão seja retirado;
- Enxágue em água destilada, no mínimo três vezes, para remoção de possíveis sais deixados pelo sabão ou pela água da torneira;
- Secagem em estufa a temperatura aproximada de 60°C;
- Embalagem da vidraria com filme PVC transparente;
- Estocagem das vidrarias devidamente embaladas em armários fechados.

## **ESTERILIZAÇÃO DE VIDRARIA**

---

A vidraria previamente lavada deve ser esterilizada pouco antes do uso, a fim de se evitar contaminação. O processo de esterilização deve seguir os seguintes passos:

- Vedação apropriada da vidraria
  - ✓ No caso de tubos de ensaio e Erlenmeyers a vedação pode ser feita com rolhas de gaze e algodão ou com rolhas plásticas autoclaváveis;
  - ✓ As placas de Petri devem ser envoltas em papel sulfite ou pardo e colocadas em sacos plásticos autoclaváveis;
- Autoclavagem por 30 minutos a 125°C e pressão de 1,5 atm;
- Secagem em estufa a temperatura de 60°C
  - ✓ Neste ponto é importante averiguar se as rolhas de gaze e algodão e os papéis envoltos nas placas estão devidamente secos, para evitar que futuramente sejam colonizados por fungos.

Ressalta-se que toda vidraria autoclavada só deve ser aberta no momento do uso e dentro da câmara de fluxo laminar.

## **ESTERILIZAÇÃO DOS UTENSÍLIOS E EQUIPAMENTOS UTILIZADOS NO ISOLAMENTO**

---

Os utensílios não autoclaváveis e equipamentos utilizados no isolamento devem ser esterilizados com lâmpada germicida (UV) dentro da câmara de fluxo laminar durante, no mínimo, 30 minutos imediatamente antes do uso. Além disso, os materiais utilizados devem ser limpos com solução de etanol 70% e aqueles resistentes ao fogo (pinças e alças) devem ser flambados em bico de Bunsen imediatamente antes do uso por cerca de 60 segundos.

A lâmpada germicida acoplada à câmara de fluxo laminar também funciona como esterilizador do ar da sala de repicagem. Por este motivo, durante o uso da câmara é fundamental que o fluxo de ar entre a sala de repicagem e o ambiente externo seja o menor possível.

## **MEIOS DE CULTURA**

---

Os meios de cultura são utilizados com a finalidade de isolar e cultivar as cianobactérias em laboratório, geralmente em culturas uniespecíficas. Um meio de cultura pode ser classificado quanto à consistência como sólido ou líquido. O meio sólido contém agentes solidificantes (ágar) e é utilizado para o isolamento. O meio líquido é utilizado para a manutenção das cepas e produção de biomassa para análises diversas. Em relação aos estudos taxonômicos, deve-se atentar para o meio utilizado no cultivo, pois a cepa pode apresentar morfometria distinta segundo a consistência ou/e composição do meio.

Alguns dos meios comumente utilizados para cultivo de cianobactérias são:

Meio BG-11      líquido; sólido (com ou sem cicloheximida)

Meio ASM-1      líquido; sólido (com ou sem cicloheximida)

A utilização de diferentes meios de cultura em diferentes condições é motivada pelas distintas concentrações e tipos de nutrientes, o que propiciam as condições nutricionais adequadas específicas para alguns grupos de cianobactérias. A cicloheximida é um antibiótico usado para eliminar organismos eucariontes, facilitando o isolamento de cianobactérias.

## **PREPARO DOS MEIOS DE CULTURA**

---

Os meios são preparados em três etapas:

1. São preparadas as soluções que compõem o meio com concentração 100:1 que são suficientes para um período aproximado de 12 meses e são armazenadas em frascos plásticos e levadas para o freezer, onde permanecem congeladas até o momento de uso (chamadas soluções-estoque - tabelas 1 e 2);
2. A partir das soluções estoque é preparado o meio concentrado que renderá 20 L de meio para uso imediato;
3. A última etapa, é o preparo do meio para uso imediato, onde o meio concentrado é descongelado e em seguida é diluído em água deionizada (tabela 3).

**PREPARO DAS SOLUÇÕES - ESTOQUE PARA O MEIO DE  
CULTURA BG-11**

(RIPPKA, R. 1979)

Tabela 1. Composição e quantidade das soluções estoques

NUTRIENTES - Soluções Estoque	Quantidade (g)
EDTA (C <sub>10</sub> H <sub>16</sub> N <sub>2</sub> O <sub>8</sub> )	0,1000
Citrato férrico amoniacal (C <sub>6</sub> H <sub>8</sub> O <sub>7</sub> x Fe <sup>3+</sup> + yNH <sub>3</sub> )	0,6000
Solução de metais traços *	(*)
Nitrato de Sódio (NaNO <sub>3</sub> )	150,0000
Fosfato ácido dipotássio trihidratado (K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> + 3H <sub>2</sub> O)	4,0000
Sulfato de magnésio heptahidratado (MgSO <sub>4</sub> + 7H <sub>2</sub> O)	7,5000
Cloreto de cálcio dihidratado (CaCl <sub>2</sub> + 2H <sub>2</sub> O)	3,6000
Carbonato de sódio (Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> )	2,0000
Ácido cítrico (C <sub>6</sub> H <sub>8</sub> O <sub>7</sub> + H <sub>2</sub> O)	0,6000

Tabela 2. Composição dos metais traços (\*)

Soluções Estoque	Quantidade (g)
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	2,8600
MnCl <sub>2</sub> + 4H <sub>2</sub> O	1,8100
ZnSO <sub>4</sub> + 7H <sub>2</sub> O	0,2220
NaMoO <sub>4</sub>	0,3900
CuSO <sub>4</sub> + 5H <sub>2</sub> O	0,0790
Co(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> + 6H <sub>2</sub> O	0,0494

Estes compostos são diluídos em 1.000 mL de água deionizada e as soluções formadas são armazenadas no freezer em frascos plásticos.

## PROCEDIMENTO BG-11 CONCENTRADO

---

Para render 20 L de meio de cultura:

200 mL da solução de EDTA;

200 mL da solução de citrato férrico amoniacal;

20 mL da solução de metais traços;

200 mL da solução de  $\text{NaNO}_3$ ;

200 mL da solução de  $\text{K}_2\text{HPO}_4 + 3\text{H}_2\text{O}$ ;

200 mL da solução de  $\text{MgSO}_4 + 7\text{H}_2\text{O}$ ;

200 mL da solução de  $\text{CaCl}_2 + 2\text{H}_2\text{O}$ ;

200 mL da solução de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ;

200 mL da solução de Ácido Cítrico.

Adicionar todas as soluções acima e nesta sequência, especialmente os dois primeiros porque do contrário o ferro precipita, em um Erlenmeyer com volume suficiente para a agitação do meio (utilizar agitador magnético). Feito isto, é preciso ajustar o pH da solução que deve ser 7,4, adicionando HCl (ácido clorídrico) 1M para acidificar o meio e NaOH (hidróxido de sódio) 1M para elevar o pH. Seguidas todas as etapas, o meio de cultura concentrado é guardado no freezer até ser diluído para uso.

## PROCEDIMENTO BG-11 PARA USO IMEDIATO

---

Descongelar o meio BG-11 concentrado e acrescentar água deionizada dependendo da quantidade a ser utilizada. É importante lembrar que a água deionizada não pode ser estocada, pois perde sua validade de ser isenta de sais. Portanto deve-se recolher a água apenas no momento de uso. Adicionada à água e completando o volume de meio, agita-se bem para homogeneizar.

Tabela 3. Quantidades utilizadas para o preparo do meio para uso imediato

Água Deionizada (mL)	Meio Concentrado (mL)
50	4,05
100	8,1
200	16,2
500	40,5
1.000	81
5.000	405

**PREPARO DAS SOLUÇÕES - ESTOQUE PARA O MEIO DE CULTURA ASM-1**

**Modificado de Gorham et al. (1964) e Zagatto & Aragão (1992).**

Tabela 4. Composição e quantidade das soluções estoques

Soluções Estoque	Nutrientes	Quantidade (g)
Sol. A	NaNO <sub>3</sub>	8,5000
	MgSO <sub>4</sub> + 7H <sub>2</sub> O	2,4500
	MgCl <sub>2</sub> + 6H <sub>2</sub> O	2,0500
	CaCl <sub>2</sub> + 2H <sub>2</sub> O	1,4500
Sol. B	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	8,7000
	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> + 12H <sub>2</sub> O	17,8000
Sol. C	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	28,4000
	MnCl <sub>2</sub> + 4H <sub>2</sub> O	13,9000
	FeCl <sub>2</sub> + 6H <sub>2</sub> O	10,8000
	ZnCl <sub>2</sub>	3,3500
	CoCl <sub>2</sub> + 6H <sub>2</sub> O	0,1900
	CuCl <sub>2</sub> + 2H <sub>2</sub> O	0,0140
Sol. D	EDTA titriplex	18,6000

Para cada solução (A, B, C e D) os compostos são diluídos em 1.000 mL de água deionizada e armazenados no freezer em frascos plásticos.

### **PROCEDIMENTO ASM-1 CONCENTRADO**

---

Para render 20 L de meio são necessários:

400 mL de solução - estoque A;

40 mL de solução - estoque B;

2 mL de solução - estoque C;

8 mL de solução - estoque D;

Adicionar todas as soluções acima e nesta sequência em um Erlenmeyer com volume suficiente para a agitação do meio (utilizar agitador magnético). Feito isto, é preciso ajustar o pH da solução que deve ser 7,4, adicionando HCl (ácido clorídrico) 1M para acidificar o meio e NaOH (hidróxido de sódio) 1M para elevar o pH. Seguidas todas as etapas, o meio de cultura concentrado é guardado no freezer até ser diluído para uso.

### **PROCEDIMENTO ASM-1 PARA USO IMEDIATO**

---

O modo de preparo para os meios ASM-1 (líquido/sólido/cicloheximida) é idêntico ao procedimento anteriormente descrito para o meio BG-11. O que modifica são apenas as concentrações dos nutrientes (Tabela 5).

Tabela 5. Quantidades utilizadas para o preparo do meio para uso imediato

<b>Água Deionizada (mL)</b>	<b>Meio Concentrado (mL)</b>
50	1,125
100	2,250
200	4,500
500	11,25
1.000	22,50
5.000	112,50

## PROCEDIMENTO MEIO SÓLIDO

---

Para o preparo do meio sólido, deve-se pesar 10g de ágar para cada 1.000 mL de meio de cultura.

Para dissolver a mistura, são utilizados dois métodos: autoclavagem ou banho-maria, dependendo do recipiente a ser utilizado.

## PROCEDIMENTO MEIO LÍQUIDO E SÓLIDO COM CICLOHEXIMIDA

---

### Meio líquido

A quantidade de cicloheximida indicada no método é de 50 mg/L.

Para preparar o meio líquido, deve-se dissolver o meio concentrado normalmente, autoclavar e deixar que esfrie até aproximadamente 50°C. Isso é importante, pois a cicloheximida perde atividade acima desta temperatura. Em seguida, o antibiótico deve ser adicionado ao meio dentro da câmara de fluxo laminar, a fim de evitar contaminação.

Quantidade de meio diluído (mL)	Quantidade de Cicloheximida (g)
1.000	0,05
500	0,025
300	0,015
100	0,005

### Meio sólido

Para preparar 1.000 mL de meio, utilizamos 1 Erlenmeyer de 2.000 mL e outro de 1.000 mL. (A quantidade de cicloheximida indicada no método é de 50 mg/L e o Ágar é de 10 g/L.)

Pesar a cicloheximida e o Ágar, reservar;

Medir meio concentrado (81 mL de meio BG-11 ou 22,50 mL de meio ASM-1) e diluir em 500 mL de água deionizada, reservar;

Reservar também 500 mL de água deionizada;

No Erlenmeyer de 2.000 mL, colocar o ágar (10g) e a água deionizada (500 mL);

No Erlenmeyer de 1.000 mL, colocar o meio concentrado diluído em 500 mL de água;

Levar ambos os Erlenmeyers para a autoclave durante 30 minutos, a 125°C e 1,5 atm. Após este período, resfriar o Erlenmeyer que contém o meio até aproximadamente 50°C para que a cicloheximida possa ser dissolvida sem perder suas propriedades;

Em seguida, levar os dois Erlenmeyers para o fluxo laminar e adicionar a cicloheximida naquele com meio e agitar até dissolver totalmente. Posteriormente, transferir o meio com cicloheximida para o Erlenmeyer que contém o ágar, homogeneizar levemente e então distribuir em placas de Petri previamente esterilizadas.

## **DISTRIBUIÇÃO DOS MEIOS DE CULTURA**

Os meios líquidos são distribuídos em tubos de ensaio, num volume de 17 mL para cada tubo; em seguida são tampados com rolhas de algodão com gaze e então autoclavados durante 30 minutos.

Depois de retirados da autoclave e atingirem temperatura ambiente estão prontos para uso ou então são guardados na geladeira em temperatura de 8°C.

Os meios sólidos são distribuídos em dois recipientes diferentes: tubos de ensaio e/ou placas de Petri.

- Tubos de ensaio: o meio preparado é colocado em banho-maria até dissolver, feito isso o meio deve ser rapidamente distribuído nos tubos antes do seu resfriamento, o que dificultaria a distribuição uniforme. Após distribuição, os tubos são tampados e autoclavados. Quando saírem da autoclave, deverão ser resfriados inclinados a fim de aumentar a superfície para o crescimento das cianobactérias, facilitando a visualização do crescimento sem ter necessidade de abrir o tubo.
- Placas de Petri: o meio preparado é autoclavado antes da distribuição e só deve ser colocado nas placas dentro da câmara de fluxo laminar.

Ainda dentro da câmara de fluxo laminar, as placas permanecem semi-abertas até que o meio chegue à temperatura ambiente e solidifique e não forme condensação na tampa. Em seguida são fechadas, embrulhadas em papel e guardadas em geladeira com a tampa para baixo, evitando assim que o meio fique úmido.

## **DESCARTE DO MATERIAL CULTIVADO**

---

---

O material a ser descartado, tanto aquele mantido em meio sólido como líquido, deve ser retirado das condições de cultivo e mantido isolado em seu recipiente original até que o processo de descarte seja finalizado. Para tanto, os tubos (com as rolhas) e placas de Petri (sem o 'parafilm') devem ser autoclavados em temperatura de 125°C e pressão de 1,5 atm. Em seguida o material é descartado e os recipientes são colocados imersos em solução de cloro ativo com concentração entre 2 e 2,5% por cerca de 12 horas, sendo lavados normalmente em seguida.

Tal procedimento é de suma importância para a segurança das pessoas que manipulam o material e para evitar contaminação do laboratório e do meio ambiente através da produção de resíduos.

## **CULTIVO E ISOLAMENTO**

---

---

### **PROCEDIMENTO PARA O ISOLAMENTO DAS CEPAS**

---

Há dois métodos básicos para o isolamento das cianobactérias em cultura: plaqueamento e seleção por capilar (pescaria). Ambos são eficazes, porém algumas cepas não se adequam bem ao meio sólido e a técnica de pescaria requer prática e paciência.

Para se obter melhor resultado, recomenda-se que os procedimentos de isolamento sejam feitos na maior variabilidade possível de meios, a não ser que se saiba previamente qual o melhor para o cultivo da cepa de interesse. A seguir os métodos são detalhados:

## PLAQUEAMENTO

---

- Coloca-se nas placas de Petri os meios de cultura, ASM-1 ou BG-11, sólidos e com cicloheximida;
- Na câmara de fluxo laminar, homogenizar a amostra e colocar três gotas de material sobre o meio sólido, espalhando uniformemente com o auxílio da alça de Drigalski ou bastão, previamente flambados no bico de Bunsen. É importante que, ao se espalhar o material, não haja sobreposição de inóculo (figura 1);
- Após inoculação, as placas são vedadas com *parafilm* e colocadas na sala de cultivo. É importante que a parte na qual se encontra o meio esteja para cima, pois é comum que na tampa acumule água, o que pode ocasionar contaminação;
- Cada placa com o inóculo deve ser etiquetada com informações relevantes como local e data de coleta, data do plaqueamento e meio utilizado, ou algum código que resuma estas informações;
- Após 2-3 semanas é possível visualizar o crescimento de diferentes massas de cianobactérias. Nesse exame (visualmente e depois ao microscópio) são analisadas: cor, estrutura, e consistência do crescimento. Os diferentes crescimentos são marcados e colônias isoladas ou pequenas frações dos crescimentos são retirados com o auxílio de uma alça metálica e então são inoculados em um tubo de ensaio contendo meio líquido;
- Estas placas ainda são mantidas para isolamento, pois algumas cianobactérias têm crescimento lento e serão visíveis apenas após 30 ou mais dias após o plaqueamento.

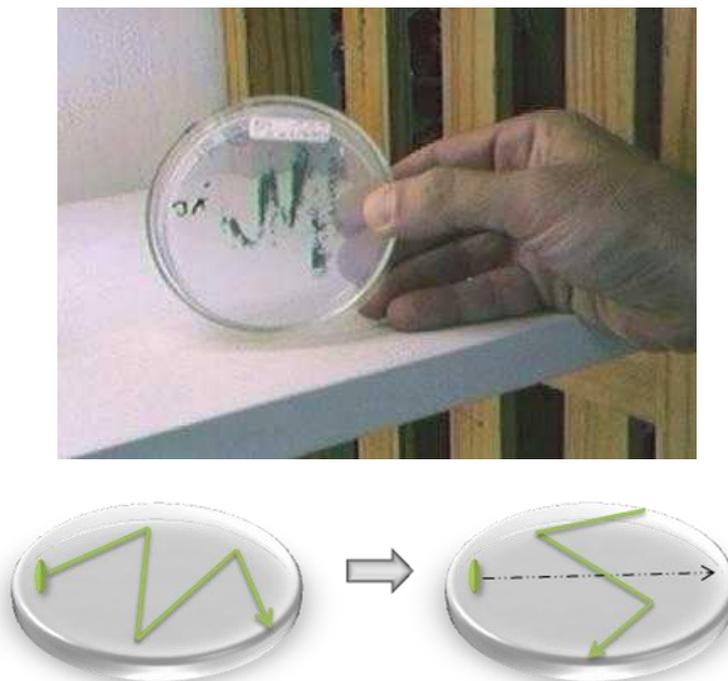


Figura 1: Esquema da técnica de plaqueamento

Caso não ocorra o isolamento aplica-se novamente a técnica, até que se obtenha culturas uniespecíficas.

### **PESCARIA**

---

- Flamba-se uma lâmina de vidro, espera-se esfriar e em seguida coloca-se uma gota da amostra e várias gotas de meio de cultura estéril (figura 2);
- Ao microscópio, visualiza-se o espécime a ser isolado, escolhendo-se preferencialmente um que esteja numa área limpa;
- Para formação do capilar, afina-se uma pipeta Pasteur na chama do bico de Bunsen, quebrando-se a ponta de acordo com o tamanho do organismo de interesse selecionado;
- Após a ‘pescaria’ do organismo, passa-se o espécime ‘pescado’ para a gota de meio estéril, sendo esse procedimento repetido até que se obtenha apenas o indivíduo de interesse;

- Em seguida é feita a transferência para o tubo de ensaio contendo meia carga de meio de cultura (cerca de 8 mL);
- Se for necessário, utilizar mais de uma lâmina e deve-se fazer o processo da mesma forma.

Pode acontecer que o organismo selecionado não se desenvolva, tanto pela sua fragilidade ou pela perda do mesmo durante o processo. Assim, o ideal é que sejam feitos vários tubos, em média 5 para cada cepa.

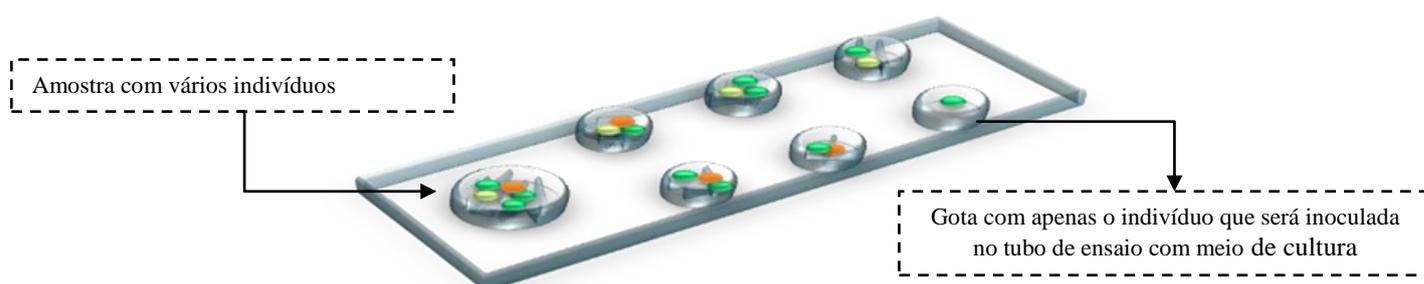


Figura 2: Esquema da técnica de pesca

## MANUTENÇÃO DAS CEPAS

- Cada cultura uniespecífica deve ser mantida em trélicas em tubos de ensaio contendo 17 mL de meio de cultura, sob condições controladas. No caso da coleção de culturas de cianobactérias do Instituto de Botânica, as condições são as seguintes: temperatura  $23 \pm 2$  °C, irradiância  $40-50 \mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$  e fotoper\u00edodo 14-10h claro-escuro. Dos tr\u00eas tubos, um \u00e9 mais antigo (repicagem anterior) e os outros dois s\u00e3o da repicagem atual, portanto t\u00eam a mesma data. A troca do meio de cultura \u00e9 feita aproximadamente a cada 30 dias, seguindo o procedimento abaixo (figura 3):
  - Dentre os tubos com a mesma data escolhe-se um para funcionar como in\u00f3culo e os outros dois s\u00e3o descartados;
  - A partir do tubo escolhido s\u00e3o feitas duas repicagens em tubos com meios novos, resultando nos tr\u00eas tubos a serem mantidos;

- É importante que se mantenha o tubo com a cultura antiga por segurança, pois a repicagem pode falhar;

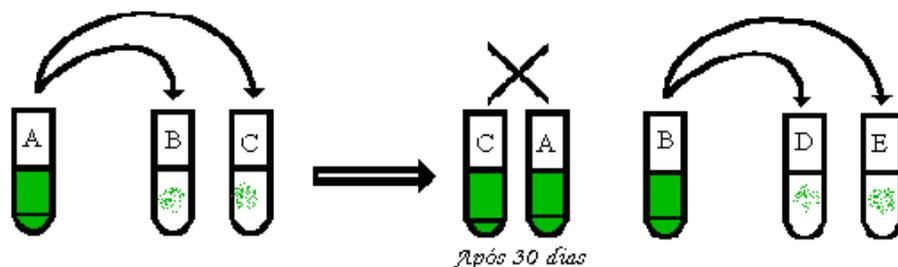


Figura 3: Esquema do processo de repicagem

## **PROTÓCOLO PARA LAVAGEM DE CÉLULAS DE CIANOBACTÉRIAS COM EXTRAN<sup>®</sup> 0,1%**

(Protocolo desenvolvido por Ricardo Y. Honda e Elaine Crespim – Centro de Energia Nuclear na Agricultura, CENA-USP)

O objetivo das lavagens com Extran<sup>®</sup> é dissolver e eliminar grande parte da mucilagem produzida por cianobactérias, visando a eliminação das bactérias (contaminantes) que crescem endogleicamente (dentro da mucilagem) (figura 4). As lavagens são feitas seguidamente com meio de cultura com o objetivo de retirar o Extran<sup>®</sup> das células de cianobactérias e diminuir o impacto causado às mesmas durante o procedimento. Abaixo são descritas todas as etapas:

1. O inóculo inicial pode partir de 500  $\mu$ L a 1 mL de cultura em meio líquido, sendo este transferido para um microtubo de 1,5 mL. Para todo o processo, utilizar somente material e soluções estéreis;
2. Centrifugar os tubos a 5.000 rpm (ou, no máximo, 7.000 rpm) por 5 minutos, para a formação de *pellet*. Com relação à centrifugação, para manter as células a temperatura adequada, aconselha-se programar a temperatura da centrífuga para cerca de 20 °C. Não aumentar a rotação para 10.000 rpm, pois o *pellet* formado pode ficar compactado demais e não se dissolver novamente;
3. Retirar o sobrenadante com pipeta, se possível evitando que as células que ficaram aderidas à parede do tubo sejam retiradas junto. Descartar o

sobrenadante. Aconselha-se retirar o sobrenadante com pipeta durante todo o procedimento para evitar maior perda de células que poderia ocorrer se os tubos fossem virados no frasco de descarte;

4. Suspender o *pellet* em 500  $\mu$ L de Extran<sup>®</sup> 0,1% e homogeneizar completamente, com cuidado para não lisar as células. (Obs.: se durante qualquer parte do protocolo o conteúdo dos tubos ficar mais azulado, isto pode indicar lise das células);
5. Deixar os tubos em repouso por 30 minutos;
6. Adicionar aos tubos 500  $\mu$ L de meio de cultura líquido e homogeneizar cuidadosamente por inversão. Centrifugar por 5 minutos a 5000 rpm;
7. Descartar o sobrenadante. Suspender o *pellet* novamente em 500  $\mu$ L de Extran<sup>®</sup> 0,1%, homogeneizar e deixar os tubos em repouso por 30 minutos;
8. Adicionar aos tubos 500  $\mu$ L de meio de cultura líquido, homogeneizar, centrifugar a 7000 rpm por 5 minutos e descartar o sobrenadante;
9. Suspender o *pellet* em 1 mL de meio de cultura líquido, homogeneizar e centrifugar a 7000 rpm por 5 minutos. Descartar o sobrenadante;
10. Suspender o *pellet* em 500  $\mu$ L de meio de cultura, homogeneizar e centrifugar novamente a 7000 rpm por 5 minutos. Descartar novamente o sobrenadante;
11. Suspender o *pellet* novamente em 500  $\mu$ L de meio de cultura. Homogeneizar e centrifugar a 5000 rpm por 15 minutos. Descartar todo o sobrenadante e suspender o *pellet* cuidadosamente em 1 mL de meio de cultura líquido;
12. Transferir essa cultura do micro tubo para Erlenmeyers de 50 mL e deixar as culturas crescendo nas condições apropriadas.

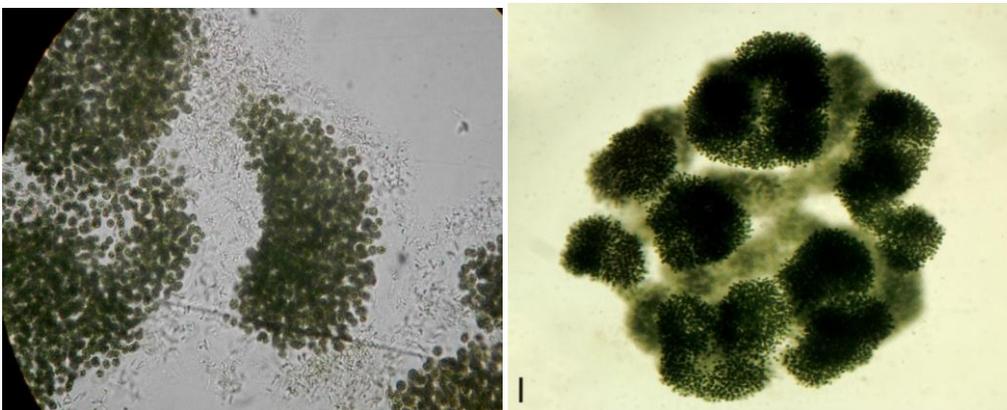


Figura 4: Linhagem antes e depois da lavagem com Extran<sup>®</sup> 0,1%

## TIPOS DE CULTURA

---

**CULTURA BATCH:** Volume de meio fixo (sistema fechado), figura 5

**CULTURA EM FED- BATCH:** Adição gradual de meio (aumento do volume)

**CULTURA EM BATCH SEMI-CONTÍNUA:** adição de meio e remoção de meio e células (a intervalos pré-estabelecidos)

**CULTURA CONTÍNUA** adição de meio e remoção de meio e células (contínua)



Figura 5: Cultura Batch

## PRODUÇÃO DE BIOMASSA

---

As cepas uniespecíficas e não axênicas também são cultivadas em grandes quantidades (figura 6). O processo consiste em 3 etapas e em cada uma delas o inóculo em fase exponencial é de 10% do volume total do meio. As condições abaixo são usadas nas etapas 1 e 2:

- Agitação: 70 rotações por minuto
- Iluminação: 15-20  $\mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2}\text{s}^{-1}$
- Temperatura:  $24 \pm 1$  °C

- Fotoperíodo: 14-10h claro-escuro

Na etapa 3:

- Aeração: constante
- Iluminação: constante
- Temperatura:  $24 \pm 1$  °C
- Fotoperíodo: 14-10h claro-escuro

A produção de biomassa é realizada a partir de um repique do banco de cultura, conforme as seguintes etapas:

- 1) 5 mL de inóculo são transferidos para recipiente com 50 mL de meio de cultura: os frascos são mantidos em agitador de bancada com rotação constante (70 rotações.minuto<sup>-1</sup>).
- 2) constatado o crescimento da cultura, transfere-se os 50 mL do inóculo para 500 mL de meio, mantendo sempre a mesma rotação mencionada. As cepas ficam sob esta condição durante 1-2 semanas (tempo médio para que a cultura atinja a fase exponencial de crescimento). Portanto, o inóculo inicial para determinação da curva foi retirado na fase exponencial.
- 3) 500 mL de inóculo são transferidos para Erlenmeyer de 6.000 mL com 5.000 mL de meio de cultura. Os Erlenmeyers são colocados na sala de cultivo com iluminação constante, sem rotação, mas com aeração.

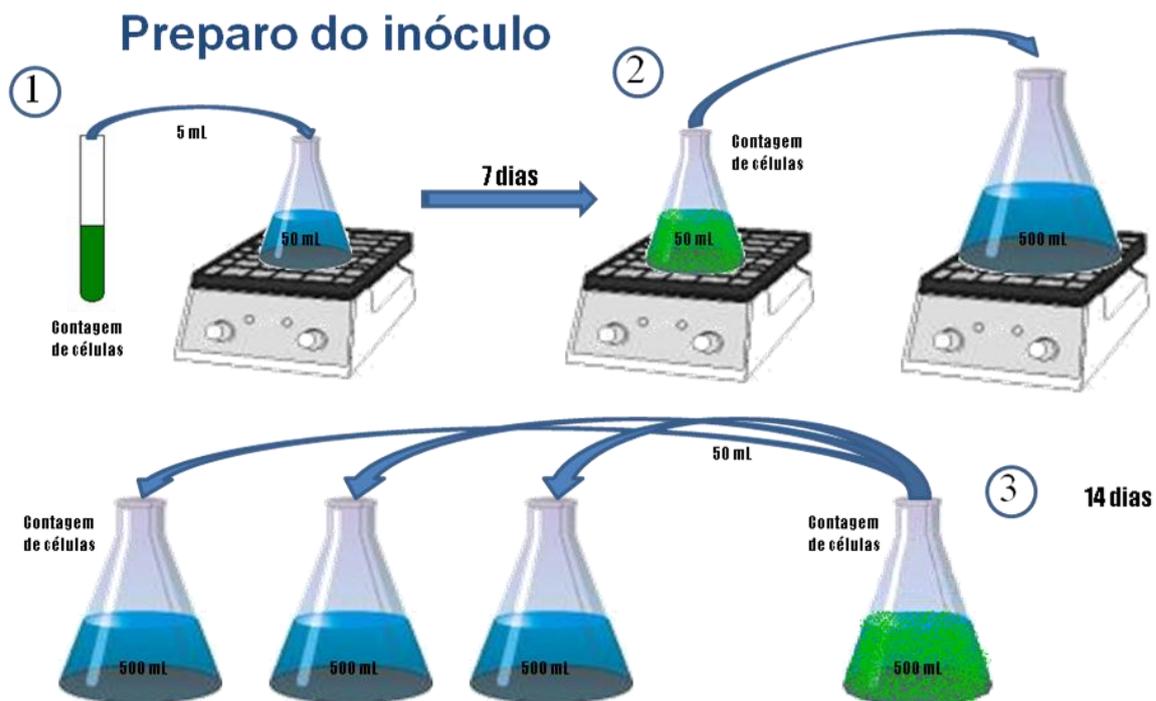


Figura 6: Obtenção de biomassa

## ESQUEMA PARA OBTENÇÃO DE UMA CULTURA UNIESPECÍFICA

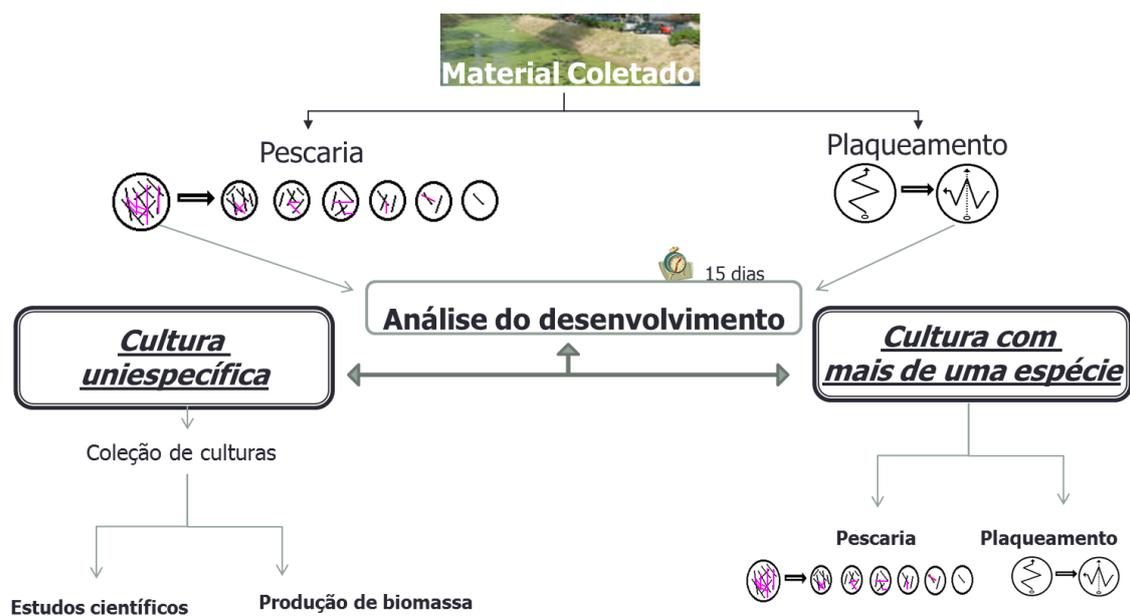


Figura 7: Resumo do organograma

## **DETERMINAÇÃO DAS CURVAS DE CRESCIMENTO**

---

As curvas de crescimento podem ser estabelecidas a partir do biovolume das cianobactérias ( $\text{mm}^3 \cdot \text{L}^{-1}$ ) ou por número de células ( $\text{células} \cdot \text{mL}^{-1}$ ) plotados contra o tempo de cultivo ( $n=3$ ). Para realizar a contagem de células é necessário que a mucilagem seja eliminada para que as células fiquem livres no meio e, para isto, utilizamos alguns procedimentos:

Para colônias grandes, com muita mucilagem, tratar o cultivo com adição de NaOH 1M na proporção de 2:1 (1 mL da cultura : 0,5 mL de NaOH) e deixar em banho-maria a  $60^\circ\text{C}$  durante 10 min.

Para colônias pequenas, com pouca mucilagem, tratar apenas em banho-maria a  $80^\circ\text{C}$ , durante 5 min.

Obs.: em alguns casos, como colônias que possuem mucilagem difícil de romper, é utilizada concentração de NaOH 2-3M, em banho-maria a  $80^\circ\text{C}$ , durante 15 min.

Fixar as amostras com solução de formol 4% sempre que a contagem for realizada em outro momento.

Contar em câmara de Fuchs-Rosenthal (hemocitômetro) (figura 8).

### **DENSIDADE ( $\text{CÉLULAS} \cdot \text{ML}^{-1}$ )**

---

Para determinação das curvas de crescimento realiza-se a contagem das células de no mínimo uma área da câmara, o que corresponde a 16 quadrados da mesma. As contagens são realizadas diariamente ou a cada dois dias, sendo estabelecido um número máximo de 400 células por contagem (quando exceder este número, uma nova contagem terá que ser realizada após a diluição da amostra). São feitas contagens nos dois lados da câmara e, caso haja diferença maior que 10% entre os lados, também é realizada uma nova contagem.

Para determinação da curva de crescimento de gêneros filamentosos são realizadas contagens dos tricomas e este número é multiplicado pelo número médio de células dos tricomas ( $n=90$ ). As contagens também são realizadas diariamente ou a cada dois dias em câmara de Fuchs-Rosenthal, em todo o campo (16 áreas) o que corresponde a 256 quadrados da câmara.

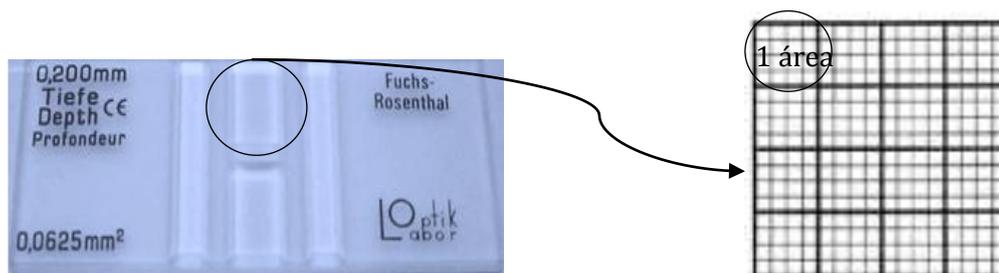


Figura 8: Câmara de Fuchs-Rosenthal utilizada para contagem de células ou filamentos e em destaque um dos campos da câmara.

A tabela 9 apresenta o fator de multiplicação necessário para conversão do número de células contadas para n°. de células. mL<sup>-1</sup>.

Tabela 9: Fatores de conversão para determinação do n° de células. ML<sup>-1</sup>  
(Honda 2005)

Área	N° de Células.mL <sup>-1</sup>
1/16 de A	n° de cel. X 80.000
1/8 de A	n° de cel. X 40.000
1/4 de A	n° de cel. X 20.000
1/2 de A	n° de cel. X 10.000
1 A (16 □)	n° de cel. X 5.000
2 A (32 □)	n° de cel. X 2.500
4 A (64 □)	n° de cel. X 1.250
8 A (128 □)	n° de cel. X 625
16 A (256 □)	n° de cel. X 312,5

### BIOMASSA (BIOVOLUME – MM<sup>3</sup> L<sup>-1</sup>)

O volume celular (V) pode ser obtido a partir da média do comprimento (a) e diâmetro (b) de trinta células, usando modelos geométricos aproximados à forma das células das cianobactérias (Sun & Liu 2003).

O biovolume total é estimado multiplicando-se a densidade celular por seus respectivos volumes (Sun & Liu 2003). Os valores obtidos em  $\mu\text{m}^3.\text{mL}^{-1}$  são divididos por  $10^{-6}$  para conversão em  $\text{mm}^3.\text{L}^{-1}$ .

## **DETERMINAÇÃO DAS TAXAS DE CRESCIMENTO, TEMPO DE DUPLICAÇÃO E RENDIMENTO CELULAR MÁXIMO.**

Após a determinação da curva de crescimento, são calculadas as taxas de crescimento ( $\mu.\text{dia}^{-1}$ ) e o tempo de duplicação ( $G.\text{dia}^{-1}$ ) para a fase exponencial de cada cepa analisada. Estas taxas são calculadas com a média das contagens dos três frascos ( $n=3$ ), segundo as fórmulas apresentadas por Fogg & Thake (1987):

$$\mu = (\ln N - \ln N_0) \cdot (t - t_0)^{-1} \quad G = \ln 2 \cdot \mu^{-1}$$

$\mu$  é a velocidade específica de crescimento.

$G$  é o tempo de duplicação celular, calculado a partir de  $\mu$ .

$N_0$  é o número inicial de células.  $\text{mL}^{-1}$  no tempo inicial  $t_0$ .

$N$  é o número final de células.  $\text{mL}^{-1}$  no tempo  $t$ .

Pode ser calculado também o rendimento celular máximo ( $R$ ), medido em células.  $\text{mL}^{-1}$ , que corresponde ao número máximo de células menos o número de células do inóculo (Carneiro 2009).

## **HIGIENIZAÇÃO E BIOSSEGURANÇA**

Para o bom andamento do trabalho algumas normas gerais de segurança e higiene precisam ser adotadas:

- Uso obrigatório do avental branco em todas as atividades laboratoriais, preferencialmente de algodão;
- Desinfecção das superfícies com álcool etílico 70%;
- Higiene e desinfecção das mãos;
- Trabalhar dentro da “zona de segurança” do bico de Bunsen: recipientes com meios de cultura devem ser abertos próximos à chama do bico;
- Ao utilizar triângulos, alças e agulhas de platina as mesmas devem ser esterilizadas por flambagem antes e após cada operação efetuada com as culturas;

- Evite falar enquanto distribui os meios de cultura para não contaminá-los;
- Flambar rapidamente a boca dos frascos imediatamente após abri-los e antes de fechá-los;
- Use apenas pipetas previamente autoclavadas e armazenadas em embalagens hermeticamente fechadas;
- Nunca pipetar com a boca, o correto é usar peras ou pipetadores apropriados.

## REFERÊNCIAS

---

- CARNEIRO, R. L., SANTOS, M. E.V., PACHECO, A. B. F., & AZEVEDO, S. M. F. O. 2009. Effects of light intensity and light quality on growth and circadian rhythm of saxitoxins production in *Cylindrospermopsis raciborskii* (Cyanobacteria). *Journal of Plankton research* 31(5): 481-488.
- FOGG, G. E. & THAKE, 1987. *Algae cultures and phytoplankton ecology*, 3<sup>rd</sup> edition. The University of Wisconsin Press, Ltd., London, 269p.
- GAULT, P.M. & MARLER, H.J. 2009. *Handbook on Cyanobacteria: biochemistry, biotechnology, and applications*. Nova Science Publishers, New York, 538 p.
- GORHAM, P.R.; MCLACHLAN, J.; HAMMER, U.T.; KIM, W.K. Isolation and culture of toxic strains of *Anabaena flos-aquae* (Lyng) de Breb. *Verh. Int. Verein. Limnol.*, 15:796-804, 1964.
- HONDA, R.Y. 2005. Estudos taxonômicos e de desenvolvimento *in vitro* de *Microcystis* spp. (Cyanobacteria) isoladas de corpos d'água do estado de São Paulo. Dissertação de Mestrado Instituto de Botânica, São Paulo.
- KOMÁREK, J. 2005. The modern classification of Cyanoprokaryotes (Cyanobacteria). *Oceanological and Hydrobiological Studies* 34: 5-17.
- LOURENÇO, S.O. 2006. *Cultivo de microalgas marinhas - Princípios e aplicações*. Rima, São Paulo, 606 p.
- REVIERS, B. 2006. *Biologia e filogenia das algas*. Artmed, Porto Alegre, p. 21.

- RIPPKA, R. 1979. Isolation and purification of Cyanobacteria. In: L. Pacher & A.N. Glazer (eds.). *Cyanobacteria Methods in Enzymology*. Blackwell 167: 3-27.
- SANT'ANNA, C.L, AZEVEDO, M.T.P., WERNER, V.R., DOGO, C.R., RIOS, F.R. & CARVALHO, LR. 2008. Review of toxic species of Cyanobacteria in Brazil. *Algological Studies* 126: 249-263.
- SUN, J. & LIU, D. 2003. Geometric models for calculating cell biovolume and surface area for phytoplankton. *Journal of Plankton Research* 25(11): 1331-1346.
- TANAKA, A.; ORITANI T.; UEHARA F.; SAITO A.; KISHITA H.; NÜZEKI Y.; YOKOTA H.; FUCHIGAMI K. 1996. Biodegradation of a musty odour component, 2-methylisoborneol. *Water Research* 30 (3): 759-761.
- VIEIRA, A.A.H. 1977. Métodos de cultura de algas do plâncton marinho: estudos realizados nas regiões de Cananéia e de Ubatuba, SP. *Bolm Inst. Oceanogr., S.P.*, 26: 303-338.
- VIEIRA, A.A.H. & TUNDISI, J. G. 1979. Notas sobre o cultivo de algumas espécies de algas de água doce. *Rev Bras Biol* 39(3): 703-706.
- YOKOYA, N.S. & AZEVEDO, M.T.P. 2002. Coleção de culturas de algas do laboratório "Marilza Cordeiro Marino", seção de Ficologia, Instituto de Botânica. In: IX Reunião Brasileira de Ficologia Algas - Biodiversidade e Exploração Racional, Santa Cruz, Aracruz, Espírito Santo.
- ZAGATTO, P.A. & ARAGÃO, M.A. 1992. Implantação de métodos para avaliação de algas tóxicas. São Paulo. Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental (CETESB). Relatório Técnico. 23p.